



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Studies of the epigenetic disease mechanism in FSHD

Greef, J.C. de

Citation

Greef, J. C. de. (2009, November 19). *Studies of the epigenetic disease mechanism in FSHD*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14369>

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/1887/14369>

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



SAMENVATTING

Facioscapulohumerale spierdystrofie (FSHD) is een erfelijke spierziekte die wordt gekenmerkt door verzwakking van de aangezichtspieren (facio), de spieren rond de schouderbladen (scapulo) en de bovenarmspieren (humeral). De eerste ziekteverschijnselen beginnen meestal voor het twintigste levensjaar en die kunnen zeer variabel zijn in presentatie en ernst. De ernst van de ziekte varieert echter niet alleen tussen patiënten uit verschillende families maar ook tussen patiënten uit dezelfde familie. Al bijna 20 jaar geleden werd ontdekt dat FSHD wordt veroorzaakt door de vermindering van een repeterend stuk DNA op het uiteinde van de lange arm van chromosoom 4 (4q35). Terwijl in controlepersonen dit stuk repeterend DNA, genaamd de D4Z4 repeat, 11 tot 100 keer voorkomt op elk chromosoom 4 uiteinde, hebben de meeste patiënten met FSHD slechts 1 tot 10 D4Z4 repeats op één van hun chromosomen 4 (FSHD1). Als gevolg van deze ontdekking heeft men vele jaren onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van een gen in de D4Z4 repeat die het ontstaan van FSHD in personen met een verkort stuk DNA zou kunnen verklaren. Tot twee jaar geleden was men echter niet succesvol in het aantonen van een functioneel gen in de D4Z4 repeat, vandaar dat onderzoek zich ook op andere modellen heeft gericht die het ontstaan van FSHD proberen te verklaren. Eén van deze modellen voorspelt bijvoorbeeld een epigenetische component die betrokken is bij het ontstaan van FSHD. Epigenetica betreft overerfbare veranderingen in genfunctie die optreden zonder wijzigingen in de volgorde van de basenparen van het DNA in de celkern. Een voorbeeld van een epigenetische modificatie is DNA methylering. Ons DNA kan extra methylgroepen bevatten en deze methylgroepen worden aan cytosine (C) bouwstenen van ons DNA gekoppeld door enzymen die DNA methyltransferases heten. De aanwezigheid van methylgroepen op het DNA heeft invloed op het aan- of uitschakelen van genen.

Al vijf jaar geleden werd aangetoond dat in patiënten met FSHD minder methylgroepen aanwezig zijn op het DNA van de eerste D4Z4 repeat in vergelijking met controlepersonen. Wat deze ontdekking nog interessanter maakte was dat ook lage DNA methylering werd gevonden in een kleine groep van patiënten met een spierziekte die qua klachten niet

te onderscheiden valt van FSHD (FSHD2). Omdat deze patiënten echter meer dan 10 D4Z4 repeats hebben kon eerder de diagnose van FSHD in een DNA test niet worden bevestigd. Nu werd echter aangetoond dat op epigenetisch niveau een overeenkomst bestaat tussen beide patiëntengroepen. Maar lage DNA methylatie op de eerste D4Z4 repeat werd ook gevonden in patiënten met het ICF syndroom. ICF is de afkorting voor Immuundeficiëntie, Centromerische instabiliteit en Faciale anomalieën syndroom. De meest prominente klachten van deze patiënten omvatten herhaaldelijke infecties als gevolg van een immuundeficiëntie, maar zij hebben geen spierklachten. Daarom bleef de rol van DNA methylatie in het ontstaan van FSHD onduidelijk.

FSHD onderzoek wordt gecompliceerd door een aantal factoren. Ten eerste bevindt zich op chromosoom 10 een soortgelijk stuk repeterend DNA als op chromosoom 4. Dit maakt de diagnose van FSHD door middel van DNA onderzoek een stuk gecompliceerder. Ook op chromosoom 10 kan een vermindering van het aantal D4Z4 repeats plaatsvinden tot minder dan 11 eenheden. Personen met minder dan 11 D4Z4 repeats op chromosoom 10 ontwikkelen echter geen FSHD. Ten tweede bestaan er meerdere genetische varianten van het uiteinde van chromosoom 4. Dusver zijn negen verschillende varianten geïdentificeerd. Opvallend is het dat alle patiënten met FSHD de 4qA161 variant dragen op hun ziektechromosoom. Naast 4qA161 zijn 4qB163 en 4qA166 veel voorkomende varianten van het chromosoom 4 uiteinde. Personen met minder dan 11 D4Z4 repeats op een 4qB163 of een 4qA166 variant ontwikkelen echter geen FSHD.

In dit proefschrift worden studies beschreven die zich richtten op het verder ontrafelen van het epigenetische mechanisme betrokken bij het ontstaan van FSHD. In hoofdstuk 2 wordt een studie beschreven die zeer nauwkeurig een vergelijking heeft gemaakt tussen patiënten met FSHD en patiënten met ICF om te bepalen of er meer overlap bestaat op epigenetisch of klinisch niveau behalve de lage DNA methylatie van de eerste D4Z4 repeat. In hoofdstuk 3 wordt juist een studie beschreven waar gezocht is naar een epigenetisch factor die verschilt tussen patiënten met FSHD en patiënten met ICF. Omdat deze factor alleen verlaagd is in patiënten met FSHD1 en FSHD2 en niet in controlepersonen en patiënten met ICF of patiënten met andere spierziektes, blijkt inderdaad de epigenetica van D4Z4 een belangrijke rol in het ontstaan van FSHD te spelen. In hoofdstuk 4 wordt vervolgens een zeer gedetailleerde DNA methylatie studie beschreven om te bepalen of epigenetische factoren verklaren waarom slechts personen met minder dan 11 D4Z4 repeats op de 4qA161 variant van chromosoom 4 FSHD ontwikkelen terwijl personen met minder dan 11 D4Z4 repeats op de varianten

4qA166 en 4qB163 en op chromosoom 10 gezond zijn. Tot slot wordt in hoofdstuk 5 een pilot studie beschreven waarin is geprobeerd de epigenetische structuur van de D4Z4 repeat te veranderen in patiënten met FSHD met behulp van foliumzuur.

LAGE DNA METHYLATIE BEPERKT ZICH TOT DE D4Z4 REPEAT IN PATIËNTEN MET FSHD2 (HOOFDSTUK 2)

Om beter te begrijpen waarom twee totaal verschillende ziektebeelden, de spierziekte FSHD en de immuundeficiëntie ICF, een epigenetische component delen, namelijk lage DNA methylatie op de eerste D4Z4 repeat, werd een studie uitgevoerd waarin deze twee patiëntengroepen uitvoerig werden vergeleken. Eén van de achterliggende ideeën was dat in het bijzonder patiënten met FSHD2 overlap vertonen met patiënten met ICF en dat mogelijk deze patiënten een defect in hetzelfde DNA methylatie mechanisme hebben. Naast lage DNA methylatie op de D4Z4 repeat is aangetoond dat in patiënten met ICF verschillende andere repeterende stukken DNA ook minder methylgroepen bevatten. Dit kan verklaard worden omdat sommige patiënten met ICF een defect in één van de DNA methyltransferase enzymen hebben. Eén van de experimenten in deze studie was de bepaling van het DNA methylatie niveau van deze andere repeats met verminderde DNA methylatie in patiënten met FSHD2. In patiënten met FSHD2 bleek DNA methylatie niet lager op andere repeats en dus is de DNA methylatie overeenkomst tussen patiënten met FSHD2 en patiënten met ICF gelimiteerd tot de D4Z4 repeat. Ook andere kenmerken van patiënten met ICF, zoals bepaalde chromosomale afwijkingen in witte bloedcellen, die alleen zichtbaar zijn na behandeling met de stof phytohaemagglutinin (PHA), en lage hoeveelheden van de immuunglobulines IgA, IgG en IgM werden niet gevonden in patiënten met FSHD2. In conclusie, de overlap tussen patiënten met FSHD2 en patiënten met ICF beperkt zich tot de verlaagde DNA methylatie op de D4Z4 repeat.

VERLIES VAN METHYLGROEPEN OP LYSINE 9 VAN HISTON H3 EN VERLIES VAN DE BINDING VAN DE EIWITTEN HPI γ EN COHESINE AAN DE D4Z4 REPEATS IN FSHD (HOOFDSTUK 3)

Naast DNA methylatie zijn histon modificaties belangrijke epigenetische factoren. Om de enorme hoeveelheid DNA in de kern van een lichaamscel te accommoderen, wordt ons DNA om specifieke eiwitten gevouwen. Deze eiwitten, de histonen, kunnen ook methylgroepen bevatten, net als DNA. Ook kunnen histonen acetylgroepen bevatten. Afhankelijk van de plaats van de methyl- en acetylgroepen en de hoeveelheid van de methyl- en acetylgroepen worden genen aan- of uitgezet. Met de studie beschreven in

hoofdstuk 3 is geprobeerd de mate van methyl- en acetylgroepen op de histon eiwitten in kaart te brengen op de D4Z4 repeat. Niet alleen verschillende histonen met hun methyl- en acetylmodificaties werden gevonden, ook bleek dat patiënten met FSHD1 en FSHD2 minder methylgroepen hadden op een specifieke plek (het aminozuur lysine 9) van het histon H3, zowel in vergelijking tot controlepersonen als tot patiënten met ICF. Als gevolg van de vermindering van de methylgroepen op lysine 9 van H3 bleken twee andere eiwitten, HP1 γ en cohesine, die normaal gesproken aan de D4Z4 repeat binden, minder goed te kunnen binden in patiënten met FSHD. De ontdekking dat deze eiwitten in huidcellen en spiercellen aan D4Z4 binden, maar niet in bloedcellen, is interessant, want tot nu toe is het onduidelijk waarom patiënten met FSHD vooral spierklachten hebben, terwijl het defect in het DNA en de lage DNA methylatie en het verlies van methylgroepen op lysine 9 van histon H3 in alle typen lichaamscellen lijkt voor te komen.

DNA METHYLATIE ANALYSE VAN DE D4Z4 REPEATS OP CHROMOSOOM 4 EN CHROMOSOOM 10 (HOOFDSTUK 4)

Om beter te begrijpen wat de rol is van DNA methylatie bij het ontstaan van FSHD en uit te vinden waarom de aanwezigheid van minder dan 11 D4Z4 repeats op alleen de 4qA161 variant leidt tot FSHD, is een gedetailleerde DNA methylatie analyse uitgevoerd van de D4Z4 repeats op chromosomen 4 en 10. In tegenstelling tot eerdere studies waarin slechts DNA methylatie van de eerste D4Z4 repeat werd bepaald, werd in deze studie ook het methylatie niveau van alle D4Z4 repeats bepaald. De resultaten van de studie worden besproken in hoofdstuk 4 en brengen heel duidelijk naar voren dat lage DNA methylatie op de D4Z4 repeat niet FSHD-specifiek is, maar gerelateerd aan de hoeveelheid D4Z4 repeats. Ook in controlepersonen met korte repeats op een niet-4qA161 chromosoom 4 uiteinde of op chromosoom 10 werd lage DNA methylatie gevonden. Deze resultaten tonen dat hoewel lage DNA methylatie op de D4Z4 repeat nodig is, het niet voldoende is om FSHD te ontwikkelen. Wij postuleren nu dat de aanwezigheid van de 4qA161 variant alles bepalend is voor het ontstaan van FSHD en dat mogelijk verschillen in de DNA volgorde van de verschillende chromosoom 4 uiteindes verklarend zijn. Deze hypothese wordt gesteund door de andere resultaten van de studie gepresenteerd in hoofdstuk 4. DNA methylatie werd namelijk ook uitvoerig bekeken in patiënten met FSHD2. Niet alleen op chromosoom 4, maar ook op chromosoom 10, werden zeer lage methylatie niveaus gemeten, hoewel in de meeste FSHD2 patiënten op beide chromosomen het aantal D4Z4 repeats groter dan

10 was. Deze resultaten suggereren dat in patiënten met FSHD2 een defect aanwezig is in een gen dat verantwoordelijk is voor DNA methylatie van de D4Z4 repeat op zowel chromosoom 4 als chromosoom 10. Het meest opvallende resultaat van deze studie is echter dat alle patiënten met FSHD2 naast lage DNA methylatie op zowel chromosoom 4 als chromosoom 10 tenminste één 4qA161 uiteinde op chromosoom 4 dragen. Samenvattend zijn er blijkbaar twee manieren om FSHD te ontwikkelen. In de meeste patiënten met FSHD is een vermindering van het aantal D4Z4 repeats op de 4qA161 variant aanwezig (FSHD1). Hierdoor neemt ook het aantal methylgroepen op de D4Z4 repeat af. In een kleine groep van patiënten met FSHD, hoewel het aantal D4Z4 repeats meer dan 10 bedraagt, zijn door een nog onbekend gendefect zeer lage DNA methylatie niveaus aanwezig op zowel chromosoom 4 als 10, en meest belangrijk ook op een 4qA161 variant (FSHD2). De combinatie van een 4qA161 variant en lage DNA methylatie lijkt dus een belangrijke voorwaarde te zijn voor het ontstaan van FSHD.

GEEN EFFECT VAN FOLIUMZUUR EN METHIONINE SUPPLEMENTATIE OP HET DNA METHYLATIE NIVEAU VAN DE D4Z4 REPEAT IN PATIËNTEN MET FSHD

Zoals gepresenteerd in dit proefschrift vertonen patiënten met FSHD belangrijke epigenetische afwijkingen, namelijk lage D4Z4 methylatie en verlies van methylgroepen op lysine 9 van histon H3 en een lagere binding van de eiwitten HP1 γ en cohesine aan de D4Z4 repeat. Omdat deze epigenetische afwijkingen een zeer centrale rol lijken te spelen, ze worden namelijk geobserveerd in zowel FSHD1 als FSHD2, is in de studie gepresenteerd in hoofdstuk 5 geprobeerd een deel van deze veranderingen in chromatine structuur weer te herstellen tot normale niveaus. Foliumzuur is een belangrijk vitamine dat samen met het aminozuur methionine het DNA methylatie niveau in onze cellen kan verhogen. Een kleine pilot studie werd daarom uitgevoerd in FSHD1 patiënten, FSHD2 patiënten en controlepersonen. Gedurende drie maanden werden deze personen gevraagd eenmaal daags 5 milligram foliumzuur en driemaal daags 1 gram methionine te slikken. Bloedmonsters werden zowel voor als na deze drie maanden afgenomen en verschillende factoren werden vervolgens getest in deze monsters, zoals serum folaat en vitamine B12 niveaus, DNA methylatie op de D4Z4 repeat van chromosoom 4 en DNA methylatie van al het DNA in een bloedcel. Hoewel het totale aantal methylgroepen van het DNA in een bloedcel toenam, was het DNA methylatie niveau niet hoger geworden op de D4Z4 repeat, noch in patiënten met FSHD noch in controlepersonen.

