



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Expanding the mutation spectrum in FSHD and ICF syndrome

Boogaard, T.L. van den

Citation

Boogaard, T. L. van den. (2018, February 13). *Expanding the mutation spectrum in FSHD and ICF syndrome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/60938>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/60938>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/60938> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Boogaard, T.L. van den

Title: Expanding the mutation spectrum in FSHD and ICF syndrome

Issue Date: 2018-02-13

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Een correcte epigenetische regulatie van het genoom is van groot belang om de juiste patronen van genexpressie te garanderen. Hierbij spelen chromatine modifiers, eiwitten die de organisatie van het eiwit-DNA complex "chromatine" reguleren, een grote rol. Verkeerde regulatie van epigenetische processen kan ziektes veroorzaken, zoals het geval is bij Facioscapulohumerale dystrofie (FSHD) en Immunodeficiëntie, Centromeerinstabiliteit, Faciale anomalieën (ICF) syndroom. FSHD en ICF worden beide gekarakteriseerd door lage hoeveelheden DNA methylering (hypomethylering) van repeterend DNA.

FSHD is een spierziekte die vooral de spieren in het gezicht, de schoudergordel en de bovenarmen treft. FSHD wordt gekenmerkt door gedeeltelijke relaxatie van de chromatine structuur van de D4Z4 macrosatelliet repeat op chromosoom 4. Dit zorgt ervoor dat het *DUX4* gen, wat zich bevindt in de D4Z4 repeat en codeert voor een transcriptie factor, per abuis tot expressie komt in skeletspieren. Eén van de consistente kenmerken van de relaxatie van de chromatine structuur in FSHD is CpG hypomethylering van de D4Z4 repeat, inclusief de *DUX4* promotor. In de meest voorkomende vorm, FSHD1, is deze chromatine relaxatie een gevolg van een contractie van de D4Z4 repeat tot 1-10 kopieën (normale lengte: 8-100 kopieën). In de zeldzame vorm van FSHD, FSHD2, ontstaat D4Z4 chromatine relaxatie op alle D4Z4 repeats en dit wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door varianten in de D4Z4 chromatine repressor SMCHD1. ICF syndroom is een primaire immunodeficiëntie, gekenmerkt door lage hoeveelheden of afwezigheid van immunoglobulinen in de aanwezigheid van B-cellen in de circulatie, ontwikkelingsachterstand en dysmorfologiën. Vergeleken met FSHD, hebben ICF patiënten hypomethylering van meer repeterende DNA sequenties verspreid over het genoom en dit zorgt voor onder andere centromeer instabiliteit, het cytogenetische kenmerk van ICF syndroom. Er zijn recessieve varianten in vier genen geïdentificeerd die ICF syndroom kunnen veroorzaken: *DNMT3B* (ICF1), *ZBTB24* (ICF2), *CDCA7* (ICF3) en *HELLS* (ICF4). In dit proefschrift worden het variantspectrum van chromatine modifiers die een rol spelen in FSHD en ICF uitgebreid.

In hoofdstuk 2 worden drie FSHD families beschreven waarin twee mogelijk schadelijke SMCHD1 varianten zijn geïdentificeerd in de proband. Voor elke familie hebben we de fasering onderzocht; d.w.z. of deze varianten zich op één (*in cis*) of twee (*in trans*) allelen bevonden en of ze individueel bijdragen aan D4Z4 hypomethylering. In de eerste familie hebben we een splice site variant en een nonsense variant *in cis* in exon 21 gevonden. De splice site variant zorgt voor exon skipping van exon 21, wat als consequentie heeft dat de nonsense variant in exon 21 geneutraliseerd wordt. Echter, de skipping van exon 21 zorgt ervoor dat het open reading frame verstoord wordt met een premature stop codon in exon 22.

In de tweede familie is de proband drager van een missense variant in exon 28 en een splice site variant in exon 25. Hoewel van de missense variant in exon 28 voorspelt wordt dat die de functie van *SMCHD1* verstoort, zorgt deze variant niet voor D4Z4 hypomethylatie in de moeder van de proband, die ook drager is van deze variant. Dit suggereert dat alleen de splice site variant in exon 25, een variant die in meer FSHD2 families voorkomt, *SMCHD1* functie verstoort en bijdraagt aan het fenotype. Deze familie laat ook de voorspellende waarde van de analyse van D4Z4 methylatie zien voor het bepalen van de functionele consequenties van *SMCHD1* varianten.

De proband van de derde familie is drager van twee missense varianten in *SMCHD1* in exon 24 en exon 45 *in trans* en heeft sterke hypomethylatie van D4Z4. Ook in de vader en de moeder van de proband, beide drager van één van de twee missense varianten, wordt D4Z4 hypomethylatie gedetecteerd. Dit geeft aan dat beide missense varianten onafhankelijk bijdragen aan D4Z4 hypomethylatie. De proband en zijn zus, die drager zijn van beide varianten, hebben sterkere D4Z4 hypomethylatie, dan hun ouders die drager zijn van maar één van de varianten. Dit laat zien dat de combinatie van de missense varianten een sterker effect heeft op D4Z4 hypomethylatie. Zowel de moeder en de proband zijn drager van een permissief D4Z4 allel van 27 kopieën, maar alleen de proband met beide *SMCHD1* missense varianten heeft een FSHD fenotype. Dit suggereert dat de varianten ook een additief effect hebben op de presentatie van de ziekte. Deze familie laat ook zien dat een combinatie van twee missense varianten *in trans* niet lethaal is in mannen en vrouwen.

In hoofdstuk 3, hebben we een deletie van het volledige *SMCHD1* gen gedetecteerd op één van de chromosomen 18 in twee FSHD2 families, die eerder negatief getest waren voor exonische *SMCHD1* varianten. De deletie bevat ook een aantal naastgelegen genen, waarvan het niet bekend is dat ze sensitief zijn voor hemizygotie. Deze studie laat zien dat FSHD2 ook veroorzaakt kan worden door *SMCHD1* hemizygotie en dat dit resulteert in een haploinsufficiëntie mechanisme. Eenzelfde mechanisme wordt ook verwacht bij 1/3 van de FSHD2 patiënten die drager zijn van varianten die het open reading frame van *SMCHD1* verstoren.

SMCHD1 hemizygotie is ook aanwezig bij de meeste patiënten met 18p-deletie syndroom, hoewel er geen klinische kernmerken van FSHD zijn beschreven in deze patiënten. Analyse van de D4Z4 methylatie in 18p-deletie syndroom patiënten geeft aan dat de meeste van hen eenzelfde mate van D4Z4 hypomethylatie hebben als FSHD2 patiënten. Gebaseerd op de frequentie in de controle populatie van permissieve 4qA allelen in combinatie met een lengte van de D4Z4 repeat in de FSHD2 range (11-16 kopieën), is de inschatting dat ongeveer 1 op de 8 18p-deletie syndroom patiënten met *SMCHD1* hemizygotie een risico lopen om FSHD te krijgen.

In hoofdstuk 4 hebben we twee FSHD families beschreven met een intronische variant in *SMCHD1*. In de eerste familie is een variant gevonden 15 baseparen proximaal van exon 14 (c.1843-15A>G), die een splice acceptor site creëert. Deze variant resulteert in de inclusie van de laatste 14 nucleotiden van intron 13 in het transcript. Voor deze variant wordt voorspeld dat die het open reading frame verstoort en leidt tot een premature stopcodon. Deze variant is gevonden in de proband en zijn zus, en segregiert met hypomethylatie.

In de tweede familie hebben we een diep intronische variant in intron 34 van *SMCHD1* gevonden. Deze variant creëert een splice acceptor site (c.4347-236A>G), terwijl er al een cryptische splice donor site voorspeld wordt op positie c.4347-183 van *SMCHD1*. Deze variant zorgt voor de inclusie van 53 baseparen van intron 34 in het transcript. Hiervan wordt voorspeld dat dit het open reading frame zal verstoren met een premature stopcodon in exon 35 tot gevolg. In deze familie segregiert deze variant met D4Z4 hypomethylatie en versterkt het fenotype in de familieleden met een permissieve D4Z4 repeat array van 7 kopieën.

D4Z4 hypomethylatie kan niet in alle FSHD2 families verklaard worden door een variant in *SMCHD1*. In hoofdstuk 5 hebben we de identificatie van heterozygote missense varianten in *DNMT3B* in twee FSHD families beschreven. Deze *DNMT3B* varianten segregeren met D4Z4 hypomethylatie en verhoogde ziekte-ernst. We hebben *DUX4* expressie gedetecteerd in MyoD getransduceerde fibroblasten van een aangedaan familielid van een van deze families met een permissieve D4Z4 repeat van 13 kopieën, maar niet in een niet-aangedaan familielid van de andere familie met een permissieve D4Z4 repeat van 44 kopieën. Dit suggereert dat heterozygote *DNMT3B* varianten alleen tot *DUX4* expressie leiden in spiercellen wanneer dit gecombineerd is met kortere D4Z4 repeats.

Omdat homozygote of compound heterozygote *DNMT3B* varianten het autosomaal recessieve ICF1 syndroom veroorzaken, hebben we een klinische en epigenetische vergelijking gemaakt tussen ICF1 patiënten en FSHD2 families met een *DNMT3B* variant. Zowel ICF1 patiënten als FSHD2 patiënten hebben D4Z4 hypomethylatie. Ook een deel van de ouders van ICF1 patiënten, die net zoals deze FSHD2 patiënten drager zijn van een heterozygote *DNMT3B* variant, hebben D4Z4 hypomethylatie. Daarnaast hebben we ook *DUX4* expressie gevonden in myoblasten van een ICF1 patiënt en in MyoD getransduceerde fibroblasten van twee andere ICF1 patiënten. Een aantal van de epigenetische karakteristieken van ICF hebben we ook gedetecteerd in een drager van een heterozygote *DNMT3B* variant uit een van de FSHD2 families. Hoewel een aantal epigenetische karakteristieken overeenkomen, is er geen spierziekte beschreven in ICF1 patiënten en hun ouders, en geen immunodeficiëntie in FSHD2 families, in overeenstemming met ouders van ICF1 patiënten.

We concluderen dat het effect van *DNMT3B* varianten op *DUX4* expressie en FSHD ziekte presentatie, net zoals bij *SMCHD1* varianten, afhankelijk is van verschillende aspecten die geassocieerd zijn met het FSHD1 locus, zoals D4Z4 repeat lengte en de aanwezigheid van een *DUX4* polyadenylatie signaal. Deze studie suggereert dat meerdere factoren betrokken zijn bij de epigenetische status van D4Z4 en de regulatie van *DUX4* expressie in spiercellen.

Tot slot hebben we in hoofdstuk 6 het spectrum van ICF1 en ICF2 varianten uitgebreid. In zeven ICF1 patiënten van vier verschillende families hebben we in totaal zes missense varianten gevonden in het katalytische domein van DNMT3B. Deze varianten zijn niet eerder beschreven in ICF1 patiënten. Verder beschrijven we vijf ICF2 patiënten uit vijf verschillende families. Vier van deze ICF2 patiënten zijn drager van homozygote nonsense varianten in *ZBTB24*, waaronder één nonsense variant die niet eerder is geïdentificeerd in ICF2. De vijfde ICF2 patiënt heeft een homozygote deletie op chromosoom 6, inclusief *ZBTB24*. Deze observatie laat zien dat volledige afwezigheid van het ZBTB24 eiwit niet lethaal is en bevestigt de hypothese dat de meeste ICF2 patiënten functioneel ZBTB24 eiwit missen.

In totaal zijn er nu 77 ICF patiënten beschreven met een gen defect in één van de vier ICF genen die tot nu toe bekend zijn. 56% van de ICF patiënten heeft mutaties in *DNMT3B* (ICF1), 31% heeft mutaties in *ZBTB24* (ICF2), 7% heeft mutaties in *CDCA7* (ICF3) en 7% heeft mutaties in *HELLS* (ICF4). Alleen voor ICF2, hebben we een gender bias gevonden, met 79% mannelijke ICF2 patiënten. Dit suggereert dat *ZBTB24* varianten schadelijker zijn voor vrouwen.