



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Modifying the modifier: discovering mechanisms of SMCHD1 mediated chromatin repression**

Goossens, R.

### **Citation**

Goossens, R. (2022, March 16). *Modifying the modifier: discovering mechanisms of SMCHD1 mediated chromatin repression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3279119>

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/1887/3279119>

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

## Nederlandse samenvatting

De epigenetische regulatie van genexpressie door chromatine modifierende eiwitten is een van de fundamentele cellulaire processen die het mogelijk maken dat alle verschillende celtypen in het menselijk lichaam zich ontwikkelen uit de totipotente stamcellen. Terwijl bijna iedere cel een identieke set aan genetische informatie bevat, zijn er sterk verschillende transcriptionele programma's nodig om er voor te zorgen dat alle verschillende weefsels gevormd en onderhouden worden. De verschillende epigenetische markers die chromatine modifierende eiwitten kunnen plaatsen (schrijven), herkennen (lezen) of verwijderen (uitwissen) kunnen genexpressie bevorderen zoals te zien is in euchromatine, of genexpressie (ver)hinderen zoals het geval is in heterochromatine. Een goed functionerende chromatine-omgeving staat de cel toe exact die coderende en niet-coderende RNA moleculen tot expressie te brengen die nodig zijn voor de cellulaire identiteit, terwijl ze tegelijkertijd in staat is om op een flexibele manier zich aan te passen aan veranderingen in de omgeving indien dat nodig is. De keerzijde is dat wanneer deze epigenetische controlemechanismen worden aangetast, zoals door mutaties in chromatine modifierende eiwitten, dit kan leiden tot ziekte. Een voorbeeld van een ziekte met een epigenetische oorzaak is facioscapulohumerale spierdystrofie (FSHD), waar de chromatinestructuur van de D4Z4 macrosatelliet repeat (herhaling) is gecompromitteerd/verstoord. Het verlies van de repressieve chromatine structuur van D4Z4 kan het gevolg zijn van een verkorting van het aantal repeats naar 1-10 eenheden (FSHD1), of van een mutatie in een D4Z4 chromatine modifierend eiwit (FSHD2). In beide vormen van FSHD resulteert de verandering op D4Z4 tot ongewenste genexpressie van het *DUX4* gen vanuit de repeat in spiercellen, wat wordt gezien als de moleculaire basis van deze ziekte.

FSHD type 2 is de zeldzamere vorm van FSHD (5%) en wordt meestal veroorzaakt door mutaties in het chromatine regulerende eiwit SMCHD1, en zeer zelden door mutaties in de chromatine regulerende eiwitten DNMT3B of LRIF1. In FSHD2 patiënten is de chromatine structuur van alle D4Z4 repeats in het genoom, zowel op chromosoom 4q en 10q, toegankelijker geworden voor genexpressie en heeft de repeat zijn hoge DNA methylatie niveaus verloren. Echter, alleen wanneer een mutatie in de chromatine modifierende eiwitten gecombineerd wordt met een D4Z4 repeat met een intermediaire lengte (8-20 eenheden), kan dit leiden tot *DUX4* expressie en tot het ontwikkelen van FSHD.

In beide FSHD varianten is het resultaat hetzelfde: gedeeltelijke chromatine-ontspanning van de D4Z4 repeat resulteert in expressie van *DUX4* van de meest distale D4Z4 kopie, maar alleen wanneer deze kopie eindigt met een somatisch poly-adenylatie signaal voor *DUX4* welke polymorf is in de populatie. *DUX4* is een transcriptie factor met een rol in de zygotische genoomactivatie in de eerste ontwikkelingsfasen van het embryo en hoort niet tot expressie te komen in spiercellen. *DUX4* activeert in de celkern van spiercellen van FSHD patiënten een reeks van onderliggende genen die van belang zijn voor de ontwikkeling van het embryo, maar de functie van de spiercellen verstoren. Deze verstoorde spierhomeostase veroorzaakt door *DUX4* leidt tot apoptose van spiercellen, waardoor de spieren van de patiënt verzwakt raken. In dit proefschrift hebben we onderzoek gedaan naar de functie van SMCHD1 en probeerden we te begrijpen in welke *DUX4* expressie remmende processen SMCHD1 een rol speelt. We hebben verder informatie verzameld over de andere rollen die SMCHD1 heeft, zoals het inactiveren van het X-chromosoom in vrouwelijke cellen en het onderhouden van telomeren.





In **hoofdstuk 2** beschrijven we hoe het verlies van één kopie van *SMCHD1* in 18p-deletie syndroom patiënten een risicofactor is voor het ontwikkelen van FSHD. In deze patiënten is de korte arm van chromosoom 18, waar naast andere genen ook *SMCHD1* te vinden is, gedeeltelijk verloren gegaan bij een van de twee kopieën van het chromosoom. Vergeleken met gezonde mensen kunnen deze 18p- patiënten maar de helft van de hoeveelheid *SMCHD1* tot expressie brengen, wat vergelijkbaar is met haploinsufficiënte FSHD2 patiënten waarin de mutatie in *SMCHD1* zorgt voor een verstoring van het leesraam. We laten zien dat wanneer 18p- patiënten dragers zijn van een FSHD-permissief D4Z4 repeat (d.w.z.: 8-20 kopieën en een *DUX4* poly-adenylatie signaal), ze inderdaad *DUX4* tot expressie brengen en de moleculaire en klinische kenmerken van FSHD kunnen vertonen.

In **hoofdstuk 3** doen we onderzoek naar het *SMCHD1* gen in twee FSHD families waarin geen mutaties konden worden gevonden in het eiwit-coderende deel van *SMCHD1*. We vonden dat in deze families de mutatie zich bevindt in de intronische DNA sequentie van *SMCHD1*, in respectievelijk intron 13 en 34. Deze varianten introduceren een alternatieve spliceplaats en zorgen er voor dat een deel van de intronische sequentie in het mRNA molecuul wordt opgenomen. Deze ge-exonizeerde intronen zorgen voor een verschuiving van het leesraam waardoor er premature stop codons ontstaan, welke de productie van *SMCHD1* van deze allelen onmogelijk maakt. We hadden spiercellen tot onze beschikking van de proband van de familie met de mutatie in *SMCHD1* intron 34, en gebruikten CRISPR/Cas9 genetische modificatie technieken om een deel van het intron te verwijderen inclusief de pathogene variant. Na een succesvolle genoombewerking resulteerde dit in een herstel van *SMCHD1* niveaus tot bijna-endogene hoogtes, wat effectief *DUX4* expressie decimeerde. Tezamen bevestigen hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3 de kritische dosisafhankelijke rol van *SMCHD1* in het onderdrukken van *DUX4*.

Het is uitzonderlijk als eiwitten op zichzelf functioneren; in het algemeen werken eiwitten in een complex met andere eiwitten. Deze interacterende eiwitten kunnen (een deel van) van de functie van het eiwit reguleren, of ze naar hun plek begeleiden waar ze hun werk doen. Er was relatief weinig informatie beschikbaar over de eiwitten waarmee *SMCHD1* samenwerkt om de verschillende rollen uit voeren. In **hoofdstuk 4** gebruiken we een geavanceerde kwantitatieve proteomics techniek genaamd SILAC massa spectrometrie om de partners in een *SMCHD1* complex te bestuderen in de U2OS modelcellijn. We identificeerden een robuuste set met tot nu toe onbekende interacterende eiwitten, en slaagden er in om per geval de interactie van *SMCHD1* met een selectie van verschillende eiwitten met bekende chromatine modifierende eigenschappen te valideren. We keken specifiek in meer detail naar de interactie van *SMCHD1* met RUVBL1, een eiwit met ATPase en helicase activiteit, welke in het verleden is geïdentificeerd als een component van de D4Z4 chromatinestructuur. We zagen dat het verlies van het RUVBL1 eiwit in FSHD spiercellen inderdaad leidt tot een verhoogde expressie van *DUX4*, maar de exacte samenstelling van het multimerische complex waarin RUVBL1 opereert is nog niet opgehelderd. Een ander interessant eiwit dat een interactie met *SMCHD1* heeft is EZHIP. Dit eiwit is in staat de activiteit van het polycomb repressieve complex 2 te remmen, een complex dat verantwoordelijk is voor de plaatsing van de repressieve histonmodificatie H3K27me3. Hoewel EZHIP waarschijnlijk geen rol speelt in spiercellen, is het mogelijk dat EZHIP betrokken is bij een *SMCHD1*-afhankelijke regulatie van *DUX4* in de vroege embryonale ontwikkeling.

Tot slot onderzoeken we in **hoofdstuk 5** de post-translationele modificatie van *SMCHD1*

door SUMOylatie. Post-translationele modificaties zijn kleine moleculen die aan eiwitten kunnen worden toegevoegd of ervan kunnen worden verwijderd, en hierdoor bijvoorbeeld de activiteit, stabiliteit of subcellulaire locatie van een eiwit reguleren. Dit geeft cellen een snelle methode om het gedrag van eiwitten en signaalcascades te controleren. We laten zien dat SMCHD1 sterk geSUMOyleerd wordt op lysine 1374, maar vinden geen direct moleculair effect wanneer SMCHD1 SUMOylatie wordt geblokkeerd. We laten verder zien dat het deSUMOyleerende SENP5 enzym de SUMO modificatie kan verwijderen van SMCHD1, en observeren dat het verlagen van SENP5 niveaus in FSHD spiercellen de expressie van DUX4 verlaagt. Interessant genoeg leidt het manipuleren van cellulaire SUMOylatie door middel van het kleine SUMO-blokkerende molecuul ML-792 of het verlagen van UBA2 niveaus, een enzym dat betrokken is bij het koppelen van SUMO groepen aan een eiwit, in FSHD spiercellen tot expressie van DUX4. Tot slot hebben we uitgebreid onderzoek gedaan naar de moleculaire eigenschappen van een SMCHD1 variant die was geïdentificeerd in een FSHD2 patiënt waarin de mutatie leidt tot het verlies van de geSUMOyleerde positie K1374. Hoewel deze SMCHD1 variant pathogeen is en de cellen van de patiënt DUX4 tot expressie brengen, blijkt het defect in SMCHD1 niet gerelateerd aan het gemis van de SUMO acceptatie positie, maar leidt de mutatie tot een haploinsufficiëntie van SMCHD1.

