



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Preclinical therapy development in FSHD: evaluation of pathophysiological aspects and therapeutic intervention in FSHD mouse models

Bouwman, L.F.

Citation

Bouwman, L. F. (2023, September 5). *Preclinical therapy development in FSHD: evaluation of pathophysiological aspects and therapeutic intervention in FSHD mouse models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3638481>

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/1887/3638481>

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

Nederlandse samenvatting

Facioscapulohumerale spierdystrofie (FSHD) is een erfelijke progressieve spierziekte die vooral de spieren in het gelaat, schoudergordel en bovenarmen aantast. Spierschade en spierzwakte in patiënten met FSHD wordt veroorzaakt doordat de transcriptiefactor DUX4, een eiwit dat normaal gesproken tot expressie komt tijdens de vroege ontwikkeling, wordt geactiveerd in de skeletspieren. DUX4 activeert meerdere genen en toxische processen in de spieren wat uiteindelijk leidt tot sterfte van de spiercellen. Bij de meeste patiënten met FSHD wordt de activatie van DUX4 veroorzaakt door een contractie van de D4Z4 macrosatelliet repeat op chromosoom 4q35 naar 1 tot 10 kopieën (FSHD1). De D4Z4 repeat bevat het *DUX4* gen en komt normaal gesproken 8-100 keer voor in het humane genoom. De contractie van de D4Z4 repeat naar 1 tot 10 kopieën zorgt voor een gedeeltelijke relaxatie van de chromatine structuur bij de D4Z4 repeat en daardoor wordt het *DUX4* gen geactiveerd. In ongeveer 5% van de gevallen wordt de D4Z4 chromatine relaxatie in FSHD veroorzaakt door de aanwezigheid van een relatief korte D4Z4 repeat (8-20 kopieën) in combinatie met een mutatie in een epigenetische repressor van de D4Z4 repeat, zijnde SMCHD1, DNMT3B of LRIF1. Op dit moment is er geen therapie beschikbaar die de spierschade in patiënten met FSHD kan voorkomen of vertragen.

Er zijn meerdere transgene FSHD muismodellen ontwikkeld. Met deze modellen kan het toxische effect van DUX4 in de spieren onderzocht worden en kunnen er mogelijke nieuwe therapieën *in vivo* getest worden. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling, karakterisatie, en de regulatie van DUX4 in verschillende muismodellen beschreven. Ook wordt een nieuwe therapie getest gericht op het afbreken van het toxische DUX4 transcript.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de rol van *Dnmt3b* in de regulatie van de D4Z4 repeat in een muismodel met een korte D4Z4 repeat van 2.5 kopieën (D4Z4-2.5 muizen). Dit transgene FSHD muismodel bevat een D4Z4 repeat afkomstig van een FSHD1 patiënt. Recent zijn heterozygote missense varianten geïdentificeerd in het *DNMT3B* gen in twee verschillende FSHD families. In stamcellen afkomstig van het D4Z4-2.5 muismodel toonden we aan dat *Dnmt3b* bindt aan de humane D4Z4 repeat en dat DUX4 levels omhoog gaan na het verlagen van de hoeveelheid *Dnmt3b*. Dit suggereert dat *Dnmt3b* de regulatie van de D4Z4 repeat kan beïnvloeden. Om de rol van *Dnmt3b* *in vivo* te bestuderen is het D4Z4-2.5 muismodel gekruist met een muismodel met een heterozygote variant in *Dnmt3b* (*Dnmt3b*^{MommeD14} muis). De *Dnmt3b*^{MommeD14} variant had geen invloed op de DUX4 expressie en veroorzaakte geen extra fenotype in de spieren van D4Z4-2.5/*Dnmt3b*^{MommeD14} muizen ten opzichte van D4Z4-2.5 muizen. In de meeste andere weefsels had de *Dnmt3b*^{MommeD14} variant ook geen invloed op de DUX4 expressie, alleen in de milt en de inguinale lymfeklieren was de expressie van DUX4 en DUX4 target genen verhoogd in D4Z4-2.5/*Dnmt3b*^{MommeD14} muizen. Alhoewel de *Dnmt3b*^{MommeD14} variant geen invloed had op de chromatine structuur van de D4Z4 repeat, zorgde de variant wel voor additionele hypomethylatie van de D4Z4 repeat in de milt. Samenvattend, deze studie laat zien dat *Dnmt3b* een bescheiden rol heeft in de regulatie van de D4Z4 repeat in cellen en weefsels van D4Z4-2.5 muizen.

In **hoofdstuk 3** is de spierpathologie van niet-geïnduceerde ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen verder onderzocht waarbij we vooral naar het inflammatoire spierfenotype hebben gekeken. Eerder is beschreven dat niet-geïnduceerde ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen relatief lage DUX4 expressie levels in de spieren hebben, minder DUX4 target gen activatie vertonen, en het ontstaan van de spierpathologie en spierzwakte verloopt langzamer en is minder ernstig vergeleken met ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen die geïnjecteerd zijn met tamoxifen. In deze studie laten we zien dat de skeletspieren van niet-geïnduceerde ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen bestaat uit kleinere spiervezels, de spieren bevatten een grote hoeveelheid spiervezels waarin de kernen een centrale ligging hebben, en de spieren zijn geïnfiltriseerd door macrofagen. Verder neemt de hoeveelheid spierschade toe met de leeftijd. Met RT-qPCR analyse is de expressie van meerdere genen die een belangrijke rol spelen in inflammatie gemeten in de skeletspieren. De spieren van de ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen hadden een verhoogde expressie van genen belangrijk voor het complementen systeem, cytokinen en chemokinen ten opzichte van muizen zonder DUX4 expressie in de spieren. De expressie van deze inflammatie genen nam over het algemeen toe met de leeftijd. Met flowcytometrie hebben wij vervolgens bepaald welk soort afweercellen de spieren van ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen infiltreren. De meeste afweercellen waren CD4⁺ T cellen en pro-inflammatoire macrofagen maar CD8⁺ T cellen, B cellen en granulocyten waren ook aanwezig in de spieren. Deze studie geeft meer inzicht in het spierfenotype van ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen en deze informatie kan worden gebruikt door andere onderzoekers die *in vivo* studies willen uitvoeren in dit muismodel.

In **hoofdstuk 4** hebben we een subcutaan geïnjecteerde antisense oligonucleotide (ASO) die het DUX4 transcript afbreekt getest in ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen. In alle geteste skeletspieren van DUX4 ASO-behandelde muizen was DUX4 transcriptie en DUX4 eiwitproductie gereduceerd en de activatie van DUX4 target genen was verlaagd ten opzichte van controle ASO-behandelde muizen. Meerdere kenmerken van spierpathologie zoals spiervezels met centraal gelegen kernen, collageen afzetting in de extracellulaire matrix, en de infiltratie van macrofagen in de spieren waren afgenomen. Gen expressie studies in de quadriceps spier lieten zien dat de DUX4 ASO verschillende processen betrokken bij inflammatie, celcyclus, en fibrose kan reduceren die normaal worden geactiveerd in spieren die DUX4 tot expressie brengen. De meeste testen om de functionaliteit van de spieren te meten lieten echter geen verbetering zien en de spieratrofie in ACTA1-MCM;FLEXDUX4 muizen was ook niet verbeterd. Wel konden de DUX4 ASO-behandelde muizen langer rennen op een loopband. Deze resultaten laten zien dat de geteste DUX4 ASO effectief was in het reduceren van DUX4 en DUX4 target genen en dat het de spierpathologie kan verminderen. Verdere verbeteringen van de ASO zouden de effectiviteit en de distributie naar de spieren mogelijk kunnen verbeteren.

In **hoofdstuk 5** is een nieuw FSHD muismodel ontwikkeld met hoge waarden van DUX4 expressie in de skeletspieren welke gebruikt kan worden voor het testen van nieuwe therapieën: het DUX4-F67A muismodel. Omdat hoge DUX4 expressie tijdens de vroege ontwikkeling lethaal is bevat het DUX4 transgen in dit muismodel een mutatie in homeobox 1 dat nodig is voor het binden van DUX4 aan DNA. Hierdoor worden de DUX4 target genen

niet meer geactiveerd. De geselecteerde DUX4-F67A muislijn heeft hoge waarden van het DUX4 transcript en het DUX4 eiwit in de skeletspieren, maar de DUX4 target genen worden niet geactiveerd. Alhoewel de spierpathologie in de DUX4-F67A muis relatief mild is ten opzichte van verschillende andere FSHD muismodellen, zorgt de aanwezigheid van het veranderde DUX4 eiwit voor kleinere spieren, een lichte verhoging van de hoeveelheid spierfibrose, en een verandering in de samenstelling van de verschillende soorten spiervezels. Dit suggereert dat de aanwezigheid van DUX4 een negatieve invloed heeft op spieren ondanks dat het geen andere genen kan activeren. Als laatste is de subcutaan geïnjecteerde DUX4 ASO die beschreven is in hoofdstuk 4 ook getest in DUX4-F67A muizen. De DUX4 ASO zorgde in DUX4-F67A muizen voor een verlaging van het DUX4 transcript met 75% en een verlaging van het DUX4 eiwit met 70%. De DUX4 ASO had geen invloed op het spiergewicht. Samenvattend, vanwege de hoge DUX4 waarden in de skeletspieren is het DUX4-F67A muismodel geschikt voor het testen van nieuwe therapieën die het DUX4 transcript of DUX4 eiwit verlagen. Daarnaast kan dit muismodel gebruikt te worden om de rol van DUX4 in spieren te onderzoeken onafhankelijk van zijn rol als transcriptie factor.

