



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Elucidating DUX4-mediated molecular mechanisms underlying FSHD pathophysiology using multiomics approaches

Zheng, D.

Citation

Zheng, D. (2026, February 13). *Elucidating DUX4-mediated molecular mechanisms underlying FSHD pathophysiology using multiomics approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4290119>

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/1887/4290119>

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

Nederlandse samenvatting

Facioscapulohumerale spierdystrofie (FSHD) is een progressieve spierdystrofie die gekenmerkt wordt door asymmetrische spierzwakte en atrofie. FSHD tast voornamelijk de spieren van het gezicht, de schouders en de bovenarmen aan. FSHD wordt veroorzaakt door de abnormale expressie van de kiembaantranscriptiefactor DUX4 in skeletspieren. Onder normale fysiologische omstandigheden is DUX4 een belangrijke drijver van zygotische genoomactivatie (ZGA) tijdens de vroege embryonale ontwikkeling, waar het een cruciale rol speelt bij het induceren van ZGA-genexpressie en het moduleren van chromatinetoegankelijkheid om de maternaal-naar-zygotische overgang te faciliteren. Bij FSHD-patiënten veroorzaakt de reactivatie van DUX4 in skeletspieren echter een uitgebreide opeenvolging van biologische effecten die normale spierdifferentiatie, regeneratie en herstelprocessen verstoren, wat uiteindelijk leidt tot celdood en het karakteristieke FSHD-fenotype.

Hoewel de rol van DUX4 als de primaire pathogene factor in FSHD is vastgesteld, blijft hoe DUX4 het complexe transcriptionele landschap in de myogene context organiseert slecht begrepen. De heterogene aard van spierweefsel en het focale patroon van spierbetrokkenheid bij FSHD suggereren dat ziektemechanismen opereren op meerdere cellulaire en moleculaire niveaus. Deze niveaus zijn vooralsnog onvolledig gekarakteriseerd. Bovendien beperkt het gebrek aan fysiologisch relevante ziektemodellen onze mogelijkheid om mechanistische inzichten te vertalen naar therapeutische strategieën.

Dit proefschrift adresseert deze uitdagingen door systematisch de cellulaire heterogeniteit en DUX4-gemedieerde transcriptionele veranderingen in FSHD te onderzoeken door middel van complementaire benaderingen. We gebruiken hierbij geavanceerde genomische technologieën om uitgebreide inzichten te verschaffen in de DUX4-gerelateerde ziektemechanismen.

In hoofdstuk 2 gebruikten we *single-nucleus RNA sequencing* (snRNA-seq) om de nucleaire heterogeniteit binnen meerkernige myotubes te onderzoeken. Door systematische analyse van drie FSHD-cellijnen en één controle cellijn brachten we de transcriptomische heterogeniteit van individuele kernen van myotubes in kaart. Deze benadering herkende succesvol DUX4-aangetaste kernen, die werden geclassificeerd in twee verschillende populaties: *DUX4-aangetast I*, voornamelijk gekenmerkt door myogenese-inhibitie, en *DUX4-aangetast II*, gekenmerkt door opregulatie van genen geassocieerd met oxidatieve stress en apoptosesignalering. Hoewel deze aangetaste processen in eerdere studies al waren geïdentificeerd, toonde onze data aan dat ze afkomstig zijn van verschillende populaties spierkernen, hetgeen heterogeniteit in de cellulaire toestand van kernen aantoont. Verdere karakterisering onthulde overeenkomsten tussen deze aangetaste clusters en vroege embryonale ontwikkelingscellen. *DUX4-aangetast I* was verrijkt voor markers van 4-celstadiumcellen, terwijl *DUX4-aangetast II* was verrijkt voor morula- en blastocystspecifieke markers. Markergenen van DUX4-aangetaste clusters komen ook hoog tot expressie in opvolgende ontwikkelingsstadia, wat aantoont dat DUX4 vroege embryonale programma's activeert in celkernen van gekweekte spiercellen via processen die vergelijkbaar zijn met vroege embryonale ontwikkelingstrajecten. De toepassing van de snRNA-seq-benadering verschafte dus systematisch inzicht in de nucleaire diversiteit in FSHD primaire spiercel kweken, wat ons

begrip van DUX4-gemedieerde transcriptomische veranderingen in individuele kernen heeft verbeterd.

In hoofdstuk 3 pasten we succesvol single-fiber RNA sequencing toe op spierbiopten, waarbij we de resolutie van transcriptionele analyse verhoogden van bulkweefsel naar individuele spiervezels om transcriptionele heterogeniteit en vezeltype-specifieke effecten geassocieerd met DUX4-activatie te bestuderen. Deze benadering stelde nauwkeurige spiervezelclassificatie mogelijk en onthulde een DUX4-signatuurexpressie in een kleine subset van FSHD-spiervezels. De ontwikkeling van transcriptomische profilering op single-fiber niveau toont de potentiële waarde van single-fiber transcriptomics voor het onthullen van de moleculaire heterogeniteit van FSHD en verschaft inzichten in de uitdagingen van het isoleren van ziekte-aangetaste vezels in kwaliteit-gefilterde datasets. Deze technische vooruitgang legt een basis voor het onderzoeken van de focale spierbetrokkenheid die FSHD typeert en maakt een verdere studie van de heterogeniteit tussen individuele spiervezels binnen bipten mogelijk.

In hoofdstuk 4 beschrijven we de constructie van 3D tissue-engineered skeletal muscles (3D-TESMs, een 3D skeletspiermodel) door genetisch gematchte myogene voorlopercellen te genereren uit humane geïnduceerde pluripotente stamcellen van drie mozaïeke FSHD-patiënten. Deze 3D-TESMs recapituleerden belangrijke pathologische kenmerken van FSHD, inclusief DUX4 en DUX4-doelgen expressie, kleinere spiervezeldiameters en verminderde absolute krachten bij elektrische stimulatie. Uitgebreide transcriptomische karakterisering onthulde dat in vergelijking met 2D cultures, 3D-TESMs verbeterde cellulaire differentiatie en verhoogde expressieniveaus van de kern DUX4-doelgenen hebben. Opmerkelijk was dat behandeling van 3D-TESMs met drie verschillende kleine moleculen, welke eerder positief waren geïdentificeerd in geneesmiddelenontwikkeling screens in 2D spiercelkweken, geen verbeteringen toonden, en soms zelfs achteruitgang in kracht en sarcomeerorganisatie lieten zien. Deze resultaten suggereren dat deze verbindingen ofwel schadelijke effecten hebben op 3D-TESM-vorming of dat een verdere verfijning van het 3D-TESM-model nodig is. Samenvattend hebben we in dit hoofdstuk succesvol een 3D skeletspiermodel voor FSHD ontwikkeld, welke nieuwe kansen biedt voor preklinisch onderzoek gericht op DUX4-expressie en DUX4-geïnduceerde effecten in relatie tot functionele eigenschappen, en voor toekomstige geneesmiddelencreeningtoepassingen.

In hoofdstuk 5 voerden we PacBio Iso-seq uit op DUX4-geïnduceerde myoblasten. Door lange en korte-read RNA sequencing data te integreren, construeerden we een uitgebreid isoform-specifiek transcriptoom voor dit cellulaire modelsysteem. Vergeleken met controle cellen resulteerde DUX4-overexpressie in een complexer transcriptoom, gekenmerkt door verhoogde productie van nieuwe isovormen van bestaande (geannoteerde) loci en van intergene regio's, door een complexer alternatief splicing landschap, en door meer transcripten die *nonsense-mediated decay* (NMD) ondergaan. Genen gerelateerd aan RNA-verwerking en RNA-metabolisme bevatten meer NMD-transcripten welke ook een significante translatie efficiëntie vertoonden, wat een potentieel mechanisme suggereert waarmee DUX4 het transcriptoom hervormt. Bovendien ontdekten we dat DUX4-doelgenen verschillen vertonen in isoformgebruik onder myogene versus embryonale cellulaire context, wat cellulaire context-specifieke kenmerken van DUX4 suggereert. Specifieke isovormen geïdentificeerd in het

transcriptoom van DUX4-positieve cellen toonden uitstekende differentiële expressie in aangetast weefsel in *in vivo* data, wat potentiële klinische relevantie suggereert. De unieke voordelen van lange-read RNA sequencing stelden ons in staat om de intergene isovormen te detecteren en te analyseren. De meeste van deze intergene isovormen waren voornamelijk afkomstig van repetitieve DNA-elementen, waarbij DUX4 aan LTRs bindt om de vorming van nieuwe isovormen te induceren die LTRs en andere repetitieve elementen bevatten. Dit fenomeen werd ook waargenomen in bestaande (geannoteerde) loci. Dit alles onthult een DUX4-gemedieerd mechanisme voor het verhogen van isovormdiversiteit. Tenslotte bestudeerden wij zowel de transcriptionele als epigenetische profielen van deze loci tijdens de vroege embryonale ontwikkeling, cel stadia waarin DUX4 van nature actief is. Dit liet kenmerken zien van actieve transcriptie van deze loci, ook tijdens embryonale ontwikkeling. Concluderend induceert DUX4 uitgebreide, diepgaande en complexe transcriptomische veranderingen in verschillende cellijnen. Onze transcriptoom karakterisering van deze veranderingen op isovorm-niveau biedt een basis voor het begrijpen van zowel de pathologische als fysiologische rollen van DUX4.

Samengevat bevordert deze studie, door middel van multidimensionale analyses van cellulaire heterogeniteit en transcriptomische complexiteit, ons begrip van DUX4-gemedieerde transcriptionele veranderingen en FSHD-pathogenese, en biedt daarbij waardevolle inzichten voor toekomstige therapeutische ontwikkeling en opheldering van ziektemechanismen.