



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).

## 中文摘要

面肩肱型肌营养不良症 (FSHD) 是一种进行性肌营养不良症, 主要影响面部、肩部和上臂肌肉, 其特征为不对称的肌无力和肌萎缩。FSHD 的根本病因是生殖细胞转录因子 DUX4 在骨骼肌中的异常表达。在正常生理条件下, DUX4 是早期胚胎发育过程中合子基因组激活 (ZGA) 的关键驱动因子, 在诱导 ZGA 基因表达和调节染色质可及性以促进母体-合子转换方面发挥关键作用。然而, 在 FSHD 患者中, DUX4 在成熟骨骼肌中的病理性再激活会触发广泛的下游级联反应, 扰乱正常的肌肉分化、再生和修复过程, 最终导致细胞死亡和典型的 FSHD 表型。

虽然 DUX4 作为 FSHD 主要致病因子的作用已经确立, 但 DUX4 如何在肌源性环境中协调复杂转录景观的机制仍然知之甚少。肌肉组织的异质性特征以及 FSHD 中肌肉受累的局灶性模式表明, 疾病机制在多个细胞和分子水平上运作, 而这些水平尚未得到充分表征。此外, 缺乏生理相关的疾病模型限制了我们将机制性见解转化为治疗策略的能力。

本论文通过互补性方法系统地研究 FSHD 中的细胞异质性和 DUX4 介导的转录变化来应对这些挑战。我们采用前沿基因组技术, 以前所未有的分辨率提供了与 DUX4 相关疾病机制的全面见解。

在第二章中, 我们使用单细胞核 RNA 测序 (snRNA-seq) 探索多核肌管内的细胞核异质性。通过对三个 FSHD 样本和一个对照样本的系统分析, 我们表征了肌管内单个细胞核的转录组异质性。该方法成功捕获了受 DUX4 影响的细胞核, 并将其分类为两个不同的群体: 主要以肌发生抑制为特征的 DUX4 影响群体 I, 以及以氧化应激和细胞凋亡信号相关基因上调为标志的 DUX4 影响群体 II。虽然这些通路在以往研究中已被识别, 但我们的数据表明它们源于不同的细胞核群体, 展示了细胞核内异质性的细胞状态。进一步的表征揭示了这些受影响簇与早期胚胎发育细胞的相似性。DUX4 影响群体 I 高表达 4 细胞期细胞的标志物, 而 DUX4 影响群体 II 富集桑椹胚和囊胚标志基因。相应地, DUX4 影响簇的标志基因在相应的发育阶段也高表达, 揭示了 DUX4 通过类似于早期胚胎发育轨迹的过程在肌管细胞核中激活早期胚胎程序。snRNA-seq 方法的应用在单细胞核分辨率下为 FSHD 原代肌管的细胞核多样性提供了系统性见解, 增强了对单个细胞核中 DUX4 介导的转录组变化的理解。

在第三章中, 我们成功地将单纤维 RNA 测序应用于肌肉活检, 将分辨率从大体组织提高到单个肌纤维, 以研究与 DUX4 激活相关的转录异质性和纤维类型特异性效应。该方法实现了准确的肌纤维分类, 并在 FSHD 肌纤维的小亚群中发现了 DUX4 特征表达。单纤维水平转录组分析的发展展示了单纤维转录组学在揭示 FSHD 分子异质性方面的潜在价值, 并为捕获质量过滤数据集中疾病影响纤维的挑战提供了见解。这一技术进步为研究 FSHD 特征性的局灶性肌肉受累奠定了基础, 并使个体活检内纤维间异质性的进一步研究成为可能。

在第四章中，我们通过从三名嵌合型 FSHD 患者的人诱导多能干细胞生成基因匹配的肌源性祖细胞，实现了 3D 组织工程骨骼肌 (3D-TESMs) 的构建。这些 3D-TESMs 成功重现了 FSHD 的关键病理特征，包括 DUX4 和 DUX4 靶基因表达、较小的肌纤维直径以及电刺激下绝对收缩力的降低。全面的转录组表征显示，与 2D 单层培养相比，3D-TESMs 展示了改善的细胞分化和核心 DUX4 靶基因表达水平的提高。值得注意的是，用三种不同的小分子化合物（这些化合物此前在使用 2D 肌肉培养的药物治疗筛选中被识别）处理 3D-TESMs 没有显示改善，有时甚至在收缩力和肌节组织方面出现下降。这些结果表明这些化合物要么对 3D-TESM 形成有害影响，要么需要进一步完善 3D-TESM 模型。总体而言，我们成功开发了 FSHD 的 3D 骨骼肌模型，为专注于 DUX4 表达和下游通路收缩特性关系的临床前研究提供了丰富资源，建立了未来药物筛选应用的有前景平台。

在第五章中，我们对 DUX4 诱导的肌母细胞进行了 PacBio Iso-seq 测序。通过整合长读长和短读长 RNA 测序数据，我们构建了特定于该细胞模型的综合异构体解析转录组，该模型具有放大的 DUX4 下游级联信号。与对照相比，DUX4 过表达导致更复杂的转录组，其特征是来自注释基因座和基因间区域的新异构体增加、更复杂的选择性剪接景观，以及相应更多的无义介导的衰减 (NMD) 靶基因。与 RNA 加工和 RNA 代谢相关的基因包含更多 NMD 靶基因并表现出显著的翻译效率，提示了 DUX4 重塑转录组的潜在调节机制。此外，我们发现 DUX4 靶基因在肌源性与胚胎细胞环境下显示异构体使用的差异，表明 DUX4 的细胞环境特异性特征。在 DUX4+ 转录组中识别的特异表达异构体在体内数据中显示出优异的差异表达，提示潜在的临床价值。长读长 RNA 测序的独特优势使我们能够检测和分析基因间异构体。这些基因间异构体大多主要源于重复元件，DUX4 结合 LTR 诱导形成包含 LTR 和下游重复元件的剪接异构体。这种现象在注释基因座中也有观察到，揭示了 DUX4 介导的增加异构体多样性的机制。最后，我们构建了这些基因座在早期胚胎发育期间的转录和表观遗传图谱，展示了胚胎发育期间的活跃转录特征。总之，DUX4 在不同细胞系中诱导广泛、深刻和复杂的转录组变化。我们对这些变化的异构体水平表征为理解 DUX4 的病理和生理作用提供了基础。

这项综合研究通过细胞异质性和转录组复杂性的多维分析推进了我们对 DUX4 介导的转录变化和 FSHD 发病机制的理解，为未来的治疗开发和疾病机制阐明提供了宝贵见解。