

Examination committee

Prof. dr. Katleen De Preter (chair)
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Prof. dr. Catia Attanasio
Department of Human Genetics,
KU Leuven (Belgium)

Prof. dr. Stefan Barakat
Department of Clinical Genetics, Erasmus University
Medical Center (The Netherlands)

Prof. dr. Timothy Cherry
Department of Pediatrics, Division of Genetic
Medicine, University of Washington (USA)

Prof. dr. Elfride De Baere
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

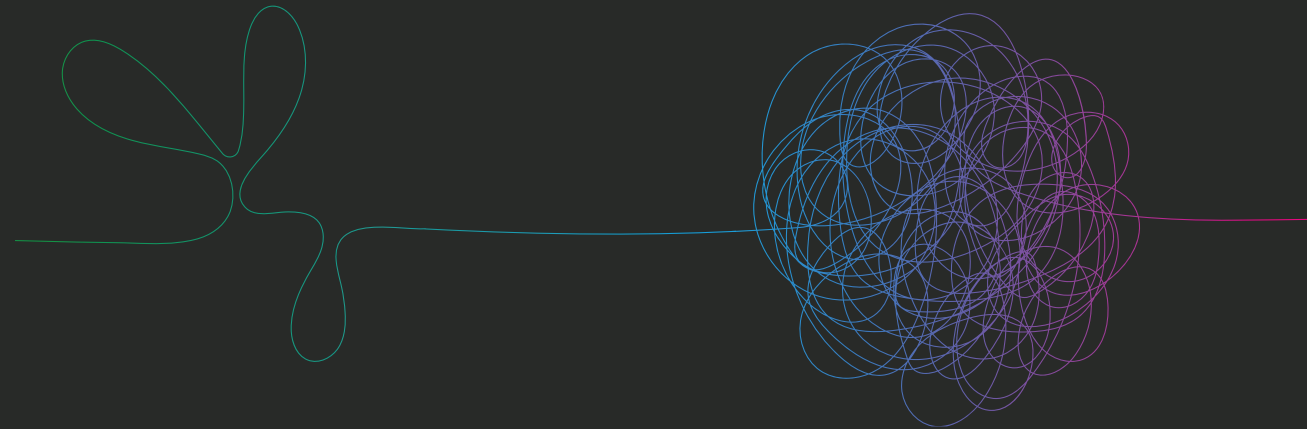
Dr. Eric de Bony de Lavergne
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

Dr. Kaat Durinck
Department of Biomolecular Medicine,
Ghent University (Belgium)

NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS IN 3D

Interpreting the impact of non-coding
structural variation on gene regulation
and 3D chromatin structure

Eva D'haene



Promoter: Prof. Sarah Vergult
Co-promoter: Prof. Björn Menten



Public PhD defense to obtain the degree of
'Doctor in Health Sciences'

Contact eva.dhaene@ugent.be

March 26, 2021

Samenvatting in mensentaal

Iedereen is uniek. Het mag daarom geen verrassing zijn dat ook geen twee genomen (het geheel van genetische informatie opgeslagen in ons DNA) identiek zijn. Een deel van die verschillen zijn te wijten aan wat we 'structurele variatie' noemen. Dat zijn grote afwijkingen in ons DNA, die hele stukken kunnen wegnemen, vermenigvuldigen of verplaatsen. Hoe dramatisch dat ook klinkt, het DNA van elk van ons bevat tienduizenden van zulke structurele varianten (SVs) zonder dat we daar last van hebben. Niet alle SVs zijn echter onschadelijk. Ze kunnen aanleiding geven tot ziekte, waaronder een hele resem ontwikkelingsstoornissen.

Om schadelijke effecten van structurele variatie te detecteren werd tot nog toe vooral gefocust op SVs die onze genen rechtstreeks aantasten. Genen 'coderen' voor eiwitten, de werkpaardjes van onze cellen, en van vele is reeds gekend of hun defect aanleiding kan geven tot een bepaalde ziekte. Wat de zaak echter aanzienlijk bemoeilijkt is dat de meeste SVs helemaal geen genen lijken aan te tasten. Dat is niet zo verwonderlijk als je bedenkt dat onze genen slechts 2% van ons genoom uitmaken. De andere 98% bevat o.a. een bont allegaartje van 'niet-coderende' functionele elementen die ervoor zorgen dat onze genen op het juiste moment en op de juiste plaats geactiveerd worden. Dit zorgt ervoor dat SVs ook genen kunnen beïnvloeden op een onrechtstreekse manier, door deze regulatorische elementen te verwijderen, te vermeerderen of te verplaatsen. Meer nog, SVs kunnen eveneens de 3D structuur van ons genoom veranderen, waardoor de niet-coderende elementen niet meer in contact 'kunnen komen met het gen dat ze dienen te reguleren of er nieuwe regulatorische connecties gevormd worden

Tijdens mijn doctoraat bestudeerde ik hoe structurele variatie in de niet-coderende regio's nabij twee genen, MEF2C en FOXG1, aanleiding kan geven tot de zeldzame, neurologische ontwikkelingsstoornis 'Rett syndroom'. Ik gebruikte verschillende experimentele technieken

om de niet-coderende elementen verantwoordelijk voor de regulatie van deze genen te identificeren, hun activiteit te bepalen, alsook hun interactie in 3D met deze genen in kaart te brengen. Om de rol van niet-coderende elementen in het ontstaan van neurologische stoornissen beter te begrijpen, onderzocht ik eveneens het belang van 'lange niet-coderende RNAs' in deze context, gebruik makend van een data-analytische strategie. Uiteindelijk zal een betere kennis omtrent deze verschillende regulatorische elementen en de impact van SVs op hun functie leiden tot een verbeterde genetische diagnose voor patiënten en mogelijk zelfs nieuwe therapeutische mogelijkheden

Scientific summary

The human genome harbours tens of thousands of structural variants (SVs). Those that affect protein-coding genes, might decrease or increase gene dosage and cause disease. Yet, SVs affecting the non-coding genome can also alter gene expression and result in disease. This non-coding genome is immensely vast and plays a crucial role in gene regulation. During my PhD, I investigated the role of the non-coding genome in the context of neurodevelopment and how it might be disrupted in patients with neurodevelopmental disorders (NDDs).

Driven by the identification of de novo SVs proximal to the developmental transcription factors MEF2C and FOXG1 in Rett-like patients, we aimed to decipher the non-coding regulatory landscapes surrounding these genes. Using a combination of enhancer assays and 4C techniques, we uncovered intricate networks in which active neuronal enhancers physically interact with the promoters of these genes in 3D nuclear space [paper 1-3]. These regulatory networks appear to be disrupted in multiple patients with NDD phenotypes. Yet, we found that deletion of regulatory elements had variable and locus-specific effects on gene expression. We showed that removal of neuronal enhancers within the FOXG1 locus was able to reduce FOXG1 expression by 50% [paper 3].

However, deletion of individual regulatory elements within the MEF2C locus had very limited effects on MEF2C expression [paper 2]. This could suggest that some developmental loci are robust to regulatory variation through mechanisms such as enhancer and CTCF site redundancy to mitigate deleterious effects on developmental gene expression. Non-coding RNA molecules represent another important regulatory layer within the genome. Therefore, in a separate study we developed an integrative analysis pipeline to identify long non-coding RNAs (lncRNAs) with putative roles in neurodevelopment and NDDs [paper 4].

Overall, the results incorporated in this thesis highlight the complexity of the regulatory landscape steering neurodevelopment. Our studies shed light on the regulatory determinants governing developmental gene expression. Specifically, our observations regarding regulation in the MEF2C and FOXG1 loci have important implications for the interpretation of patient variation in both regions and will ultimately aid the genetic diagnosis of patients harbouring non-coding SVs.

Publications included in this thesis

D'haene E. et al. A neuronal enhancer network upstream of MEF2C is compromised in patients with Rett-like characteristics. *Human Molecular Genetics*. 2019

Mohajeri K., D'haene E. et al. Mechanistic dissection of chromatin topology disruption in the 5q14.3 MEF2C locus as an indirect driver of neurodevelopmental disorders. *In preparation*.

Eshel R., D'haene E. et al. Epigenomic profiling during human inhibitory interneuron-like differentiation elucidates enhancer elements driving FOXG1 expression and disease. *In preparation*.

D'haene E. et al. Identification of long non-coding RNAs involved in neuronal development and intellectual disability. *Scientific Reports*. 2016

D'haene E. & Vergult S. Interpreting the impact of noncoding structural variation in neurodevelopmental disorders. *Genetics in Medicine*. 2020 (review article)