



ROL VAN DUX4 IN HET ZIEKTEPROCES VAN AXIALE SPONDYLOARTRITIS

Ruben Jacobs

Promotoren:

Bedrijfspromotor:
Dr. Patrick Vandormael

PXL-promotor:
Dr. Elke Clynen





ROL VAN DUX4 IN HET ZIEKTEPROCES VAN AXIALE SPONDYLOARTRITIS

Ruben Jacobs

Promotoren:

Bedrijfspromotor:
Dr. Patrick Vandormael

Opdrachtgever:
Dr. Elke Clynen



Voorwoord

Dit artikel is geschreven in kader van mijn studie Agro- en Biotechnologie aan de Hogeschool PXL. Als laatstejaarsstudent heb ik deze bachelorproef opgesteld en uitgevoerd gedurende mijn stageperiode aan het Biomedisch onderzoeksinstituut in Diepenbeek. Hier kreeg ik de kans om mee te werken in één van de auto-antilichaamonderzoeksgroepen waar ze onderzoek verrichten naar axiale spondyloartritis. Concreet bestond mijn onderzoek eruit te bepalen wat de rol van het Double Homeobox proteïne 4 is in deze aandoening.

Deze bachelorproef werd mogelijk gemaakt door de samenwerking met een aantal personen die ik graag wil bedanken. Eerst en vooral mijn PXL- en bedrijfspromotor, Dr. Elke Clynen en Dr. Patrick Vandormael. Door hun goede begeleiding en feedback heb ik dit project tot een goed einde kunnen brengen en heb ik mijn stage op een positieve wijze ervaren. Ook wil ik graag Pieter Ruytinx bedanken, zonder officieel benoemd te zijn als copromotor was zijn begeleiding gedurende mijn stage een grote hulp. Bedankt aan Ronald Driesen voor zijn expertise bij de interpretatie van de fluorescentiebeelden en Marie Paule Tulleners voor de uitleg bij enkele labotechnieken. Tenslotte wil ik Igna Rutten bedanken voor het verderzetten van mijn experimenten gedurende deze uitzonderlijke tijden.

Ik ben heel dankbaar aan Biomed om mee te mogen werken in hun onderzoek naar axSpA en ik hoop dat dit artikel hieraan kan bijdragen.

Ruben Jacobs
Agoralaan Gebouw C, Diepenbeek
(05/06/2020)

Rol van DUX4 in het ziekteproces van Axiale Spondyloartritis

Ruben Jacobs¹, Elke Clynen¹⁻², Patrick Vandormael² en Pieter Ruytinx²

¹PXL- Tech, Diepenbeek, België

²UHasselt – Biomed, Diepenbeek, België

Abstract

Axiale spondyloartritis (axSpA) is een inflammatoire, reumatische aandoening waarbij de wervelkolom en aangrenzende gewrichten worden aangetast. Patiënten hebben voornamelijk last van lage rugpijn en verminderde flexibiliteit. Indien de ziekte niet tijdig behandeld wordt, kan het kraakbeen tussen de ruggenwervels zich omzetten tot bot, waardoor deze wervels met elkaar vergroeien. Door het ontbreken van een goede bloedtest en de afwezigheid van duidelijke ziektekenmerken in een vroeg stadium van de ziekte, is bij veel patiënten de diagnose met enkele jaren vertraagd waardoor een effectieve behandeling vaak ook laat wordt opgestart. Daarom is er voorafgaand aan deze studie een screening uitgevoerd met als doel antilichamen te identificeren die gebruikt kunnen worden als nieuwe biomarker om zo versnelde diagnose mogelijk te maken. Eén van de gevonden autoantilichamen is gericht tegen het 'Double homeobox proteïne 4', kortweg DUX4 genoemd. Doordat DUX4 als transcriptionele activator voornamelijk actief is in de vroege embryonale ontwikkeling en niet tot expressie hoort te komen in volwassen cellen, werd er in dit onderzoek nagegaan wat de rol van dit eiwit is in het ziekteproces van patiënten die lijden aan axSpA. Zo werd er aan de hand van immunohistochemische (IHC) kleuringen en trichroomkleuringen bepaald of de expressie van DUX4 specifiek is voor axSpA en welke cellen DUX4 tot expressie brengen. Om de DUX4 specificiteit voor axSpA te bepalen werden er IHC kleuringen uitgevoerd op weefsels die afkomstig zijn van patiënten die lijden aan een andere reumatische aandoening, genaamd reumatoïde artritis (RA) en op gezonde controles. De celspecificiteit werd bepaald door merkers te gebruiken die specifiek voorkomen in een bepaald celtype, zoals CD68 voor macrofagen en fibroblast activated proteïne (FAP) en vimentine voor fibroblasten. Uit het onderzoek blijkt dat DUX4-expressie niet specifiek is voor axSpA, maar ook voorkomt bij patiënten die lijden aan andere reumatische aandoeningen, zoals RA. Deze expressie komt voornamelijk voor in cellen gelegen in de synoviale membraan, waar zowel fibroblasten en macrofagen voorkomen. Een duidelijke co-lokalisatie op celniveau is echter nog niet aangetoond. Om effectief te bepalen of DUX4 een rol speelt in axSpA zal de expressie van DUX4 gemoduleerd moeten worden in één van de gevonden DUX4 positieve celtypes.

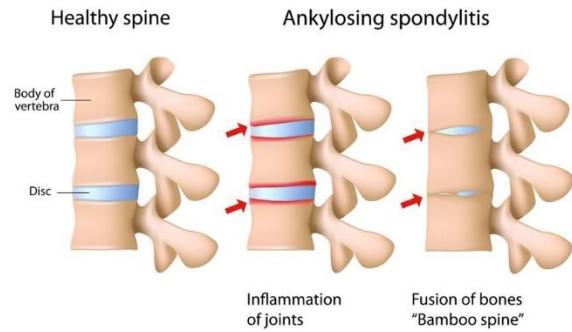
Sleutelwoorden: autoantilichamen, axiale spondyloartritis, axSpA, CD68, Double homeobox proteïne 4, DUX4, fibroblast activated proteïne, immunohistochemie, macrofaag, trichroomkleuring, vimentine

Introductie

Spondyloartritis (SpA) is de verzamelnaam voor een groep van reumatische aandoeningen die wordt gekenmerkt door ontsteking van de sacro-iliacale (SI) gewrichten en de wervelkolom. De prevalentie van deze aandoening varieert tussen de 1 en 2%. Afhankelijk van de symptomen wordt SpA onderverdeeld in twee grote groepen: axiale spondyloartritis (axSpA) en perifere spondyloartritis. Deze onderverdeling is gebaseerd op de symptomen die het meest op de voorgrond staan. Bij perifere spondyloartritis is er voornamelijk ontsteking van de grote gewrichten zoals de knieën, enkels, schouders of polsen (= perifeer skelet). Deze onderverdeling is echter niet zeer strikt, zo kan een patiënt die lijdt aan perifere SpA ook last hebben van rugklachten of kan een patiënt met axiale SpA last hebben van enthesitis (Landewé and van der Heijde, 2011).

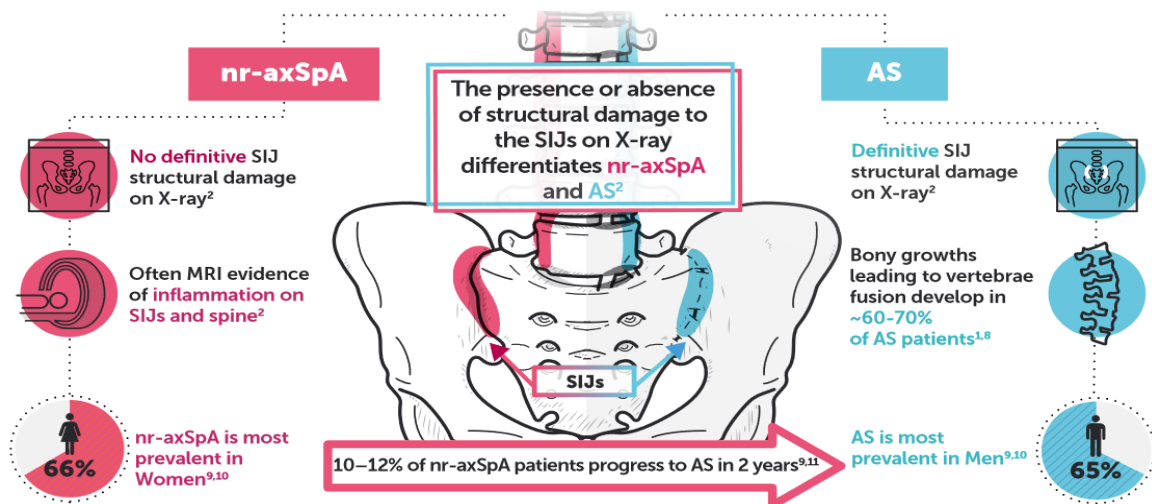
AxSpA

AxSpA is een chronische, inflammatoire reumatische aandoening waarbij het axiale skelet (wervelkolom en aangrenzende gewrichten) wordt aangetast. Patiënten hebben last van (lage) rugpijn en verminderde flexibiliteit. Meestal manifesteren er nog andere inflammatoire problemen, zoals ontsteking aan het oog (uveïtis), de huid (psoriasis) en aan de vingers en tenen (dactylitis) (Landewé and van der Heijde, 2011). Indien de ziekte niet tijdig behandeld wordt, kan het kraakbeen tussen de ruggenwervels zich omzetten tot bot, waardoor de ruggenwervels met elkaar vergroeien (figuur 1). De leeftijd waarop de symptomen ontstaan, varieert tussen het 15^e en het 40^e levensjaar en de aandoening komt evenveel voor bij mannen als bij vrouwen (Landewé and van der Heijde, 2011). Doordat de ziekte zich in een vroeg stadium op verschillende manieren kan uiten en een goede bloedtest ontbreekt, is in veel patiënten de diagnose enkele jaren vertraagd waardoor een effectieve behandeling vaak ook laat wordt opgestart.



Figuur 1: gevolgen van axSpA (Streur, n.d.)

AxSpA is een overkoepelende term voor niet-radiografische axSpA (nr-axSpA) en radiografische axSpA, beter bekend als ankyloserende spondylitis (AS) of de ziekte van Bechterew. Het onderscheid tussen deze twee vormen wordt gemaakt door de aanwezigheid van structurele schade aan de sacro-iliacale (SI) gewrichten op Röntgen beelden (Landewé and van der Heijde, 2011). In tegenstelling tot nr-axSpA, de vorm die het meest voorkomt bij vrouwen en vastgesteld kan worden m.b.v. MRI beelden, komt AS het meest voor bij mannen (figuur 2). Bij een groot deel van de patiënten die lijden aan AS treedt er in een later stadium in de ziekte abnormale botgroei op, syndesmofyt genoemd. Dit is een benige vergroeiing die ontstaat vanuit het binnenste van de ligamenten van de tussenwervelgewrichten en uiteindelijk leidt tot vergroeiing/fusie van de wervels wat de stijfheid en verlaagde mobiliteit in patiënten verklaart (O'Dwyer et al., 2016). Ongeveer 1 op de 10 gevallen die lijden aan nr-axSpA ontwikkelen in een later stadium toch schade aan de SI gewrichten en evolueren zo naar de radiografische variant van de aandoening. De symptomen voor beide varianten zijn dus grotendeels vergelijkbaar, maar er is wel sprake van een verschil in geslachtsvoorkeur en prevalentie in bevolkingsgroepen.



Figuur 2: twee vormen van axSpA (Ucb, 2019)

Zoals reeds vermeld is het stellen van een correcte diagnose voor patiënten die lijden aan axSpA een moeilijke kwestie. De criteria die actueel worden gehandhaafd om te bepalen of iemand de aandoening heeft, berusten op fysiek onderzoek, aanwezigheid van schade aan de SI gewrichten en testen op de aanwezigheid van HLA-B27 en het C-reactieve proteïne (CRP). HLA-B27 wordt gezien als hét spondylitis-gen, 90% van de patiënten die lijden aan deze aandoening zijn ook drager van dit eiwit. Het CRP is een eiwit dat geproduceerd wordt door de lever, vervolgens wordt het gesecreteerd in de bloedbaan. Hoeveelheden van dit eiwit worden groter als respons op inflammatie. Deze criteria werden opgesteld door de ASAS groep (Assessment in SpondyloArthritis International Society) (Landewé and van der Heijde, 2011). Omdat deze criteria problemen geven om een onderscheid te maken tussen patiënten die lijden aan chronische lage rugpijn (CLBP) en axSpA-patiënten is er nood aan goede biomerkers om zo vroege diagnose mogelijk te maken.

Biomarkeridentificatie

Bij de identificatie van nieuwe biomerkers voor axSpA, gaat men in het plasma van axSpA patiënten op zoek naar autoantilichamen die als merker zouden kunnen dienen (persoonlijke communicatie). Autoantilichamen zijn antilichamen die componenten

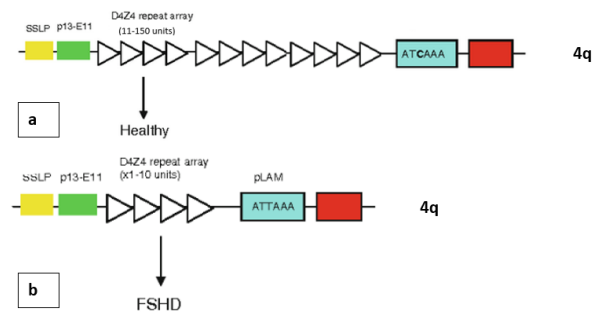
zoals cellen of weefsels van het eigen lichaam aanvallen. Bij een verandering in het lichaam, bijvoorbeeld de expressie van een eiwit dat niet tot expressie hoort te komen, zullen hier antilichamen tegen geproduceerd worden. Deze antilichamen zullen dus in grotere hoeveelheden voorkomen dan bij gezonde personen. Wanneer er een cDNA bibliotheek afkomstig van het mRNA van axSpA patiënten wordt gemaakt en men serum (met antilichamen) van patiënten toevoegt, zullen complexen worden gevormd. Deze complexen kunnen worden opgezuiverd en geanalyseerd. Met behulp van Serological Antigen Selection (SAS) kunnen de antigentargets van de gevonden autoantilichamen (d.m.v. sequencerings-technieken) worden geïdentificeerd (Somers et al., 2002). Ook zal de reactiviteit van dit antilichaam bepaald worden door middel van een faag-ELISA. Eén van de gevonden antilichamen vertoonde een verhoogde reactiviteit tegen het DUX4 eiwit (ongepubliceerde resultaten van onze onderzoeksgroep).

DUX4

Eén van de ontdekte kandidaat autoantilichaambiomerkers is gericht tegen het DUX4 eiwit (screening uitgevoerd door groep prof. Somers). Het 'Double homeobox protein 4', kortweg DUX4 genoemd is een eiwit dat functioneert als een transscriptionele

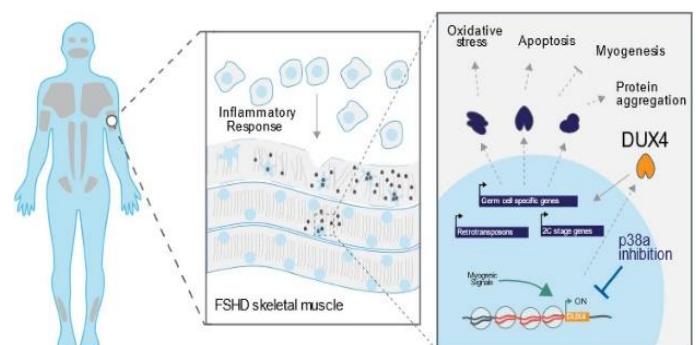
activator die voornamelijk actief is in de vroege embryonale ontwikkeling en zorgt voor de activatie van honderden endogene genen. Hierna wordt DUX4 in alle weefsels (behalve in de testikels en thymus) *gesilenced* waardoor dit niet tot expressie komt in volwassen spiercellen (Hendrickson et al., 2017).

Het DUX4 eiwit is voornamelijk gekend door zijn rol in facioscapulohumerale dystrofie (FSHD). FSHD is een autosomaal dominant vererfbare, degeneratieve spierziekte met een geschatte wereldwijde prevalentie van 1 op de 8000-20 000. De expressie van DUX4 in FSHD kan veroorzaakt worden door een mutatie in het coderende *DUX4* gen (FSHD1) of door een mutatie in het *SMCHD1* gen (FSHD2). In het eerste geval ligt de oorzaak bij een contractie in het coderende *DUX4* gen. Dit gen is gelegen in een polymorfe D4Z4 repeat regio op chromosoom 4q35. In gezonde personen bestaat deze regio uit 11 tot 150 repeats waarbij elk van deze repeats een DUX4 kopij bevat, terwijl bij FSHD patiënten deze regio verkleind is tot maximaal 10 repeats (figuur 3) (Rosenberg and Pascual, 2014). Deze zogenaamde contractie veroorzaakt relaxatie van het chromatine (hypomethylatie) waardoor het DNA toegankelijk wordt voor transcriptie. Hierdoor ontstaat er een afwijkende (ectopische) expressie van DUX4. DUX4 zal wel enkel tot expressie komen indien deze mutatie gepaard gaat met de aanwezigheid van een pLAM sequentie welke een polyadenylatie signaal bevat (Richards et al., 2012). Aangezien niet alle personen dit allel met de pLAM sequentie bevatten, zal ook niet iedereen FSHD kunnen ontwikkelen.



Figuur 3: Voorstelling D4Z4 repeatregio op chromosoom 4q. a. gezond persoon, meer dan 10 repeats b. FSHD patiënt, < 10 repeats, leidend tot DUX4-expressie (Richards et al., 2012)

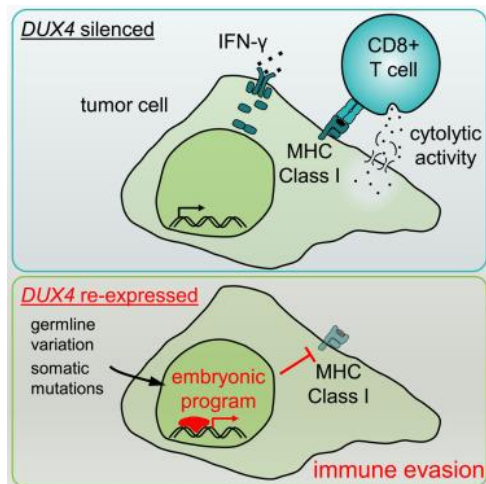
Bij FSHD2 ligt de oorzaak niet in de contractie van het desbetreffende stuk DNA, maar leiden mutaties in het *SMCHD1* gen op chromosoom 18p en de aanwezigheid van een bepaalde allelcombinatie op chromosoom 4 tot deze aandoening. Het *SMCHD1* gen speelt een belangrijke rol in de regulatie van de DNA-methylatiestatus. In geval van mutatie zal dit ook hier weer leiden tot een gewijzigde (verlaagde) methylatiestatus wat zorgt voor de expressie van DUX4 (Rosenberg and Pascual, 2014). De symptomen zijn voor beide types gelijkaardig, FSHD1 komt echter wel het meest voor ($\pm 95\%$). Expressie van DUX4 in somatische cellen is toxisch, leidt tot oxidatieve stress, interfereert met de organisatie van de sarcomeren en resulteert in celdood wat de geleidelijke verlamming bij FSHD patiënten verklaart (figuur 4) (Rojas et al., 2019).



Figuur 4: overzicht effecten DUX4-expressie in FSHD (Rojas et al., 2019)

Door de rol van DUX4 als transcriptionele activator wordt de expressie van dit eiwit ook vaak aangetroffen in kankercellen (Yao et al.,

2014). Ook hier liggen mutaties in DUX4-repressoren aan de basis van de expressie. Kankers waarin DUX4 werd teruggevonden worden gekarakteriseerd door een lager aantal Major Histocompatibility Complex (MHC) klasse I. Dit zal ervoor zorgen dat peptide fragmenten niet meer worden gepresenteerd op het celoppervlak waardoor interactie met cytotoxische T-cellen wegvalt (figuur 5) (Chew et al., 2019).



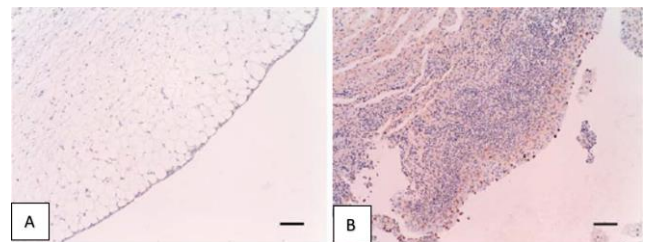
Figuur 5: Effect DUX4 expressie in kanker (Chew et al., 2019)

Door het aantreffen van een verhoogde hoeveelheid antilichamen tegen DUX4 in axSpA patiënten en door het aantreffen van DUX4 expressie in synoviaal weefsel vereist deze expressie in synovium verder onderzoek (ongepubliceerde resultaten van onze onderzoeksgroep). Het onderzoeken van synoviaal weefsel is interessant omwille van het feit dat dit weefsel ontsteekt in axSpA patiënten en mede voor de typische klachten zorgt.

Synovium

Het synovium of het synoviale membraan is een dunne slijmvlieslaag in de diarthrodiale gewrichten, peesschedes en slijmbuurzen. Deze 'gewrichtsbekleding' is slechts enkele cellagen dik en maakt soepele beweging mogelijk. Deze soepele beweging wordt in stand gehouden door de aanwezigheid van een stroperige synoviale vloeistof. Ontsteking van deze binnenbekleding van het

gewrichtskapsel of peesschede (synovitis) zorgt ervoor dat de cellen in het synovium worden aangezet tot proliferatie waardoor deze laag verdikt (figuur 6). Deze inflammatie is kenmerkend voor patiënten die lijden aan axSpA of reumatoïde artritis (RA). De cellen die normaal voorkomen in het synovium zijn fibroblasten en macrofagen (Smith, 2011; Van Landuyt, 2010). In geval van inflammatie kan infiltratie van andere immuuncellen echter niet uitgesloten worden. Synovitis gaat gepaard met pijn en stijfheid van het gewricht en komt het vaakst voor aan de knie of aan de heup. Doordat deze synovitis kenmerkend is voor onder andere axSpA en doordat er een grotere hoeveelheid DUX4 antilichamen aanwezig is in deze patiënten worden er verschillende technieken toegepast om DUX4 expressie in synoviaal weefsel te testen (ongepubliceerde resultaten van onze onderzoeksgroep).



Figuur 6: IHC kleuring van synoviale macrofagen in konijn. Synoviaal membraan gekleurd met anti-rabbit macrofaag antilichaam (RAM11) van gezonde konijnen (A), konijnen die lijden aan artritis (B) (Prieto-Potín et al., 2013)

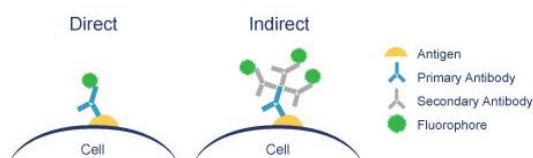
Histologische kleuringen

Technieken die gebruikt worden zijn immunohistochemische kleuringen en trichroomkleuringen.

Immunohistochemie (IHC)

In immunohistochemische kleuringen wordt er gebruik gemaakt van specifieke antilichamen om componenten in weefsels te lokaliseren. De techniek wordt veel gebruikt om abnormale cellen te visualiseren om zo diagnoses te kunnen stellen. De gebruikte antilichamen worden specifiek gericht tegen bepaalde merkers die enkel voorkomen in bepaalde (geactiveerde) cellen of

kenmerkend zijn voor bepaalde cellulaire processen zoals proliferatie. In de praktijk zijn er twee soorten IHC kleuringen: de directe en de indirecte kleuring. De directe kleuring maakt gebruik van één soort antilichaam dat zal reageren met een bepaald antigen in het weefsel. Dit antilichaam is gelabeld met een bepaald enzym, bv. horseradish peroxidase (HRP), dat een kleurreactie veroorzaakt bij binding aan het antigen. Bij de indirecte IHC kleuring maakt men gebruik van een ongelabeld primair antilichaam, dat net zoals bij de directe kleuring zal binden aan zijn target in het weefsel, en een gelabeld secundair antilichaam. Dit secundair antilichaam is gericht tegen het primaire antilichaam. De voornaamste reden voor het gebruiken van de indirecte methode is de signaalversterking die hierbij optreedt. Zo kunnen er meerdere secundaire antilichamen binden op het primaire antilichaam, waardoor het signaal sterker wordt (figuur 7). Het secundaire antilichaam wordt ook hier weer gelabeld met een enzym dat zal zorgen voor een kleurreactie of met een fluorescente stof (Matos et al., 2010). Door middel van (fluorescentie-)microscopie kan er bepaald worden of het antigen aan- of afwezig is in het weefsel.



Figuur 7: Directe vs indirecte kleuring (abcam, n.d.)

Trichroomkleuring

Trichroomkleuringen maken gebruik van verschillende kleurstoffen met verschillende zuurtegraad om zo componenten in het weefsel een bepaalde kleur te geven. Over het algemeen scheidt deze kleuring een duidelijker beeld over welke structuren er aanwezig zijn in het weefsel. De structuren die worden aangekleurd zijn collageen, cytoplasma en de celkernen. Het collageen kleurt hierbij blauw-paars, het cytoplasma

vertoont een rode kleur en de kernen krijgen een blauw-zwarte kleur.

Onderzoeksdoel

In dit onderzoek wordt nagegaan of de DUX4 expressie die werd teruggevonden in synoviaal weefsel van axSpA patiënten specifiek is voor deze aandoening. Dit wordt bepaald door na te gaan of DUX4 ook voorkomt bij een andere aandoening, zoals reumatoïde artritis (RA) en gezonde controles. Ook wordt er onderzocht welke celtypes DUX4 tot expressie brengen en of deze expressie eventueel specifiek is voor een bepaald celtype. De technieken die worden gebruikt zijn IHC en trichroomkleuringen. Bij de IHC kleuringen wordt er gebruik gemaakt van DUX4 antilichamen, antilichamen gericht tegen fibroblastmerkers (FAP), antilichamen gericht tegen (cytoskelet-)merkers van mesenchymale cellen (vimentine) en antilichamen gericht tegen CD68, een merker voor macrofagen. De trichroomkleuringen in dit onderzoek dienen voornamelijk ter ondersteuning van de IHC kleuringen. Zo kan er a.d.h.v. deze kleuring verklaard worden waarom bepaalde gebieden veel of weinig (achtergrond)fluorescentie geven en kan men een vergelijking uitvoeren tussen de verschillende ziekteaandoeningen en de gezonde controles.

Materialen en methoden

Patiënten- en controlestalen

De synoviale weefsels van de patiënten en gezonde controles werden verzameld tijdens heup- of knieoperaties in het ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL). Deze werden ingevroren en bewaard op -80°C . In totaal werden er 4 verschillende types weefsels ter beschikking gesteld; weefsels van patiënten die lijden aan axSpA, RA en weefsels van gezonde personen. In Biomed werden deze weefsels versneden met de cryostaat (Bright) (voor meer details zie bijlage 3: maken van weefselcoupes) en bewaard als cryocoupes met een dikte van $10\ \mu\text{m}$ op -20°C .

Immunohistochemische kleuring

Het gebruikte primaire DUX4 antilichaam is een muis monoclonaal antilichaam, gericht tegen de C-terminus van DUX4 (P4H2, MA5-16147, Thermofisher). Het secundaire antilichaam is een Goat anti-Mouse gelabeld met Alexa Fluor 555 (A21425, Invitrogen). Bij excitatie zal dit fluorofoor een rood signaal geven onder de fluorescentiemicroscop. Fibroblast activated protein (FAP) is een merker voor fibroblasten, stamcellen en tumorcellen en het gebruikte primaire antilichaam is een anti-FAP, alfa polyclonaal antilichaam (ab53066, Abcam) met konijn als gastheer. Het secundaire antilichaam (A11008, Invitrogen) is een Geit anti-konijn IgG H+L (Abcam) gekoppeld met Alexa Fluor Plus 488 wat een groen signaal geeft. Het primaire vimentine (VIM) antilichaam is een muis monoclonaal antilichaam (V9, ab8069, Abcam). Het secundaire antilichaam is een geit anti-muis IgG H&L (A11017, life technologies) ook gekoppeld met Alexa Fluor Plus 488 wat een signaal geeft in het groene spectrum. Het primaire CD68 antilichaam is een muis monoclonaal antilichaam (14-0688-82, eBioscience). Er werd gebruikt gemaakt van twee verschillende gelabelde secundaire antilichamen, hierdoor geven deze signaal in het rode en groene kanaal. Het gebruikte secundaire antilichaam (groen) is een ezel anti-muis IgG (H+L), gekoppeld met Alexa Fluor 488 (A21202, life technologies). Het secundaire antilichaam (rood) is dezelfde als die voor de DUX4 kleuring gebruikt werd (A21425, Invitrogen). Meer informatie over de gebruikte antilichamen bevindt zich in bijlage 1: immunohistochemische fluorescentiekleuring.

De cryocoupes werden 30 minuten (min) gedroogd op kamertemperatuur (KT), voor 10 min gefixeerd in ijskoude aceton en vervolgens 30 min gedroogd op KT. Hierna werden ze 3x 5 min gewassen in PBS en voor 30 min geblokkeerd met 100% Dako proteïn block om specifieke achtergrondkleuring te voorkomen. Vervolgens werden de

cryocoupes geïncubeerd met verdund primair antilichaam. De initieel gebruikte verdunningen voor zijn; 1/100 voor DUX4, 1/200 voor FAP en 1/200 voor VIM. Deze verdunning werd gemaakt in PBS met 0.5% Triton. Na overnacht incubatie op 4°C werden de coupes gewassen en geïncubeerd met het secundaire antilichaam. Dit antilichaam werd verdund in 10% goat serum. De initieel gebruikte verdunningen voor de secundaire antilichamen waren: 1/600 voor DUX4, 1/250 voor FAP, 1/250 voor VIM en 1/500 voor CD68. Hierna ondergingen de coupes een kernkleuring met DAPI. Vervolgens werden de coupes weer gewassen en geïncubeerd met Sudan Black. Finaal werden de stalen gemonteerd met een fluorescent mounting medium. Voor elke coupe werd er ook een negatieve controle meegenomen waar er geen primair antilichaam op werd toegevoegd. Deze negatieve controle geeft informatie over de specificiteit van de binding van het secundaire antilichaam en zou geen signaal mogen geven bij dezelfde instellingen (gain en exposure time) als het positief staal.

Trichroomkleuring

Voor elk beschikbaar weefsel werd er ook een Masson's Trichroomkleuring uitgevoerd. De vriescoupes werden eerst 30 min gedroogd op KT, 10 min gefixeerd in ijskoude aceton en gewassen in PBS. Hierna werden de coupes voor 10 min ondergedompeld in haematoxyline mayer (HM). HM is een paars-rode kleurstof die de kernen kleurt. De coupes werden vervolgens 20 min ondergedompeld in stromend kraanwater. Dit kraanwater is geïoniseerd en start de kleurreactie. De stalen werden overgebracht en voor 5 min ondergedompeld in Ponceau/Fuchsine. Dit is een rode kleurstof dat het cytoplasma kleurt. Na elke kleuringstap werden de coupes voor 2 min in gedestilleerd water ondergedompeld om de kleuring te stoppen. Vervolgens werden de coupes ondergedompeld in fosfomolybdeen zuur dat gebruikt wordt om de cellen ten opzichte van het omringende bindweefsel te markeren. Anilineblauw is een

blauwe kleurstof dat het collageen kleurt en finaal wordt er azijnzuur gebruikt als wasstap om overtollige/aspecifieke kleuring te voorkomen. Na de kleuring volgt er nog een dehydratatie in toenemende alcoholconcentratie (70% -> 80% -> 95% -> 100% -> 100%). Dit zorgt ervoor dat het resterende water in het weefsel verwijderd wordt zodat dit niet interfereert met de kleuring. Hierna worden de coupes in xyleen gebracht. Xyleen is een klaringsreagent dat het resterende alcohol van de coupes verwijdert en de coupes transparant maakt zodat lichtmicroscopie vergemakkelijkt wordt. Als laatste stap volgt de montering van de coupes met DPX. Dit monteermiddel droogt snel en zorgt voor langdurig behoud van de kleuring. Voor het uitgebreide protocol, zie bijlage 2: Masson's trichroomkleuring.

Resultaten en Discussie

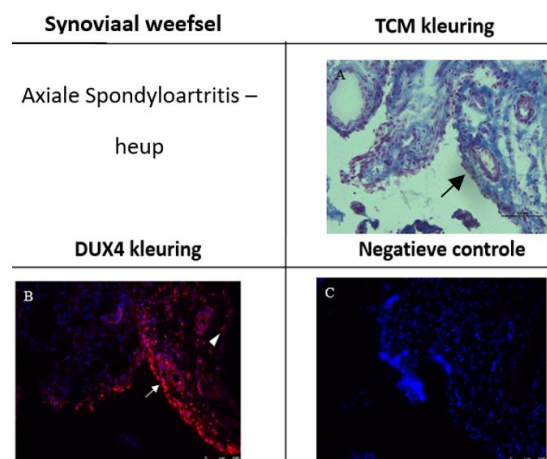
Weefsel specificiteit van DUX4

Om te bepalen of DUX4 effectief een rol speelt in het ziekteproces van axSpA werden er IHC en trichroomkleuringen uitgevoerd op alle beschikbare weefsels (axSpA, RA, gezond weefsel). Hieruit kan men besluiten of DUX4 specifiek is voor axSpA of ook nog tot expressie komt bij andere aandoeningen.

DUX4 expressie in axSpA

Allereerst werd er een DUX4 kleuring uitgevoerd op axSpA weefsel afkomstig van de heup (figuur 8). Het gebruikte fluorofoor heeft een emissiegolflengte dat in het rode spectrum valt. Celkernen krijgen door het toevoegen van DAPI een blauwe kleur. Dit is namelijk een fluorofoor dat DNA in dode/permeabele cellen kleurt. Men kan duidelijk afleiden dat er veel cellen aanwezig zijn in dit weefsel, wat al een eerste indicatie geeft dat het effectief over ontstoken synovium gaat. Hieruit blijkt ook dat bijna alle cellen in het synoviale membraan rood aankleuren m.a.w. dat al deze cellen DUX4 positief zijn. Door ook de negatieve controle

te beschouwen ziet men dat het effectief om een specifiek signaal gaat. Voor elke IHC-kleuring die werd uitgevoerd, werd er ook een trichroom (TCM) kleuring meegenomen. Doordat deze kleuring collageen (blauw), cytoplasma (rood) en celkernen (zwart) kleurt, kunnen er al enkele besluiten worden getrokken over of er enerzijds een synoviale membraan aanwezig is en anderzijds waarom er bepaalde gebieden in de IHC-beelden zijn die sterker fluorescent zijn dan andere in het weefsel. Uit de resultaten kunnen we afleiden dat er een synoviale structuur aanwezig is, dit zijn de structuren aan de randen van het weefsel waar cellen talrijk aanwezig zijn (pijl figuur 8A, 8B). AxSpA wordt namelijk sterk gekenmerkt door inflammatie met proliferatie als gevolg. Een opmerking die wel gemaakt moet worden is dat weefsels niet altijd ten volle hun originele vormgeving behouden. Dit kan te wijten zijn aan moeilijkheden tijdens het snijden van de weefselcoupes met de cryostaat, door de weefsels te lang te laten drogen of door het niet direct invriezen van de weefsels na operatie in het ziekenhuis.

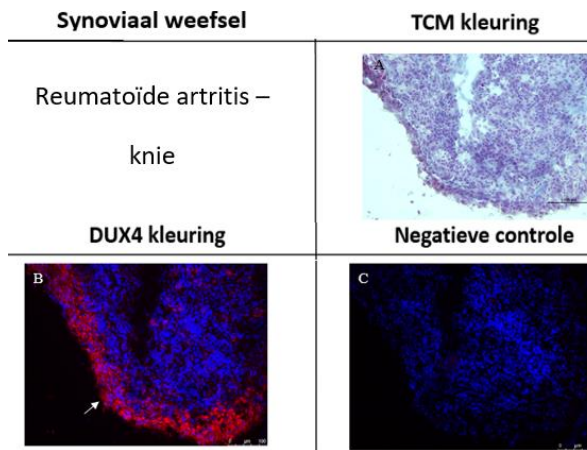


Figuur 8: DUX4 kleuring in synoviaal heupweefsel axSpA patiënt. A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen, pijl = synoviale membraan) B. IHC kleuring (rood = DUX4, blauw = DAPI; pijl links = synoviaal membraan, pijl rechts = fibroblast) C. negatieve IHC. Schaal IHC = 0-100 µm.

DUX4 expressie in RA

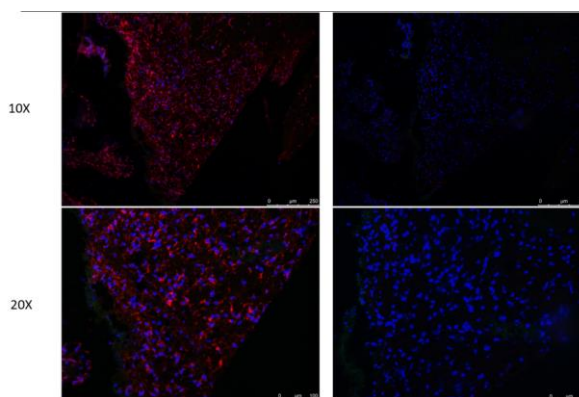
Dezelfde TCM en DUX4 kleuring werden ook uitgevoerd op RA weefsel (figuur 9, 10). Ook

in dit weefsel is er een synoviale membraan aanwezig met een groot aantal cellen die overvloedig DUX4 positief zijn (figuur 9). Uit deze kleuring kan er dus al besloten worden dat de expressie van DUX4 niet specifiek is voor axSpA, maar ook voorkomt in RA.



Figuur 9: DUX4 kleuring in RA knieweefsel. A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen B. IHC kleuring (rood = DUX4, blauw = DAPI, pijl: synoviaal membraan) C. negatieve IHC. Schaal IHC = 0-100 μ m

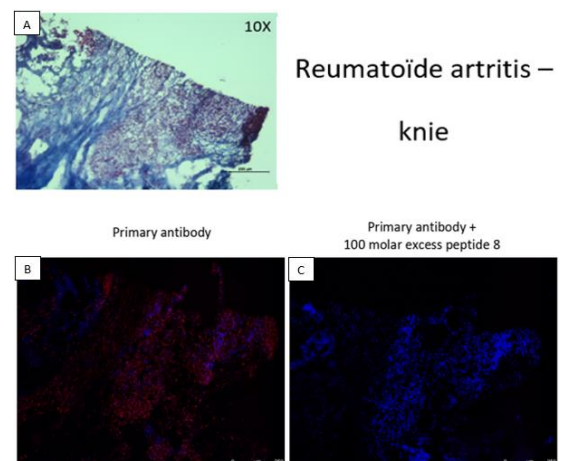
Opmerkelijk is dat er ook regio's zijn teruggevonden waarbij de DUX4 expressie zich niet beperkt tot de rand van het weefsel (figuur 10). Op deze foto lijken alle cellen DUX4 tot expressie te brengen. Aan de hand van de negatieve controle kan er besloten worden dat dit effectief om specifieke binding van het secundaire antilichaam gaat wat wilt zeggen dat dit signaal niet te wijten kan zijn aan achtergrond/aspecifieke binding.



Figuur 10: DUX4 (IHC-)kleuring in RA knieweefsel. (rood = DUX4, blauw = DAPI) Links: positieve DUX4 kleuringen, Rechts: respectievelijke negatieve controles. Schaal IHC

10x vergroting= 0-250 μ m, schaal IHC 20x vergroting = 0-100 μ m

Omwille van deze overvloedige expressie werden er ook peptide-blockingsexperimenten uitgevoerd als bijkomende controle om na te gaan of de binding van het primaire DUX4 antilichaam effectief specifiek is (figuur 11). Dit peptide komt overeen met de laatste 29 aminozuren van de C-terminus van DUX4 en er werd onderzocht of deze aan de bindingssite van het primaire DUX4 antilichaam kon binden. Indien het antilichaam specifiek zou zijn dan wordt de bindingssite bedekt met het peptide waardoor het niet meer zal kunnen binden aan het DUX4 eiwit in het weefsel. Uit de resultaten blijkt wel degelijk dat het antilichaam specifiek bindt aangezien er geen signaal meer waar te nemen is na incubatie van het antilichaam met het peptide.

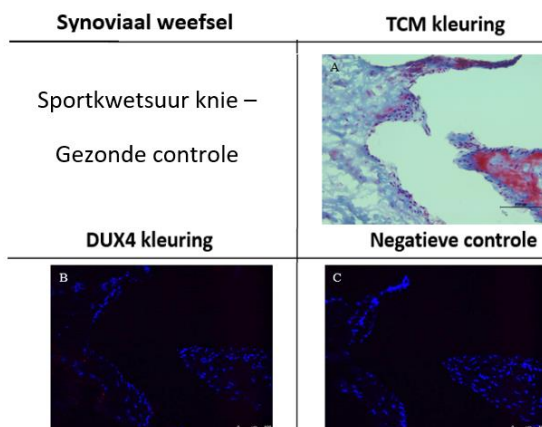


Figuur 11: Dux4 kleuring RA knieweefsel – blockingsexperiment. A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen) B. Normale DUX4 kleuring (rood = DUX4, blauw = DAPI) C. DUX4 kleuring met toevoeging van DUX4 peptide. Schaal IHC = 0-250 μ m

DUX4 expressie in gezonde controle

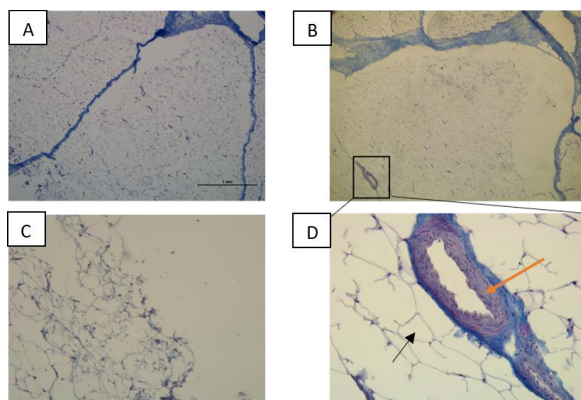
Als laatste werd de DUX4 IHC- en trichroomkleuring ook nog eens herhaald op enkele gezonde controles. Dit werd gedaan als bevestiging van de literatuur om er zeker van te zijn dat er geen DUX4 expressie aanwezig is in gezonde personen. Uit de IHC kleuring blijkt duidelijk dat er geen signaal aanwezig is in dit weefsel (figuur 12). Dit

bewijst dat DUX4 niet tot expressie komt in het synovium van gezonde individuen.



Figuur 12: TCM + DUX4 kleuring in gezond weefsel. A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen) B. IHC kleuring (rood = DUX4, blauw = DAPI) C. Negatieve controle. Schaal IHC = 0-100 μ m

Er is ook een duidelijk verschil te zien in de TCM-kleuringen wanneer deze worden vergeleken met de TCM-kleuringen van de verschillende aandoeningen. Er zijn geen dikke, celrijke randen meer te zien en men ziet over het algemeen ook veel minder cellen doorheen het weefsel, wat wijst op afwezigheid van inflammatie. De voornaamste structuren in het gezond weefsel zijn zeer veel vetcellen met enkele bloedvaten verspreid doorheen het weefsel (figuur 13).

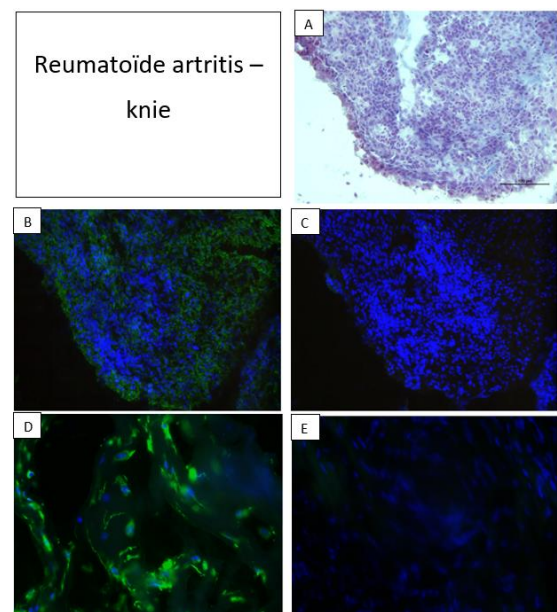


Figuur 13: TCM kleuring in gezond knieweefsel (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen). A+B. overzichtopname structuren in gezond weefsel C. close-up synoviale rand: afwezigheid van dikke, celrijke rand D. zwarte pijl = vetcel, oranje pijl = bloedvat

Celspecificiteit van DUX4

IHC kleuring op Vimentine

Omdat het synovium voornamelijk uit fibroblasten en macrofagen bestaat, werden er ook kleuringen uitgevoerd met antilichamen gericht tegen merkers die aanwezig zijn in deze celtypes. Om te bepalen of de kleuring werkt, werd er eerst een enkelvoudige vimentine kleuring uitgevoerd (figuur 14). Vimentine is een cytoskeletmerker die voorkomt in alle mesenchymale cellen. Dit zijn alle cellen ontstaan uit het mesenchym (=embryonaal bindweefsel), m.a.w. cellen van bind- en steunweefsel waar fibroblasten deel van uitmaken. Het gebruikte fluorofoor heeft een emissiegolflengte dat zich bevindt in het groene kanaal. Uit de resultaten blijkt dat de meeste, maar niet alle, cellen vimentine positief zijn.

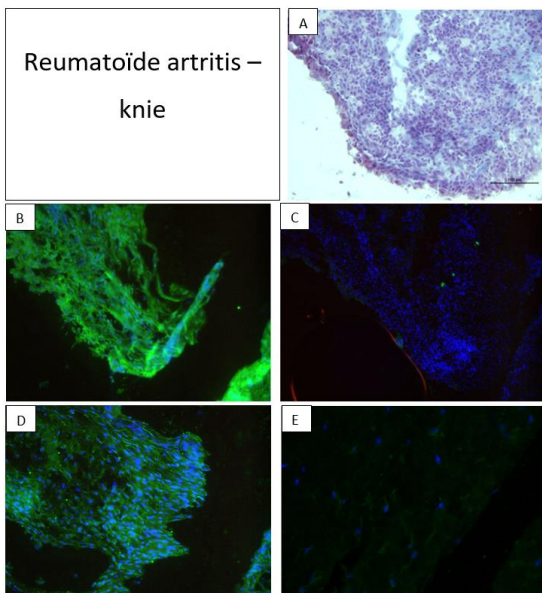


Figuur 14: Vimentine kleuring in RA knieweefsel (groen = vimentine, blauw = DAPI). A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen) B. VIM kleuring (20x) C. negatieve controle D. VIM kleuring (100x) E. negatieve controle

IHC kleuring op FAP

Naast de vimentine kleuring werd er ook een kleuring uitgevoerd met antilichamen gericht tegen FAP (figuur 15). Deze kleurt de geactiveerde fibroblasten, stamcellen en tumorcellen. De cellen die dus zowel VIM als

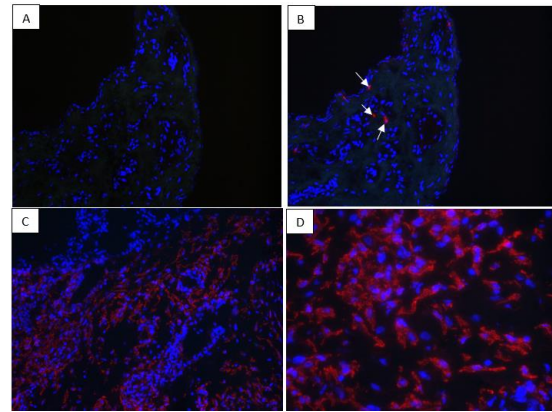
FAP positief zijn, zijn geactiveerde fibroblasten (=celtype dat als enige zowel FAP als VIM positief is). Net zoals VIM is het secundaire antilichaam gekoppeld met een fluorofoor dat emitteert in het groene gebied. Uit de resultaten blijkt dat er gebieden te vinden zijn met FAP positieve cellen (figuur 15). Deze cellen zijn echter moeilijk te vinden door de vele achtergrondfluorescentie die nog aanwezig is. Deze fluorescentie kan mede veroorzaakt worden door de aanwezigheid van het ouderdomspigment lipofuscine. Om een duidelijker beeld te krijgen zou deze kleuring opnieuw moeten worden uitgevoerd met een sterker verdund (secundair) antilichaam.



Figuur 15: FAP kleuring in RA knieweefsel (groen = FAP, blauw = DAPI). A. TCM kleuring (blauw = collageen, rood = cytoplasma, paars/zwart = celkernen) B. FAP kleuring (20x) C. negatieve controle D. FAP kleuring, andere positie (20x) E. FAP kleuring (100x)

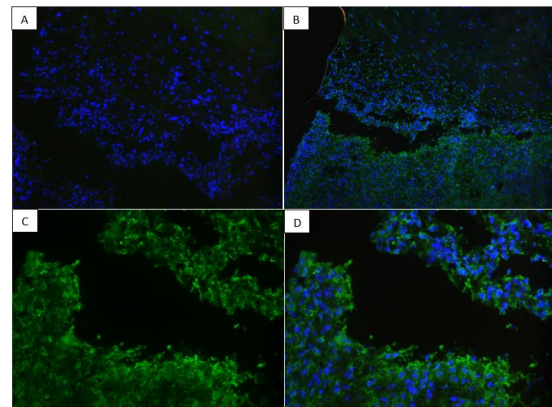
IHC kleuring op CD68

Omdat er naast fibroblasten ook macrofagen aanwezig zijn in synovium werden ook deze cellen aangekleurd (figuur 16). Er werd gebruik gemaakt van antilichamen gericht tegen CD68, aanwezig in weefselmacrofagen.



Figuur 16: CD68 kleuring in gezond knieweefsel (A&B) en in RA knieweefsel (C&D) (rood = CD68, blauw = DAPI). A. negatieve controle B. CD68 kleuring; pijlen geven positieve CD68 kleuring aan C. CD68 kleuring RA (20x) D. CD68 kleuring RA (40x)

Er is een lage CD68 positiviteit te zien in gezond weefsel, terwijl dit in RA weefsel zeer uitgesproken is. Dit wijst er dus op dat er meer macrofagen zijn in synovium van RA patiënten dan in gezond weefsel (figuur 16). Om deze kleuring bruikbaar te maken in combinatie met DUX4 (secundair antilichaam ook in het rode spectrum) werd ditzelfde experiment uitgevoerd met het secundair antilichaam gekoppeld met een fluorofoor dat emitteert in het groene spectrum (figuur 17).

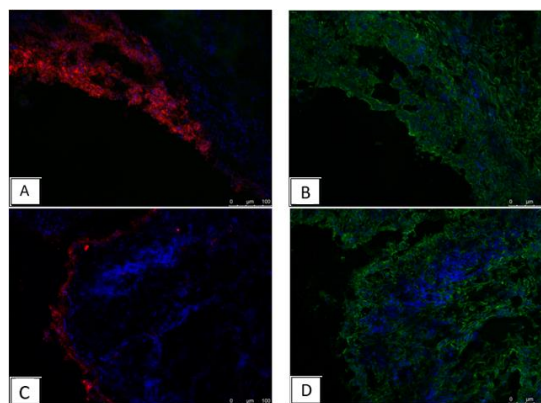


Figuur 17: CD68 kleuring in RA knieweefsel (groen = CD68, blauw = DAPI). A. negatieve controle B. CD68 kleuring (10x) C. enkel CD68, geen DAPI (40x) D. CD68, met DAPI (40x)?

Ook hier is er weer een sterke CD68 positiviteit te zien in het RA weefsel. Aangezien er veel achtergrondfluorescentie waarneembaar is, kan er nog een verdere/grotere verdunning van het secundaire antilichaam toegepast worden.

IHC-dubbelkleuring

Eens de enkelvoudige kleuringen uitgevoerd waren, werden er ook dubbelkleuringen uitgevoerd. Zoals vermeld is de combinatie VIM en FAP nuttig om enkel de geactiveerde fibroblasten te selecteren, FAP kleurt naast deze fibroblasten namelijk ook nog de stamcellen en eventueel aanwezige tumorcellen aan. Doordat de secundaire antilichamen van VIM en FAP beide signaal geven in het groene gebied was het niet mogelijk om deze met elkaar te combineren. Een oplossing hiervoor is om één van deze secundaire antilichamen te labelen met een ander fluorofoor. Ook de combinatie DUX4 en VIM bleek met de huidige antilichamen niet mogelijk. Beide primaire antilichamen zijn namelijk gekloneerd in hetzelfde gastorganisme waardoor het signaal niet van elkaar te onderscheiden was. Zelfs als beide secundaire antilichamen gelabeld waren met een ander fluorofoor zouden deze nog steeds binden aan dezelfde primaire antilichamen waardoor er competitie kan optreden en de fluorescentie niet betrouwbaar kan worden geanalyseerd. Deze combinatie van DUX4 en VIM kan ons meer leren over of alle mesenchymale cellen DUX4 positief zijn of slechts gedeeltelijk. De combinatie DUX4 met FAP bleek wel mogelijk te zijn, maar door de nog niet geoptimaliseerde FAP kleuring was het moeilijk om de resultaten te interpreteren (veel achtergrond). Om voor deze problemen te compenseren werden de enkelvoudige kleuringen van DUX4 en VIM in RA knieweefsel met elkaar vergeleken (figuur 18). Uit de analyse blijkt dat voornamelijk de randen van het weefsel DUX4 positief zijn. Ook valt er af te leiden dat alle cellen die DUX4 positief zijn ook VIM positief zijn, maar dat niet alle VIM positieve cellen DUX4 positief zijn. Dit wil zeggen dat de cellen die DUX4 tot expressie brengen zeker mesenchymale cellen zijn, maar dat niet alle mesenchymale cellen DUX4 positief zijn.



Figuur 18: DUX4 & vimentine kleuring in RA knieweefsel (rood = DUX4, groen = vimentine, blauw = DAPI). Schaal = 0-100 μ m

Algemene Discussie

In deze studie werd er onderzoek gedaan naar de rol van DUX4 in axSpA. Allereerst werd er bepaald of de aanwezigheid van dit eiwit specifiek was voor deze aandoening. Door het uitvoeren van IHC- kleuringen kon er afgeleid worden dat DUX4-expressie zichtbaar was in axSpA weefsel, maar ook in weefsel van patiënten die lijden aan RA. Omdat inflammatie ook prominent aanwezig is in RA zou het in de toekomst nuttig zijn om dezelfde kleuring uit te voeren in weefsels van patiënten die lijden aan aandoeningen die minder ontsteking gebonden zijn, zoals osteoarthritis. Hieruit kan er een eventueel verband worden gelegd tussen de expressie van DUX4 en de aanwezigheid van inflammatie. In gezonde weefsels werd er geen DUX4 signaal waargenomen en is er een duidelijk verschil te zien als we dit weefsel vergelijken met de verschillende aandoening gebonden weefsels. Zoals verwacht is de synoviale membraan in dit weefsel veel dunner. De DUX4-expressie in axSpA en RA weefsel komt voornamelijk tot uiting komt in de cellen in de synoviale rand. Dit is mogelijk te verklaren doordat ontsteking ervoor zorgt dat cellen in het membraan worden aangezet tot proliferatie, met als doel herstel van het weefsel. Deze ontsteking gebonden proliferatie blijkt mogelijks gerelateerd te zijn aan de expressie van DUX4. De specificiteit van het gebruikte DUX4 antilichaam werd geverifieerd aan de hand van negatieve

controles en peptideblockingsexperimenten. Uit deze experimenten blijkt duidelijk dat dit antilichaam specifiek bindt aan zijn target. Voor de Vimentine en CD68 antilichamen met een secundair in het groene kanaal, was deze specificiteit nog niet helemaal duidelijk, omwille van achtergrondkleuring en autofluorescentie.

Het tweede deel van de studie bestond eruit te bepalen of de waargenomen DUX4-expressie specifiek is voor een bepaald celtype. Aangezien synovium bestaat uit fibroblasten en macrofagen werden hierop kleuringen uitgevoerd. De fibroblastkleuringen met merkers FAP en VIM gaven beide positief signaal. De FAP kleuring gaf echter wel veel achtergrondfluorescentie. De reden hiervoor kan zijn door een te lage verdunning van het secundaire antilichaam of door de aanwezigheid van ouderdomspigmenten, zoals lipofuscine. De macrofagen werden aangekleurd met antilichamen gericht tegen CD68. Ook deze kleuring gaf de aanwezigheid van dit celtype in synovium aan. Omdat er uit de foto's overlap tussen de expressiepatronen van beide eiwitten (CD68 en DUX4) zijn in opeenvolgende coupes kan men besluiten dat er waarschijnlijk CD68 positieve cellen zijn die DUX4 positief zijn. Door deze kleuringen op FAP, VIM en CD68 te combineren met de DUX4 kleuring kan er in de toekomst met meer zekerheid worden afgeleid welke cellen het DUX4 tot expressie brengen.

Om effectief te kunnen bepalen of DUX4 een rol speelt in axSpA, is het uitvoeren van *in vitro* studies noodzakelijk. Hierin kan men expressie van DUX4 moduleren in één van de gevonden DUX4 positieve celtypes. Door het niveau van expressie van DUX4 te verhogen (overexpressie) of te verlagen (uitschakelen) kan men in deze cellen dan eventuele fenotypische veranderingen waarnemen.

Conclusie

De expressie van DUX4 werd teruggevonden in gewrichtsweefsels van axSpA patiënten, maar ook in gewrichten van andere chronische aandoeningen zoals RA. In weefsels met acute schade daarentegen werd er geen DUX4 expressie waargenomen. Dit zou mogelijk kunnen suggereren dat DUX4 geïnduceerd wordt in gewrichten met chronische schade. Deze expressie is duidelijk niet specifiek voor axSpA. DUX4 expressie komt voornamelijk voor in cellen gelegen in de synoviale membraan. DUX4 komt tot expressie in regio's waar zowel fibroblasten als macrofagen voorkomen, maar een duidelijke colocalisatie op celniveau is nog niet aangetoond.

Door het ontbreken van een *in vitro* studie op de celtypes die DUX4 tot expressie brengen kan er niet met zekerheid worden besloten of dit eiwit een significante rol speelt in het ziekteproces van axSpA.

Literatuurlijst

- abcam, n.d. Week 2 fluorescent staining training- choosing your antibody [WWW Document]. URL <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/week-1--choosing-your-antibody> (accessed 3.19.20).
- Chew, G.-L., Campbell, A.E., De Neef, E., Sutliff, N.A., Shadle, S.C., Tapscott, S.J., Bradley, R.K., 2019. DUX4 Suppresses MHC Class I to Promote Cancer Immune Evasion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Dev. Cell* 50, 658-671.e7. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2019.06.011>
- Hendrickson, P.G., Doráis, J.A., Grow, E.J., Whiddon, J.L., Lim, J.-W., Wike, C.L., Weaver, B.D., Pflueger, C., Emery, B.R., Wilcox, A.L., Nix, D.A., Peterson, C.M., Tapscott, S.J., Carrell, D.T., Cairns, B.R., 2017. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nat. Genet.* 49, 925–934. <https://doi.org/10.1038/ng.3844>
- Landewé, R., van der Heijde, D., 2011. Het herkennen van patiënten met spondyloarthritis. *Ned Tijdschr Geneeskd* 155, 1–6.
- Matos, L.L. de, Trufelli, D.C., de Matos, M.G.L., da Silva Pinhal, M.A., 2010. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark. Insights* 5, 9–20. <https://doi.org/10.4137/bmi.s2185>
- O'Dwyer, T., O'Shea, F., Wilson, F., 2016. Decreased health-related physical fitness in adults with ankylosing spondylitis: a cross-sectional controlled study. *Physiotherapy* 102, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.physio.2015.05.003>
- Prieto-Potín, I., Roman-Blas, J.A., Martínez-Calatrava, M.J., Gómez, R., Largo, R., Herrero-Beaumont, G., 2013. Hypercholesterolemia boosts joint destruction in chronic arthritis. An experimental model aggravated by foam macrophage infiltration. *Arthritis Res. Ther.* 15, R81. <https://doi.org/10.1186/ar4261>
- Richards, M., Coppée, F., Thomas, N., Belayew, A., Upadhyaya, M., 2012. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum. Genet.* 131, 325–340. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1100-z>
- Rojas, L.A., Valentine, E., Accorsi, A., Maglio, J., Shen, N., Robertson, A., Kazmirski, S., Rahl, P., Tawil, R., Cadavid, D., Thompson, L.A., Ronco, L., Chang, A.N., Cacace, A.M., Wallace, O., 2019. P38 α Regulates Expression of DUX4 in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *bioRxiv* 700195. <https://doi.org/10.1101/700195>
- Rosenberg, R.N., Pascual, J.M., 2014. Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Fifth Edition. <https://doi.org/10.1016/c2012-0-02688-9>
- Smith, M.D., 2011. The normal synovium. *Open Rheumatol. J.* 5, 100–6. <https://doi.org/10.2174/1874312901105010100>
- Somers, V.A., Brandwijk, R.J., Joosten, B., Moerkerk, P.T., Arends, J.-W., Menheere, P., Pieterse, W.O., Claessen, A., Scheper, R.J., Hoogenboom, H.R., Hufton, S.E., 2002. A Panel of Candidate Tumor Antigens in Colorectal Cancer Revealed by the Serological Selection of a Phage Displayed cDNA Expression Library. *J. Immunol.* 169, 2772–2780. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.5.2772>
- Streur, M., n.d. Fysieke fitheid belangrijk bij ziekte van Bechterew voor kwaliteit van leven | Psychfysio Opleidingen [WWW Document]. URL <https://www.psychfysio.nl/fysieke-fitheid-belangrijke-ziekte-van-bechterew/> (accessed 2.16.20).

Ucb, 2019. Axial Spondyloarthritis | UCB [WWW Document]. URL <https://www.ucb.com/disease-areas/Axial-Spondyloarthritis> (accessed 2.10.20).

Van Landuyt, K., 2010. Mesenchymal stem cells in arthritis [WWW Document]. URL <https://www.kuleuven.be/doctoraatsverdediging/fiches/3M05/3M050638.htm> (accessed 2.26.20).

Yao, Z., Snider, L., Balog, J., Lemmers, R.J.L.F., Van Der Maarel, S.M., Tawil, R., Tapscott, S.J., 2014. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5342–5352. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu251>

Bijlagen

Bijlage 1: Protocol: Immunohistochemische fluorescentiekleuring

Stalen: weefsels van axSpA, RA, gezond (zie bijlage 4)

Primaire antilichamen:



- DUX4: M α H DUX4 Monoclonaal Antilichaam (P4H2) (MA5-16147, Thermofisher)
- FAP: konijn Polyclonaal Antilichaam (ab53066, Abcam)
- Vimentine: Geit Monoclonaal Antilichaam (ab8069, Abcam)
- CD68: Muis monoclonal Antilichaam (14-0688-22, eBioscience)

Secundaire antilichamen:

- DUX4: F(ab')₂-Geit anti-Muis IgG (H+L) Secundair Antilichaam, Alexa Fluor[®] 555 gekoppeld (A21425, Invitrogen)
- FAP: Geit anti-konijn IgG (H+L) Secundair Antilichaam, Alexa Fluor Plus 488 (A11008, life technologies)
- Vimentine: Geit anti-Muis IgG (H+L) Secundair Antilichaam, Alexa Fluor Plus 488 (A11017, life technologies)
- CD68 (groen): Ezel anti-Muis IgG (H+L) Secundair Antilichaam, Alexa Fluor 488 (A21202, life technologies)
- CD68 (rood): F(ab')₂-Geit anti-Muis IgG (H+L) Secundair Antilichaam, Alexa Fluor[®] 555 gekoppeld (A21425, Invitrogen)

Dag 1 van de kleuringen

Cryocoupes

- Zorg dat er koude aceton klaarstaat (in een glazen fles bij -20°C)
- Cryocoupes 30 minuten laten drogen op KT (*2 coupes per patiënt, 1x neg. controle = geen primair*)
- 10 minuten in koude **aceton** fixeren (4°C)   *brandbaar, opslag gescheiden van oxiderende stoffen, vermijd contact en inademing → handschoenen*
- 30 minuten laten drogen op KT
- Markeer met behulp van een pap pen (DAKO) de omtrek van de coupe. Doe dit zonder de coupe te raken en let erop dat het glas eronder droog is.
- Coupes 3x 5 minuten schuddend wassen (schudder) in glazen bakje met 1xPBS
- 30 minuten blokken op kamertemperatuur met ong. 200 μ l onverdund **DAKO Protein block serum free**
- Maak intussen de 'vochtige kamer' klaar door er natte tissues (kleenex) in te leggen
- Giet de blockingsvloeistof af (ev. Opnieuw de pap pen gebruiken)
- Druppel **primair antilichaam** (bv. *M α H DUX4 1/100*) **verdund in PBS 0.5% Triton** op de coupe en laat overnacht incuberen in de vochtige kamer op 4°C.

Dag 2 van de kleuringen

Cryocoupes

- Coupes 3x 5 minuten schuddend wassen in glazen bakje met 1xPBS
- Incuberen met **secundaire antilichaam** (bv. *goat anti-mouse 555 1/600*) in **10% goat serum**, 1 uur op KT (buisje/epje met secundair AL centrifugeren (= @) vooraleer het op de coupe te brengen en vanaf nu in donker werken: fluorescentie)
- Coupes 3x 5 minuten schuddend wassen in glazen bakje met 1xPBS
- Maak ondertussen 0,3% Sudan Black klaar in 70% EtOH *ontvlambaar!*. Op de schudder plaatsen.
- Kernkleuring met **Dapi**: 10 minuten op KT.
- Coupes 3x 5 minuten schuddend wassen in glazen bakje met 1xPBS
- Auto-fluorescentie blokken door incubatie met **Sudan Black** (0,3% in 70% EtOH) gedurende 10 minuten op KT.
- Eén keer op en neer in 70% EtOH en 8 keer op en neer in 1x PBS.
- Monteren met fluorescent mounting medium (1 druppel zonder luchtbellens naast weefsel).
 - o Glaasje onderaan afdrogen
 - o Aan elke kant van de coupe een druppel mounting medium aanbrengen
 - o Het dekglasje langs 1 kant op het mounting medium brengen en langzaam laten zakken naar de 3e hoek
 - o Het mounting medium voorzichtig over de coupe verspreiden zonder luchtbellens
- Coupe bekijken onder de fluorescentie microscoop.

Bijlage 2: Masson's Trichroomkleuring

Stalen: weefsels van axSpA, RA, gezond in de vorm van vriescoupe (zie bijlage 4)

Kleurstoffen: Haematoxyline Mayer, Ponceau/Fuchsine, Fosfomolybdeenzuur 1%

Vorbereiding:

Vriescoupe:

- Coupes 30' drogen op KT
- 10' fixeren in koude aceton
- Coupes 3x 5' wassen in PBS

Kleuring:

- Coupes onderdempelen in haematoxyline Mayer voor 5'-10'
- Plaats coupes in bakje onder stromend tapwater 10-30'
- Coupes onderdempelen in Ponceau/Fuchsine 5'
- Overbrengen van coupes in gedeïoniseerd water 2'
- fosfomolybdeenzuur 1% 5'
- Overbrengen van coupes in gedeïoniseerd water 2'
- Aniline blauw 5'
- Overbrengen van coupes in gedeïoniseerd water 2'
- fosfomolybdeenzuur 1% 5'
- Overbrengen van coupes in gedeïoniseerd water 1'
- Azijnzuur 1% 2'
- Overbrengen van coupes in gedeïoniseerd water 1'
- Rehydratatie: stijgende alcoholconcentraties – xyleen
 - o Eerste 3 bakjes: dippen
 - o 2 bakjes 100% ethanol + 2 bakjes **xyleen** trekkast: elk 5'



ontploffingsgevaar/brandbaar, vluchtige stof, kan opgenomen worden via huid! → werken onder trekkast + draag (2 paar) handschoenen!

- Monteer in DPX



zeer toxisch, brandbaar, vermijd contact → werken onder trekkast + draag (2 paar) handschoenen, bij contact verwijder handschoen!

Ponceau/Fuchsine

- A. Ponceau de Xylidine: 1% in gedeïoniseerd water, na oplossen 1mL ijsazijn toevoegen per 100mL totaal volume
- B. Zure Fuchsine : 1% in gedeïoniseerd water, na oplossen 1mL ijsazijn toevoegen per 100mL totaal volume

Maak een mengsel van 2 delen A + 1 deel B, op deze manier bewaren

Anilineblauw

2% in gedeïoniseerd water: warm op tot koken, laat koken tot volledig opgelost

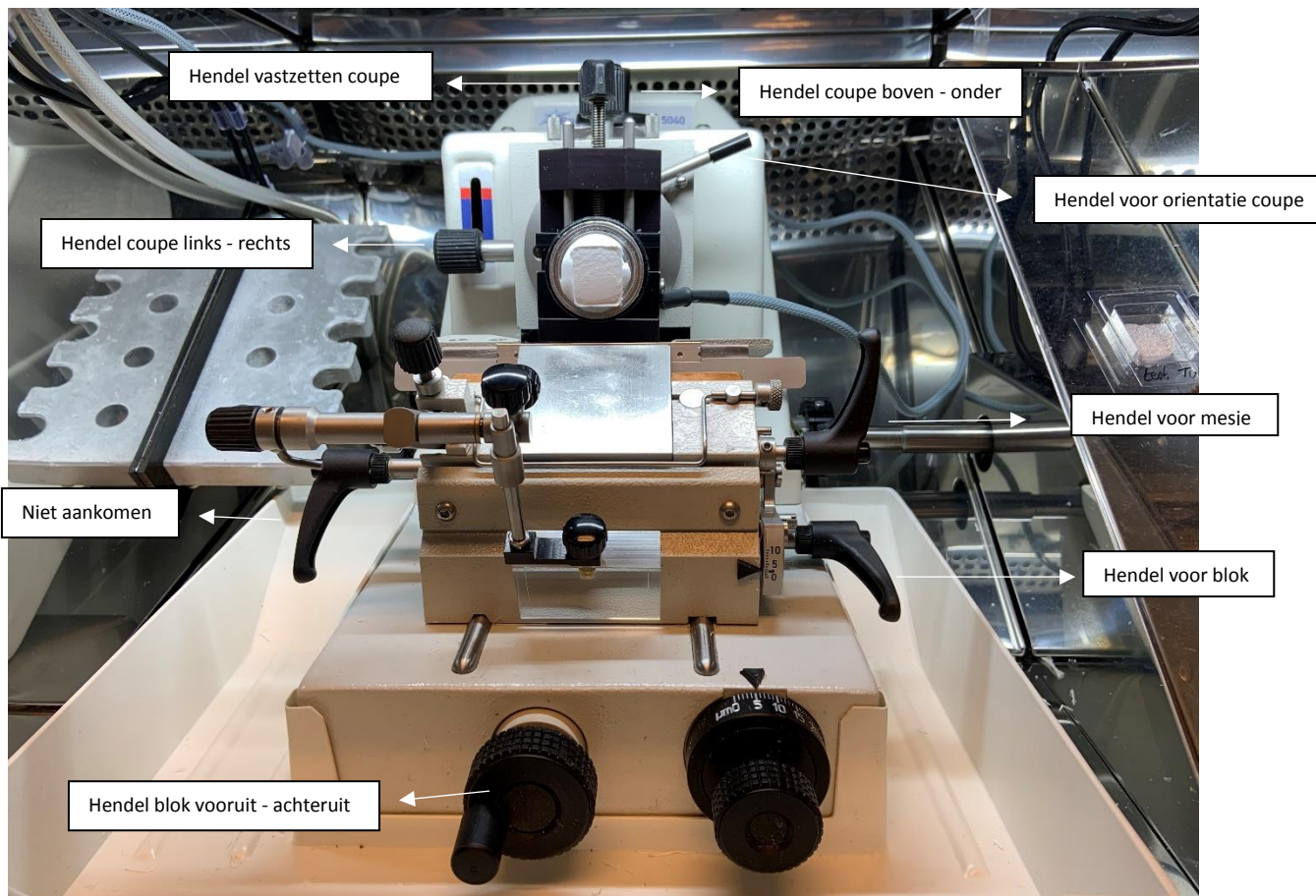
Na afkoelen: 2mL ijsazijn/100mL toevoegen

Filtreren m.b.v. filtreerpapier, geen vacuümtrekken nodig

Bijlage 3: Protocol: Cryostaat: maken van weefselcoupes

Cryostaat Bright

- Plasticsen kap afnemen
- Glas naar beneden doen om cryostaat af te sluiten
- In cryostaat, plasticsen kapje linkerkant afnemen
- Licht aandoen door op de "light" knop te drukken
- Chamber Temperature aanpassen
 - Druk op de set button
 - Gebruik de pijltjes om de temperatuur te verhogen of te verlagen
- Specimen Temperature aanpassen
 - Druk op de set button
 - Gebruik de pijltjes om de temperatuur te verhogen of te verlagen



Figuur 19: Overzicht werking cryostaat (Bright)

Werkwijze :

- Weefsel op houder plaatsen
 - Op houder tissuetec doen
 - Weefsel erop plaatsen
 - Houder met weefsel op linkerplaat zetten “Quickfreeze” tot tissuetec wit verkleurd is
 - Tijdens stollen → labelen microscopieglasjes
- Plaats houder met weefsel op de kop
 - Bovenste schroef “hendel vastzetten coupe” op de kop losdraaien
 - Houder met weefsel er tussen plaatsen
 - Schroef vastdraaien
- Blok naar houder brengen
 - Hendel “Hendel voor blok” losdraaien (naar achteren)
 - Met de draaiknop “hendel blok vooruit – achteruit” aan de voorkant naar links of rechts draaien, tafel gaat voor of achteruit
 - Zorgen dat mesje net voor het blokje met weefsel staat
 - Hendel “Hendel voor blok” terug vastdraaien
- weefsel op de kop oriënteren zodat ze gelijk staat met het mesje (qua afstand zowel links rechts boven onder)
 - Hendel “Hendel voor orientatie coupe” naar links draaien
 - Indien nodig kan je met de hendel “hendel coupe links of rechts” het blokje zo draaien dat het gelijk staat met het mes
 - met de hendel “hendel coupe boven of onder” kan je het blokje zo draaien dat het gelijk staat met het mes
 - snijden: meestal 10 micrometer
 - als OK → glazen plaatje op mes plaatsen → zorgen voor mooi vlak weefsel → drukken van glaasje op weefsel (indien gebruik penseel: altijd van mes weg vegeen!)
- “Rewind en Advance knop” aan zijkant op toestel
 - Deze knoppen dienen om het mesje naar voor of naar achter te schuiven tijdens het snijden
 - Dit kan enkel indien je blokje halfweg beneden staat, anders hoor je een vreemd geluid

!!Zorg dat voor het snijden van je weefsel de tafel altijd volledig naar achteren staat (zie rode-blauwe balk achter de hendel om de coupe links of rechts te draaien)

Als deze in het rood staat tijdens het snijden dan kan je niet verder en moet je eerst de tafel naar achter schuiven met Rewind en dan terug met de hendel naar de coupe brengen

Afsluiten van de cryostaat “Bright”

- Maak de binnenkant van de cryostaat proper
- Breng de tafel terug naar achteren met de knop “Rewind”
- Breng de plasticen kap terug over de Quick freeze
- Doe het licht uit
- Breng de glazen deksel naar achteren en plaats de originele deksel terug op het toestel

Bijlage 4: Overzicht van gebruikte weefselcoupes

Tabel 1: overzicht weefsels

Aandoening	Aantal geteste patiënten	Weefseltype(s)	Uitgevoerde kleuringen
RA	3	knieweefsel	DUX4 kleuring, FAP & VIM kleuring, CD68 kleuring + blockingsexperiment trichroomkleuring
axSpA	2	heupweefsel	DUX4 kleuring, VIM kleuring, FAP kleuring + blockingsexperiment trichroomkleuring
gezond	2	knieweefsel	DUX4 kleuring, VIM kleuring, FAP kleuring + blockingsexperiment trichroomkleuring