

Door: Eline van Hugte (eline.vanhugte@radboudumc.nl), Moleculaire Neurofysiologie, Humane Genetica, Radboudumc, Nijmegen.

# Patiënt-specifieke neuronale netwerken als modelsysteem voor Dravet syndroom

Op vrijdag 5 juli 2024 zal Eline van Hugte aan de Radboud Universiteit haar proefschrift getiteld *Exploring the equilibrium between seizure and synchrony, neuronal network development in health and disease*<sup>1</sup> verdedigen. Zij onderzocht de netwerk ontwikkeling van neuronale ontwikkelingsstoornissen met als primaire focus het Dravet syndroom. Het doel van dit onderzoek was om specifiek te begrijpen hoe excitatoire en inhibitoire neuronen bijdragen aan dit syndroom. Verder werd getest of patiënt-specifieke *in vitro* neuronale netwerken kunnen bijdragen aan een op maat gemaakte therapie strategie, door medicijnen te testen buiten de patiënt om.

Dravet Syndroom (DS) is een ernstige ontwikkelings- en epileptische encefalopathie die vaak gediagnosticeerd wordt voor het eerste levensjaar. Patiënten met DS hebben moeilijk te behandelen epilepsie, soms uitgelokt door temperatuurverhogingen, in combinatie met andere neurologische en ontwikkelingsstoornissen. In 80% van de gevallen is de oorzaak van DS een *de novo* variant in het *SCN1A* gen (coderend voor het natriumkanal  $\text{Na}_v1.1$ ). Er is sprake van een zeer hoge genetische variabiliteit, aangezien meer dan 1200 verschillende *SCN1A* varianten beschreven zijn die kunnen leiden tot een vorm van DS. Daarnaast is het syndroom ook klinisch heterogeen, sommige patiënten met een *SCN1A* variant hebben een mildere vorm, ook wel *genetic epilepsy with febrile seizures+* (GEFS+) genoemd. Hoewel er voor patiënten met epileptische encefalopathieën heldere richtlijnen zijn voor diagnose en behandeling (<https://www.nice.org.uk/guidance/ng217>), is het voor de clinicus lastig om het aanvalsverloop in te schatten vanwege deze heterogeniteit. Er ontbreekt dus een patiënt-specifieke gouden standaard voor behandeling. Het beter begrijpen van de onderliggende neuropathologie van verschillende *SCN1A* mutaties kan inzicht geven in de verwachte klinische fenotypes en de beste medicatiekeuzes.

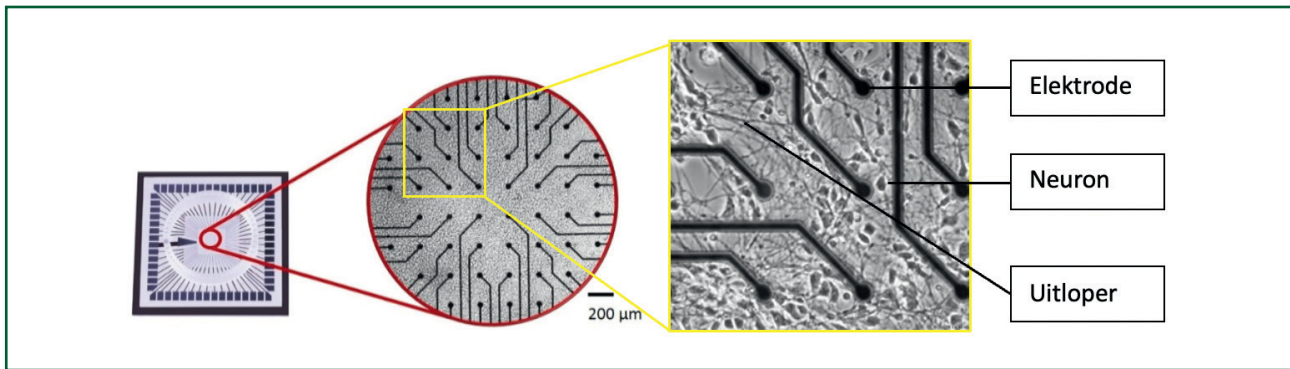
Aanvankelijk werd gedacht dat een vermindering van de  $\text{Na}^+$  stroom in inhibitoire neuronen, resulterend in disinhibitie, ten grondslag lag aan de epilepsie bij DS. Steeds meer onderzoek toont echter aan dat excitatoire neuronen ook een rol kunnen spelen in het DS-fenotype, al staat de mate waarin ter discussie. De tegenstrijdige observaties zouden toegeschreven kunnen worden aan zowel de intrinsieke functionele verschillen van de onderzochte mutaties

in *SCN1A*, als de bestudeerde celtypen. Daarnaast ontbrak onderzoek naar de excitatoire fenotypes in patiënten met verschillende klinische fenotypes (DS versus GEFS+), of verschillende mutaties in *SCN1A*. Dit zou de tegenstrijdige observaties in sommige onderzoeken kunnen verklaren. Eline van Hugte onderzocht daarom of de verschillende excitatoire neuronale fenotypes toe te schrijven zijn aan de specifieke mutaties in *SCN1A*, of de verschillende klinische fenotypes (DS versus GEFS+), met behulp van patiënt-specifieke *in vitro* neuronale netwerken. Daarnaast onderzocht zij of deze patiënt-specifieke neuronale netwerken ingezet kunnen worden voor de ontwikkeling van op maat gemaakte therapieën voor individuele patiënten.

## Patiënt-specifieke neuronale netwerken

De ontwikkeling van de humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs)-techniek biedt een platform om in het laboratorium (lab) patiënt-specifieke neuronen te kweken. hiPSCs zijn stamcellen die kunnen worden verkregen door pluripotente genen tot expressie te brengen in somatische bloedcellen van patiënten (Takahashi & Yamanaka, 2006). hiPSCs kunnen vervolgens gedifferentieerd worden tot elk gewenst celtype, oneindig worden gekweekt en vormen hierdoor een onuitputtelijke bron van patiënt-specifieke cellen. Door hiPSCs verder te differentiëren naar excitatoire of inhibitoire neuronen, kan een patiënt-eigen neuronaal netwerk worden gekweekt. Omdat lichaamseigen cellen van patiënten worden gebruikt, hebben de uiteindelijke neuronen exact dezelfde mutatie(s) en genetische achtergrond als de patiënt. De patiënt-specifieke, functioneel actieve neuronale netwerken kunnen uitgroeien op *micro-electrode arrays* (MEAs), petrischalen met elektroden op de

<sup>1</sup> Promotoren: Nael Nadif Kasri, Radboudumc Nijmegen; Hans van Bokhoven, Radboudumc Nijmegen; Marian Majoie, Academisch Centrum voor Epileptologie, Kempenhaeghe/MUMC+.



**Figuur 1** Links een voorbeeld van een micro-electrode array (MEA) met een chip op de bodem waarop het netwerk van neuronen groeit. Rood omkaderd een vergroting van de elektrodes van de chip. Door middel van deze elektrodes worden de actiepotentialen van de neuronen gemeten. Geel omkaderd een nog sterkere vergroting waarop ook de neuronen zelf goed te zien zijn, die op en om de elektrodes heen groeien.

bodem, die vervolgens de elektrofysiologische activiteit van het neuronale netwerk meten (figuur 1). De combinatie van deze twee technieken vormt de basis van het proefschrift.

### Genotype-fenotype correlaties

Er werd eerst onderzocht of MEA-metingen effectief genoeg waren om neuronale netwerken van gezonde proefpersonen te onderscheiden van patiënten met neuronale ontwikkelingsstoornissen. Hiervoor zijn de neuronale netwerk fenotypes van tien gezonde proefpersonen vergeleken met netwerk fenotypes van patiënten van twee verschillende neuronale ontwikkelingsstoornissen: het Kleefstra syndroom en het MELAS syndroom (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes*). De bevindingen toonden aan dat netwerk fenotypes van de gezonde individuen onderling vergelijkbaar en reproduceerbaar zijn en dat de netwerk fenotypes van patiënten een verschillend netwerk fenotype hadden. Daarnaast konden de netwerk fenotypes van patiënten met het Kleefstra syndroom onderscheiden worden van de fenotypes van patiënten met het MELAS syndroom (Mossink et al., 2021). Dit illustreerde dat neuronale netwerken op MEAs een krachtig instrument zijn om genotype-fenotype correlaties te onderzoeken.

### Zijn excitatoire neuronen mutatie specifiek?

Om de rol van excitatoire neuronen in de pathofysiologie van DS en GEFS+ beter te begrijpen, heeft Eline van Hugte een panel van neuronale netwerken op MEAs onderzocht (van Hugte et al., 2023). Dit panel bestond uit neuronale netwerken verkregen uit DS en GEFS+ patiënten met verschillende mutaties in *SCN1A* en verschillende klinische fenotypes, inclusief een familie waarin dezelfde mutatie leidt tot zowel DS als GEFS+. De neuronale netwerken van patiënten correspondeerden met de hyperactiviteit van controlenetwerken die werden blootgesteld aan chemicaliën die epileptische aanvallen kunnen opwekken in gezonde proefpersonen. De excitatoire neuronale netwerken hadden een verschillend fenotype afhankelijk van het type mutatie, maar onafhankelijk van het klinische fenotype van de patiënt. Daarnaast werd de hyperactiviteit verergerd door

verhoogde temperaturen, een belangrijk kenmerk van de epileptische aanvallen in DS. Deze bevindingen illustreerden dat het fenotype van het netwerk van excitatoire neuronen mutatie-specifiek is, en dat dit fenotype gevoelig is voor DS specifieke klinisch relevante kenmerken, zoals temperatuurverhoging.

### De weg naar een patiënt-specifieke behandeling

Daarnaast werd onderzocht of de patiënt-specifieke neuronale netwerken gebruikt konden worden om anti-epileptica te testen buiten de patiënt om (van Hugte et al., 2023). Als *proof-of-principle* is er met een retrospectieve analyse onderzocht of de anti-epileptica die voor aanvalsvermindering zorgde in patiënten, ook het neuronale netwerk fenotype *in vitro* kon beïnvloeden. De bevindingen toonden aan dat de neuronale netwerken van GEFS+ patiënten gunstig reageerden op anti-epileptica die ook resulteerden in aanvalsvermindering in de patiënt zelf. Voor DS, een ernstiger klinisch fenotype, was het nog niet mogelijk om deze correlatie te maken. Vervolgonderzoek zal zich daarom gaan richten op het bepalen van het meest optimale *in vitro* model, bestaande uit een mix van excitatoire en inhibitoire neuronen, om zo het beste te kunnen voorspellen welke medicatie werkt voor iedere individuele patiënt. Met dit onderzoek is de eerste stap gezet naar een toekomstige meer patiënt-specifieke behandeling voor patiënten met DS en GEFS+.

### Referenties

- Van Hugte EJH, Lewerissa E, Wu K et al. (2023) *SCN1A*-deficient excitatory neuronal networks display mutation-specific phenotypes. *Brain* 146(12):5153-5167.
- Mossink, B, Verboven, AH, van Hugte, EJH et al. (2021) Human neuronal networks on micro-electrode arrays are a highly robust tool to study disease-specific genotype-phenotype correlations *in vitro*. *Stem cell reports* 16(9):2182-2196.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126(4):663-676.