



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

The epileptogenic trinity

Oxidative stress, brain inflammation and iron in epilepsy

Zimmer, T.S.

Publication date

2021

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

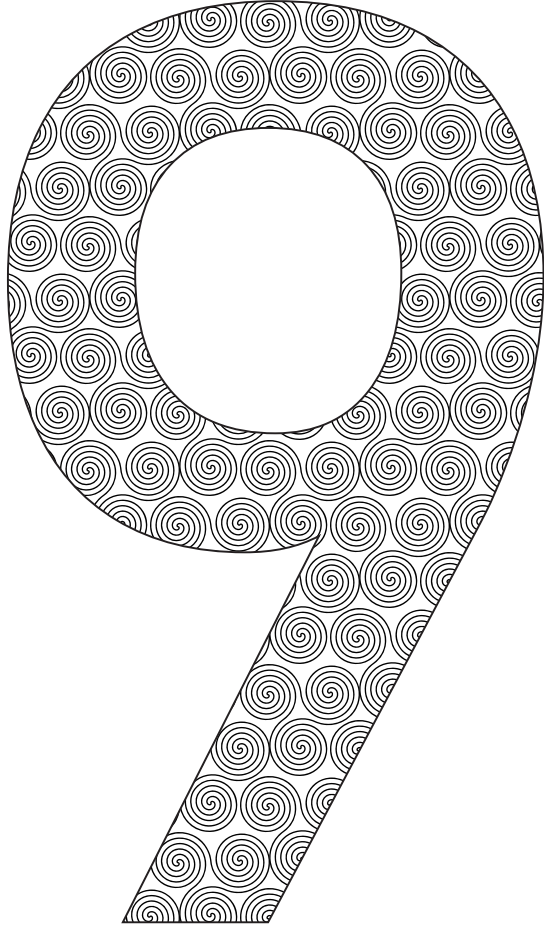
Zimmer, T. S. (2021). *The epileptogenic trinity: Oxidative stress, brain inflammation and iron in epilepsy*.

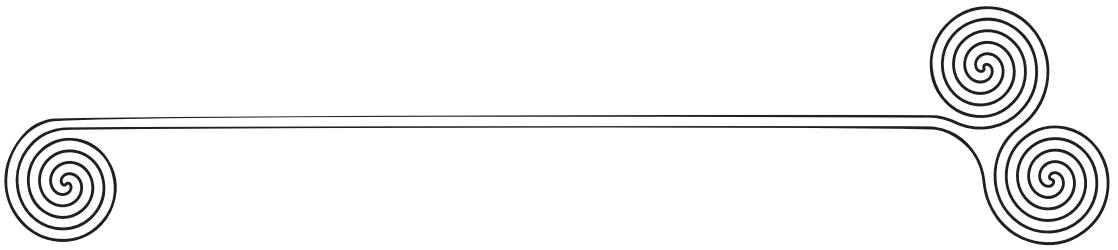
General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.





NEDERLANDSE SAMENVATTING

Epilepsie is een neurologische ziekte die wereldwijd ongeveer 65 miljoen mensen treft. De ziekte wordt gedefinieerd als "een aandoening van de hersenen die wordt gekenmerkt door een blijvende aanleg om epileptische aanvallen te veroorzaken, en de neurobiologische, cognitieve, psychologische en sociale gevolgen van deze aandoening". De etiologie van epilepsie is divers, variërend van genetische mutaties, zoals mTORopathieën als gevolg van mutaties in de mammalian target of rapamycin (mTOR) signaleringsroute, tot verworven epilepsie als reactie op acuut hersenletsel zoals beroerte, trauma of status epilepticus (SE). Epileptogenese is het geleidelijke proces waarbij een normaal brein epilepsie ontwikkelt en wordt gedefinieerd als "de ontwikkeling en uitbreiding van weefsel dat in staat is om spontane terugkerende aanvallen te veroorzaken, resulterend in (1) de ontwikkeling van een epileptische aandoening, en/of (2) progressie van de epilepsie nadat het is vastgesteld". Hoewel anti-epileptische medicatie de aanvallen bij sommige epilepsiepatiënten kan onderdrukken, lijdt meer dan 30% van de patiënten aan medicijnresistente aanvallen en op dit moment bestaan er geen behandelingen die zich richten op het proces van epileptogenese waardoor epilepsie voorkomen of genezen kan worden. Eén van de kenmerkende processen van epileptogenese die leidt tot neuronale verstoring, is neuro-inflammatie. Een andere belangrijke epileptogene factor is verlies van neuronen als gevolg van de overmatige vorming van reactieve zuurstofcomponenten (ROS) die in combinatie met onvoldoende antioxidante capaciteit tot een toestand leidt van oxidatieve stress (OS). Bovendien kan ontregeld ijzermetabolisme in de vorm van ijzerionen (Fe^{2+}/Fe^{3+}) de potentieel toxische effecten van ROS versterken, waardoor neuronale schade nog groter wordt. Het doel van dit proefschrift is om oxidatieve stress en de relatie met ontstekingsprocessen en ijzermetabolisme te onderzoeken, evenals de bijdrage van oxidatieve stress aan cellulair schade en veranderingen in neuronale netwerken tijdens epileptogenese en epilepsie.

In **hoofdstuk 2** onderzochten we de expressie van markers van OS (inducible nitric oxide synthase (iNOS) en solute carrier 7 A 11 (xCT)) en hersenontsteking (Toll-like receptor 4 (TLR4) en cyclooxygenase 2 (COX-2)) in mTORopathieën: tubereuze sclerose complex (TSC), focale corticale dysplasie type 2 (FCD 2) en hemimegalencefalie (HME). We vonden sterke expressie van alle markers in de voor de ziekte karakteristieke misvormde cellen en een sterke correlatie tussen OS en ontstekingsmarkers. In dezelfde cellen vonden we nucleaire lokalisatie van de transcriptiefactor nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells (NFκB) en identificeerden we *in vitro* een concentratieafhankelijke omschakeling naar een inflammatoire toestand als reactie op OS, waarschijnlijk gemedieerd door NFκB. Deze bevindingen ondersteunen een sterk verband tussen OS en neuro-inflammatie wijzen OS aan als ROS concentratie-afhankelijke oorzaak van hersenontsteking.

In **hoofdstuk 3** is de bijdrage van het perifere immuunsysteem aan neuro-inflammatie bij FCD 2 laesies onderzocht. We wilden specifiek verschillen karakteriseren tussen

de neuropathologische subtypen FCD 2a en FCD 2b, die op histopathologisch niveau worden onderscheiden door de aanwezigheid van de FCD 2b-specifieke balloncellen. We vonden een opmerkelijk hoge activatie van het immuunsysteem in de cortex van patiënten met FCD 2b in vergelijking met controles, met name wat betreft de rekrutering van perifere T-lymfocyten en verhoogde antigeenpresentatie door misvormde cellen. Bovendien ontdekten we dat balloncellen in FCD 2b de immuuncellen lijken aan te trekken, waardoor ze de dichtheid van oligodendrocyten in de subcorticale witte stof verminderen en de hypomyelinisatie bevorderen. Met name de omvang van deze effecten was afhankelijk van de dichtheid van balloncellen in de laesie. Deze bevindingen impliceren dat patiënten met FCD 2b mogelijk baat zouden kunnen hebben bij aanvullende ontstekingsremmende behandeling of een gereguleerde immunosuppressie.

Na het vaststellen van NFκB als belangrijke transcriptiefactor in de regulatie van inflammatie in hoofdstuk 2, hebben we ervoor gekozen om nieuwe transcriptionele regulatoren van hersenontsteking te identificeren die als anti-epileptogene behandeling kunnen worden gebruikt. Hiertoe hebben we in **hoofdstuk 4** transcriptomische gegevens van TSC-tubers gebruikt om nieuwe transcriptiefactoren te identificeren die pro-inflammatoire genexpressie moduleren. Analyse van transcription factor enrichment leverde SPI1/PU.1 op als potentiële kandidaat. We konden de SPI1/PU.1 overexpressie in misvormde cellen valideren met mTOR-activering in TSC-tubers, foetaal TSC-weefsel en FCD 2b-laesies. Ten slotte vonden we *in vitro* bewijs dat SPI1/PU.1 RNA-expressie in verschillende celmodellen (inclusief van tubers afgeleide primaire cellen) ROS-afhankelijk is en niet afhangt van mTOR. Hoewel we SPI1/PU.1 RNA-overexpressie vonden in verschillende celtypen, waarschijnlijk als reactie op ROS, kon eiwitexpressie alleen worden gedetecteerd in cellen met mTOR-activering. Deze bevindingen geven aan dat ROS- en mTOR-activering een “dubbele hit” vertegenwoordigen in misvormde cellen, wat leidt tot de expressie van SPI1/PU.1 en daaropvolgende verhoging van pro-inflammatoire genen, waarmee nog een ander verband wordt gelegd tussen OS en hersenontsteking. Het richten op SPI1/PU.1, met name in misvormde cellen, zou mogelijk neuro-inflammatie kunnen dempen.

In **hoofdstuk 5** werd oxidatieve schade onderzocht in FCD 2b en TSC, evenals de anti-oxidant nuclear factor erythroid 2 like 2 (NRF2) pathway en de modulatie ervan door het eerder geïdentificeerde inflammatie-geassocieerde microRNA (miR) miR155. We vonden markers voor oxidatieve schade, maar ook activering van de NRF2-route en miR155-expressie, voornamelijk in misvormde cellen met mTOR-activering in FCD 2b-laesies, TSC-tubers en in een experimenteel TSC knockout model (*Tsc1*^{GFAP-/-} muizen). Na transfectie van menselijke foetale astrocyten met miR155 *in vitro* bleek dat miR155 en aantal NRF2-doelgenen activeert via verlaging van de expressie van de NRF2-competitieve transcriptiefactor BTB-domein en CNC-homoloog 1 (Bach-1).

Langdurige blootstelling aan miR155 leidde tot chronische overexpressie van het NRF2-doelwit heme-oxygenase 1 (HO-1), dat op zijn beurt de afgifte van vrij ijzer en veranderingen in de metabolische genexpressie van ijzer metabolisme gerelateerde genen bevorderde. Vervolgens werd ontregeling van het ijzermetabolisme gevalideerd en vastgesteld in FCD 2b-laesies, TSC-tubers, een TSC-model en foetale TSC-laesies. Deze bevindingen geven aan dat chronische activering van genexpressie van antioxidanten via NRF2 de HO-1-gemedieerde ijzerafgifte bevordert. Aangezien ijzer de ROS-toxiciteit kan versterken, wijzen deze resultaten op een rol voor ijzer in de pathogenese bij deze mTORopathieën. Bovendien suggereren deze bevindingen het potentieel van therapeutische benaderingen die gericht zijn op ontregeling van de NRF2 signaleringsroute.

Het ijzermetabolisme, oxidatieve schade en anti-oxidante genexpressie werden verder onderzocht in autopsie hersenweefsel van patiënten die zijn overleden als gevolg van SE en in geresecteerd hersenweefsel van patiënten met temporaalkwabepilepsie en hippocampale sclerose (TLE-HS) in **hoofdstuk 6**. We vonden naast ijzerafzetting en veranderingen in metabole factoren van ijzer ook oxidatieve schade en overexpressie van antioxidantfactoren in de hippocampus van patiënten met SE of TLE-HS in vergelijking met controles. In een experimenteel TLE-rat model hebben we ijzerafzetting gedetecteerd tijdens de acute fase na elektrisch geïnduceerde SE, maar ook tijdens de chronisch fase, na de ontwikkeling van spontane terugkerende aanvallen. Deze veranderingen gingen gepaard met veranderingen in factoren die betrokken zijn bij het verwerken van ijzer en de afweer tegen antioxidanten. *In vitro* wordt ijzeropname in hersenplakjes van muizen vergemakkelijkt door epileptiforme activiteit en ijzerblootstelling houdt in deze plakjes verband met de RNA expressie van pro-inflammatoire factoren. Om een beter begrip te krijgen of de gegevens van TLE-HS-weefsel kunnen worden geëxtrapoleerd naar andere vormen van verworven epilepsie, hebben we weefsel van tumor gerelateerde epilepsiepatiënten gekarakteriseerd en vergelijkbare veranderingen gevonden in het antioxidant- en ijzermetabolisme. Om te onderzoeken of ijzerstapeling ook een rol zou kunnen spelen bij de pathogenese van epilepsie, hebben we ijzer gemeten in weefsel van patiënten die leden aan potentieel epileptogene aandoeningen, namelijk een beroerte of traumatisch hersenletsel. Hier hebben we ijzerstapeling gedetecteerd, vergelijkbaar met hersenweefsel van mensen met chronische epilepsie. Samengevat laten we in hoofdstuk 6 ijzerstapeling en veranderingen in het ijzermetabolisme bij epileptogene aandoeningen zien maar ook bij chronische epilepsie, wat wijst op een rol van ijzer bij epileptogenese.

De bevindingen van dit proefschrift worden samengevat en besproken in **hoofdstuk 7**. De verzamelde gegevens geven aan dat neuro-inflammatie en OS betrokken zijn bij de ontwikkeling en progressie van epilepsie. Bovendien lijken beide processen nauw met elkaar verbonden te zijn en versterken ze elkaar door verschillende

regulatoren waaronder NFκB, SPI1/PU.1 en/of miR155.

Ten slotte identificeren we ijzerstapeling als een nieuwe, extra pathogene trigger die betrokken zou kunnen zijn bij celverlies bij epilepsie. Nieuwe ontstekingsremmende therapieën gericht op NFκB of SPI1/PU.1 en therapieën die chronische NRF2-activering in mTORopathieën moduleren, kunnen veelbelovende nieuwe therapeutische mogelijkheden zijn. Bovendien verdient het bestrijden van ijzerstapeling met middelen die ijzer wegvangen of antiferroptotische middelen nader onderzoek als mogelijke anti-epileptogene therapie. Vanwege de belangrijke rol van ijzer in de homeostase van de hersenen, vereist deze potentiële therapeutische benadering echter nog grondiger onderzoek.