

## Webinar: Mingshan Xue - Roles of Different Neurons

### **Charlene:**

Guten Tag und guten Abend. Ich bin Charlene Son Rigby und ich bin die Präsidentin und Mitbegründerin der STXBP1-Stiftung. Dies ist das letzte Forschungs-Webinar in unserer Forschungs-Webinar Reihe. Und wir schließen diesen Monat mit einem großartigen Redner. Diese Webinar Reihe ist Teil des STXBP1-Bewusstseins-Monats, der den ganzen September über stattfindet. Heute begrüßen wir Mingshan Xue. Mingshan Xue, PhD, ist der Caroline DeLuca-Stipendiat und Assistenzprofessor der Abteilung für Neurowissenschaften am Baylor College of Medicine und am Neurologischen Institut Jan und Dan Duncan am Texas Children's Hospital. Der Forschungsschwerpunkt von Dr. Xue liegt auf der Aufklärung der synaptischen Mechanismen neuronaler Schaltkreise und dem Verständnis der Schaltkreisfunktionsstörung bei Störungen der neurologischen Entwicklung. Dieses Wissen soll genutzt werden, um neue therapeutische Strategien für diese Störungen zu erforschen. Dr. Xue promovierte am Baylor College of Medicine und arbeitete als Postdoktorand an der Universität von Kalifornien, San Diego. Im Jahr 2018 erhielt er den McKnight Scholar Award. Ich möchte Mingshan für seinen tiefen und langen Einsatz für STXBP1 und unsere Patientengemeinschaft danken. Bevor wir mit der Präsentation beginnen, werden Sie sicher noch Fragen haben. Um eine Frage zu stellen, klicken Sie bitte auf die Frage-und-Antwort-Schaltfläche am unteren Rand Ihres Zoom-Bildschirms. Geben Sie dann Ihre Fragen in das Frage- und Antwort-Fenster ein. Wir werden alle Fragen bis zum Ende der Präsentation aufbewahren. Jetzt übergebe ich den Bildschirm an Mingshan.

### **Mingshan:**

Hallo. Lassen Sie mich damit beginnen, meinen Bildschirm freizugeben. Okay. Ich danke Ihnen. Ich möchte Ihnen für die wunderbare Einführung danken. Ich bin Charlene und der Stiftung wirklich dankbar für die Organisation dieser Webinar Reihe. Denn es ist wirklich, wirklich wichtig, dass in dieser besonders schwierigen Zeit die Familien und die Wissenschaftler zusammenarbeiten. Ich denke, diese Plattform war für mich eine wunderbare Gelegenheit, meine Verbindung mit den Patienten fortzusetzen und mit verschiedenen Wissenschaftlern auf der ganzen Welt an diesem wichtigen Thema zusammenzuarbeiten.

# How different neurons in the brain contribute to *STXBP1* encephalopathy



Mingshan Xue

Department of Neuroscience  
Baylor College of Medicine  
Jan and Dan Duncan Neurological Research Institute



Jan and Dan Duncan  
Neurological Research Institute™



Heute werde ich also darüber sprechen, wie verschiedene Neuronen im Gehirn zur STXBP1-Enzephalopathie beitragen, und gegen Ende werde ich die Plattform wohl noch weiter öffnen, um einige Ihrer Fragen zu beantworten. Deshalb beabsichtige ich, diesen Vortrag etwas kürzer als gewöhnlich zu gestalten. Und ich versuche auch, ein Gleichgewicht zu finden zwischen einer eher wissenschaftlichen Ebene gegenüber Wissenschaftlern und einer allgemeineren Ebene

gegenüber Patientenfamilien. Ich hoffe also, dass ich beides tun kann, aber wenn etwas unklar ist, stellen Sie bitte einfach die Frage. Wenn Sie mehr Details über ein bestimmtes wissenschaftliches Experiment wissen wollen, stellen Sie bitte auch Fragen. Die meisten der Studien, die ich heute vorstellen werde, wurden also von zwei talentierten Postdocs in meinem Labor durchgeführt. Charles, den Sie letztes Jahr auf der Familienkonferenz kennen gelernt haben. Und Joanne, hoffentlich lernen Sie sie bald kennen.



Joo Hyun (Joanne) Kim, Ph.D.



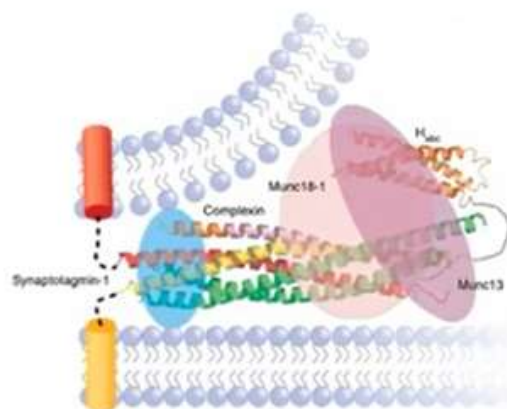
Wu (Charles) Chen, Ph.D.

Charlene hat mich gebeten, Ihnen eine Art kurze Einführung in meinen beruflichen Werdegang zu geben und Ihnen zu erklären, wie ich in die Studie der STXBP1-Enzephalopathie eingestiegen bin. Sie haben gerade von ihr erfahren, dass ich meinen Dokortitel vom Baylor College of Medicine erhalten habe, wo ich eigentlich die molekularen Mechanismen der Neurotransmitterfreisetzung untersucht habe.

## Career path



- 2004–2009: Ph.D., molecular mechanisms of neurotransmitter release



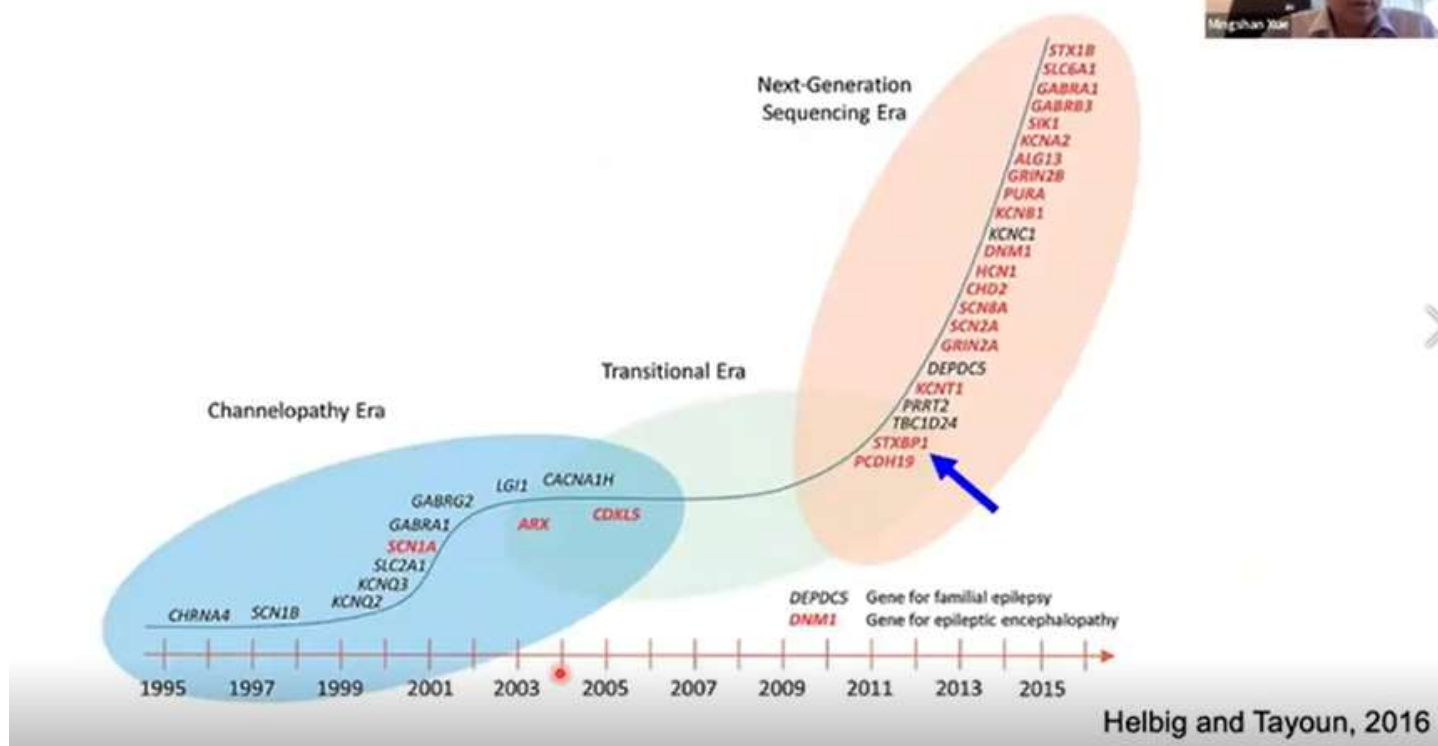
Rizo and Rosenmund, 2008

- 2009–2014: Postdoc, structure and function of visual cortical circuits
- 2014–now: PI, *STXBP1* encephalopathy

Im Grunde habe ich also diesen Proteinkomplex studiert, und wie dieser Proteinkomplex die Vesikelfusion vermittelt. In diesem Diagramm im Bild oben sehen Sie, dass dies die Plasmamembran ist, und dies ist die synaptische Vesikelmembran. Und Sie haben diesen Proteinkomplex und zu diesem Zeitpunkt kennt wahrscheinlich jeder den Namen STXBP1, auch Munc18-1 genannt, richtig? Denn dieses Protein ist ein entscheidender Bestandteil dieses Proteinkomplexes, der die Vesikelfusion vermittelt.

Ich hatte also untersucht, wie dieses andere Molekül diesen Prozess vermittelt, obwohl wir damals nicht wirklich wussten, dass Munc-18 an dieser Erkrankung beteiligt ist. Nach meiner Doktorarbeit ging ich also zu einem Postdoc über, wo ich die Struktur und Funktion der kortikalen Schaltkreise, insbesondere im visuellen Kortex der Maus, untersuchte. Und 2014 begann ich dann mein Labor am Jan and Dan Duncan Neurological Research Institute und am Baylor College of Medicine, wo ich begann, die STXBP1-Enzephalopathie zu untersuchen. Warum ist dies also der Fall?

## Timeline of gene discovery in human epile



Tatsächlich war die Erkrankung also so, dass die STXBP1-Mutation bei menschlicher Epilepsie tatsächlich 2008 identifiziert wurde. Das war sozusagen gegen Ende meiner Doktorarbeit. Ich sah die Studie und sagte: "Oh, das ist sehr interessant, aber wissen Sie, es ist relevant. Aber da ich kurz vor dem Abschluss stand, habe ich mich auf ein ganz anderes Gebiet begeben. Ich wusste also davon, habe aber nicht wirklich viel gemacht. Aber nach zwei Jahren als Postdoc hatte ich die Gelegenheit, Caroline DeLuca zu treffen, und ich bin sicher, dass viele von Ihnen Caroline gekannt haben und ihre Mutter Elizabeth kennen.



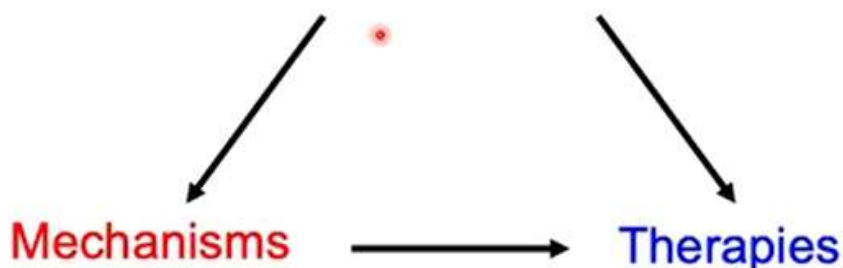
Caroline DeLuca (1997 – 2016)

Ich traf sie also etwa 30 Minuten lang. Sie hatte drei Anfälle direkt vor meinen Augen, was meine Gefühle über diese Erkrankung wirklich so tiefgreifend verändert hat. Ich denke also, man kann in gewisser Weise sagen, dass Caroline mich in dieser 30-minütigen Sitzung im Grunde genommen davon überzeugt hat, dass ich diese Erkrankung untersuchen sollte, sobald ich mein eigenes Labor hätte, was auch tatsächlich geschehen ist. Zwei oder drei Jahre später, als ich mit meinem Labor begann, begann ich mit diesem Forschungsprogramm, das sich auf die STXBP1-Enzephalopathie konzentrierte. Im Grunde hat mein Labor jetzt also drei Forschungsziele.

## Lab research directions



### Mouse models of *STXBP1* encephalopathy

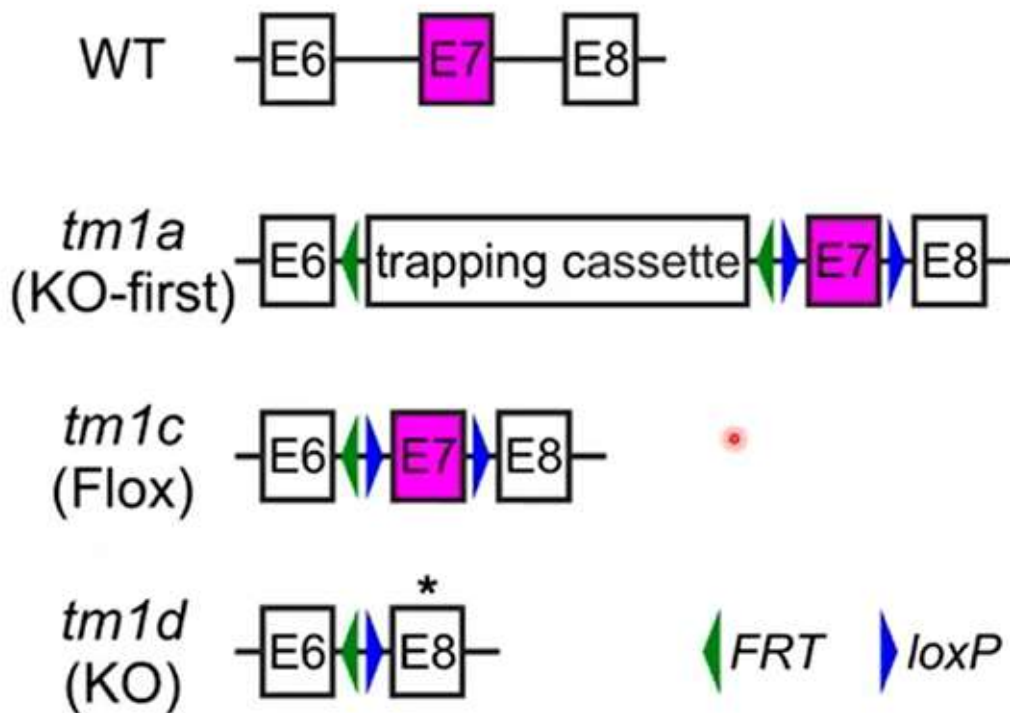


Das erste ist die Erstellung von Mausmodellen für diese Erkrankung, deren Ergebnisse Charles und ich im vergangenen Jahr auf dieser Gründungskonferenz vorgestellt haben. Sobald wir diese Tiermodelle haben, wollen wir zwei Dinge tun. Erstens wollen wir diese Tiermodelle nutzen, um den Mechanismus zu verstehen, z.B. warum diese Krankheit auftritt, wie diese Krankheit entsteht. Wir wollen dieses Tier auch zur Entwicklung von Therapien verwenden. Jede Therapie, die wir entwickeln können, müssen wir zuerst an diesem Tiermodell testen. Natürlich wird uns das Forschung des Mechanismus der Krankheit helfen, den Mechanismus zu verstehen und Therapien besser zu entwickeln. So sehe ich



also diese drei Bereiche miteinander verbunden. Heute werde ich mich also hauptsächlich auf den Mechanismus der Krankheit konzentrieren, aber beim nächsten Mal werden wir hoffentlich mehr über die Therapien sprechen können. Bevor ich auf die mechanistische Untersuchung dieser Krankheit eingehe, möchte ich kurz auf unsere Tiermodelle eingehen und alle auf die gleiche Folie bringen. Und ich bin sicher, dass einige von Ihnen diese Studie bereits gesehen haben, aber damit wird die Grundlage für die späteren unveröffentlichten Ergebnisse gelegt. Als ich mit dem Labor begann, habe ich hier mit mehreren Personen zusammengearbeitet, um mehrere Tiermodelle zur Untersuchung dieser Erkrankung zu erstellen. Im Wesentlichen bauen wir zwei Haploinsuffizienz-Modelle.

## New mouse *Stxbp1* alleles



Hongmei Chen  
Gabriele Schuster  
Hsiao-Tuan Chao

Diese so genannten tm1a und das frühere tm1d kann man im Grunde beide als Knockouts des STXBP1-Gens betrachten. Gleichzeitig haben wir auch dieses tm1c-Allel erstellt, das im Wesentlichen ein normales Tier ist, aber das Potenzial hat, ein Knockout-Tier zu werden. Wenn man ein Enzym namens Cre-Rekombinase verwendet, um dieses spezielle Exon zu entfernen, kann es zu einem Knockout-Tier werden. Dieses Tier wird also später in der Präsentation wichtig werden, weil wir dieses Tier zur selektiven Entfernung von STXBP1 in einer Untergruppe von Neuronen verwenden werden, um zu untersuchen, wie diese speziellen Arten von Neuronen zu dieser Störung beitragen. Daher haben wir zunächst mit der Charakterisierung dieser beiden Knockout-Allele begonnen. Hier ist eine tabellarische Zusammenfassung unserer Studie.

# Neurological characterization of *Stxbp1*<sup>+/-</sup>



Human phenotypes (% of patients)	Mouse phenotyping tests	Stxbp1 mouse models and phenotypes	
		<i>tm1d</i>	<i>tm1a</i>
Epilepsy (85%)	Video-EEG/EMG	Yes	Yes
Intellectual disability (100%)	Novel object recognition	↓	↓
	Contextual fear	↓	↓
	Cued fear	↓	↓
Motor deficits (92%)	Hindlimb clasping	Yes	Yes
	Grip strength	↓	↓
	Foot slip	↓	↓
	Vertical pole	↓	↓
	Rotarod	No	—
Developmental delay (64.3%)	Body weight	↓	↓

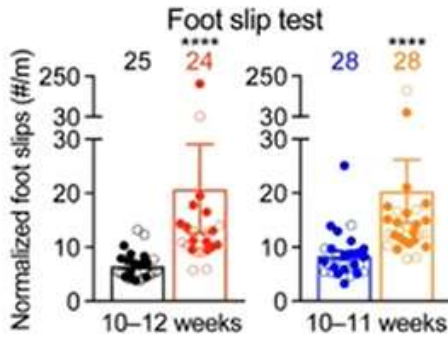
Wu Chen

In der linken Spalte im Bild oben führe ich die verschiedenen Symptome der menschlichen Patienten auf, wobei der Prozentsatz angibt, wie häufig dieses Symptom in der Patientenpopulation beobachtet wird. Zum Beispiel hat fast jeder einzelne Patient eine geistige Behinderung und 85% der Patienten haben Epilepsie. So charakterisieren wir also diese Erkrankung. Vieles davon haben Sie bereits in den vorangegangenen Webinaren gehört. In der zweiten Spalte führe ich also eine Reihe von neurologischen Untersuchungen auf, die wir am Tier, an der Maus, durchführen können, in diesem Fall mit einer gewissen Verbindung zu den menschlichen Phänotypen. Wir können zum Beispiel auch Video-EEG-Aufnahmen bei Tieren machen, um sie zu untersuchen, wenn sie Anfälle haben. Wir können eine Vielzahl von Verhaltenstests durchführen, um ihre kognitiven Funktionen als Proxy für die geistige Behinderung zu untersuchen. Wir können auch eine Reihe von motorischen Tests durchführen, um ihre motorischen Funktionen zu beurteilen. Aus dieser Studie haben wir also tatsächlich herausgefunden, dass sowohl *tm1d* als auch *tm1a* sehr ähnliche Phänotypen haben und, was wichtig ist, sie resümieren die meisten der Symptome, die wir bei menschlichen Patienten beobachtet haben. In dieser Tabelle im Bild oben bedeutet also das "Ja", dass das Tier die ähnlichen Phänotypen hat, und das "Nein", dass sie kein Problem haben. Die Pfeile nach unten bedeuten, dass die Fähigkeit des Tieres, diese Aufgabe zu erfüllen, vermindert ist. Wie Sie hier sehen können, ist dies, der Lerngedächtnistest, die Fähigkeit des Tieres, zu lernen und sich Dinge zu merken, reduziert, und auch seine Motorik ist vermindert. Und darüber hinaus betrachten wir einige dieser psychiatrischen Phänotypen, zum Beispiel Hyperaktivität, Angst und autistische Merkmale. Hier bedeutet also der Pfeil nach oben, dass das Tier zum Beispiel hyperaktiver und ängstlicher wird. Auch hier sieht man also, dass beide Tiermodelle sehr ähnliche Phänotypen aufweisen und dass sie viele Phänotypen wieder erfassen, die wir bei menschlichen Patienten sehen. Ohne all dies durchgehen zu müssen, werde ich Ihnen also bei jedem einzelnen Assay zwei, drei Schlüsselergebnisse zeigen, um Sie mit einigen der von uns untersuchten Assays vertraut zu machen. Als erstes betrachten wir also die motorische Funktion dieses Tieres.

# Stxbp1<sup>+/-</sup> mice show impaired motor func



Noldus

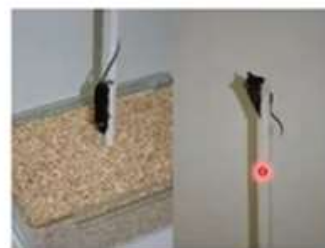


Hier legen Sie also dieses Tier auf diesen Drahtgitter wie im Bild oben und lassen das Tier laufen. Das Tier muss also seine Pfote genau auf diesen Draht legen. Sonst machen sie einen Fehler. Dann wird es sich als ein Ausrutscher zeigen. So charakterisieren wir also ihre Fähigkeit, auf diesem Drahtgitter zu laufen. Auf dieser Grafik oben im Bild sehen Sie also Folgendes: Schwarz und Blau sind normale Tiere, Weiß und Gelb sind mutierte Tiere. Die ausgefüllten Kreise sind also männliche Tiere und die leeren Kreise sind weiblich. Wie Sie hier sehen können, machen die mutierten Tiere sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren deutlich mehr Fehler als der Wildtyp oder die normalen Tiere. Ein anderer motorischer Test wird als Vertikalstangen-Test bezeichnet, bei dem wir das Tier einfach mit dem Gesicht nach oben in der Nähe des Endes dieser Stange, nahe der Spitze dieser Stange im Bild unten rechts, aufstellen.

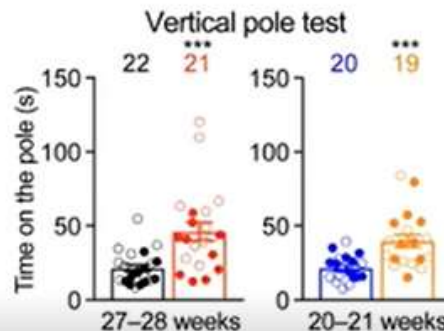
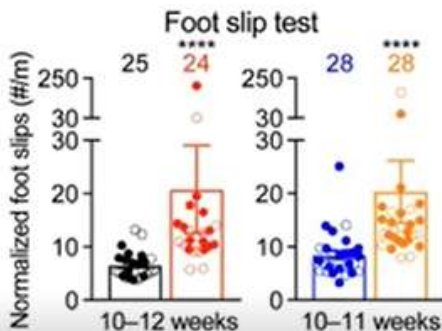
# Stxbp1<sup>+/-</sup> mice show impaired motor func



Noldus



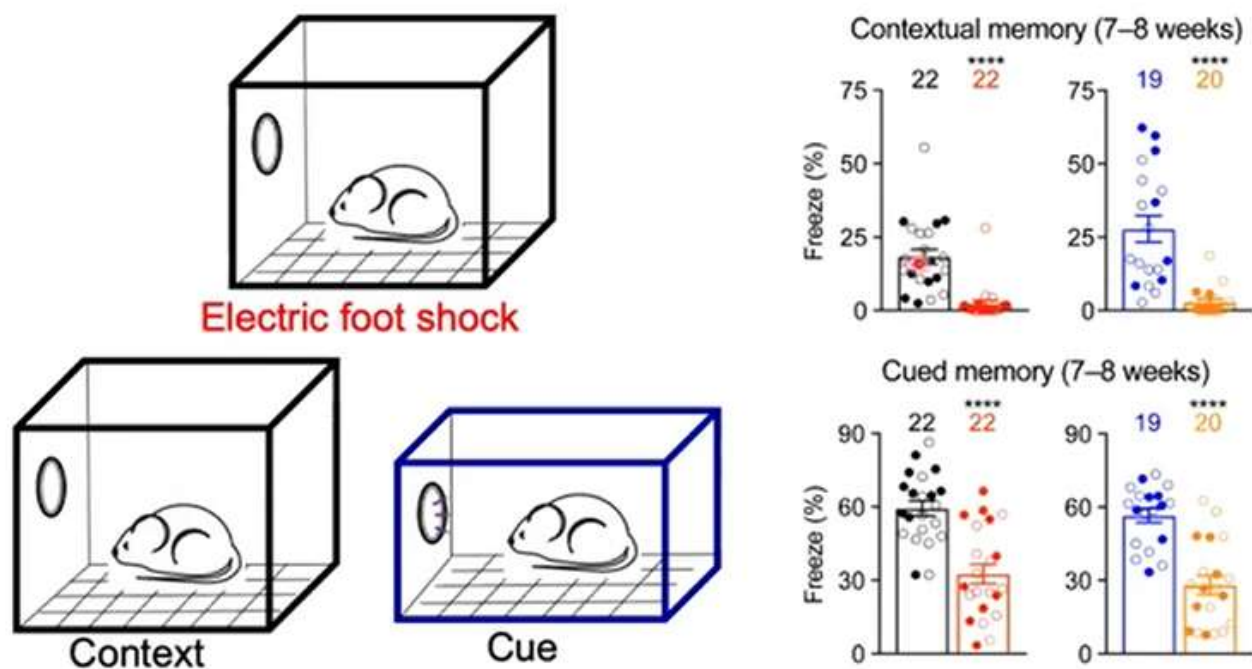
QPSNeuro



Das Tier müsste also nach oben klettern, sich dann umdrehen und dann wieder nach unten zum unteren Ende dieser Stange zurückkehren. Es dauert also eindeutig länger, bis das mutierte Tier diese Aufgaben erledigt hat, was wiederum

darauf hindeutet, dass seine motorischen Funktionen beeinträchtigt sind. Um also ihre kognitive Funktion zu untersuchen, verwenden wir einen Assay, der als Angstkonditionierung bezeichnet wird, um im Grunde genommen das Gedächtnis dieser Tiere zu untersuchen. Man nimmt also eine Kiste und steckt die Maus in diese Kiste, spielt ein kleines Lied und gibt dem Tier einen elektrischen Schlag auf den Fuß, gefolgt von dem Lied, das man benutzt. Es ist also ein bisschen schmerzhaft für das Tier.

## ***Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice show memory deficits in Pavlovian fear conditioning**



Das Tier wird sich also an diese schlechte Erfahrung erinnern. Am nächsten Tag legen Sie das Tier also wieder in die gleiche Box zurück, nun ohne das Lied zu spielen und auch ohne das Tier zu schocken. Aber wenn dieses Tier sich daran erinnert, dass es gestern in dieser Box war, wo es diesen Fußschock bekam, dann wird sich dieses Tier an dieses Ereignis erinnern und Angst haben, und wenn das Tier Angst hat, wird es erstarren. Also benutzen wir dieses Einfrierverhalten als Proxy für sein Gedächtnis. Ein weiterer Test ist, dass Sie dieses Tier in eine andere Box stecken. Dem Tier wird also klar, okay, dies ist eine andere Umgebung, aber Sie spielen dasselbe Lied, das das Tier gestern gehört hat. Wenn das Tier sich daran erinnert, dass auf dieses Lied ein Fußschock folgt, dann wird dieses Tier Angst haben. Wieder wird es erstarren. Also verwenden wir diese beiden Einfrierverhaltensweisen, um zu messen, wie gut sich das Tier an diese Umgebung erinnert. Das nennt man kontextuelles Gedächtnis. Oder wie gut sich dieses Tier an dieses Lied erinnert. Dies ist die induzierte Erinnerung. Hier ist nun im Bild oben, was wir gefunden haben. Das normale Tier, die schwarzen und blauen Datenpunkte, zeigen, dass die Tiere eindeutig einfrieren, aber die mutierten Tiere frieren nicht wirklich ein, was darauf hindeutet, dass sie sich nicht wirklich daran erinnern, was gestern passiert ist. Das gilt also für das kontextuelle Gedächtnis. Das gilt auch für die angezeigten Erinnerungen. Was ist also mit Epilepsie, Anfällen? Wir führten bei diesem Tier eine chronische Video-EEG-Aufzeichnung durch und fanden zwei Hauptphänotypen. Der eine nennt sich Spike-Wellen-Entladung, was typisch dafür ist, was Sie bei den Anfällen ohne Epilepsie und auch bei den myoklonischen Anfällen sehen.



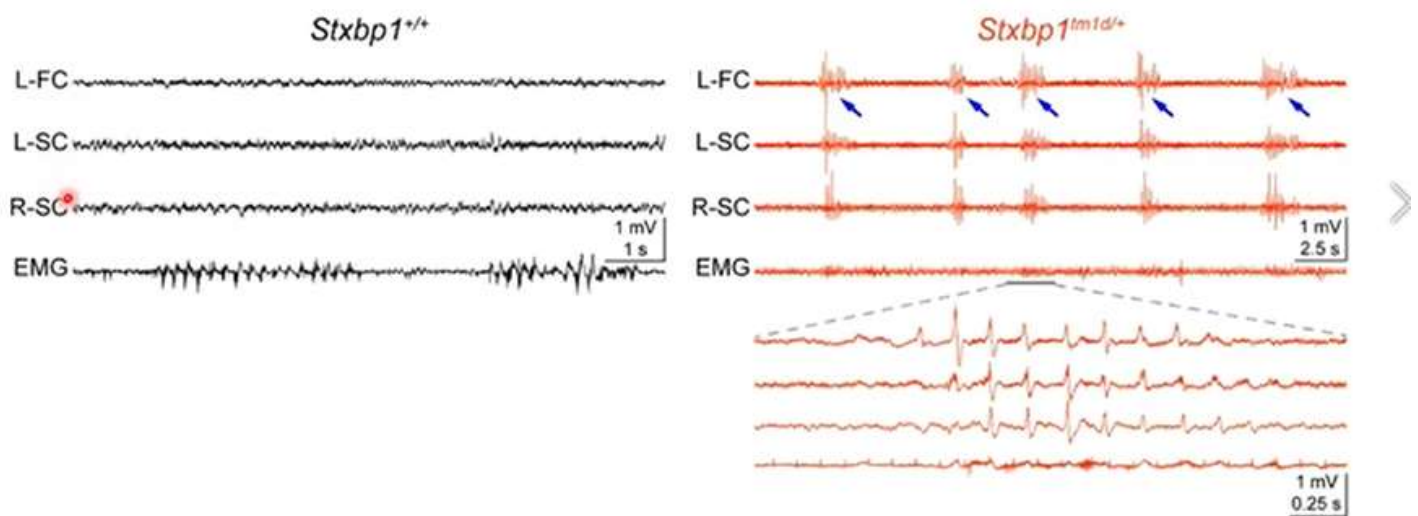
# Cortical hyperexcitability and epileptic seizures in *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice



- Chronic video-EEG/EMG recordings in 4–8-week old, freely move mice for at least 3 days
- Spike-wave discharges (SWDs)
- Myoclonic seizures

Hier oben im Bild ist also das, was Sie normalerweise bei einem normalen Tier sehen werden. Dies unten im Bild sind also die EEG-Aufzeichnungen aus dem frontalen Kortex, aus dem somatischen sensorischen Kortex, links und rechts.

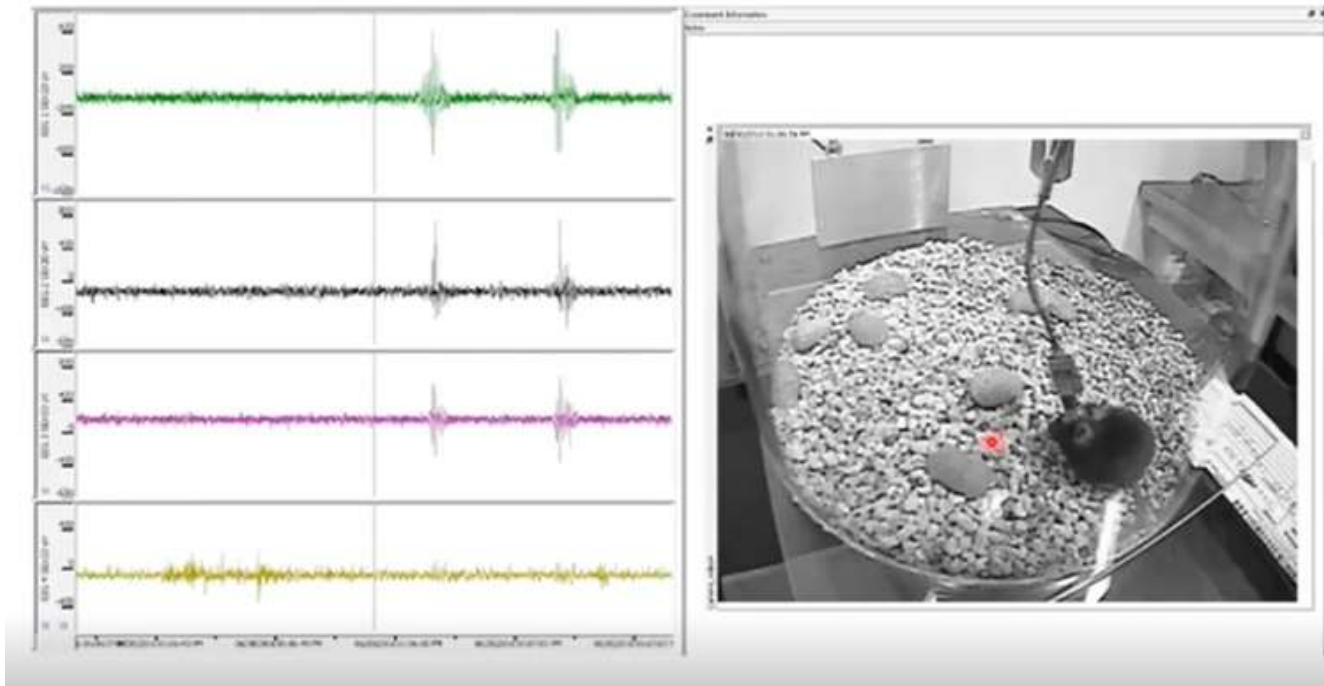
## Frequent SWDs in *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice



Und die letzte Spur zeigt Ihnen das EMG, den Muskel, der die Muskelaktivität anzeigt. Wenn Sie sich das mutierte Tier ansehen, beobachten Sie sehr oft diese Spikewellenentladung. Wenn Sie eines dieser Ereignisse ausdehnen, können Sie den Spike und die Welle deutlich sehen.

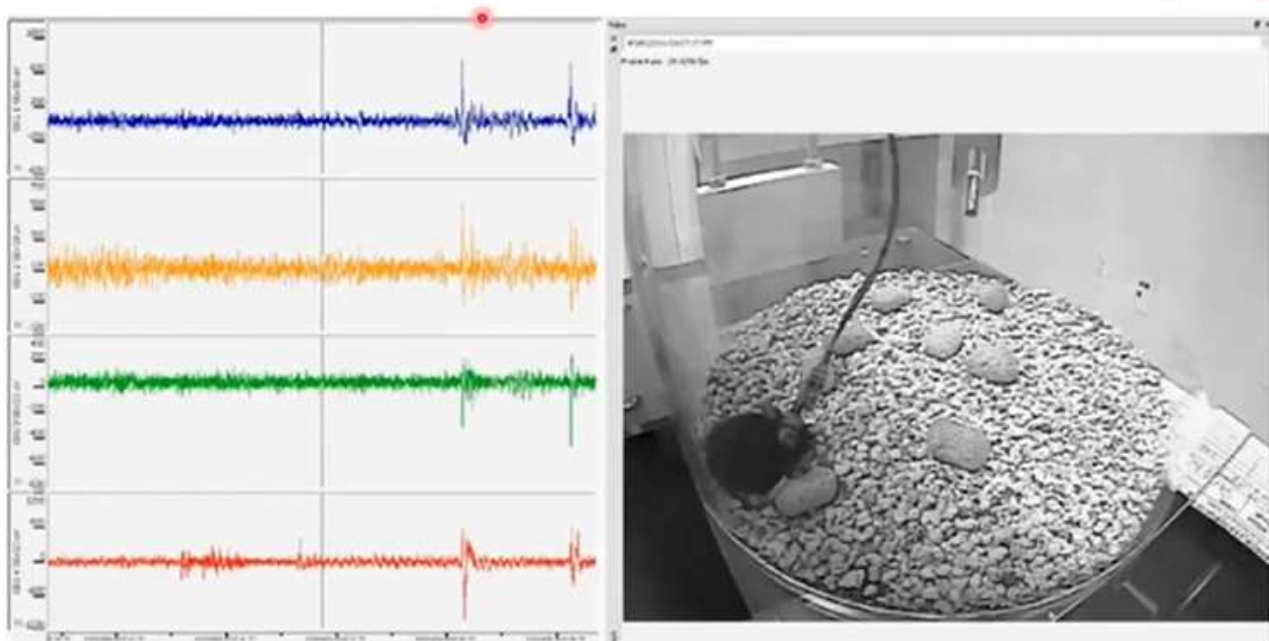
Das ist also sehr, sehr häufig bei diesen Tieren. Hier unten im Bild ist ein Video (siehe Video), das Ihnen ein solches Tier mit einer solchen Spike-Wellenentladung zeigt.

# Frequent SWDs in *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice



Was Sie hier sehen werden, ist, dass diese drei, obersten drei Kanäle das EEG sind, der letzte ist das EMG. Diese vertikale Linie zeigt also genau das aktuelle Bild dieses Videos. Wie Sie also hier sehen können, erfährt dieses Tier diese Spitzen- und Wellenentladung, und zwar viele hintereinander, nicht wahr? Wir machen also diese Art der chronischen Aufzeichnung, und wir haben auch einen myoklonischen Anfall beobachtet, der zwei verschiedene Formen hat. Die eine ist diese Art von milderer Form. Wir nennen sie myoklonischen Ruck.

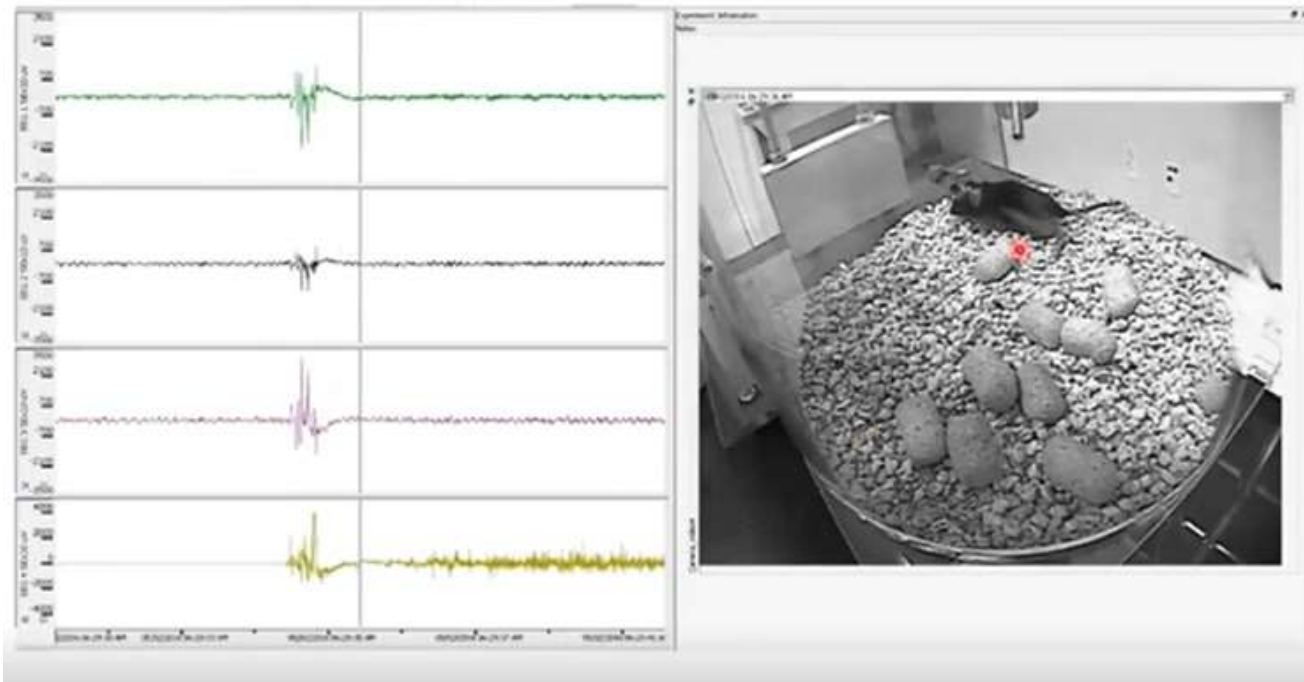
# Myoclonic jerks in *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice



Wu Chen

In dieser EEG-Aufzeichnung sehen Sie eine große Spitze, weil das Tier zuckt oder mit dem Körper zuckt. Und das geschieht auch viele Male hintereinander. Es handelt sich also um eine leichte Form des myoklonischen Anfalls. Eine andere dramatischere Version dieses myoklonischen Anfalls ist diese im Bild unten.

# Myoclonic jumps in *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice



Wir nennen es myoklonischen Sprung. Hier ist also ein Tier, während es schläft. Und wie Sie sehen können, war das EEG ziemlich ruhig, aber plötzlich springt dieses Tier auf die andere Seite des Käfigs und wacht dann auf. Dies geschieht also im Grunde während des Schlafes. Es handelt sich also eher um eine dramatische Version dieses myoklonischen Anfalls. Ich hoffe also, dass ich Ihnen hier gezeigt habe, dass wir zwei Tiermodelle haben, die einige der Hauptmerkmale dieser Erkrankung resümieren, darunter geistige Behinderung, Epilepsie und Motorik.

## Conclusion 1



- *Stxbp1* haploinsufficient mice recapitulate the key neurological phenotypes of *STXBP1* encephalopathy.
  - Intellectual disabilities
  - Epilepsy
  - Motor dysfunctions

An dieser Stelle möchte ich betonen, dass diese Tiermodelle für die Haploinsuffizienz am relevantesten sind, weil es sich um Knockout-Tiere handelt. Wie wir wissen, tragen unter den menschlichen Patienten etwa 60% der Patienten eine trunkierte Mutation, die von diesen Modellen im Grunde genommen nachgeahmt werden, aber dann gibt es etwa 40% der Patienten, die eine Missense Mutation tragen. Und diese Missense Mutationen haben möglicherweise einen anderen Krankheitsmechanismus, wie Sie aus dem vorherigen Vortrag gehört haben. Es ist also wichtig zu erkennen, dass dieses Tiermodell den Phänotyp der Missense Mutation rekapitulieren kann oder auch nicht. Deshalb ist es für uns auch wichtig, der Gemeinschaft anzubieten, mehrere Missense Mutationsmodelle zu etablieren und auch diese Tiermodelle zu untersuchen. Ich denke, das Labor von Jacqueline Burré arbeitet im Grunde genommen an dieser Frage, und ich hoffe, dass wir in naher Zukunft einen gewissen Einblick erhalten werden. Ausgehend von diesem Tiermodell zweigen wir nun also in zwei verschiedene Richtungen ab. Die eine besteht darin, dieses Tiermodell zur Untersuchung des Krankheitsmechanismus zu verwenden.

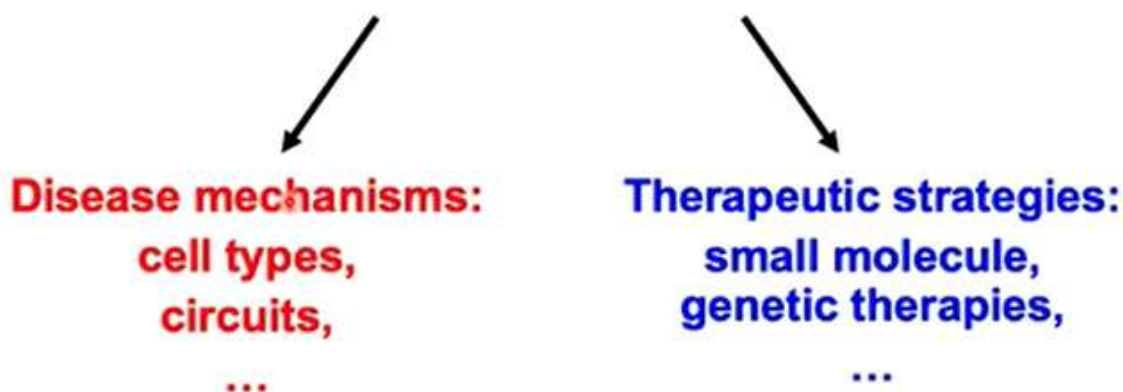


Wir wollen zum Beispiel verstehen, wie verschiedene Zelltypen zu dieser Störung beitragen, welche Zelltypen wichtig sind und wie diese Störung der Synapse schließlich die Funktion der Schaltkreise, also die Funktion des Gehirnnetzwerks, beeinträchtigt.

## Conclusion 1



- *Stxbp1* haploinsufficient mice recapitulate the key neurological phenotypes of *STXBP1* encephalopathy.
  - Intellectual disabilities
  - Epilepsy
  - Motor dysfunctions



Wir können dieses Tiermodell auch für die Entwicklung von Therapien nutzen. Natürlich gibt es viele verschiedene Therapien, Möglichkeiten, Therapien zu entwickeln. Kein einzelnes Labor kann sie alle durchführen, richtig. Aber wir konzentrieren uns hauptsächlich auf den genetischen Ansatz, aber andere Labors konzentrieren sich auf kleine Moleküle und so weiter. Es bleibt zu hoffen, dass diese Tiermodelle für jeden nützlich werden, der seine Therapien testen möchte. Nicht wahr? Für den Rest des Vortrags werde ich mich also wirklich auf den Zelltyp konzentrieren. Wie ist die Frage zu beantworten: Welche Zelltypen sind für die Pathogenese dieser Erkrankung entscheidend?

## What cell types are critical to the pathogenesis of *STXBP1* encephalopathy?



- Help understand the mechanisms underlying *STXBP1* encephalopathy
- Identify important targets for therapies

Warum ist dies eine wichtige Frage? Nun, meiner Ansicht nach hat sie zwei Funktionen, richtig? Erstens wird sie uns helfen, den Mechanismus zu verstehen, der der *STXBP1*-Enzephalopathie zugrunde liegt. Und, was vielleicht noch wichtiger ist, diese Art von Studie wird uns helfen, das wichtige Ziel für die Therapie, für die Entwicklung jeglicher Therapien, zu identifizieren. Natürlich ist dieses Gen in allen Nervenzellen vorhanden. In einer idealen Therapie sollten wir in der Lage sein, alle Neuronen zu behandeln, unabhängig davon, wo die Funktionsstörung auftritt. Wenn das jedoch mit der gegenwärtigen Technologie nicht möglich ist, dann wollen wir wissen, was unsere Priorität sein wird. Welches

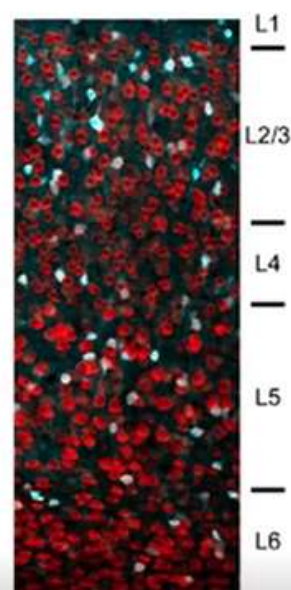
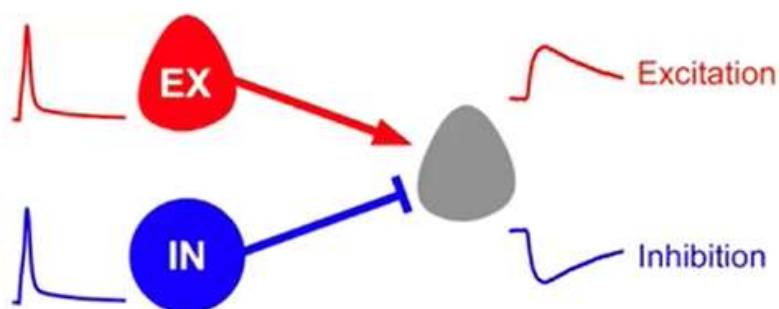


werden die Zelltypen sein, die für diese Erkrankung am kritischsten, am wichtigsten sind? Dann sollten wir sicherstellen, dass unsere Therapie zuerst auf diese Neuronen oder Hirnregionen abzielt. Deshalb ist dies also eine wichtige Frage.

## Two main neuron types in the brain

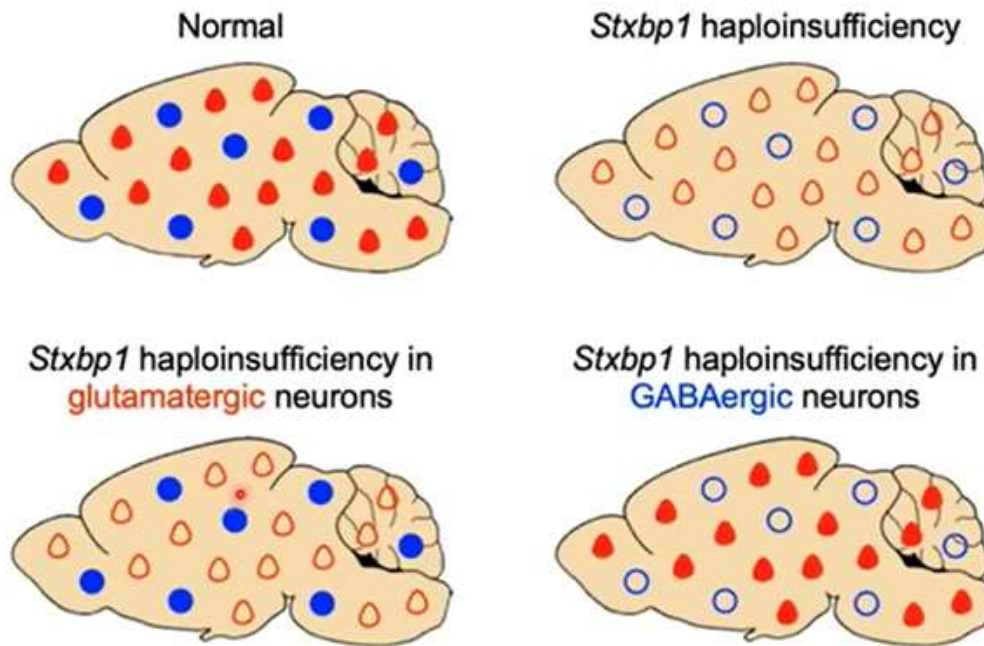


- **Glutamatergic excitatory (EX) neurons: 80-85%**
- **GABAergic inhibitory (IN) neurons: 15-20%**



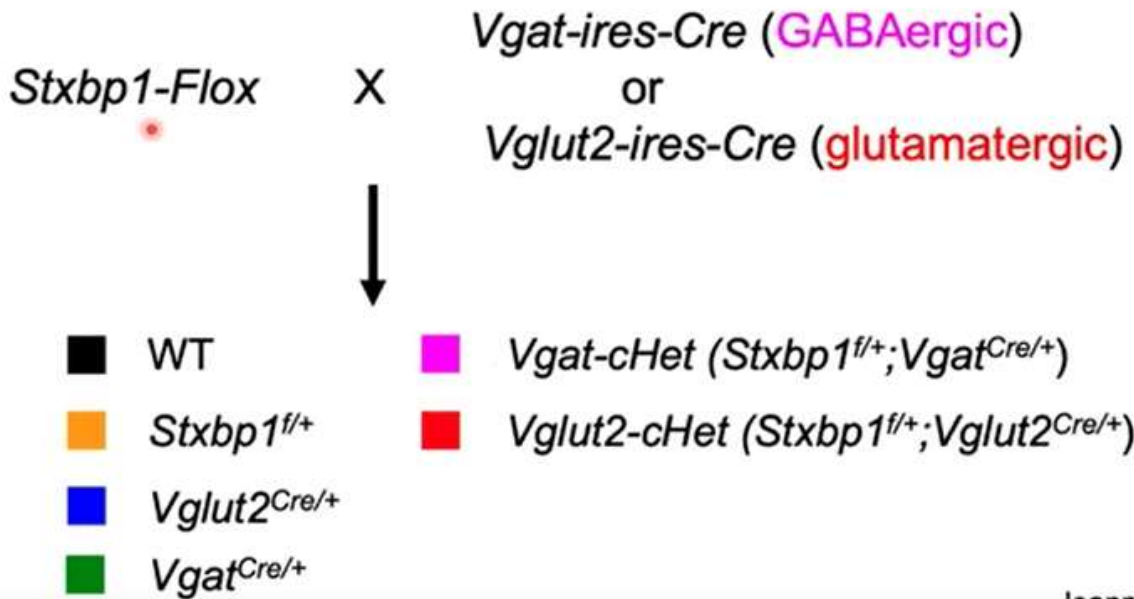
Wir beginnen also mit den beiden im Gehirn an häufigsten vorkommenden Zelltypen oben im Bild, den glutamatergen exzitatorischen Neuronen, die etwa 80 bis 85% der Neuronen im Gehirn ausmachen, und den GABAergen inhibitorischen Neuronen, die etwa 15 bis 20% ausmachen, richtig? Hier ist also oben ein Bild, das Ihnen den Kortex einer Maus zeigt, wo diese roten Blutkörperchen im Wesentlichen die glutamatergen exzitatorischen Neuronen markieren. Diese hellblauen Zellen hingegen sind die GABAergen inhibitorischen Neuronen. Wenn das exzitatorische Neuron aktiviert wird, schüttet es Neurotransmitter auf sein Ziel aus, um sein Ziel stärker zu erregen. Das Zielneuron muss also aktiviert werden. Das hemmende Neuron setzt einen anderen Neurotransmitter namens GABA frei. Durch GABA wird das Zielneuron gehemmt. Es macht dieses Neuron also weniger aktiv. Im Gehirn ist es also entscheidend, dass diese beiden Arten von Signalen - Erregung oder Hemmung - ein angemessenes Gleichgewicht erreichen, um verschiedene Arten von Gehirnfunktionen zu unterstützen. Für unsere Studie wollen wir also eine zelltypspezifische Perturbation am STXBP1 durchführen. Hier ist also die Idee.

# Cell type-specific *Stxbp1* haploinsufficiency



Dieses Bild oben zeigt Ihnen also ein Mäusehirn, ein normales Mäusehirn mit zwei Arten von Neuronen, die als die exzitatorische Neuronen und die inhibitorischen Neuronen bezeichnet werden. Und das andere ist ein mutiertes STXBP1-Gehirn. Das haploinsuffizienz-Gehirn, bei dem in jedem Neuron eine Kopie von STXBP1 fehlt, wie hier gezeigt. Wir wollen also zwei Mausmodelle erstellen. In einem Modell wollen wir normale GABAergen Zellen haben. Aber in jedem glutamatergen Neuron fehlt eine Kopie von STXBP1. Wenn dieses Tier einen ähnlichen Phänotyp aufweist wie dieses Haploinsuffizienzmodell, bedeutet das, dass das glutamaterge Neuron sehr wichtig ist, richtig? Denn nur das Fehlen eines Exemplars von STXBP1 aus dieser Population reicht aus, um das zu rekapitulieren, was wir im Haploinsuffizienzmodell sehen, d.h. glutamaterge Neuronen sind wichtig. Umgekehrt wollen wir ein Tiermodell erstellen, in dem das STXBP1 bei glutamatergen Neuronen intakt ist, bei GABAergen Neuronen jedoch eine Kopie fehlt. Auch hier gilt: Wenn dieses Tiermodell die Krankheit rekapituliert oder ein Aspekt der Krankheit aufweist, dann bedeutet das, dass diese GABAergen Neuronen wichtig sind. Richtig? Um dies zu erreichen, wenden wir also einen genetischen Trick an, bei dem wir das STXBP1-Flox-Tier, wie unten im Bild gezeigt wird, verwenden.

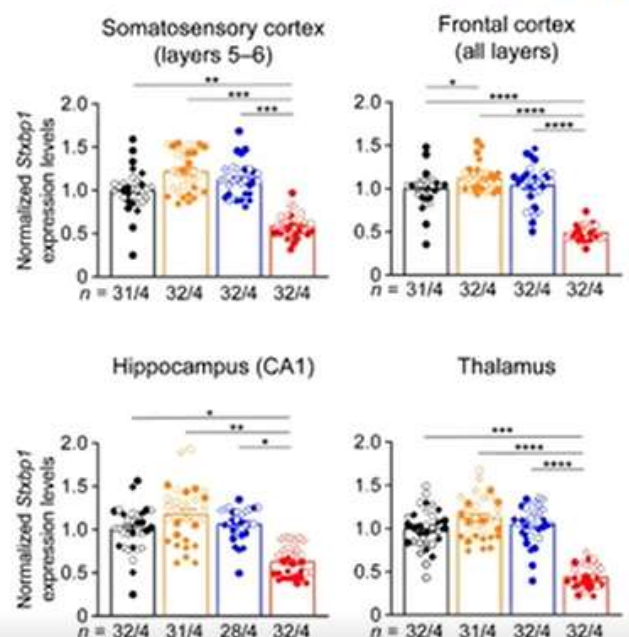
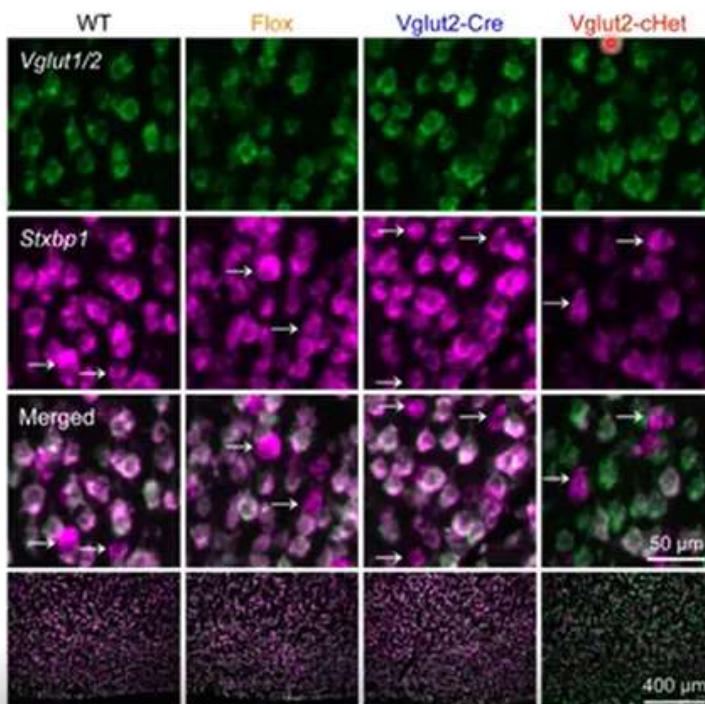
# Cell type-specific *Stxbp1* heterozygous knock



Joanne Kim

Dieses Tier habe ich Ihnen schon vorhin gezeigt. Dieses Tier ist normal, bis es ein Enzym bekommt, nämlich die Cre-Rekombinase, um STXBP1 zu löschen. Also können wir dieses Enzym spezifisch nur in GABAergen Neuronen oder in glutamatergen Neuronen haben. Daher sind wir in der Lage, diese zelltypspezifischen heterozygoten Knockouts von STXBP1 zu erzeugen. Aus dieser genetischen Manipulation erzeugen wir also sechs verschiedene Arten von Tieren. Das Tier könnte also völlig normal sein, oder das Tier kann eines der so genannten STXBP1-Flox-Allele tragen, welches ebenfalls normal sein sollte. Und, oder sie können diese beiden Cre-Transgene tragen, die das Enzym darstellen. Oder sie können STXBP1 aus GABAergen Zellen oder aus glutamatergen Zellen deletiert haben. Zuerst sehen wir uns also an, ob unsere genetische Manipulation erfolgreich ist.

## Glutamatergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup>

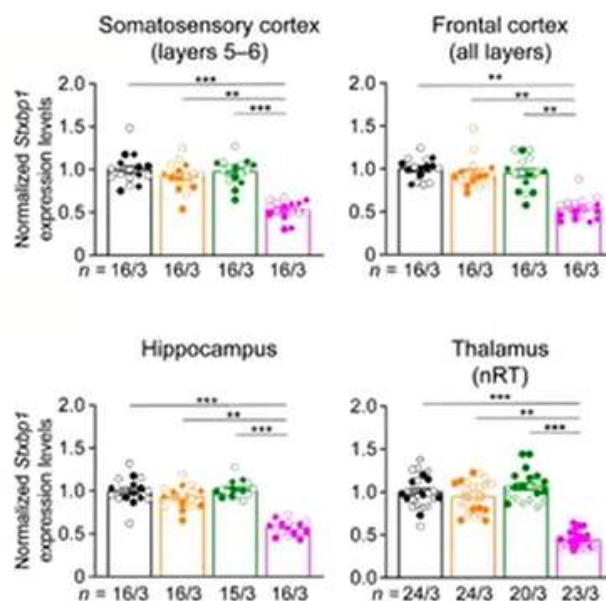
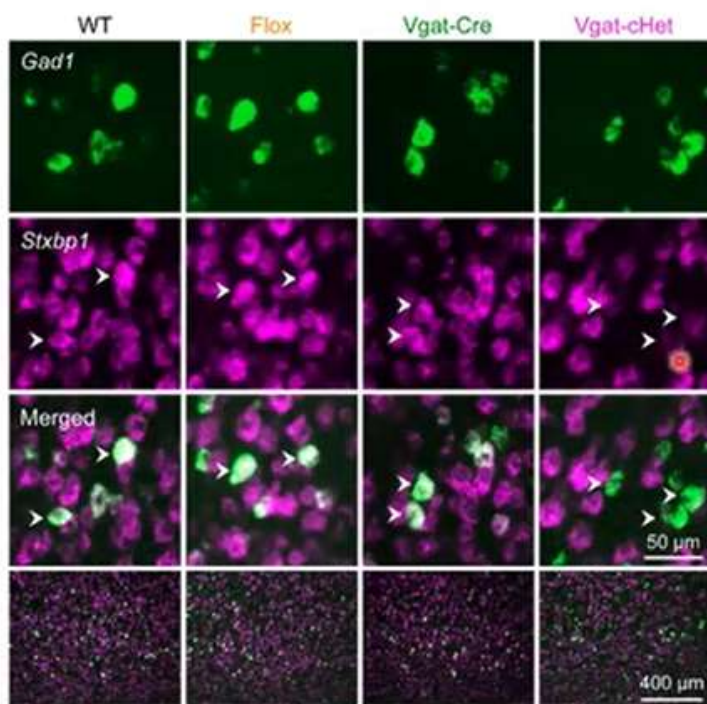


Hier oben ist also das Bild, um Ihnen den glutamatergen-spezifischen Knockout von STXBP1 zu zeigen. Hier sind also die vier verschiedenen Tiere. Die ersten drei sind also die Kontrollen, und dies ist das mutierte Tier. Das wäre Vglut1, und 2 sind die Marker zur Markierung der glutamatergen Neuronen. Und die magentafarbenen sind die STXBP1. Wie Sie also



hier sehen, sind die meisten dieser Neuronen grün. Die glutamatergen Neuronen zeigen eine Verringerung der STXBP1-Werte. Das deutet darauf hin, dass unsere Manipulation das STXBP1 in diesen glutamatergen Zellen reduziert hat, aber das können sie auch, also wird dies hier sozusagen quantifiziert. Wie Sie sehen können, haben wir den Kortex, den somatosensorischen Kortex, den frontalen Kortex, den Hippocampus, den Thalamus und viele andere Hirnregionen untersucht. Wir sahen eine ähnliche Reduktion der STXBP1-Spiegel, was darauf hindeutet, dass unsere genetische Manipulation gültig ist. Sehen Sie sich auch diese Zelle an, die mit diesen Pfeilen markiert sind. Das sind diese Vglut1/2-negativen Zellen, vermutlich sind es die GABAergen-Zellen. Sie haben also eigentlich ein normales Niveau. Was darauf hindeutet, dass unsere Manipulation spezifisch für eine glutamaterge Zelle ist. Und wir haben die GABAergen Zellen nicht beeinflusst.

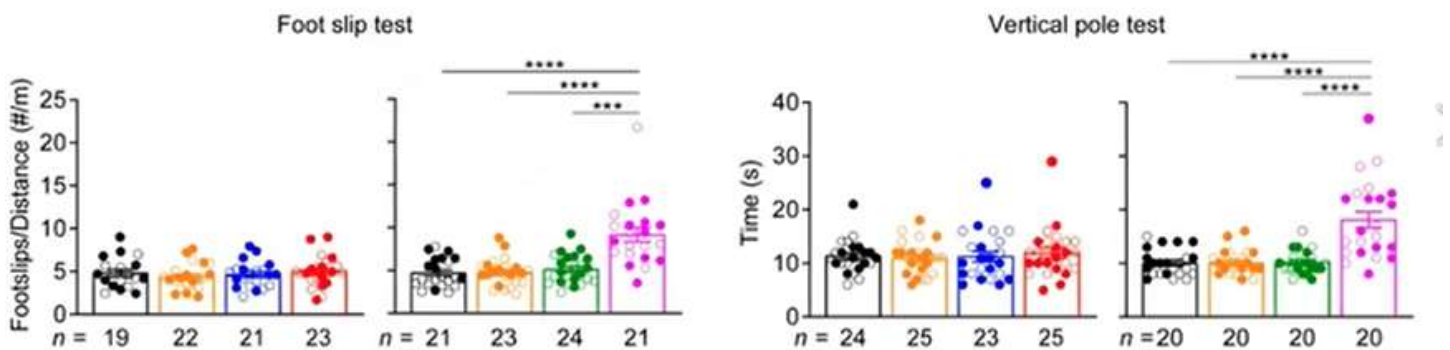
## GABAergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup>



Umgekehrt haben wir eine reziproke Manipulation, wie oben im Bild, vorgenommen. Jetzt entfernen wir diesmal gezielt eine Kopie von STXBP1 aus den GABAergen Zellen, die mit diesem hier gezeigten Gad1 gekennzeichnet ist. Wie Sie diese grünen Zellen sehen können, ist ihr STXBP1-Spiegel im Vergleich zu diesen Kontrollen reduziert. Es sind wiederum die glutamatergen Zellen, die hier die Gad1-negativen Zellen sind. Sie zeigen ein normales STXBP1. Auch diese Daten werden hier also quantifiziert. Jetzt haben wir also zwei Tiermodelle, von denen jedes spezifisch auf eine STXBP1-Disruption in glutamatergen Neuronen oder GABAergen Neuronen abzielt. Wir sehen uns also ihre motorischen Funktionen, wie im Bild unten, an; man führt diesen Test zum Abrutschen der Füße durch und legt das Tier auf das Drahtgitter und lässt es laufen.

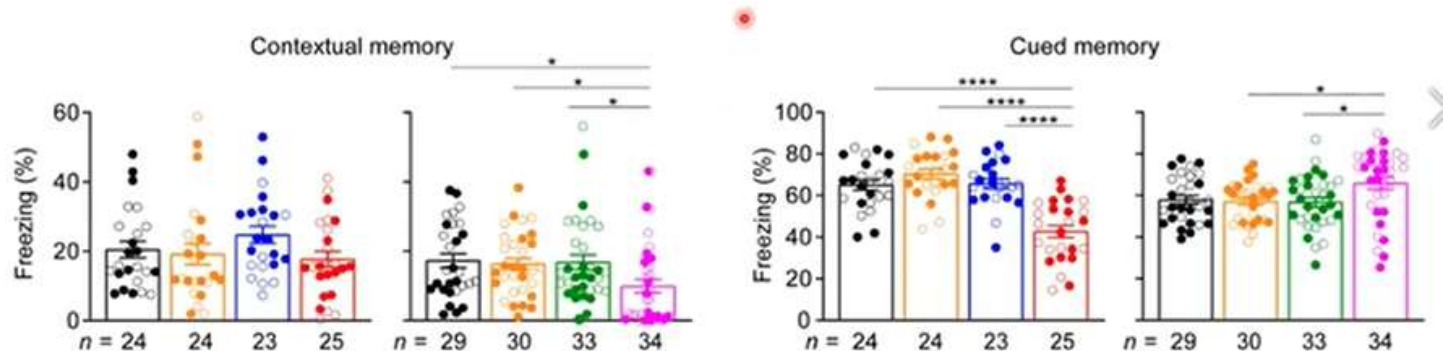


# GABAergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice show impaired motor functions



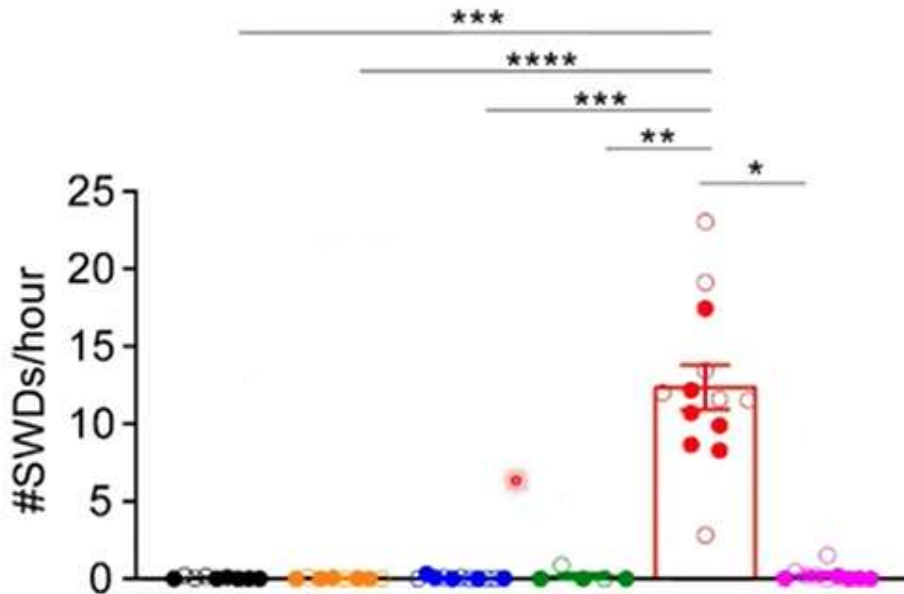
Und Sie sehen, dass die STXBP1-Mutanten, wenn Sie eine glutamaterge Probe haben, ähnlich funktionieren wie die Kontrolltiere, richtig? Sie haben also kein motorisches Defizit, während die GABAergen-spezifischen Mutanten, die hier gezeigt werden, wie Sie sehen können, mehr Fehler machen als die Kontrolltiere. Offensichtlich haben sie die motorische Dysfunktion. In ähnlicher Weise schneidet dieses Tier in diesem Vertikalpol-Test viel schlechter ab als die Kontrolltiere. Die glutamatergenspezifisch heterozygoten Tiere zeigen hingegen keinen solchen Phänotyp. Dies weist uns also bereits darauf hin, dass die GABAergen Zellen für diese Störung sehr wichtig sein könnten. Wir haben uns auch mit der kognitiven Funktion dieser beiden Modelle, wie im Bild unten, befasst, wobei wir etwas sehr Interessantes gefunden haben, weil die beiden unterschiedlichen Formen des Gedächtnisses von diesen beiden Tiermodellen unterschiedlich beeinflusst werden.

# GABAergic- and glutamatergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice show different memory deficits in Pavlovian fear conditioning



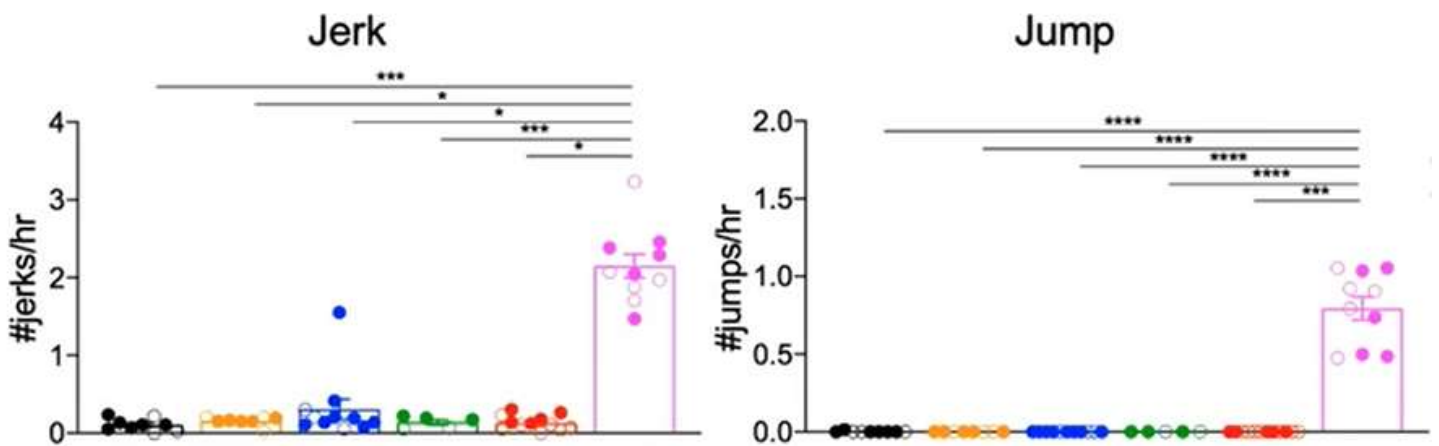
Also für das kontextuelle Gedächtnis ist die Fähigkeit des Tieres, sich an die Box zu erinnern gestört. Der Kontext ist bei dem GABAergen-spezifischen heterozygoten, knockout-fähigen Tier gestört, aber bei der glutamatergen Mutante ist er intakt. Aber das Erinnerungsvermögen, das durch den Gesang induzierte Einfrierverhalten, ist in den glutamatergen spezifischen Neuronen gestört oder reduziert, aber nicht wirklich in den GABAergen Mutanten. Sie könnten sogar etwas besser sein als ihre Kontrollen. Was ist also mit Epilepsie oder mit der Spike-Wellen-Entladung und den myoklonischen Anfällen? Auch hier haben wir uns die beiden Mutanten angesehen und einige recht interessante Unterschiede zwischen den beiden Tieren festgestellt.

# Frequent SWDs in **glutamatergic** but not **GABAergic-specific Stxbp1<sup>+/-</sup>**



Dies oben im Bild ist die Y-Achse, sie zeigt Ihnen die Frequenz der Spike-Wellen-Entladung. Wie Sie erwartet haben, zeigen dieser Wildtyp, die Flox- oder die Cre-Tiere, eine sehr minimale Spike-Wellen-Entladung. Und interessanterweise sehen Sie, dass die glutamatergen spezifischen Mutanten zeigen, dass ein großer Teil dieser Spike-Wellen-Entladung dem ähnelt, was Sie in den konstitutiv haploinsuffizienten Modellen sehen, aber die GABAergen spezifischen Mutanten haben nicht wirklich diesen Phänotyp. Betrachtet man jedoch die myoklonischen Anfälle im Bild unten, entweder beim Ruck oder beim Sprung, so ist das Ergebnis das Gegenteil, wobei die GABAergen Mutanten sowohl beim Ruck als auch beim Sprung viele dieser myoklonischen Anfälle zeigen, die glutamatergen Zellen scheinen in diesem Fall jedoch nicht betroffen zu sein.

# Frequent myoclonic seizures in **GABAergic-specific Stxbp1<sup>+/-</sup>** but not **glutamatergic-specific Stxbp1<sup>+/-</sup>**



Daher fassen wir alle unsere Studien zu diesen beiden unterschiedlichen Modellen hier im Bild unten zusammen. Dies ist eine ähnliche Tabelle, die ich Ihnen vorhin schon gezeigt habe.

# GABAergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice exhibit many features *STXBP1* encephalopathy



Human phenotypes (% of patients)	Mouse phenotyping tests	Stxbp1 mouse models and phenotypes		
		<i>tm1d</i>	<i>Vglut2-cHet</i>	<i>Vgat-cHet</i>
Epilepsy (85%)	Video-EEG/EMG	Yes	Yes	Yes
Intellectual disability (100%)	Novel object recognition	↓	No	No
	Contextual fear	↓	No	↓
	Cued fear	↓	↓	No
Motor deficits (92%)	Hindlimb clasping	Yes	No	Yes
	Foot slip	↓	No	↓
	Vertical pole	↓	No	↓
	Rotarod	No	No	No
Developmental delay (64.3%)	Body weight	↓	No	↓

Auch das Modell der konstitutiven Haploinsuffizienz habe ich hier zum Vergleich aufgeführt. Von hier aus können Sie sehen, dass das GABAerge konditional heterozygote Tier deutlich mehr Phänotypen aufweist als die glutamatergen konditional heterozygoten Tiere, insbesondere in den Bereichen der Motorik, nicht wahr?

Diese Tiere zeigen also tatsächlich eine Umklammerung der Hintergliedmaßen, sie haben ein geringeres Körpergewicht und schneiden in den motorischen Tests viel schlechter ab. Und sie haben auch frühe Verzögerungsphänotypen, die ich Ihnen nicht gezeigt habe. Auch hier im Bild unten, in diesen psychiatrischen Assays, zeigt dieses *Vgat*-Tier Phänotypen in mehr dieser verschiedenen Kategorien.

# GABAergic-specific *Stxbp1*<sup>+/-</sup> mice exhibit many features *STXBP1* encephalopathy



Human phenotypes (% of patients)	Mouse phenotyping tests	Stxbp1 mouse models and phenotypes		
		<i>tm1d</i>	<i>Vglut2-cHet</i>	<i>Vgat-cHet</i>
Hyperactivity (4%)	Open-field	↑	No	↑
Autistic traits (17%)	Three-chamber	No	No	No
	Partition	No	-	-
Aggressive behavior (3.4%)	Resident- intruder	↑	↑	↑
	Tube	↑	-	-
Anxiety (27%)	Elevated plus maze	↑	No	↑
	light-dark chamber	↑	No	No

Aber offensichtlich sind auch die glutamatergen Neuronen beteiligt. Da die glutamatergen heterozygoten Tiere eine Spike-Wellen-Entladung haben, sind bei diesem Tier auch die Abwesenheitsanfälle und ihr Gedächtnis, eine besondere Form des Gedächtnisses, betroffen. Aus dieser Studie haben wir also im Wesentlichen herausgefunden, dass die glutamatergen und die GABAergen Neuronen verschiedene oder unterschiedliche Aspekte dieser Krankheit vermitteln.



## Conclusion 2



- Glutamatergic and GABAergic neurons mediate distinct disease features with little overlap
- Dysfunction of GABAergic neurons critically contributes to the phenotypes of *Stxbp1* haploinsufficiency
- Distinct mechanisms of two seizure types in *Stxbp1* haploinsufficiency mouse models
- Reveal the possibility to selectively modulate disease phenotypes by targeting specific neurotransmitter systems

Und es gibt eine sehr kleine oder minimale Überlappung zwischen den beiden, was die Aspekte dieser Erkrankung betrifft. Und zweitens, dass wir erkennen, dass die Dysfunktion des GABAergen Neurons wirklich, wirklich kritisch für den Phänotyp dieser Tierkrankheitsmodelle zu sein scheint. Denn wenn man spezifisch nur eine Kopie von STXBP1 aus GABAergen Neuronen entfernt, konnten wir mehr vom Phänotyp in der STXBP1-Haploinsuffizienz sehen. Und es ist auch klar, dass die beiden unterschiedlichen Anfallstypen in diesen Tiermodellen durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Einer ist wahrscheinlich eher an den exzitatorischen Neuronen beteiligt, die höchstwahrscheinlich den Kortex und den Thalamus betreffen. Und der andere Typ, der myoklonische Ruck, ist stärker von der Dysfunktion der GABAergen Neuronen betroffen. Daher denken wir, dass diese Studie oder der Vergleich zwischen exzitatorischen und GABAergen Zellen die Möglichkeit aufzeigt, dass wir den Krankheitsphänotyp selektiv modulieren können, indem wir auf spezifische Neurotransmittersysteme zielen.

Wir müssen exzitatorische Neuronen oder die GABAergen inhibitorischen Neuronen als Angriffspunkt nehmen. Das wird natürlich Auswirkungen darauf haben, wie wir über Therapien denken, und hängt auch vom Ziel der Therapie ab, das uns helfen wird, darüber nachzudenken, was der Endpunkt der klinischen Studien sein wird. Welcher Phänotyp könnte für das Ziel der Therapien relevant sein?

Zusammenfassend kann man also sagen, dass wir zwei Modelle dieser Erkrankung sowohl mit genetischer Genauigkeit als auch mit der Plausibilität etabliert haben.



# Summary and future directions



- Established preclinical models of *STXBP1* encephalopathy with construct and face validity
  - To explore therapeutic strategies
- GABAergic synaptic dysfunction is a crucial contributor to disease pathogenesis
  - To determine the mechanisms underlying distinct deficits of different GABAergic synapses
- Glutamatergic synaptic dysfunction is important for the generation of SWDs
  - To determine the underlying circuit mechanisms

Wir hoffen also, mit diesen Tieren therapeutische Strategien, insbesondere genetische Strategien, zu erforschen. Natürlich stehen diese Tiermodelle, wie ich bereits erwähnt habe, jedem zur Verfügung, der andere Arten von therapeutischen Strategien, wie kleine Moleküle und so weiter, testen möchte. Und zweitens halten wir die GABAergen Neuronen für kritisch. So haben wir in einer anderen Studie tatsächlich festgestellt, dass diese *STXBP1*-Mutation verschiedene Typen von GABAergen Neuronen ebenfalls unterschiedlich beeinflusst. Wir wollen also verstehen, wie das geschieht. Und das sagt uns auch, dass wir für die Therapie wirklich sicherstellen wollen, dass wir die GABAergen Neuronen als Angriffspunkte nutzen. Wir sollten sicherstellen, dass wir in der Lage sind, die Fehlfunktionen der GABAergen Neuronen zu retten, um die Mehrzahl der Phänotypen zu behandeln. Und schließlich sind auch die glutamatergen Neuronen beteiligt, weil sie für die Erzeugung der Spike-Wave-Entladung wichtig sind. In diesem Fall interessieren wir uns besonders für die Schaltkreisdynamik, die dieser Art von Absence-Anfall-Aktivität zugrunde liegt, insbesondere für die Cortico-Thalamus-Wechselwirkungen. Bevor ich also aufhöre, möchte ich mich bei den Leuten im Labor bedanken, die zu diesen Studien beigetragen haben, insbesondere bei Charles und Joanne, und sie hatten auch Hilfe von einer Reihe von Leuten, darunter Jack, der die Elektrophysiologie gemacht hat.



# Acknowledgement



## Xue lab

- Zhao-Lin Cai, Ph.D.
- Hongmei Chen, B.S.
- **Wu Chen, Ph.D.**
- **Joanne Kim, Ph.D.**
- Colleen Longley, B.S.
- Armando Rivera, Ph.D.
  
- Eugene Chao, B.A.
- Jessica Messier, Ph.D.

## Collaborators

- Matthew Caudill, Ph.D.
- Hsiao-Tuan Chao, M.D., Ph.D.
- Shuang Hao, Ph.D.
- Gabriele Schuster, B.S.
- Corinne Spencer, Ph.D.
- John Swann, Ph.D.
- Jianrong Tang, Ph.D.
- Huda Zoghbi, M.D.

## Funding

- Caroline DeLuca Endowment
- Jan and Dan Duncan Neurological Research Institute
- Gordon and Mary Cain Pediatric Neurology Research Foundation
- Citizens United for Research in Epilepsy
- National Institutes of Health



Hongmei trug zur Erstellung der Tiermodelle bei, Colleen Longley trug zur Charakterisierung der molekularen Charakterisierung des Krankheitsmodells bei. Auch zwei ehemalige Labormitglieder, Eugene und Jessica, halfen bei der Analyse des EEG und auch der Elektrophysiologie. Hier oben im Bild sind also meine Mitarbeiter. Ohne sie wären wir nicht in der Lage, all diese Arbeit zu leisten und auch nicht in der Lage, diese Studien zu finanzieren und zu unterstützen. Ich höre also hier auf und sehe, dass es bereits einige Fragen gibt. Soll ich aufhören, den Bildschirm freigegeben und dann die Fragen beantworten?

### Charlene:

Großartig. Ja. Und Sie können Ihre Dias hochhalten oder austauschen. Danke, Mingshan, wir kommen jetzt zu den Fragen. Es gab ziemlich viele Fragen, wie Mingshan erwähnt hat. Und für diejenigen unter Ihnen, die noch eine Frage haben, klicken Sie bitte auf Ihre Frage- und Antwort-Schaltfläche am unteren Rand Ihres Zoom-Bildschirms, und Sie können Ihre Frage dort eingeben. Lassen Sie mich also mit dieser Frage beginnen. Glauben Sie, dass verschiedene Mutationen die exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen unterschiedlich beeinflussen könnten? Und eine verwandte Frage, die ebenfalls hereinkam: Gibt es verschiedene menschliche Patientengruppen mit unterschiedlichen Anfallsphänotypen, die sich irgendwie an die Mausmodelle anpassen würden, an denen Sie gearbeitet haben?

### Mingshan:

Ja, ich denke, das ist eine großartige Frage. Ich denke deshalb, weil die Wahrheit ist, dass wir keine experimentellen Beweise haben. Meine Überlegungen zu dieser Frage haben sich also im Laufe der Zeit gewissermaßen verändert, wenn man die Tiermodelle oder die menschlichen Patienten vergleicht. Dieses Protein funktioniert also in verschiedenen Klassen von Neuronen ähnlich. Exzitatorische oder inhibitorische Neuronen. Und der Grund, warum die Mutation verschiedene Arten von Neuronen unterschiedlich beeinflussen könnte, liegt meiner Meinung nach in der Empfindlichkeit des Neurons für die Senkung des STXBP1-Spiegels. Vielleicht reagieren die erregten - die hemmenden Neuronen, die hemmenden GABAergen-Neuronen - am empfindlichsten auf eine 50%ige Senkung des STXBP1-Spiegels. Nun, wenn Sie eine andere Mutation haben, lassen Sie uns die beiden verschiedenen Fälle vergleichen. Der eine Fall ist die Haploinsuffizienz, der andere eine Missense Mutation. Dann hängt es wirklich von der Art der Missense Mutation ab, ob das Neuron empfindlicher auf die durch diese Mutation vermittelte Störung der Missense Mutation reagiert. Derzeit wissen wir es also noch nicht, aber wir können ein paar Missense Mutations-Tiermodelle erstellen, mit denen wir diese Idee tatsächlich testen können. Wenn es uns gelingt, die Mutation spezifisch in einer Klasse von Zellen im Vergleich zu einer anderen Klasse von Zellen zu erzeugen, sollten wir in der Lage sein, diese Frage zu beantworten. Beziehen wir uns nun auf den menschlichen Patienten. Menschliche Patienten haben also offensichtlich ganz

unterschiedliche Phänotypen, insbesondere unterschiedliche Arten von Anfällen. Dies könnte also auf eine Vielzahl von Gründen zurückzuführen sein, einer könnte die Art der Mutation sein, wie sich diese spezielle Mutation in verschiedenen Klassen dieser Neuronen auswirkt. Und zweitens hängt es offensichtlich mit dem so genannten genetischen Hintergrund jedes Patienten zusammen. Denn wir alle haben verschiedene genetische Varianten, die mit der Störung von STXBP1 interagieren könnten, die das Endergebnis der Anfallsphänotypen verändert.

**Charlene:**

Großartig. Und noch eine Frage, eine Frage zu den epileptischen Anfällen. Sie sprachen über myoklonische Anfälle und Absenz Anfälle. Gibt es in den Tiermodellen noch andere Arten von Anfällen wie tonische, tonisch-klonische oder fokale Anfälle?

**Mingshan:**

Ja, die Spike-Wave-Entladung und die myoklonischen Anfälle sind also die häufigsten, die wir beobachtet haben. Und gelegentlich sehen wir auch einige generalisierte Anfälle, aber sie sind nicht sehr häufig und sie zeigen sich nicht bei jedem einzelnen Tier. Deshalb haben wir das nicht wirklich berichtet, weil es selten ist. Aber wir sehen sie gelegentlich bei verschiedenen Typen von verschiedenen mutierten Tieren.

**Charlene:**

Großartig. Nächste Frage. Hat STXBP1 verschiedene oder unterschiedliche Funktionen an verschiedenen Synapsen? Und wenn ja, welche Art von Funktionen?

**Mingshan:**

Bisher, so denke ich, gibt es die Ansicht, dass dieses Protein sehr, sehr ähnliche Funktionen an verschiedenen Synapsen ausübt. Es ist an der Verschmelzung der Vesikel beteiligt.

Ohne dieses Protein würde jede Synapse, die man sich angesehen hat - insbesondere die Gruppe von Dr. Verhage hat das untersucht – betroffen sein, wenn dieses Protein fehlt. Ich denke also, die Funktion wäre ziemlich ähnlich. Der Unterschied hängt also wahrscheinlich von der Funktion dieser Zellen oder dieser Synapsen im Gehirn ab und nicht davon, ob dieses Protein diese Synapsen beeinflusst oder nicht.

**Charlene:**

Großartig. Und hier ist eine verwandte Frage über die Menge des STXBP1-Proteins. Ist es also in allen Hirnregionen reduziert oder nur in einigen Hirnregionen?

**Mingshan:**

Ja, zumindest in den Tiermodellen, die wir gesehen haben, ist das STXBP1-Protein in vielen Hirnregionen reduziert. Wir haben es uns angesehen. Aber in etwas anderem Maße. Zum Beispiel im Kleinhirn ist die Reduktion irgendwie weniger als die Kortikalis. Wir wissen nicht warum, aber das beobachten wir. So ist, insbesondere die Granulatzelle, die Reduktion in der Granulatzelle des Kleinhirns, recht mild.

**Charlene:**

Okay. Nächste Frage. Sehen Sie im Laufe der Zeit regressive Symptome bei den STXBP1-Mäusen? Und wenn ja, wie sieht das aus?

**Mingshan:**

Eigentlich haben wir nicht gesehen, dass sich die Tiere scheinbar mit einer Vielzahl von Phänotypen entwickeln, und sie scheinen dies immer zu haben und sie machen nicht wirklich viel Rückschritte. Tatsächlich haben die mutierten Tiere im Labor, wenn sie in der Lage sind, bis zu, sagen wir, zwei Monaten zu überleben, und sie haben eine fast normale Lebensspanne wie die Tiere des Wildtyps. Wir sehen also keine großen Rückschritte, was beim Menschen vielleicht nicht der Fall ist. Wir haben uns auch noch nicht allzu lange damit beschäftigt. Wir gehen von etwa sechs Monaten bis zu einem Jahr aus.

**Charlene:**

Und was ist das, für ein Mäuseleben? Und was ist das für ein Menschenleben?

**Mingshan:**

Nun, die Maus lebt etwas mehr als zwei Jahre.

**Charlene:**

Nächste Frage. Wie wird sich die Untersuchung dieser verschiedenen Neuronen auf die Entwicklung der STXBP1-Therapie für unsere Kinder auswirken, und vielleicht Mingshan, darüber möchten Sie in Bezug auf die Art, den kurzfristigen und den längerfristigen Zeitraum sprechen?

**Mingshan:**

Ja. Also, wie ich im Gespräch erwähnt habe, wenn wir eine Therapie haben, die jedes einzelne Neuron im Gehirn behandeln kann, dann ist das ideal. Aber wenn wir noch nicht über die Technologie verfügen, um dies zu tun, können Sie beispielsweise nicht jede Zelle im Gehirn mit Gentherapie versorgen.

Dann könnte uns eine solche Studie sagen, dass Sie sicherstellen sollten, dass Sie die GABAergen Interneurone effizient ansprechen, damit Sie die meisten Symptome oder die meisten Aspekte der Krankheit behandeln können, oder?

Das ist also eine Art Festlegung der Priorität für die Therapien. Und auch wenn, stellen Sie sich vor, Sie entwickeln eine Therapie, sagen wir, es handelt sich um ein kleines Molekül, das die Funktion der glutamatergen Neuronen moduliert. Dann sollte vielleicht Ihre klinische Endpunktstudie von einer solchen Studie geleitet werden. Und Sie könnten nicht erwarten, Änderungen zu sehen, wissen Sie, das ist wahrscheinlich eine große Reichweite, richtig. Es ist jedoch nicht zu erwarten, dass sich alle Aspekte Ihrer klinischen Endpunkte ändern. Daher sollten Sie die Endpunkte mit Bedacht auswählen, damit Ihre klinische Studie erfolgreich ist.

**Charlene:**

Nächste Frage: Können Sie uns etwas über den Gentherapie-Preis erzählen, den Sie im Zusammenhang mit STXBP1 erhalten haben?

**Mingshan:**

Ich denke, dies bezieht sich auf ein Stipendium, das ich und ein Mitarbeiter kürzlich als Pilotstudie erhalten haben. Bei diesem Stipendium geht es also mehr um die Technologieentwicklung. Wir wollen die Technologie nutzen und entwickeln, um den AAV-Vektor besser in das Gehirn zu bringen. Es geht also um die Verabreichungstechnologie, und wir dachten einfach, es wäre großartig, das STXBP1-Modell als eine Art Plattform zu verwenden, um diese Technologie zu testen. Bei der Technologie geht es also darum, Ultraschall einzusetzen, um die Blut-Hirn-Schranke zu öffnen, so dass wir den Vektor effizient in das Gehirn einbringen können.

**Charlene:**

Die nächste Frage bezog sich auch auf die Gentherapie. Würde eine Gentherapie bei allen Mutationen funktionieren?

**Mingshan:**

Wir wissen es also nicht sicher, aber ich denke, wenn die Gentherapie, sagen wir, eine Gensatzstrategie ist, dann sollte sie für eine Mutation funktionieren, wie zum Beispiel die Verlustfunktionsmutation, die das Protein abschneidet. Also, das sind etwa 60% der Patientenpopulation. Für die Missense Mutationen wird es meiner Meinung nach ebenfalls hilfreich sein, denn Sie würden im Grunde genommen zusätzliche Kopien des Wildtyp-Proteins liefern, so dass, selbst wenn die Missense Mutation dominant und aktiv ist, dies immer noch die Konkurrenz mit dem mutierten Protein verstärken sollte, um die Funktion der Synapse zu verbessern. Aber auch diese müssen im richtigen Tiermodell getestet werden.

**Charlene:**

Großartig. Und noch eine Frage zur Gentherapie. Wenn wir eine Gentherapie für den Menschen entwickeln, können wir dann die Auswirkungen auf die exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen beim Menschen, bei den Patienten, untersuchen?



**Mingshan:**

Ich schätze, technisch, theoretisch, ja. Denn wenn Sie irgendwie in der Lage sind, die Gentherapie spezifisch in GABAerge Neuronen oder glutamaterge Neuronen einzubringen, könnten Sie unterschiedliche Ergebnisse beobachten. Das ist richtig. Aber diese Studie kann zuerst in Tiermodellen durchgeführt werden. Wir könnten also das umgekehrte Experiment durchführen, wie ich es Ihnen gezeigt habe. Wir können das STXBP1 sozusagen auf das Tier zurückführen, aber in einem Fall auf die exzitatorischen Neuronen, im anderen Fall nur auf die GABAergen inhibitorischen Neuronen. Wir können sehen, was passiert dann? Bei klinischen Studien am Menschen wollen wir also natürlich so viele Neuronen wie möglich ins Visier nehmen.

**Charlene:**

Dies ist also eine allgemeinere Frage. Was ist über Promotor Gene im Zusammenhang mit STXBP1 bekannt? Promotor-Gen, oder vielleicht stromaufwärts. Ich denke, die Frage bezieht sich auf Gene, die möglicherweise stromaufwärts im Signalweg für STXBP1 liegen.

**Mingshan:**

Oh ja. Wenn sich diese Frage also zum Beispiel darauf bezieht, welches Protein die Expression dieses Gens steuert, dann richtig. Wissen Sie, die meisten beziehen sich auf, sagen wir, Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität des Promotor-Enhancers dieses Gens kontrollieren. Soweit ich weiß, kenne ich eigentlich keinen bestimmten spezifischen Transkriptionsfaktor, der für dieses spezielle Gen identifiziert wurde, aber da es sich um ein sehr reichlich vorhandenes neuronales Protein handelt, werden vermutlich einige der üblichen Neuronen spezifischen Transkriptionsfaktoren beteiligt sein.

**Charlene:**

Okay, unsere Zeit ist vorbei, aber ich wollte noch eine letzte Frage stellen, nämlich: Was können wir als Eltern von STX-Betroffenen tun, um diese Forschung und Ihre Forschung zu unterstützen? Wir haben ungefähr 400 Familien, mit denen wir täglich in Kontakt stehen, so dass wir bei Fragebögen oder Blutabnahmen helfen können, wirklich alles, was Ihnen helfen würde, voranzukommen. Als letzte Frage konnte ich nicht widerstehen.

**Mingshan:**

Richtig? Das ist also offensichtlich wahrscheinlich der wichtigste Aspekt bei der Entwicklung einer Therapie und klinischer Studien. Deshalb hatte ich also von Anfang an das Privileg, viele der Familien kennenzulernen. Ich kann also tatsächlich viele Leute hier sehen, viele bekannte Namen hier. Wenn Sie es also einmal wissen. Es gibt also zwei Aspekte, nicht wahr? Erstens halte ich es für sehr wichtig, dass alle an einer Registrierung teilnehmen. Zum Beispiel das Simons-Register, über das Dr. Chung vor einigen Wochen gesprochen hat, damit wir mehr Naturgeschichtsstudien durchführen können. Dadurch wird die Gemeinschaft auf die klinische Prüfung vorbereitet, um die klinische Prüfung so zu gestalten, dass wir wissen, auf welchen Aspekt der Krankheit wir abzielen sollten, wie wir die Wirksamkeit der Gentherapie bewerten sollten. Das zweite ist natürlich, dass wir das Bewusstsein für die Krankheit schärfen müssen, denn ich glaube, dass es viele Patienten gibt, die vielleicht noch nicht diagnostiziert worden sind. Auch wenn STXBP1 eindeutig auf den Gen-Panels für Tests steht. Und auch jeder Arzt wird auf die Exom Sequenzierung achten, die auf STXBP1 hinweist. Aber in unserem eigenen Krankenhaus liegt die Diagnoserate bei Menschen, die mit schwereren Anfällen kommen, immer noch unter 50%. Nicht wahr? Ganz zu schweigen davon, dass ein erheblicher Teil der STXBP1-Patienten vielleicht nicht an Epilepsie leidet. Bis jetzt haben etwa 15% keine sehr schwere Epilepsie. Die Sensibilisierung wird also für die Gemeinschaft wichtig sein. Wissen Sie, je mehr Menschen wir haben, desto lauter wird unsere Stimme im Vergleich zu anderen seltenen Krankheiten. Das stimmt.

**Charlene:**

Großartig. Vielen Dank, Mingshan, dass Sie unserer STXBP1-Gemeinschaft die heutige Präsentation vorgestellt haben, und vielen Dank an alle, die daran teilgenommen haben.

**Mingshan:**

Ich habe eine Frage, es gibt hier einige Fragen, die ich im Q und A sehe. Ich kann sie beantworten, indem ich die Antwort abtippe. Wenn wir das irgendwie hinbekommen könnten, oder was soll ich tun? Ich werde diese Fragen sehr gerne beantworten.

**Charlene:**

Das wäre fantastisch. Also ja, ich kann das behalten, ich kann es offenhalten und dann können wir die Antworten auf die Fragen über die Aufnahme geben oder nicht über die Aufnahme, sondern zusätzlich zur Aufnahme.

**Mingshan:**

Okay.

**Charlene:**

Großartig. Wunderbar. Nun, vielen Dank an alle, die an der heutigen Präsentation teilgenommen haben. Wir werden die Aufnahme mit Bildunterschriften sowie einige schriftliche Antworten von Mingshan in den nächsten Tagen auf unserer Website veröffentlichen. Wir haben noch einen weiteren Tag im September und einen weiteren Tag des STXBP1-Bewusstseins-Monats. Wir danken allen für Ihre Teilnahme in diesem Monat und wünschen Ihnen einen schönen Tag.

**Einige weitere Fragen, die offline beantwortet wurden:**

**Frage des Publikums:**

Glauben Sie, dass eine Gentherapie sowohl jüngeren als auch älteren Patienten helfen könnte?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Ich hoffe es, wir werden dies testen.

**Frage des Publikums:**

Wie wollen Sie den Vektor in einer Studie an Mäusen liefern?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Die Injektion funktioniert gut bei Mäusen, aber für menschliche Gehirne müssen wir daran arbeiten.

**Frage des Publikums:**

Wie könnte ein PPI-Inhibitor, der auf die alpha-helikale Syntaxin-1A-Interaktion abzielt, eine mögliche Anwendung bei STXBP1 haploinsuffizienz-assoziierten epileptischen Erkrankungen sein? Wie wirkt er?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Möglich, eine Gruppe testet dies gerade.

**Frage des Publikums:**

Ist bekannt, warum manche Kinder schon im sehr jungen Alter von z.B. 2 Monaten Anfälle bekommen und andere erst im Alter von z.B. 6 Monaten? Und manche bekommen keine Anfälle?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Das wissen wir noch nicht.

**Frage des Publikums:**

Denken Sie, dass der Mausstamm / genetische Hintergrund den Phänotyp verändern würde, insbesondere den Anfallsphänotyp, den Sie in Ihren Modellen sehen?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Möglich, aber wir haben verschiedene Hintergründe noch nicht getestet.

**Frage des Publikums:**

Wurden im STXBP1-Gen Gift-Exons gefunden, die die Expression eines Gens dämpfen können, und wenn ja, was bedeutet das genau für die Freisetzung des STXBP1-Transmitters?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Nein.

**Frage des Publikums:**

Verändert sich die Funktion von STXBP1 in Abhängigkeit vom Alter der Maus? Wir sehen eine Veränderung der Funktion bei den Kindern, wenn sie älter werden. Diese Veränderungen scheinen bei verschiedenen Kindern ähnlich zu sein, wenn sie ein bestimmtes Alter erreichen.

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Nicht bei Mäusen.

**Frage des Publikums:**

Vielen Dank, Mingshan, für eine sehr interessante Präsentation! Haben Sie getestet, ob die niedrigen Werte von STXBP1 die Werte anderer Gene in den verschiedenen Neuronen Typen unterschiedlich beeinflussen?

**Schriftliche Antwort von Mingshan Xue:**

Nein, noch nicht.