

Door: Jurgen Schelhaas¹ (schelhaasj@kempenhaeghe.nl), Judith Verhoeven¹, Marian Majoie^{1,3}, Joost Nicolai^{1,4}, Eline van Hugte^{1,2}, Monica Frega², Nael Nadif Kasri², Hans van Bokhoven².

¹ Neurologie, Academisch Centrum voor Epileptologie Kempenhaeghe/Maastricht UMC+, Heeze/Maastricht

² Humane genetica, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboudumc, Nijmegen

³ School of Mental Health and Neuroscience, Maastricht UMC+

⁴ Kinderneurologie, Maastricht UMC+

Van ‘gissen en missen’ naar een patiëntgerichte behandeling: de inzet van de pluripotente stamceltechniek

Het Epilepsiefonds en ZonMw hebben recent een subsidie verleend aan een onderzoeksgroep van het Radboudumc, het Maastricht UMC+ en Kempenhaeghe voor het ontwikkelen van een nieuwe techniek die een belangrijke stap kan zijn in de evolutie van een algemene, ziekte-georiënteerde behandeling naar een specifieke, op de patiënt afgestemde behandeling. In deze bijdrage wordt nader ingegaan op de inhoud van het onderzoek.

De nieuwe techniek die wordt toegepast in dit onderzoek wordt ook wel de *human-induced* pluripotente stamcel- of hiPSC-techniek genoemd. Met de hiPSC-techniek is het mogelijk om in het laboratorium een neurale netwerk te creëren waarvan de neuronen de genetische kenmerken hebben van de individuele patiënt. Dit maakt het mogelijk om onderzoek te doen naar een op de patiënt afgestemde behandeling (*personalised medicine*).

Achtergrond

Moeilijk behandelbare epilepsie bij jonge kinderen kan een uiting zijn van een epileptische encefalopathie met genetische oorzaak. Hierbij zijn de persisterende epileptische aanvallen een bedreiging voor de ontwikkeling van het kind (McTague et al., 2016). Hoewel de clinicus zijn medicatiekeuze baseert op factoren zoals bijvoorbeeld aanvalstype en syndroomdiagnose (<http://epilepsie.neurologie.nl>) is medicamenteuze behandeling vaak gebaseerd op een weloverwogen *trial and error* strategie. Daardoor worden patiënten soms behandeld met medicijnen die achteraf onvoldoende, niét, of zelfs averechts blijken te werken. Dit leidt tot frustratie, maar meest belangrijk, tot tijdsverlies bij het jonge kind met epileptische encefalopathie waar verloren tijd verloren ontwikkeling is. Ook is recent aangetoond dat het gebruik van de ‘verkeerde’ medicatie gedurende een bepaalde periode, de ontwikkeling op termijn bij kinderen met een Dravet-syndroom ongunstig beïnvloedt (de Lange et al., 2018).

De *trial and error* strategie zou voor deze patiënten voorkomen kunnen worden door het testen van anti-epileptica te verplaatsen naar het laboratorium, met een volledig patiënt-eigen medium. De zogenaamde *human-induced* pluripotente stamcel (hiPSC)-techniek is de basis voor dit patiënt-eigen medium. De hiPSC-techniek is een nieuwe techniek waarbij men uit bloed van de patiënt witte bloedcellen herprogrammeert naar stamcellen, om deze vervolgens te laten uitrijpen naar neuronen (Yamanaka & Blau, 2010). Wanneer deze zenuwcellen worden samengebracht met astrocyten op een ‘slimme petrischaal’ (*smart dish*), zullen ze connecties maken, rijpen en functioneel actieve neuronale netwerken vormen. De beschikbaarheid van de *smart dishes*, of liever *Micro-Electrode Arrays* (MEAs) (figuur 1) is essentieel voor dit onderzoek (Frega et al., 2017). Met behulp van elektroden, op de bodem van de MEAs gelegen, kan de activiteit van deze neuronale netwerken continu worden gemeten. Parameters die met behulp van de MEAs bepaald kunnen worden zijn bijvoorbeeld de vuurfrequentie van het neuronale netwerk, de *burst*-frequentie, de duur van de *burst* en de regelmatigheid van het vuurpatroon. Door het combineren van verschillende parameters is het mogelijk voor elke patiënt een patiënt-specifiek neurale elektrofysiologisch fenotype, een *fingerprint*, te definiëren. Voor deze studie maken we gebruik van MEAs waarbij op elke MEA ruimte is voor 24 patiënten/fenotypen (*bron/well*) met 12 elektroden per *well*. Op deze manier kan bijvoorbeeld het neuronale netwerk van 24 verschillende

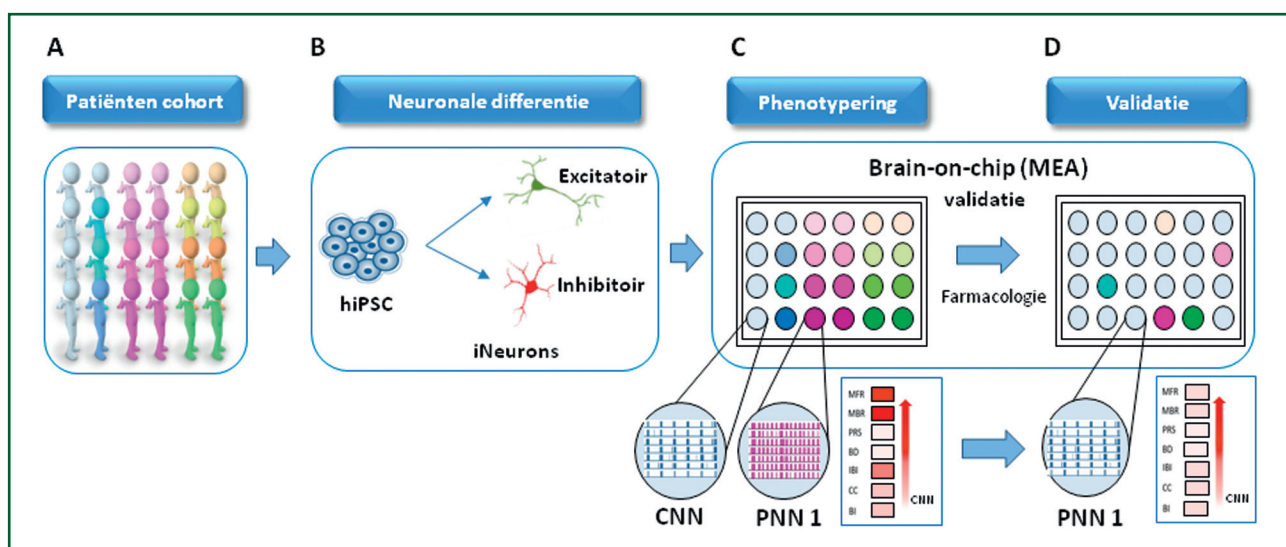
patiënten met dezelfde gen-mutatie of van 24 patiënten met hetzelfde fenotype maar met een andere mutatie worden aangebracht. Aan dit model kan ook medicatie worden toegevoegd, waardoor het effect van de medicatie op het neuronale fenotype kan worden bestudeerd. Op basis van vooronderzoek is gebleken dat het inderdaad mogelijk is om een herkenbaar neuraal fenotype/fingerprint van patiënten met een ontwikkelingsstoornis te genereren en het neuraal elektrofysiologisch fenotype te beïnvloeden door het toevoegen van medicatie. Recent onderzoek, waarbij deze techniek is toegepast, heeft aangetoond dat patiënten met epilepsie vaak beschikken over een hyperexcitabel neuraal netwerk. De hypothese is dat door het toevoegen van anti-epileptica de excitabiliteit genormaliseerd en het fenotype ‘gecorrigeerd’ kan worden. Op deze manier zou de werkzaamheid van de verschillende anti-epileptica voor een specifieke patiënt voorspeld kunnen worden. Alvorens de methode echter ook als prospectief model voor epilepsie en het moduleren van epileptische aanvallen kan worden ingezet moet er nog veel onderzoek plaatsvinden. Om die reden is gekozen voor een multidisciplinaire aanpak met betrokkenheid van specialisten op het gebied van de kliniek (epileptologie/kinderneurologie), farmacologie, moleculaire genetica, neurobiologie en MEA-technologie. Daarnaast ligt het focus van de aanvragen op het Dravet-syndroom en aanverwante aandoeningen, zodat de enorme hoeveelheid data die gegenereerd zal worden ook goed geïnterpreteerd kan worden.

Onderzoeksgroep en plan van aanpak

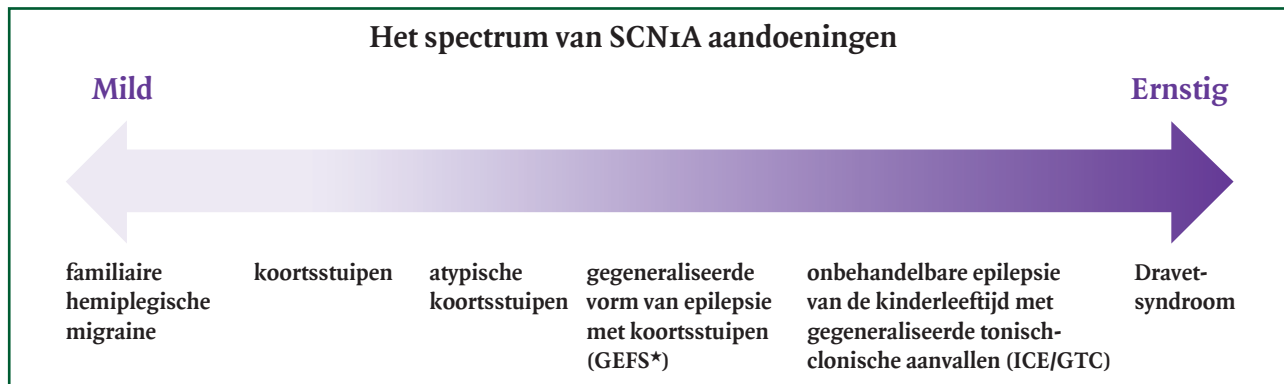
Het onderzoek richt zich op patiënten met een fenotype

passend binnen het spectrum van het Dravet-syndroom en GEFS+ (*generalized epilepsy with febrile seizures plus*). We onderscheiden vier verschillende groepen patiënten en een controle groep van gezonde individuen. Het gaat om de volgende groepen patiënten:

- De eerste groep betreft patiënten met het Dravet-syndroom én een mutatie in het SCN1A-gen.
- De tweede groep betreft patiënten met een Dravet-syndroom fenotype (Dravet, 2011), maar met een mutatie in een ander gen dan SCN1A zoals bijvoorbeeld patiënten met een CHD2- of PCDH19-mutatie. Deze tweede groep wordt onderzocht om te zien in hoeverre het neuronale netwerk geschikt is voor het beoordelen van genetische heterogeniteit, omdat verschillende mutaties wel een vergelijkbaar klinisch beeld geven. Hierbij is de hypothese dat het mogelijk is een herkenbare fingerprint te maken van het Dravet-syndroom, ondanks de mutaties in verschillende genen.
- De derde groep patiënten zijn kinderen met een mutatie in het SCN1A-gen maar met een milder fenotype dan het Dravet-syndroom. Een DNA-fout in het SCN1A-gen kan namelijk ook andere, mildere epilepsiesyndromen veroorzaken (figuur 2). Deze groep wordt onderzocht om te zien in hoeverre het neuronale netwerk geschikt is voor het bestuderen van klinische pleiotropie, waarbij één gen meer dan één fenotypisch effect teweeg kan brengen.
- De vierde groep patiënten zijn kinderen uit de eerste groep waarbij de pathogene SCN1A-mutatie middels CRISPR/Cas9-technologie (Paquet et al., 2016) in vitro vervangen wordt door een wild type (normaal) SCN1A-gen.



Figuur 1 A) Een patiëntencohort bestaat uit gezonde controles en patiënten met epilepsie. B) Excitatoire en inhibitorische neuronen worden gedifferentieerd vanuit iPSC-lijnen en worden gekweekt op MEAs (24 multiwell system, Multichannel Systems). C) Neuronen van gezonde controles vormen functioneel actieve controle neuronale netwerken (CNN) en laten synchrone netwerkactiviteit zien op de MEAs. Een kwantitatief netwerk-fenotype wordt gegenereerd voor elke patiënt-neuronale-netwerk (PNN), dat bestaat uit parameters die samen een disfunctioneel netwerk beschrijven. D) De PNNs zullen worden getarget met medicijnen. HiPSC: Human induced pluripotente stamcel, CNN: Controle neuronale netwerk; PNN: Patiëntgebonden neuronale netwerk; MEA: Micro-Electrode Arrey ('smart disc').



Figuur 2 Het spectrum van SCN1A-aandoeningen (bron: www.dravetfoundation.org)

Gedetailleerde kennis van aanvals-, ontwikkelings- en EEG-kenmerken is essentieel voor de interpretatie van de resultaten van de MEA-technologie. De eerste stap in het onderzoek is dan ook dat de kinderen klinisch zorgvuldig in kaart worden gebracht. Ook zal retrospectief gekeken worden naar de eerdere en huidige responsen van de patiënt op de gebruikte anti-epileptica. Parallel aan de eerste stap is de analyse van de specifieke mutatie en de veronderstelde pathogeniciteit van deze mutatie. Vervolgens zullen de patiënt-specifieke cellen, na de differentiatie tot hiPSC's, geherprogrammeerd worden naar homogene populaties excitorische en inhibitorische neuronen en samengebracht met astrocyten op de MEAs in een 80/20 verhouding, zoals ook in het brein terug te vinden is. Vanaf het aanbrengen van de cellen kan gestart worden met de metingen en begint het analyseren van de data. De interpretatie van deze data in relatie tot het klinische fenotype en de reactie op anti-epileptica is de grote uitdaging van deze studies. Tijdens het eerste, door het Epilepsiefonds gesubsidieerde deel van de studie, zullen de data geïnterpreteerd worden tegen het licht van de retrospectief verzamelde klinische en farmacologische data. Het tweede, door ZonMw gesponsorde deel van de studie, gaat verder en moet het bewijs leveren dat de methode ook in een prospectieve setting overeind blijft. Tijdens dit deel van de studie zal veel aandacht besteed worden aan fundamentele aspecten die betrekking hebben op de pathogenese van de onderzochte aandoeningen, zodat onverwachte resultaten beter geïnterpreteerd kunnen worden. Zo zal bijvoorbeeld ook gekeken worden naar het effect van specifieke SCN1A-mutaties op de expressie van andere, epilepsie

geassocieerde genen, omdat juist dit effect wel eens van groot belang zou kunnen zijn voor het begrip van de pathogenese en de behandeling van het Dravet-syndroom (Jiao et al., 2013).

Referenties

- De Lange IM, Gunning B, Sonsma ACM et al. (2018) Influence of contraindicated medication use on cognitive outcome in Dravet syndrome and age at first afebrile seizure as a clinical predictor in SCN1A-related seizure phenotypes. *Epilepsia*, May (2018) Epub ahead of print.
- Dravet C (2011) The core Dravet Syndrome phenotype. *Epilepsia* 2011,52 Suppl 2:3-9.
- Frega M, van Gestel SHC, Linda K et al. (2017) Rapid neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells for measuring network activity on micro-electrode arrays. *J Vis Exp*.
- Jiao J, Yang Y, Shi Y et al. (2013) Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Hum Mol Genet.* 22(21): 4241-52.
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE (2016) The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol*, 15: 304-16.
- Paquet D, Kwart D, Chen A et al. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 5;533: 125-9.
- Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465: 704-712.

Lees het actuele overzicht van congressen over epilepsie.

Kijk voor meer informatie op www.epilepsieliga.nl.



Johan Arends is sinds 1986 neuroloog. In 1984 promoveerde hij aan de Radboud Universiteit in Nijmegen op experimenteel onderzoek in de epilepsie. Vanaf 1986 tot 1995 had hij een farmacologisch onderzoekslaboratorium bij Janssen Pharmaceutica waar hij betrokken was bij de (klinische) ontwikkeling van stoffen voor behandeling van slaap en epilepsie. In deze periode was hij ook parttime werkzaam in Kempenhaeghe waar hij in 1988, samen met Guus Declerck, het slaap-spreekuur startte. Vanaf 1995 is Johan fulltime werkzaam in Kempenhaeghe als hoofd van het slaapcentrum (tot 1997) en van de afdeling klinische neurofysiologie (tot 2011). In 2011 werd hij parttime hoogleraar aan de Technische Universiteit Eindhoven met als opdracht *Ambulatory monitoring of epilepsy and related disorders*. Hier vervolgde hij zijn onderzoek naar aanvalsdetectie. Na de oprichting in 2011 van het landelijke TeleConsortium Epilepsie kreeg dit onderzoek een flinke versnelling, wat geleid heeft tot een nieuw detectie-apparaat, de NightWatch. Daarnaast doet hij onderzoek naar beslisondersteuning en expertsystemen. In december 2018 gaat Johan met pensioen.

Door: Johan Arends (arendsj@kempenhaeghe.nl), neurologie, Academisch centrum voor Epileptologie Kempenhaeghe/ Maastricht UMC+, Heeze/Maastricht en Technische Universiteit Eindhoven en Frans Leijten, neurologie, Hersencentrum Rudolf Magnus en Universitair Medisch Centrum Utrecht.

Het belang van nachtelijke aanvalsdetectie

Het detecteren van epileptische aanvallen is vooral van belang tijdens de nacht. In deze periode is geen goede observatie mogelijk en treden relatief veel aanvallen op. Ook kan plotselinge dood door epilepsie optreden (Sudden Unexpected Death in Epilepsy, SUDEP). Daarom is er behoefte aan een alarmeringssysteem voor nachtelijke epileptische aanvallen. Dat geldt voor de chronische professionele zorg, met personeelstekorten in de nacht, en voor ouders van een kind met nachtelijke aanvallen. Uit EEG-registraties blijkt dat patiënten hun nachtelijke aanvalsfrequentie onderschatten, terwijl verwanten vaak het gevoel hebben dat er een gebrek is aan controle wanneer de persoon met een epileptische aanval hulp nodig heeft.

Veiligheid in de epilepsiezorg verbeteren betekent allereerst het tegengaan van de complicaties van de aanvallen. Dit houdt in dat de riskante aanvallen, vooral 's nachts, moeten worden opgemerkt. Thuis gebeurt dat meestal direct door de ouders of met de babyfoon. Instellingen moeten

de zorg op hetzelfde niveau brengen als thuis, waar de middelen veel beperkter zijn. Het is bekend dat 'uitluisteren' het risico op SUDEP met ongeveer een factor drie verlaagt (Harden et al., 2017) maar dit uitluisteren kent veel valse alarmen. Ook het EEG is minder geschikt als bewaking op langere termijn. Daarom is door het TeleConsortium Aanvalsdetectie Epilepsie¹ - een samenwerking tussen academische centra, patiëntenbelangenorganisaties en bedrijven - vol ingezet op de ontwikkeling van adequate detectieapparatuur op basis van eenvoudig te meten veranderingen, zoals veranderingen in hartritme en beweging. Automatische detectie van videobeelden, geluid of spieractiviteit wordt nog nader onderzocht.

De NightWatch

Het meest in het oog springende resultaat van het TeleConsortium is tot nu toe de ontwikkeling van de NightWatch. De NightWatch is een armband die op basis van een multimodaal algoritme, dat is gebaseerd op verande-

¹Het TeleConsortium Aanvalsdetectie Epilepsie is een samenwerkingsverband tussen het Academisch Centrum voor Epileptologie, Kempenhaeghe & MUMC+, Stichting Epilepsie Instellingen Nederland (SEIN), het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMC Utrecht), de Technische Universiteit Eindhoven, Hobo Heeze BV, Pontes Medical, het Epilepsiefonds, LivAssured, CLB Integrated Solutions B.V. en patiëntenbelangenorganisaties Epilepsie Vereniging Nederland (EVN), Stichting Dravetsyndroom en Stichting Zorg Intensief en Epilepsie (ZIE).