

'Amyloid-beta: a potential link between epilepsy and cognitive decline', *Nat Rev Neurol*, 17: 469-85.

Sen A, Jette N, Husain M, Sander JW (2020).

'Epilepsy in older people', *Lancet*, 395: 735-48.

Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meissner JN, et al. (2016).

'Endothelial LRP1 transports amyloid-beta(1-42) across the blood-brain barrier', *J Clin Invest*, 126: 123-36.

Tallis R, Boon P, Perucca E, Stephen L (2002). 'Epilepsy in elderly people: management issues', *Epileptic Disord*,

4 Suppl 2: S33-9.

van Vliet EA, Marchi N (2022). 'Neurovascular unit dysfunction as a mechanism of seizures and epilepsy during aging', *Epilepsia*, 63: 1297-313.

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ (2011).

'The role of inflammation in epilepsy', *Nat Rev Neurol*, 7: 31-40.

Vossel KA, Ranasinghe KG, Beagle AJ, Mizuiri D, et al.

(2016). 'Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease',

Ann Neurol, 80: 858-70.

Door: Bobby Koeleman (b.p.c.koeleman@umcutrecht.nl) en Eva Brilstra, Genetica, Divisie Lab, UMC Utrecht Hersencentrum, Universitair Medische Centrum, Utrecht.

Genetische therapie voor epilepsie

Naarmate van steeds meer ziektebeelden de genetische achtergrond bekend wordt, ontstaat de mogelijkheid om gerichte behandeling te geven, niet alleen afgestemd op de persoon, maar ook gericht op het onderliggende moleculaire proces. In deze bijdrage staan we stil bij *precision medicine* bij epilepsie, dat op drie niveaus kan plaatsvinden.

Genetische therapie is in opkomst en wordt door vele wetenschappers gezien als de oplossing voor genetische aandoeningen die niet of slecht reageren op de huidige en traditionele (*drug*) therapie. Ook voor epilepsie komt genetische therapie dichterbij. In deze bijdrage geven wij een overzicht van de toepassingen van genetische therapie bij epilepsie, waarvan een aantal in de preklinische fase, maar ook een aantal in de klinische trial fase zijn opgenomen. Genetische therapie is bij de monogenetische, ernstige vormen van epilepsie van toepassing, en gericht op correctie of modulatie van het genetische defect. In figuur 1 is weergegeven dat therapie gericht kan zijn op de drie niveaus van gen naar functioneel eiwit (Weuring et al., 2021).

Farmacologische interventie op eiwitniveau

Het eerste en huidige niveau van behandeling is farmacologische interventie gericht op het eiwitniveau met behulp van drugs en organische verbindingen. In de afgelopen decennia zijn vele nieuwe anti-epileptica ontwikkeld, maar ondanks de exponentiele toename heeft het niet geleid tot een significant betere *drug response* (Brodie, 2017). Uitzonderingen zoals fenfluramide bij Dravet syndroom bestaan en zullen in de toekomst een zorgvuldige afweging noodzakelijk maken tussen enerzijds farmacologische

behandeling en een mogelijke eenmalige curatieve genetische therapie, waarbij vooral het voorkomen van bijwerkingen van beide behandelingen tegen elkaar afgezet moeten worden.

Het functionele effect van mutaties

Bij genetische therapie van monogenetische epilepsie is het belangrijk om onderscheid te maken tussen de twee soorten mutaties die de strategie bepalen. Ten eerste zijn er mutaties die als effect een 'verhoogde functie' (*gain of function* GoF) hebben, of een toxisch product veroorzaken. Een voorbeeld is SCN8A epileptische encefalopathie, waarbij de heterozygote missense mutaties leiden tot de productie van een abnormaal actief ionkanaal, dat neuronale hyperactiviteit veroorzaakt. Een behandeling moet in dit geval gericht zijn op inhibitie van het abnormale ionkanaal, zonder verstoring van het normale ionkanaal dat gecodeerd wordt door het normale SCN8A gen kopie. Ten tweede zijn er 'verlies van functie' mutaties (*Loss of Function* LoF), waarbij de mutatie leidt tot een dis- of non-functioneel eiwit, en haplo-insufficiëntie: een 50% reductie van normaal functioneel eiwit. De therapie is hier dan ook gericht op het verhogen van expressie of activiteit van het normale eiwit. Voorbeelden van deze twee strategieën worden hieronder verder besproken

voor RNA- en gentherapie, die in ontwikkeling zijn voor epilepsie.

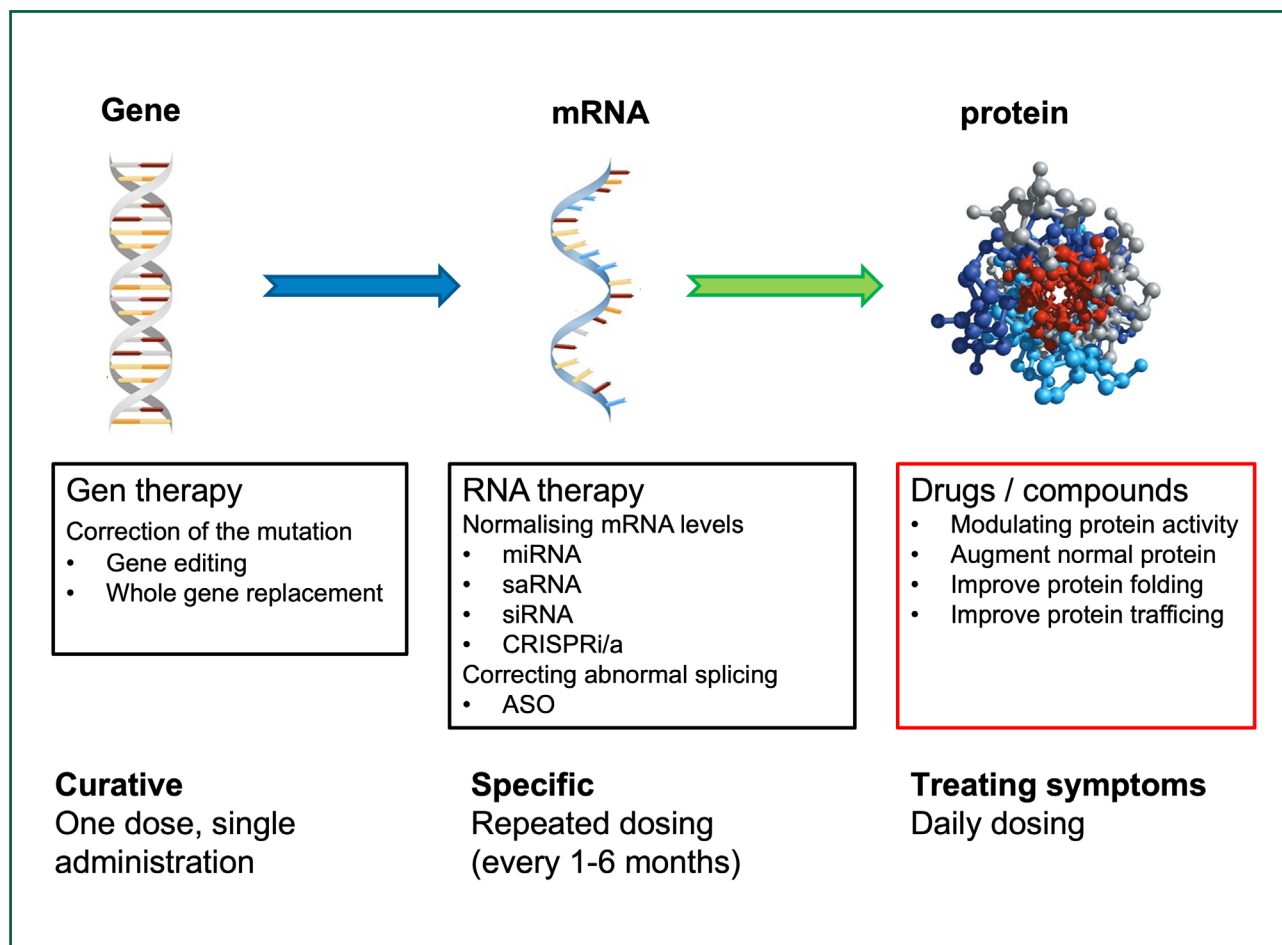
RNA-therapie

Het tweede niveau van behandeling is een genetische therapie waarbij de behandeling gericht is op het mRNA dat codeert voor het eiwit. RNA-therapie kan zich specifiek richten op het mRNA geproduceerd door het ziektegen, specifiek een toxisch of disfunctioneel mRNA inhiberen, of in het geval van een verlies van functie mutaties, de expressie of translatie van het normale mRNA verhogen. De meeste therapeutische RNAs werken via de RNA interference (RNAi) pathway en verlagen de genexpressie door interactie met het (pre-)mRNA. De binding van een small interfering RNA (siRNA) of micro-RNA (miRNA) aan het (pre-)mRNA resulteert in een verhoogde degradatie van het mRNA.

Inhibitie van het mRNA door si- of miRNA is voor epilepsie van toepassing voor de GoF mutaties. Deze vorm van therapie is in ontwikkeling voor SCN2A en SCN8A epileptische encefalopathie in de vorm van allel-specifieke antisense oligonucleotides (ASO) (LI et al., 2021; Lenk et al, 2020). Voor zowel SCN2A als SCN8A is het preklinisch werk verricht met ASO's, die zowel het wildtype mRNA als het

mRNA met de mutatie kunnen binden. Het is belangrijk om in de toekomst ASO's te ontwerpen die specifiek en uitsluitend het mRNA met de mutatie inhiberen. Voor klinische toepassing zou dat betekenen dat voor iedere mutatie een nieuwe ASO ontworpen, getest en goedgekeurd moet worden. Om dit nadeel te omzeilen kunnen ASO's zodanig ontworpen worden dat ze binden aan een deel van het mRNA waar frequente en neutrale coderend polymorfisme gelokaliseerd zijn. Het mRNA van een persoon die heterozygoot is voor deze variatie zal twee vormen van mRNA hebben: een vorm met het wildtype allel en een vorm met het alternatieve allel. Twee ASO's kunnen nu ontworpen worden die met hoge specificiteit binden aan een van de twee allelen. Voor de behandeling van de patiënt zal vervolgens bepaald moeten worden op welke van de twee allelen de mutatie zich bevindt. Met het juiste allel-specifieke ASO kan nu specifiek het abnormale mRNA geïnhibeerd worden. Het moge duidelijk zijn dat door dit ontwerp de twee ASO's gebruikt kunnen worden voor alle verschillende mutaties, maar uitsluitend als de patiënt heterozygoot is voor het polymorfisme waarop de ASO ontworpen is (Hill et al., 2021).

Voor de genen met LoF mutaties is RNA-inhibitie niet van toepassing. In die gevallen is het soms mogelijk om het



Figuur 1 Definitie van therapie niveau. De drie niveaus waarop behandeling van epilepsie mogelijk is: op DNA-, RNA-, en eiwitniveau.

gen dat codeert voor een inhibitor van het doelgen te inhiberen ('inhibitie van de inhibitor'). Zo zijn er studies gedaan naar inhibitie van RACK1 en MHD2, die de SCN1A expressie verlagen (Dong et al., 2014; Chen et al, 2017). Een verrassende toepassing is de inhibitie van SCN8A in ziektemodellen van het Dravet syndroom. Bij Dravet syndroom is de aanname dat het verlies van functie van SCN1A leidt tot een te lage neuronale inhibitie, welke gecompenseerd kan worden door inhibitie van neuronale activatie via SCN8A (Lenk, 2020; Weuring et al, 2020).

Verhoging van mRNA levels voor LoF mutaties is ook mogelijk door het inhiberen van foutieve splicing van het pre-mRNA. Deze aanpak is in vergevorderd stadium gebracht door STOKE therapeutics (<https://www.stoketherapeutics.com/>). Het principe van deze RNA-behandeling is gebaseerd op het natuurlijk voorkomen van mRNA producten die foutief gespliced zijn. Hierdoor kan een abnormale sequentie als exon geïncorporeerd worden, zoals bij SCN1A bekend is (Wengert et al., 2022; Liang et al, 2021). Een mutatie kan ook de normale splicing beïnvloeden, waardoor 50% van het mRNA foutief is. In beide gevallen leidt foutieve pre-mRNA splicing in de meeste gevallen tot afbraak van het abnormale mRNA, een verminderde beschikbaarheid van normaal mRNA en een verlaging van translatie van het eiwit. Abnormale splicing kan voorkomen worden door de binding van een ASO aan de specifieke splicing sequenties, waardoor een normale, correcte splicing wordt geïnduceerd. STOKE therapeutics heeft deze aanpak in een vergevorderd stadium voor SCN1A ontwikkeld in de vorm van STK-001 die in klinische fase 1/2a is in de Monarch en Admiral studies (www.Monarchstudy.com).

Synthetische long-noncoding RNAs (SINEUP) zijn ook ontwikkeld met als doel de mRNA functionaliteit te verhogen. SINEUP zijn antisense long noncoding RNAs die aan de 5' untranslated regio van mRNA binden, waardoor het mRNA gestabiliseerd wordt en minder wordt afgebroken. Op deze manier wordt op post-transcriptie niveau de hoeveelheid mRNA verhoogd dat beschikbaar is voor translatie, wat leidt tot een hogere eiwit expressie. SINEUP is in ontwikkeling door Transine Therapeutics om STXBP1 encefalopathie te behandelen ([Aesnet.org/abstractslisting/sineups--a-novel-therapeutic-strategy-for-stxbp1-encephalopathy-based-on-non-coding-rna--preliminary-in-vitro-studies](https://aesnet.org/abstractslisting/sineups--a-novel-therapeutic-strategy-for-stxbp1-encephalopathy-based-on-non-coding-rna--preliminary-in-vitro-studies)).

Tenslotte is een CRISPR-toepassing relevant voor LoF mutaties zoals bij het Dravet syndroom: CRISPRa. Bij deze vorm wordt gebruik gemaakt van een gemuteerd Cas9 eiwit dat het genomische DNA niet meer kan knippen. Dit dead Cas9 (dCas9) wordt gekoppeld aan trans-

criptiefactoren en een guide RNA dat het gericht maakt voor activatie van een doelgen. Binding van het dCas9-transcriptie factor complex kan de expressie van het doelgen specifiek en op genomisch niveau verhogen. Deze aanpak is getest in een muismodel van Dravet syndroom (Colasante et al, 2020; Yamagata et al, 2020). De behandeling bleek effectief, maar met een laag effect. Deze studie laat zien dat verhoging van SCN1A expressie mogelijk is, maar voor behandeling in mensen zal mogelijke toxiciteit en immunogeniciteit van herhaaldelijke toediening van bacteriële dCas9 eiwitten verder bestudeerd moeten worden (Weuring et al., 2021).

Dit laatste aspect is het grootste nadeel van iedere RNA-therapie. Het effect van therapeutische RNAs is tijdelijk, en om een langdurig effect te krijgen zal de administratie (in de meeste gevallen door intrathecale injectie) iedere paar maanden herhaald moeten worden. Een voordeel hiervan is dat de behandeling reversibel en te doseren is.

Genetische therapie

Genetische therapie waarbij de mutatie wordt gecorrigeerd, of een functioneel transgen wordt geïntegreerd in het genoom, heeft de mogelijkheid om volledig curatief te zijn na een enkele behandeling. Deze belofte heeft bijgedragen aan de exponentiele toename aan studies en bedrijven die gericht zijn op de ontwikkeling van genetische therapie. Introductie van een transgen (*gene replacement*) is gericht op het compenseren van een tekort aan genproduct door de introductie van een extra genkopie; het transgen. Het doel is om dit transgen in het genoom van de patiënt te integreren, waarvoor in de meeste gevallen een adeno-associated virus (AAV) wordt gebruikt. Het transgen staat onder controle van een eigen promotor waardoor enige controle op het niveau van expressie wordt verkregen. Veel onderzoek wordt gedaan naar cel-specifieke promotoren, waardoor alleen expressie van het transgen in het juiste celtype kan worden verkregen.

Correctie van de mutatie door *gene editing* is een van de meest veelbelovende CRISPR-technieken (Tanenhaus, 2022). De eerste CRISPR-technieken maken gebruik van een Cas9 eiwit dat dubbelstrengs DNA knipt. Bij *gene editing* wordt gebruik gemaakt van een recent ontwikkeld Cas9 eiwit die het DNA *nicked*, een basepair uit een van de twee DNA-strands knipt, die vervolgens door de eigen DNA-correctie machinerie gerepareerd wordt met behulp van een *template* of voorbeeld RNA. Met deze techniek kan in theorie iedere base in het genoom veranderd worden en kunnen heterozygote mutaties gecorrigeerd worden.

Voor epilepsie zijn de belangrijkste vormen van genetische

therapie gericht op het inbrengen van een artificieel ontworpen, functioneel gen. De belangrijkste ontwikkeling is die van Encoded Therapeutics (Inc.), die gebruik maakt van AAV virale toediening (Doudna, 2020). Omdat het SCN1A-gen te groot is voor de standaard AAV virale toediening heeft Encoded een artificieel transcriptie factor gemaakt, die specifiek aan de promotor van SCN1A bindt en daardoor de mRNA expressie van SCN1A verhoogt. De expressie van het transgen staat onder controle van een GABAergic neuron selectieve regulator, waardoor alleen expressie in het juiste celtype, de GABAergic neuronen wordt verkregen.

De eerste toepassingen van *gene editing* in de mens zijn een feit. Voor epilepsie zijn we nog in het preklinische stadium. In onze groep hebben we *gene editing* in non-neurale en stamcel cellijnen ontwikkeld voor KCNQ2 en

SCN1A encefalopathie (Wout et al., 2022). Het grootste obstakel van deze toepassing is, net zoals bij de CRISPRa experimenten in de muis, de lage efficiëntie van het inbrengen van de CRISPR-machinerie. Ons onderzoek richt zich dan ook voor een deel op het verhogen van de efficiëntie van dit proces. Op dit moment is een herhaalde toediening van de *gene editing* machinerie noodzakelijk om in voldoende cellen een succesvolle mutatie correctie te verkrijgen. *Gene editing* in de mens lijkt daardoor vooralsnog voorbehouden aan ex-vivo applicaties, waarbij cellen waarin de mutatie succesvol is gecorrigeerd, na een selectie weer terug in de patiënt getransplanteerd worden.

Discussie en conclusies

Ondanks alle limitatie en huidige technologische beperkingen verwachten wij dat gen- en RNA-therapie in de toekomst een belangrijke rol gaat spelen in de behande-



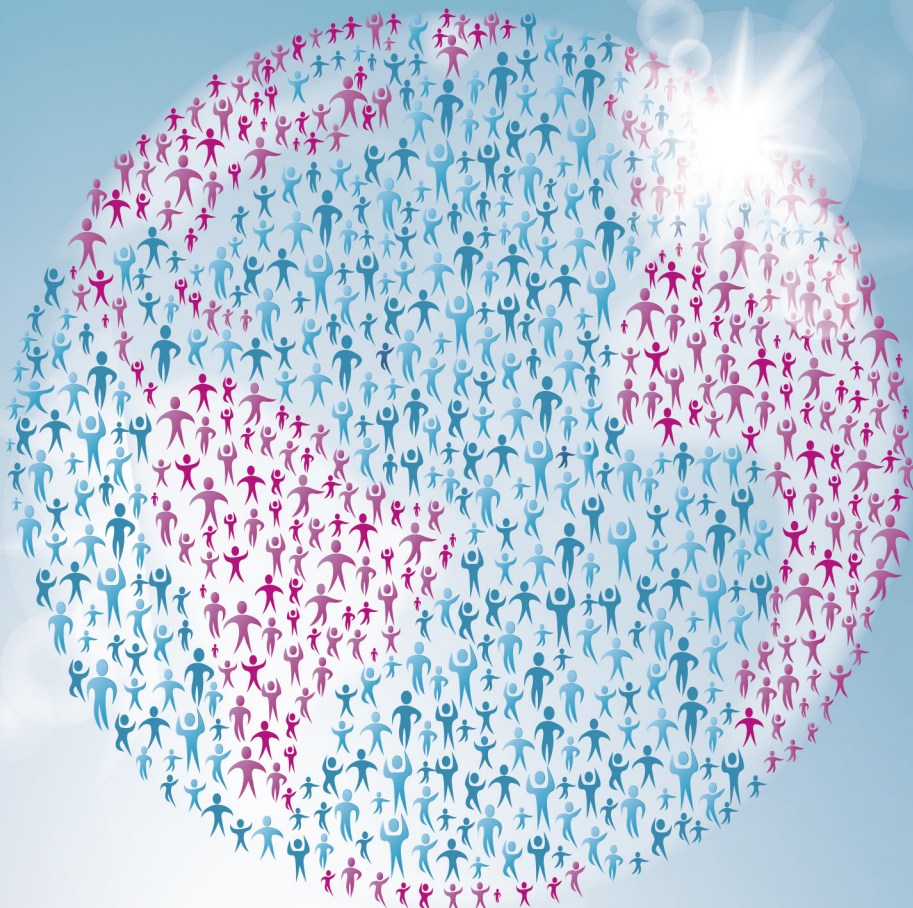
'Epilepsie, periodiek voor professionals' is het vakblad van De Nederlandse Liga tegen Epilepsie. 'Epilepsie' verschijnt vier maal per jaar via open access op website: www.epilepsiejournal.nl.

Naast publicatie op de website, wordt per uitgave de 'Epilepsie' nieuwsbrief verstuurd.

Op de hoogte blijven van de nieuwste publicaties van 'Epilepsie, periodiek voor professionals'?

[Meld u dan nu aan voor de nieuwsbrief!](#)

SAMEN STRIJDEN WE TEGEN EPILEPSIE



Eisai zet zich in voor het ontwikkelen en beschikbaar maken van (nieuwe) medicamenteuze behandelingen. Dit om het leven van mensen met epilepsie en hun familie te verbeteren. Hiermee geeft Eisai invulling aan haar Human Health Care missie, de betrokkenheid van het bedrijf om innovatieve oplossingen te bieden op het gebied van ziekte, preventie, genezing, de zorg voor gezondheid en het welzijn van mensen wereldwijd.

>80

jaar maken we onze medicijnen beschikbaar voor mensen die het nodig hebben!



69 klinische studies in epilepsie*²

>10k werknemers wereldwijd!



5 verschillende aanvalstypes zijn bestudeerd*²

15 locaties voor R&D en geneesmiddelenonderzoek wereldwijd!



2 anti-epileptica op de Nederlandse markt^{3,4}

*Interventionele, door Eisai mogelijk gemaakte studies, inclusief die naar indicaties waarvoor geen registratie is verleend, nog niet zijn voltooid of zijn afgerond. Omvat focaal beginnende aanvallen, secundair gegeneraliseerde aanvallen, primair gegeneraliseerde tonisch-clonische aanvallen, refractaire aanvallen en Lennox-Gastaut-syndroom.

Referenties

1. Eisai Global. Eisai at a glance www.eisai.com/company/glance/index.html (geraadpleegd oktober 2022).
2. ClinicalTrials.gov (geraadpleegd oktober 2022).
3. Inovelon SmPC mei 2021.
4. Fycompa SmPC augustus 2022.



ling van ernstige monogenetische epilepsiesyndromen. Voor de implementatie van deze therapieën zijn kennis over het natuurlijk verloop, vroege en accurate genetische diagnostiek, een zorgvuldige regulering en het waarborgen van de veiligheid essentieel. De potentie voor epilepsie is enorm. De huidige ontwikkelingen zijn gericht op een klein aantal van de belangrijkste epilepsiegenen, maar er zijn honderden verschillende epilepsiegenen waarvoor eenzelfde toepassing mogelijk is. Het wachten is dan ook op een succesvolle applicatie en formulering van een gen- of RNA-therapie. Het is daarna mogelijk om met een kleine aanpassing, zoals aanpassing van de RNA-sequentie van een ASO, of de guide RNA voor CRISPR-technieken, de succesvolle therapie geschikt te maken voor een ander epilepsiegen. Hierdoor kan het tijdrovende en kostbare preklinische traject significant verkort worden en zal het mogelijk worden om echte precisetherapie, ontworpen voor de individuele patiënt toe te passen in de kliniek. De toediening van de therapie, via virale-, liposomale-, of andere nanopartikelen, is ook generiek te gebruiken voor verschillende doelgenen. Het NWA-project Nanospresso-NL (<https://www.nwo.nl/onderzoeksprogrammas/nationale-wetenschapsagenda/onderzoek-op-routes-door-consortia-orc/toekenningen/2020/21>) is een goed voorbeeld van deze aanpak. Het project wil een lokale academische productielijn van liposomale DNA- en RNA-geneesmiddelen maken met een gestandaardiseerde machine in de ziekenhuisapotheek. Hierdoor wordt de bereiding van direct klinisch toepasbare genetische therapie mogelijk in het ziekenhuis, als het ware naast het bed van de patiënt. Zo zien wij de veelbelovende toekomst voor snelle en goedkope ontwikkeling van gerichte genetische therapie.

Referenties

- Brodie MJ (2017) Outcomes in newly diagnosed epilepsy in adolescents and adults: Insights across a generation in Scotland. *Seizure*;44:206-210.
- Colasante G, Lignani G, et al. (2020): dCas9-Based Scn1a Gene Activation Restores Inhibitory Interneuron Excitability and Attenuates Seizures in Dravet Syndrome Mice. *Mol Ther*. Jan 8;28(1):235-253.
- Chen YH, Liu SJ, Gao MM, Zeng T, et al. (2017) MDH2 is an RNA binding protein involved in downregulation of sodium channel Scn1a expression under seizure condition. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis*.1863, 1492-1499.
- Dong ZF, Tang LJ, Deng GF, Zeng T, et al. (2014) Transcription of the human sodium channel SCN1A gene is repressed by a scaffolding protein RACK1. *Mol. Neurobiol*. 50, 438-448.
- Doudna JA (2020) The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. Feb;578(7794):229-236.
- Hill SF, Meisler MH (2021) Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodevelopmental Disorders. *Dev Neurosci*. 43(3-4):247-252.
- Lenk GM, Jafar-Nejad P, et al. (2020). Scn8a Antisense Oligonucleotide Is Protective in Mouse Models of SCN8A Encephalopathy and Dravet Syndrome. *Ann Neurol*. Mar;87(3):339-346.
- Li M, Jancovski N, Jafar-Nejad P, et al. (2021): Antisense oligonucleotide therapy reduces seizures and extends life span in an SCN2A gain-of-function epilepsy model. *Clin Invest*. Dec 1;131(23).
- Liang L, Fazel Darbandi S, et al. (2021): Developmental dynamics of voltage-gated sodium channel isoform expression in the human and mouse brain. *Genome Med*. Aug 23;13(1):135.
- Tanenhuis A, Stowe T, et al. (2022): Cell-Selective Adeno-Associated Virus-Mediated SCN1A Gene Regulation Therapy Rescues Mortality and Seizure Phenotypes in a Dravet Syndrome Mouse Model and Is Well Tolerated in Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther*. Jun;33(11-12): 579-597.
- Wengert ER, Wagley PK, et al. (2022): Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output (TANGO) of Scn1a rescues parvalbumin interneuron excitability and reduces seizures in a mouse model of Dravet Syndrome. *Brain Res*. Jan 15;1775.
- Wearing WJ, Singh S, et al. (2020): NaV1.1 and NaV1.6 selective compounds reduce the behavior phenotype and epileptiform activity in a novel zebrafish model for Dravet Syndrome. *PLoS One*;15(3):e0219106.
- Wearing WJ, Dilevska I, et al. (2021a): CRISPRa-Mediated Upregulation of scn1laa During Early Development Causes Epileptiform Activity and dCas9-Associated Toxicity. *CRISPR J*. Aug;4(4):575-582.
- Wout J, Wearing WJ, Dirks N, et al (2022): Efficient and accurate prime editing strategy to correct genetic alterations in hiPSC using single EF-1alpha driven all-in-one plasmids Biorxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2022.05.04.490422>
- Yamagata T, Raveau M, et al. (2020): CRISPR/dCas9-based Scn1a gene activation in inhibitory neurons ameliorates epileptic and behavioral phenotypes of Dravet syndrome model mice. *Neurobiol Dis*. Jul;141:104954.