

Academiejaar 2016 - 2017

IS ER EEN TOEKOMST VOOR GENTHERAPIE VOOR DE BEHANDELING VAN PATIËNTEN MET EPILEPSIE?

Lyssa **MARTENS**

Promotor: Prof. Dr. Robrecht Raedt

Masterproef voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding tot

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

INHOUDSTAFEL

ABSTRACT	1
INLEIDING	2
1. Refractaire epilepsie	3
2. Transfer van genen in neuronen	4
2.1. Virale vectoren	4
2.2. Transgene dieren.....	6
2.3. Combinatie van transgene dieren en virale vectoren.....	7
3. Optogenetica	7
3.1. Optogenetische stimulatie van neurale activiteit	8
3.2. Optogenetische inhibitie van neurale activiteit	11
3.3. Lichttoediening.....	12
4. Chemogenetica	14
4.1. Gq-DREADD's	14
4.2. Gi-DREADD's	16
4.3. Gs-DREADD's en β -arrestine-DREADD's	17
5. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie	17
5.1. Overexpressie van kaliumkanalen	18
5.2. Knock-down van spanningsafhankelijke natriumkanalen.....	18
5.3. Knock-down van NMDA-receptoren	18
5.4. Overexpressie van GABA _A -receptoren	18
6. Celgedieerde vrijstelling	18
6.1. Vormen van celgedieerde vrijstelling.....	19
6.2. Endogene stoffen	19
7. Diermodellen van epilepsie	21
7.1. Tetanustoxine.....	21
7.2. Kaïnaat.....	22
7.3. Pilocarpine	22

7.4. Kindling	22
METHODOLOGIE	23
RESULTATEN.....	24
1. Optogenetica	24
1.1. Optogenetische modulatie van neuronen in modellen voor temporalekwabepilepsie	25
1.2. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor neocorticale epilepsie	29
1.3. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor thalamocorticale epilepsie ...	29
1.4. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor astrocytgerelateerde epilepsie	30
2. Chemogenetica	31
3. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie	32
4. Celgemedieerde vrijstelling	35
4.1. Adenosine	35
4.2. Galanine	37
4.3. Neuropeptide Y	38
4.4. GABA	41
DISCUSSIE.....	42
1. Bedenkingen bij translatie naar de kliniek	42
1.1. Algemeen	43
1.2. Optogenetica	44
1.3. Chemogenetica	46
1.4. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie	47
1.5. Celgemedieerde vrijstelling	47
2. Conclusie	48
REFERENTIES	48

ABSTRACT

Refractaire epilepsie vormt een belangrijk klinisch probleem: bij ongeveer één derde van de patiënten met epilepsie is medicatie niet voldoende om de ziekte onder controle te houden.

Aangezien naast medicatie ook andere behandelingsvormen – waaronder nervus vagus stimulatie en diepe hersenstimulatie – bij sommige patiënten niet effectief blijken te zijn en resectie van de epileptogene focus soms niet mogelijk is, is het belangrijk alternatieve behandelingen te ontwikkelen.

Gentherapie is een behandeling die in ontwikkeling is, en die in het bijzonder nuttig kan zijn voor patiënten met refractaire epilepsie met een focus die niet in aanmerking komt voor resectie. Eén van de mogelijkheden van gentherapie is het inbrengen van genen in neuronen – meestal door middel van virale vectoren – om depolarisatie of hyperpolarisatie van deze cellen te bekomen. Dankzij de spatiale, cellulaire en soms zelfs temporele precisie van gentherapie kan zo de exciteerbaarheid van de pathologische hersenzones bij bepaalde neurologische aandoeningen – zoals epilepsie – worden gewijzigd.

De types gentherapie die in aanmerking komen voor de behandeling van patiënten met epilepsie zijn optogenetica, chemogenetica, spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie en celgemedieerde vrijstelling.

Bij optogenetica worden neuronen genetisch gemanipuleerd om lichtgevoelige eiwitten (opsines) tot expressie te brengen. Belichting van deze opsines resulteert in opening van een kanaal of activatie van een pomp, resulterend in depolarisatie of hyperpolarisatie van de neuronen. Door de exciteerbaarheid van inhibitoire neuronen te verhogen of die van excitatoire neuronen te verlagen, kan men een epileptogene focus minder prikkelbaar maken.

Bij chemogenetica zijn voornamelijk DREADD's relevant voor de behandeling van neurologische aandoeningen. DREADD's zijn genetisch gemanipuleerde receptoren die tot expressie gebracht worden in doelcellen in de hersenen en geactiveerd worden door een exogene stof die men peroraal toedient. Er bestaan verschillende vormen van DREADD's, die onder andere excitatie, inhibitie of modulatie van neuronale signalisatie kunnen teweegbrengen. Voornamelijk de inhibitoire DREADD (hM4Di) is veelbelovend voor de behandeling van epilepsie.

Bij spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie wordt de expressie van endogene ionenkanalen constitutief verhoogd of verlaagd om neuronen te hyperpolariseren of te depolariseren. In preklinische studies bij knaagdieren met epileptische aanvallen bewees men reeds het effect van overexpressie van de GABA_A-receptor, knock-down van de NMDA-receptor, en overexpressie van bepaalde kaliumkanalen.

Bij celgemedieerde vrijstelling van aanvalsonderdrukkende stoffen worden cellen genetisch gemanipuleerd om een hogere vrijstelling van bepaalde endogene stoffen te verkrijgen. Zo verhoogde men in preklinische studies de synthese van de endogene anticonvulsieve stoffen adenosine, galanine, neuropeptide Y en GABA om epileptogene activiteit te reduceren. Hoewel de werkzaamheid van deze vormen van genterapie meermaals werd aangetoond in preklinische studies, is het belangrijk om bepaalde moeilijkheden in acht te nemen die zich kunnen voordoen bij het vertalen van deze vormen van genterapie naar de kliniek. Dit zijn onder andere problemen gerelateerd aan de toediening van virale vectoren, aan de gewijzigde expressie van genen en eiwitten, en aan de praktische uitvoering van genterapie bij de mens.

INLEIDING

Genterapie is een recente technologie waarbij genen ingebracht worden in neuronen zodat een bepaald proces plaatsvindt, afhankelijk van de vorm van genterapie, dat activatie of inhibitie van de cellen bewerkstelligt. Op deze manier kan de exciteerbaarheid van neuronen gemoduleerd worden.

Genterapie werd ontwikkeld omwille van de beperkingen van huidige farmacologische behandelingen. Zo kunnen voornamelijk twee vormen van genterapie, namelijk optogenetica en chemogenetica, met spatiale, cellulaire en temporele specificiteit de neuronale activiteit in de hersenen moduleren. Er wordt dus enkel een effect uitgeoefend op een kleine hoeveelheid afwijkend weefsel. Op deze manier vinden geen systemische bijwerkingen plaats en wordt dus een groot nadeel van huidige farmacologische toediening van medicatie vermeden.

Het doel van deze masterproef is een kritische evaluatie te vormen van wat reeds gebeurd is wat betreft genterapie, wat de voor- en nadelen ervan zijn en wat de bezwaren kunnen zijn, om zo na te gaan of er een toekomst is voor genterapie als behandeling van patiënten met epilepsie.

Eerst zal hiervoor in de inleiding het probleem van refractaire epilepsie worden toegelicht.

Vervolgens zal de algemene werking van de verschillende vormen van genterapie uitgelegd worden, evenals de gebruikte diermodellen in preklinische studies. In de resultaten zullen de bevindingen van preklinische toepassingen in het kader van epilepsie besproken worden.

Vervolgens zullen in de discussie de mogelijkheden tot translatie naar de kliniek overwogen worden met afweging van de voor- en nadelen van de verschillende vormen van genterapie, met ten slotte een kritische discussie over de mogelijke toekomst van genterapie voor de behandeling van epilepsie.

1. Refractaire epilepsie

Voor refractaire epilepsie – ook medicatieresistente epilepsie genoemd – bestaat geen eenduidige definitie, wat ervoor zorgt dat de frequentie van refractaire patiënten moeilijk in te schatten is. Over het algemeen wordt de proportie refractaire patiënten echter geschat op ongeveer een derde van de epilepsiepatiënten (1, 2).

De epidemiologie van refractaire epilepsie wordt bemoeilijkt door verschillende zaken. Ten eerste bestaat geen eenduidige definitie voor refractaire epilepsie (1-3). Omdat de invloed van zelfs een enkele epileptische aanval op fysiek, sociaal en psychologisch functioneren zo groot is, wordt zelfs het optreden van een enkele aanval tijdens de behandeling vaak beschouwd als refractaire epilepsie. In andere studies wordt behandelingsresistentie dan weer beschouwd als het optreden van aanvallen vanaf een bepaalde frequentie (1). Ten tweede is het verloop niet steeds gelijkaardig: patiënten worden niet noodzakelijk refractair op het moment van de diagnose, noch blijven ze onvermijdelijk refractair gedurende het verloop van hun ziekte (1, 3). Als derde factor is het vaak onduidelijk of de als niet-refractair beschouwde patiënten een belangrijk antwoord vertonen op de behandeling aangezien de meeste patiënten snel na het stellen van de diagnose behandeld worden (1). Ten slotte is voldoende aangetoond in klinische studies dat patiënten die beschouwd worden als refractair wel gedeeltelijk antwoorden op hun behandeling en bovendien bij ongeveer de helft van de patiënten een matige tot volledige aanvalsreductie bestaat bij add-onbehandeling (1, 2).

Er is slechts weinig geweten over de oorzaken van refractaire epilepsie. De pathofysiologie wordt sterk onderzocht, evenals de genetische basis van resistentie aan medicatie.

Op basis van studies werden twee neurobiologische theorieën geformuleerd. De eerste wordt de ‘transporterhypothese’ genoemd. Deze hypothese zegt dat er onvoldoende toegang is van anti-epileptische medicatie (AED) tot epileptisch weefsel ten gevolge van een verwijdering ervan door multidrugtransporters die in overdreven mate tot expressie gebracht worden. De tweede hypothese is de ‘targethypothese’, die zegt dat aangeboren of verworven mutaties in de moleculaire ‘targets’ van AED’s leiden tot gereduceerde farmacodynamische effecten van toegediende medicatie. Beide theorieën zijn echter onvoldoende bewezen en in verschillende studies zelfs weerlegd (2, 3).

Op klinisch vlak werden bepaalde genetische en klinische eigenschappen en structurele hersenletsels geassocieerd aan medicatieresistentie in epilepsie (2). Prospectieve studies hebben aangetoond dat – ondanks de heterogeniteit van de etiologie van epilepsie – een consistente vondst in de studies is dat de belangrijkste factor geassocieerd met prognose – dit is de kans op remissie van aanvallen na diagnose – de frequentie van aanvallen in de vroege fase van epilepsie is. Er bestaat dus een associatie tussen een hoog aantal aanvallen in deze periode en een slechtere

outcome. Dit wordt dan ook beschouwd als grootste risicofactor voor medicatieresistentie (3). Een alternatieve interpretatie van de resultaten van deze studies is dat recurrenente aanvallen de epilepsie op termijn meer resistent maken aan behandeling. Er is in de meeste gevallen echter weinig evidentie dat aanvallen leiden tot meer aanvallen, en wel goede evidentie dat de kans op langetermijnremissie van aanvallen niet afhankelijk is van de duur van de epilepsie of van vroege behandeling ervan (3).

Het concept dat factoren gerelateerd aan het frequent optreden van aanvallen geassocieerd zijn met het refractair zijn van epilepsie lijkt biologisch plausibel: als de epilepsie van de aard is dat aanvallen makkelijk uit te lokken zijn, leidend tot frequente aanvallen, dan kunnen de aanvallen ook moeilijker te onderdrukken zijn. Dit wordt aangetoond door de observatie dat in veel modellen van acute aanvallen onderdrukking van de aanvallen door gelijk welke dosis van AED's overkomen kan worden door de intensiteit van de aanvalsuitlokkende farmacologische of elektrische stimulus te verhogen. Als de gevoeligheid voor aanvallen dus voldoende hoog is, kan het onmogelijk zijn om aanvallen te voorkomen met niet-toxische doses van huidig beschikbare AED's (3).

2. Transfer van genen in neuronen

Efficiënte toediening en expressie van de gewenste genen is essentieel om celtypespecifieke genetische wijziging te bekomen. Hiervoor bestaan verschillende methodes. Er wordt voornamelijk gebruik gemaakt van virale vectorsystemen, maar ook transgene dieren vormen een optie. Zelfs een combinatie van deze twee methodes blijkt efficiënt te zijn.

2.1. Virale vectoren

Bij gebruik van virale vectoren bestaat nauwe controle over spatiale lokalisatie van genexpressie. Een gemanipuleerd virus dat een bepaald gen gedreven door een specifieke promotor bevat, wordt geïnjecteerd in de gewenste hersenregio. Deze methode biedt snelle en robuuste expressie, maar de draagkracht (de lengte van het genetisch materiaal dat een virus kan dragen) is beperkt, waardoor de grootte van de promotor beperkt wordt en bijgevolg het aantal celtypes dat specifiek 'getarget' kan worden met voldoende expressie gereduceerd wordt (4).

Sommige virale vectoren werden ontwikkeld om specifieke celklassen te 'targeten', maar de meerderheid van celtypes vereist meer genetisch materiaal dan gedragen kan worden door het virus (4).

2.1.1. Problemen van virale vectoren

Er stellen zich verscheidene mogelijke problemen bij gebruik van virale vectoren. Zo moet rekening worden gehouden met een immuunreactie die kan worden opgewekt door een virale vector of door virale eiwitten die door de getransduceerde cellen tot expressie kunnen worden gebracht, en met de overbrugging van de bloedhersenbarrière (5).

A) Bloedhersenbarrière

De bloedhersenbarrière (BBB) brengt verschillende obstakels met zich mee die ervoor zorgen dat een virale vector niet systemisch kan worden toegediend (figuur 1 in bijlage). Daarom vormt injectie van de virale vector in de gewenste hersenregio – wat de BBB overbrugt – de meest gebruikte toedieningswijze (5).

B) Immuunsysteem

Het immuunsysteem kan op verschillende manieren een hindernis vormen voor het gebruik van virale vectoren. Ten eerste kunnen virale vectoren door aangeboren immuuncellen zoals macrofagen geïnternaliseerd en gedegradeerd worden; ten tweede kunnen reeds aanwezige antilichamen tegen het wild-typevirus – waarvan de vector afgeleid is – de vector elimineren uit de circulatie; en ten slotte kunnen cytotoxische T-cellen gericht tegen virale antigenen of het transgenproduct de cellen die transgenen tot expressie brengen elimineren (figuur 2 in bijlage). Een vector toegediend via de bloedstroom is het meest kwetsbaar voor eliminatie door antilichaamneutralisatie en opsonisatie. Directe injectie in het hersenparenchym of in het CSV kan echter wel transductie bereiken in aanwezigheid van antilichamen aangezien de antilichaamconcentratie veel lager is op deze plaatsen dan in het bloed (5).

De intensiteit van de aangeboren en adaptieve immuunrespons is gerelateerd aan het vectortype (5).

2.1.2. Keuze van de vector

Als vector wordt meestal gekozen voor een lentivirus of een adeno-associated virus (AAV). Ook herpes simplexvirussen (HSV) kunnen in aanmerking genomen worden. Adenovirussen worden zeer frequent gebruikt in klinische studies, maar niet in studies die neurologische ziekten betreffen – voornamelijk wegens hun sterke toxiciteit (6). Daarom zullen adenovirussen hier niet besproken worden.

A) AAV

AAV's zijn de meest frequent gebruikte virale vectoren in (pre)klinische studies van gentherapie voor neurologische ziekten (6). AAV kan langdurige – tot acht jaar in niet-humane primaten –

stabiele genexpressie bewerkstelligen zonder geassocieerde inflammatie of toxiciteit (6, 7). Over het algemeen vinden bij gebruik van AAV's weinig immunoreacties plaats, maar een immunoreactie is mogelijk indien de patiënt al eerder een infectie met AAV heeft gehad. Recent werd gerapporteerd dat in sommige gevallen een reactie van cytotoxische T-lymfocyten kan plaatsvinden tegen cellen die door deze vector getransduceerd werden en een antigeen transgen tot expressie brengen (5). Het grootste nadeel van AAV's is echter hun kleine transgencapaciteit (± 4.5 kb DNA), zodat moeilijker celtypespecificiteit door middel van promotors bereikt kan worden (5, 7).

B) Lentivirus

Lentivirussen hebben een grotere transgencapaciteit (± 9 kb DNA), zodat een betere mogelijkheid bestaat tot gebruik van specifieke promotors (7). Lentivirussen transduceren neuronen echter slechts in een kleine hersenzone, dus zij moeten specifiek in de gewenste hersenzone geïnjecteerd worden (5). Ook worden lentivirussen als minder veilig beschouwd dan AAV. Dit is enerzijds omdat de meeste lentivirale vectoren afkomstig zijn van hiv, anderzijds omdat insertionele mutaties bij traditionele retrovirussen zouden kunnen leiden tot activatie van cellulaire oncogenen (6, 8).

C) HSV

Herpes simplexvirussen hebben een grote transgencapaciteit (> 100 kb DNA) en bieden dus de beste mogelijkheid om celtypespecificiteit te bereiken (7). Deze vectoren brengen echter meer immunoreacties teweeg dan de andere vectoren. Ondertussen zijn relatief veilige recombinant HSV-1 (rHSV-1)-vectoren ontwikkeld, waarbij verschillende genen van het virale genoom verwijderd zijn. Deze vectoren zijn zeer waardevol, aangezien ze weinig wild-type virale genen tot expressie brengen, minimale toxiciteit vertonen en een hoge transgenexpressie bezitten (6). HSV-vectoren zijn voorlopig echter onvoldoende in staat tot langdurige transgenexpressie, wat eraan bijdraagt dat ze tegenwoordig zelden gebruikt worden in klinische studies (6, 7).

2.2. Transgene dieren

Transgene of knock-in dieren, dus dieren die een lichaamsvreemd gen tot expressie brengen, worden voornamelijk gecreëerd door embryonale stamcel (ESC)-gemedieerde gentransfer. Bij ESC-gemedieerde gentransfer gebeurt insertie van de gewenste DNA-sequentie door homologe recombinatie in een in vitro cultuur van embryonale stamcellen. Deze cellen worden dan geïncorporeerd in een embryo in het blastocyststadium. Zo ontstaat een chimeer dier dat het ingebrachte gen tot expressie brengt.

Bij transgenese wordt eveneens gebruik gemaakt van een celtypespecifieke promotor. Er kunnen grotere promotorfragmenten gebruikt worden dan bij virale vectorsystemen, zodat nog meer specifieke expressie in een bepaalde neurale populatie mogelijk is.

Deze methode vereist echter meer werk en tijd om een stabiele transgene lijn te genereren, en het gebruik van deze dieren is beperkt omdat de spatiale lokalisatie die bij viralevectorinjectie bereikt wordt, hier verloren is (4).

2.3. Combinatie van transgene dieren en virale vectoren

De combinatie van Cre-recombinase-gebaseerde muislijnen met virale vectoren, ook ‘flip-excision’ (FLEX)-benadering genoemd, is een belangrijke strategie gebruikt om specifieke celtypes te targeten, en biedt meer flexibiliteit (4, 9). Cre-recombinase katalyseert recombinatie tussen twee loxP-sites die een gen of ander genetisch materiaal flankeren. Afhankelijk van de oriëntatie van deze sites, zal het genetisch materiaal dat tussen hen ligt ofwel omgekeerd (‘reversed’) ofwel uitgeknipt (‘excised’) worden wanneer het Cre-enzym aanwezig is, maar niet beïnvloed worden wanneer het niet aanwezig is. Een virale vector die een geïnverteerd en ‘floxod’ (‘flanked by loxP’) gen bevat, wordt lokaal toegediend in een gekozen hersenregio in een transgene muis die Cre-recombinase in een specifiek celtype tot expressie brengt. Hoewel het virus alle cellen zal infecteren, zal het gen enkel ‘geflipt’ worden op de correcte oriëntatie en functioneel zijn in slechts één celtype aangezien Cre enkel aanwezig is in deze cellen. Gebruik makend van deze methode kan goed afgestemde genetische en spatiale (zelfs projectiespecifieke) ‘targeting’ plaatsvinden (4). Een succesvol gebruik van deze methode vereist efficiënte verpakking van genetisch materiaal dat tot expressie zal worden gebracht in een recombinase-afhankelijk systeem dat twee eigenschappen bezit, namelijk een zeer lage expressie van het ingebrachte gen in cellen die geen recombinase tot expressie brengen en een zeer hoge recombinase-geïnduceerde expressie van het ingebrachte gen (8).

Deze methode kan uitgebreid worden door gebruik van alternatieve recombinases (bv. Dre of Flp) in combinatie met Cre-recombinase om targeten van cellen gedefinieerd door meer dan één eiwit toe te laten (4).

3. Optogenetica

Optogenetica is een vrij recente technologie die gebruikt kan worden om de activiteit van geselecteerde neuronen te controleren door middel van belichting. Deze neuronen worden eerst genetisch gemanipuleerd zodat ze lichtgevoelige eiwitten (opsines) tot expressie brengen. Wanneer deze neuronen vervolgens belicht worden met licht van de juiste golflengte, ondergaat retinaal dat

gebonden is aan het opsine een conformationele verandering die resulteert in opening van een kanaal of activatie van een pomp, wat leidt tot celdepolarisatie of -hyperpolarisatie, afhankelijk van het gekozen opsine (figuur 3 in bijlage). Op deze manier kan men neuronale activatie of inhibitie bewerkstelligen (4, 8).

Naast celtypespecificiteit – door gebruik van een celtypespecifieke promotor – richt optogenetica zich op het bereiken van temporele en spatiale precisie. Celtypespecifieke expressie wordt bereikt door gebruik van transgene dieren, virale vectoren of een combinatie ervan. Spatiaal begrensde lichtapplicatie laat verdere verfijning in targeting van specifieke hersenregio's toe. Licht kan toegediend worden in een verscheidenheid van temporele patronen of kan begrensd worden tot specifieke korte periodes tijdens bepaald gedrag van dieren in vivo, zodat goede temporele precisie mogelijk is (4).

De optogenetica heeft vier grote categorieën wat betreft effect ervan: snelle excitatie, snelle inhibitie, bistabiele modulatie en controle van intracellulaire biochemische signalisatie in neuronen en andere celtypes. De optogenetische technieken laten experimentele manipulaties toe die afgestemd zijn op: (1) het gewenste fysiologische effect; (2) de gewenste kinetische eigenschappen van de licht-afhankelijke modulatie; (3) de vereiste golflengte, vermogen en spatiaal bereik van het lichtsignaal (8).

Optogenetica werd al succesvol gebruikt om een beter inzicht te krijgen in neurale circuits bij onder andere stemmingsstoornissen, verslaving, de ziekte van Parkinson, angst en obsessieve-compulsieve stoornis. Ook om neurale circuits die normaal gedrag – zoals sociaal gedrag en beloningsgedrag – mediëren beter te begrijpen werd optogenetica gebruikt (4, 8).

3.1. Optogenetische stimulatie van neurale activiteit

Voor stimulatie van neurale activiteit wordt voornamelijk gebruik gemaakt van channelrhodopsines, maar er bestaan ook andere varianten die gebruikt worden of in ontwikkeling zijn.

3.1.1. Channelrhodopsines

Channelrhodopsines (ChR's) zijn lichtgevoelige ionenkanalen. ChR2 was het eerste microbieel opsine dat gebruikt werd om de actiepotentiaalactiviteit van neuronen te controleren. ChR2 is een lichtgevoelig niet-specifiek kationkanaal dat, na beschijning met blauw licht, opent en de passage van kationen met de daaropvolgende depolarisatie van de cel toelaat. Zeer korte (milliseconde-durende) blauwlichtpulsen kunnen gebruikt worden om enkelvoudige actiepotentialen te induceren in neuronen die ChR2 tot expressie brengen, en actiepotentiaalactiviteit gedreven door activatie van

dit opsine kan gecontroleerd worden met hoge precisie aan frequenties die 30 actiepotentialen per seconde benaderen. Eens het belang van optogenetica voor neurobiologie en gedragsleer werd bevestigd, werd ChR2 genetisch gewijzigd om expressie ervan in zoogdiersystemen te optimaliseren (4).

Ondertussen werd de optogenetische 'toolbox' uitgebreid en werden veel nieuwe opsines met een waaier van spectrale, temporele en geleidende eigenschappen ontdekt en ontworpen. Microbiële organismen hebben een reeks opsines ter beschikking gesteld die een verscheidenheid aan functionele eigenschappen bezitten en gebruikt kunnen worden voor talrijke toepassingen met slechts minimale nood aan optimalisatie. Bovendien werd eiwitmanipulatie door middel van gerichte mutaties en creatie van chimere gebruikt om een brede set nieuwe functies te creëren, om de bestaande functie te optimaliseren en om controle te verkrijgen over cellulaire targeting van opsines (4).

3.1.2. Ultrasnelle opsines

Generatie van opsines met snellere temporele kinetiek werd bereikt door het versnellen van opsinedeactivatie (off-kinetiek) door gerichte mutatie of door de creatie van chimere. Zo werden onder andere opsines zoals ChETA en ChEF/ChIEF ontwikkeld. Deze opsines zijn geschikt voor toepassingen waarin zeer snelle temporele controle gewenst is aan hoge snelheid in situaties met hoge neurale activiteit (bijvoorbeeld om de activiteit van inhibitoire parvalbumineneuronen met hoge neuronale activiteit te controleren). Bovendien reduceren deze opsines het voorkomen van dubbele of drievoudige actiepotentialen resulterend uit een enkele lichtpuls, wat soms problematisch is bij gebruik van ChR2 wanneer het expressieniveau niet voldoende onder controle is (4).

3.1.3. Step-function opsines

Soms kan het gewenst zijn om het niveau van spontane activiteit van een neurale populatie te modificeren eerder dan de generatie van elke actiepotentiaal te controleren. Deze benadering kan in het bijzonder nuttig zijn in situaties waar meer natuurgetrouwe, gedesynchroniseerde patronen van actiepotentiaalgeneratie verkozen worden. Daarom werden bistabiele opsines of step-function opsines (SFO's) gecreëerd. Dit gebeurde door een modificatie van ChR2 die leidde tot een stabilisatie van de open, geleidende status en dus een vertraagd verval van de fotostromen. De eerste SFO werd gecreëerd door introductie van een puntmutatie van ChR2, die de duur van de open status van het kanaal verlengde tot tientallen seconden, wat een depolariserende 'step' creëerde bij korte belichting. Een andere puntmutatie resulteerde in een deactivatieduur in de grootteorde van minuten. De combinatie van deze twee mutaties resulteerde in een gestabiliseerd

SFO dat een spontane deactivatieduur heeft van bijna een halfuur. Bij gebruik van deze opsines kunnen fotostromen geïnitieerd worden met een korte blauwlichtpuls en beëindigd worden met een geellichtpuls, wat temporele precisie op millisecondeschaal van depolarisatie-onset en -offset toelaat, gekoppeld aan een spontaan patroon van actiepotentiaalgeneratie aan hogere snelheid (4). Twee essentiële kenmerken van SFO's in vergelijking met conventionele ChR's zijn: (i) sterk verhoogde effectieve cellulaire lichtgevoeligheid, die resulteert uit accumulatie van open kanalen tijdens de lichtpuls, leidend tot rekrutering van grotere weefselvolumes; (ii) de asynchrone aard van SFO-gemedieerde neuronale activatie, waarbij niet alle neuronen die de SFO's tot expressie brengen in eenzelfde patroon geactiveerd worden, een eigenschap die de voorkeur zou krijgen in sommige toepassingen, maar niet in andere toepassingen die synchrone of precies getimedede actiepotentialen vereisen (4, 8).

3.1.4. Spectraal verschoven excitatoire opsines

Het ontdekken en ontwikkelen van opsines met verschoven excitatiespectra hadden als doel het bereiken van onafhankelijke optische controle van verschillende populaties neuronen. De ontwikkeling van 'red-shifted' opsines (opsines waarvan de activatie door licht verschoven is naar het rode spectrum) was een doelstelling omwille van twee belangrijke redenen. Ten eerste zou een dergelijk opsine gebruikt kunnen worden in combinatie met blauwlichtgevoelig ChR2 met minimale spectrale overlap. Ten tweede zou een opsine gevoelig aan licht van lange golflengte nuttig zijn om diepe lichtpenetratie in weefsel mogelijk te maken met minder lichtverstrooiing, wat leidt tot minder invasieve lichttoediening (4).

Het eerste red-shifted opsine, VChR1, werd geïdentificeerd in *Volvox carteri* en had een excitatiemaximum aan 535 nm, wat significant red-shifted was vergeleken met ChR2, dat een maximum heeft aan 460 nm. Hoewel gebruik van VChR1 gehinderd werd door lage fotostroom in zoogdiersystemen, vertoont DIV1 – een variant gegenereerd door de N-terminale sequentie van ChR1 te fuseren met de C-terminale sequentie van VChR1 – ook naar rood verschoven piekabsorptie aan 539 nm. Dit DIV1 werd dan algemeen gebruikt, hoewel moet opgemerkt worden dat deze variant relatief lange deactivatiekinetiek heeft vergeleken met ChR2. Een andere variant, rood-activerbaar channelrhodopsine (ReaChR) heeft efficiënter transport naar het membraan en verbeterde expressie in zoogdiercellen met snellere kinetiek en hogere fotostromen. Het is ook significant meer red-shifted, met piekrespons aan 590-630 nm, en werd gebruikt om neuronale activiteit aan te drijven doorheen de intacte schedel (4).

Hoewel deze opsines piekexcitatie tonen voor red-shifted lichtgolflengtes, vertonen ze ook wat residuele absorptie van blauw licht. Dit kan resulteren in een graad van kruisreactie tussen kanalen,

tenzij men zeer precies het expressieniveau en lichtvermogen kalibreert. Twee recent ontdekte opsines vormen echter een significante vooruitgang naar de oplossing van dit probleem. Deze opsines, ontdekt door de novo sequencing van opsines van meer dan honderd soorten algen, zijn Chrimson – een opsine met een excitatiespectrum dat 45 nm naar het rode spectrum verschoven is in vergelijking met vorige ChR's – en Chronos – een blauwlicht- en groenlicht-gevoelig opsine met hoge lichtgevoeligheid en snelle kinetiek (figuur 4 in bijlage). Wanneer deze opsines gecombineerd gebruikt worden, lokt het lage lichtvermogen dat vereist is om Chronos te activeren geen significante respons uit in Chrimson, en het red-shifted licht dat gebruikt wordt om Chrimson te activeren lokt geen respons uit in Chronos. Deze combinatie maakt activatie van neuronale activiteit door twee kleuren mogelijk in onafhankelijke neuronale populaties zonder detecteerbare kruisreactie (4).

3.2. Optogenetische inhibitie van neurale activiteit

3.2.1. Chloorpompen

Een van de meest efficiënte en algemeen gebruikte inhibitoire opsines, NpHR, is een halorhodopsine afkomstig van het archaeon *Natromonas pharaonis*. NpHR pompt chloorionen in de cel onder lichtactivatie, resulterend in hyperpolarisatie. Genetische wijziging van dit rhodopsine bestond uit een serie van correcties met als resultaat eNpHR3.0, een opsine dat verbeterde membraanlokalisatie vertoont en een grote fotostroom toelaat. Met een excitatiemaximum aan 590 nm, wordt eNpHR3.0 gedreven door groene, gele of rode lichtgolflengtes, wat het gebruik van goedkopere lasersystemen mogelijk maakt (4).

3.2.2. Protonpompen

Protonpompen kunnen ook gebruikt worden om neuronen te inhiberen door middel van hyperpolarisatie die bereikt wordt door protonen uit de cel te pompen. Overigens hebben ze bepaalde eigenschappen die hen nuttige alternatieven voor chloorpompen maken. Ze vertonen namelijk snel herstel na inactivatie en hoge door licht aangedreven stromen (4).

3.2.3. Spectraal verschoven inhibitoire opsines

Recent zijn spectraal verschoven inhibitoire opsines ontwikkeld. De inhibitoire chloorpomp- en protonpomp-opsines (hierboven besproken) zijn significant red-shifted in vergelijking met ChR2: de chloorpomp eNpHR3.0 heeft een excitatiemaximum aan 590 nm, terwijl protonpompen zoals eArch3.0, eArchT3.0 en eMac3.0 excitatiemaxima hebben tussen 520 en 550 nm. Er werd gefocust op het vinden of ontwikkelen van een groter aantal red-shifted inhibitoire opsines – voor maximale en niet-invasieve lichtpenetratie in de hersenen – en blue-shifted inhibitoire opsines – voor

simultane controle van verschillende soorten kanalen met de huidig beschikbare inhibitoire opsines. Recent was er een significante vooruitgang naar de ontwikkeling van sterk red-shifted inhibitie. Er werd een red-shifted cruxhalorhodopsine ontdekt en geoptimaliseerd, genaamd Jaws. Deze chloorpomp is een sterk lichtgevoelig opsine met fotostromen die drie keer groter zijn dan die van andere gekende inhibitoire opsines (4).

Recente studies hebben de kristalstructuur van channelrhodopsinehybride C1C2 gebruikt om een klasse lichtgeactiveerde inhibitoire chloorkanalen te creëren. iC1C2 laat 'blue-shifted' inhibitie toe met snelle kinetiek, terwijl SwiChR step-function inhibitie biedt. Deze klasse van kanalen maakt de creatie van verschillende varianten met verbeterde lichtgevoeligheid, step-functionkinetiek en andere kenmerken gelijkaardig aan ChR-varianten mogelijk (4).

3.2.4. Aniongeleidende channelrhodopsines

Anion channelrhodopsines (ACR's) zijn vrij recent ontdekte chloorgeleidende channelrhodopsines die zeer efficiënte inhibitie in neuronen mogelijk maken. Initieel werden ACR's ontworpen uit kationgeleidende channelrhodopsines (ChR's) en later werden ze ontdekt in het genoom van cryptofytalgen (10-12).

De eerst ontdekte ACR's waren de *Guillardia theta* ACR's (GtACR1 en GtACR2). GtACR1 heeft dankzij zijn lichtabsorptiepiek aan 515 nm – en dus belichting door groen licht – een voordeel ten opzichte van GtACR2, dat een maximale absorptie vertoont aan licht met een kortere golflengte van 470 nm – en dus belicht wordt door blauw licht (10, 11).

Recent werd een andere ACR ontdekt in *Proteomonas sulcata* – genaamd PsACR1 – die een strikte anionselectiviteit vertoont die gelijkaardig is aan deze bij GtACR's (11, 12). PsACR1 heeft een tien keer lagere kanaalactiviteit dan de GtACR's, maar een acht keer snellere halfwaardetijd van de sluiting van het kanaal, zodat het in het bijzonder geschikt is voor inhibitie van een subklasse van neuronen die aan hoge frequentie depolariseert (12). De maximumactivatie van PsACR1 gebeurt bij belichting met een golflengte van 540 nm, wat impliceert dat PsACR1 beschenen wordt met groen licht en dat hier nog minder verstrooiing optreedt dan bij de GtACR's (11, 12). Bovendien bestaat bij de groen licht absorberende GtACR1 en PsACR1 de mogelijkheid om in optogenetische experimenten gecombineerd te worden met blauw licht absorberende kationgeleidende ChR's (11).

3.3. Lichttoediening

3.3.1. Lichtbronnen

Optogenetische experimenten kunnen, afhankelijk van de toepassing, een lichtbron vereisen die een specifieke distributie van golflengtes uitzendt met snelle temporele modulatie, met hoog vermogen en met een specifiek spatiaal patroon. Aangezien optogenetische instrumenten gebaseerd op

microbiële opsines gedeactiveerd kunnen worden door licht met golflengtes die dichtbij de activatiegolflengte liggen, worden lichtbronnen met scherpe spectrale afstemming meestal verkozen boven breedbandlichtbronnen. De meest frequent gebruikte lichtbronnen zijn lasers en LED's (8).

A) Laserlichtbronnen

Lasers worden het meest frequent gebruikt in optogenetica omdat ze de toepassing van licht van nauwe bandbreedte (< 1 nm) toelaten – wat multimodale optische controle met meer dan één opsine faciliteert – en omdat ze efficiënt aan optische vezels kunnen worden gekoppeld. Dit laatste is vooral een voordeel in manipulatie van diepe hersenstructuren met een geïmplanteerde optische vezel. Bovendien vertonen laserstralen een hoog vermogen en een lage divergentie; dit laatste heeft een minimale scattering als gevolg en dus de mogelijkheid om een klein volume weefsel te bereiken (4, 8).

B) Light emitting diodes (LED's)

LED's zijn eenvoudig, goedkoop, vereisen geen complexe controle-elektronica en hebben nauwe spectrale afstemming met diverse kleuropties. De lage efficiëntie van koppeling van de LED's aan optische vezels beperkt echter de bruikbaarheid van LED-lichtbronnen voor sommige lichtgolflengtes wegens laag resulterend vermogen aan de vezeltop. Ook hittegeneratie kan problematisch zijn, in het bijzonder voor in vivo gebruik. Toch maken hun klein formaat en het lage vereiste vermogen LED's zeer nuttig voor multi-site belichting en draagbare draadloze optogenetische apparaten (4, 8).

3.3.2. Belichtingsdiepte

A) Lichttoediening aan oppervlakkige structuren

In experimentele preparaten die rechtstreeks bereikbaar zijn voor licht zoals gecultiveerde neuronen, hersensneden of corticaal oppervlak, wordt licht gewoonlijk toegediend doorheen een microscoopbelichtingspad, passerend doorheen het objectief en zo een plaats belichtend die binnen het gezichtsveld ligt (8).

B) Lichttoediening aan diepe structuren

In vivo kan het mogelijk zijn dat licht gericht moet worden op diepe hersenstructuren. Een dunne optische vezel (< 200 nm) kan gebruikt worden om licht van een bron – meestal een laser – rechtstreeks naar een gekozen intracraniële locatie te brengen met minimale weefschade en bovendien efficiënte koppeling aan de lichtbron. Optische vezels (glasvezels) zijn dunne, flexibele

kabels die bestaan uit transparant materiaal en dienen als lichtgeleiders. De vezel kan ofwel rechtstreeks in de hersenen ingebracht worden met behulp van een stereotactisch apparaat (voor geanestheerde preparaten) of kan ingebracht worden in een canule die vooraf stereotactisch geïmplant werd, waarbij gelijktijdige farmacologische manipulaties mogelijk zijn. Als alternatief kan een korte optische vezel met één uiteinde gelokaliseerd in de doelregio in de hersenen en het andere uiteinde eindigend aan een miniatuur-optische-vezelconnector permanent geïmplant worden en vastgemaakt worden aan de schedel; deze methode heet ‘implanted fiberoptic lightguide’ (IFL) (4, 8).

4. Chemogenetica

Chemogenetica is een methode waarbij eiwitten gemanipuleerd worden om te interageren met exogene kleine moleculen die werken als chemische actoren. Over de laatste twee decennia werd een groot aantal chemogenetische platformen ontwikkeld die zeer nuttig geweest zijn binnen de neurowetenschappen. Chemogenetisch werd een aantal eiwitklassen ontwikkeld, waaronder kinasen, niet-kinase-enzymen, ‘G-protein coupled receptors’ (GPCR’s) en ‘ligand-gated ion channels’. Er bestaan verscheidene GPCR-gebaseerde chemogenetische tools. Deze omvatten eerstegeneratie-platformen (allel-specifieke GPCR’s), tweedegeneratie-platformen (RASSL’s en ‘engineered GPCR’s’) en derdegeneratie-platformen (DREADD’s). DREADD’s (‘Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs’) worden het meest frequent gebruikt als chemogenetische ‘tool’. Deze worden hier dan ook meer in detail besproken (13).

DREADD’s kunnen worden ingedeeld in Gq-DREADD’s, Gi-DREADD’s, Gs-DREADD’s en β -arrestine-DREADD’s. Deze verschillende soorten DREADD’s leiden respectievelijk tot neuronale excitatie, neuronale inhibitie, modulerende signalisatie en arrestinesignalisatie (figuur 5 in bijlage). Een belangrijk voordeel van DREADD’s is dat ze gebruikt kunnen worden voor celtypespecifieke en projectiespecifieke modulatie van neuronale activiteit, dit bovendien met temporele precisie (figuur 6 in bijlage).

4.1. Gq-DREADD’s

De oorspronkelijke Gq-DREADD, een excitatoire DREADD, werd gecreëerd door de humane M3-muscarinereceptor (hM3) te onderwerpen aan meerdere cycli van willekeurige mutagenese in een gist die een chimeer Gq-eiwit tot expressie bracht. Slechts twee puntmutaties bleken vereist te zijn om een mutante hM3 te bereiken met drie belangrijke kenmerken, namelijk (i) nanomolaire potentie voor clozapine-N-oxide (CNO), een farmacologisch inert metaboliet van het anti-psychotisch geneesmiddel clozapine, (ii) ongevoeligheid voor acetylcholine, de endogene ligand

van de muscarinerge acetylcholinereceptor (mAChR), en (iii) een laag niveau van constitutieve activiteit (figuur 7 in bijlage). Deze DREADD werd hM3Dq genoemd (9, 13, 14).

Verder werden initieel nog twee additionele Gq-gekoppelde DREADD's gecreëerd, elk gebaseerd op een verschillende humane muscarinereceptor. Deze DREADD's werden hM1Dq en hM5Dq genoemd. De drie initiële DREADD's worden alle geactiveerd door lage nanomolaire concentraties van CNO en mobiliseren intracellulair calcium. Deze Gq-DREADD's oefenen hun excitatoir effect uit door het verhogen van neuronale activiteit en door activatie van Gq-signalisatie in neuronale en niet-neuronale cellen. Van deze drie DREADD's wordt hM3Dq het meest frequent gebruikt (13). CNO, de prototype chemische actuator voor Gq-DREADD's, heeft uitstekende farmacologische eigenschappen met snelle penetratie en distributie in het centraal zenuwstelsel. De stof blijft in vivo in muizen minstens 60 minuten aanwezig na intraperitoneale toediening. Gezien de lange verblijfsduur in het lichaam, is het niet verbazend dat de in vivo effecten van CNO-gemedieerde activatie van hM3Dq robuust en langdurig zijn. Tenzij langdurige activatie van Gq-signalisatie en neuronale activiteit nodig is, is het aanbevolen dat de laagst effectieve dosis van CNO toegediend wordt zodat enkel piekconcentraties van CNO de DREADD activeren. Wanneer een grote dosis van CNO wordt toegediend, kunnen de effecten van CNO zeer langdurig zijn omdat concentraties van CNO in de hersenen langdurig hoger blijven dan de drempel voor activatie van de DREADD-receptor. Lagere systemische doses van CNO daarentegen zouden resulteren in tijdelijke piekactivatie gevolgd door een relatief snel verval van activiteit (13).

Omdat CNO gedeeltelijk kan worden gemetaboliseerd tot clozapine via 'backtransformatie' en op die manier nevenwerkingen zou kunnen veroorzaken, werden nieuwe chemische actuatoren voor de Gq-DREADD's ontwikkeld. De eerste, Compound 21, heeft minimale 'off-target'-activiteit en uitstekende selectiviteit voor het activeren van hM3Dq versus muscarinereceptoren en andere GPCR's. Inleidende studies wijzen erop dat Compound 21 in vivo equivalente potentie heeft vergeleken met CNO. Het kan waarschijnlijk niet via normale routes gemetaboliseerd worden naar clozapine of gelijk welke gerelateerde stof. Daarom vormt Compound 21 een alternatief voor CNO voor studies waarin 'backmetabolisme' van CNO naar clozapine een probleem vormt. Een tweede stof, die overigens in het bijzonder geschikt is voor translationele studies, is perlapine, een geneesmiddel dat in Japan gebruikt wordt voor insomnie. Perlapine heeft een meer dan 10.000-voudige selectiviteit voor het activeren van hM3Dq versus muscarinereceptoren. Aangezien perlapine een matige affiniteit heeft voor sommige biogenische aminereceptoren is het essentieel om perlapine aan de laagst mogelijke dosis te testen in dieren die geen DREADD's tot expressie brengen vooraleer te beginnen aan studies die gebruik maken van DREADD's. Deze studies zouden verzekeren dat off-target-acties van perlapine niet interfereren met het bestudeerde

fenomeen. Perlapine zal waarschijnlijk het meest bruikbaar zijn in translationele studies van DREADD's in primaten en misschien in mensen (13).

Sinds de ontdekking dat CNO-geïnduceerde activatie van hM3Dq leidde tot depolarisatie en excitatie van genetisch gedefinieerde neuronen, werd hM3Dq frequent gebruikt om neuronale activiteit te versterken; dit gebeurde in studies waarin bijvoorbeeld voeding, energieverbruik, locomotie en striatale synaptogenese, geheugen en sociaal gedrag gemoduleerd werden door hM3Dq in vivo. Omdat hM3Dq-activatie intracellulaire calciumvrijstelling induceert, werd het ook gebruikt om astrocyten, hepatocyten, bèta-cellen van de pancreas, vasculaire gladde spiercellen en iPS-afgeleide neuroblasten te stimuleren (13).

4.2. Gi-DREADD's

Momenteel bestaan drie Gi-DREADD's: hM2Di, hM4Di en KORD. Van deze kunnen hM2Di en hM4Di geactiveerd worden door CNO, Compound 21 en perlapine. Tegenwoordig is hM4Di de meest frequent gebruikte inhibitoire DREADD. Het kan succesvolle neuronale inhibitie teweegbrengen, kan amfetaminesensitisatie en synaptische plasticiteit moduleren en kan ademhaling, eetgedrag, jeuk en emotioneel gedrag reguleren. De κ -opioïd-afgeleide DREADD (KORD) is een nieuwe chemogenetische GPCR die geactiveerd wordt door de farmacologisch inerte stof salvinorin B. Deze stof heeft geen activiteit op andere geteste moleculaire targets (GPCR's, ionenkanalen, transporters en enzymen) en heeft dus schijnbaar geen off-target-activiteit. De stof heeft echter slechts matige affiniteit voor de κ -opioïd-receptor (KOR), zodat KORD aan de laagst mogelijke dosis gebruikt moet worden en geverifieerd moet worden dat salvinorin B geen effecten heeft in afwezigheid van KORD. Er is al aangetoond dat succesvolle inhibitie van neurale activiteit bereikt wordt met KORD. Salvinorin B heeft echter een kort halfleven – korter dan CNO – zodat het meer geschikt is voor studies waar relatief acute neuronale inhibitie vereist is. CNO-gebaseerde DREADD's zijn dan weer nuttiger waar langdurige inhibitie nodig is (13, 15).

Zowel hM4Di als KORD lijken neuronale activiteit te inhiberen via twee mechanismen: (i) inductie van hyperpolarisatie door $G\beta/\gamma$ -gemedieerde activatie van specifieke kaliumkanalen, namelijk 'G-protein inwardly rectifying potassium channels' (GIRK's) en (ii) inhibitie van de presynaptische vrijstelling van neurotransmitters (synaptische inhibitie). Bovendien kan activatie van hM4Di ook leiden tot andere downstream signalisatiefenomenen, zoals de activatie van de ERK/MAPK-pathway (9, 13).

In tegenstelling tot bacteriële opsines die neuronen inhiberen via een sterke hyperpolarisatie en met millisecondeprecisie, induceren DREADD's een matige hyperpolarisatie en een schijnbaar sterke inhibitie van axonale vrijstelling van een neurotransmitter in een tijdschaal van seconden, minuten

of uren. Omdat hM4Di en KORD afhankelijk zijn van $G\beta/\gamma$ -gemedieerde activatie van GIRK's om hyperpolarisatie te induceren, is het mogelijk dat ze niet alle neuronen kunnen hyperpolariseren. Tot nu toe werd echter niet gerapporteerd dat hM4Di of KORD niet in staat was om neuronale activiteit partieel of volledig te inhiberen (13).

Aangezien de G_i -gekoppelde DREADD's effecten hebben op axonale vrijstelling, werd nagegaan of CNO (of een analoog ervan) of salvinorin B (of een analoog ervan) lokaal geïnjecteerd zou kunnen worden om lokaal neurale activiteit te onderdrukken. Minstens twee studies hebben op een succesvolle manier axonale projecties geïnhibeerd via lokale toediening van CNO. Axonen werden ook geactiveerd door lokale CNO-injectie in ratten die hM3Dq tot expressie brengen. Voor selectieve axonale inhibitie werd een variant van hM4Di gecreëerd die zich preferentieel richt op axonen en axonuiteinden (13).

4.3. Gs-DREADD's en β -arrestine-DREADD's

In tegenstelling tot de huidige G_q - en G_i -DREADD's vertoont de – overigens enige – Gs-DREADD (GsD) enige constitutieve activiteit in getransfecteerde cellen, wat leidt tot een matig basaal fenotype in β -cellen van de pancreas. Aangezien $G\alpha_{olf}$ het voornaamste Gs-like $G\alpha$ -eiwit is in sommige hersenzones, was het kritisch om te bepalen of GsD ook $G\alpha_{olf}$ kan activeren. Er werd aangetoond dat GsD in vitro en in vivo efficiënt koppelt aan $G\alpha_{olf}$, en dat GsD in vitro en in vivo minimale constitutieve activiteit heeft voor $G\alpha_{olf}$ -gemedieerde signalisatie (13). GsD werd al meermaals gebruikt om de rol van Gs-like signalisatie voor verscheidene vormen van gedrag te onderzoeken, zoals alcoholgebruik, beloningsgedrag, locomotorische sensitiviteit en circadiaanse ritmes (13).

Eveneens werd een DREADD ontwikkeld die schijnbaar enkel via β -arrestine signaleert. Deze DREADD werd nog niet gebruikt in vivo, maar heeft het potentieel om specifieke fenomenen downstream van β -arrestine-signalisatie te verduidelijken (13).

5. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie

Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie omvat constitutieve op- of downregulatie van endogene ionenkanalen die de exciteerbaarheid controleren door middel van genetisch gemanipuleerde overexpressie of knock-down van deze kanalen. Enerzijds kan de intrinsieke exciteerbaarheid gemoduleerd worden zodat neuronale activiteit rechtstreeks gemanipuleerd kan worden, dit door middel van wijziging van de expressie van kalium- of natriumkanalen. Anderzijds kan de synaptische exciteerbaarheid gemoduleerd worden door de graad van excitatoire of

inhibitoire synaptische input te wijzigen, dit door wijziging van de expressie van excitatoire of inhibitoire neurotransmitterreceptoren, zoals NMDA- en GABA_A-receptoren (7).

5.1. Overexpressie van kaliumkanalen

Als essentiële onderdrukkers van intrinsieke exciteerbaarheid kunnen kaliumkanalen zoals Kv1.1 tot overexpressie worden gebracht om therapeutisch de activiteit van neuronen te onderdrukken of volledig te inhiberen (7, 16, 17).

5.2. Knock-down van spanningsafhankelijke natriumkanalen

Spanningsafhankelijke natriumkanalen (Na_v's) versterken intrinsieke exciteerbaarheid, wat Na_v-knock-down een aantrekkelijke benadering maakt in de therapeutische inhibitie van neuronale activiteit (7).

5.3. Knock-down van NMDA-receptoren

NMDA-receptoren (NMDAR) spelen een kritische rol in excitatoire glutamaterge synaptische transmissie binnen het CZS. Receptoractivatie resulteert in een niet-selectieve kationflux die aan de basis ligt van de trage component van de snelle excitatoire post-synaptische stroom. Verhogingen in de post-synaptische calciumconcentratie volgend op NMDAR-activatie zijn cruciaal voor activiteitsafhankelijke versterking van synaptische transmissie, en deze synaptische plasticiteit is vaak essentieel voor langdurige versterking van de exciteerbaarheid van neurale netwerken. Een aantal studies heeft dan ook het therapeutische potentieel van NMDAR-knock-down voor de behandeling van stoornissen van neuronale hyperexciteerbaarheid geëxploreerd (7).

5.4. Overexpressie van GABA_A-receptoren

GABA_A-receptoren spelen een essentiële rol in inhibitoire synaptische transmissie binnen het CZS. Overexpressie van deze chloorpermeabele ionotrope receptor heeft dus het potentieel om op een therapeutische wijze lokale exciteerbaarheid van neurale netwerken te onderdrukken (7).

6. Celgemedieerde vrijstelling

Celgemedieerde vrijstelling houdt in dat cellen die bepaalde genen tot expressie brengen die leiden tot productie van endogene stoffen, genetisch gemanipuleerd worden om overexpressie van deze genen te verkrijgen en dus de aanmaak van deze stoffen te verhogen.

6.1. Vormen van celgemedieerde vrijstelling

Er bestaan twee vormen van celgemedieerde vrijstelling: enerzijds ex vivo genterapie, dat gebruik maakt van celtransplantaties, en anderzijds in vivo genterapie, dat in vivo genetisch materiaal in cellen inbrengt.

6.1.1. Ex vivo celgemedieerde vrijstelling

Bij ex vivo genterapie – dus celtransplantaties – worden stamcellen eerst geïsoleerd en vervolgens wordt expansie teweeggebracht. Er kunnen embryonale stamcellen of neurale stamcellen worden gebruikt. In het geval van embryonale stamcellen kan men predifferentiatie en/of genetische modificatie uitvoeren. Stamcellen kunnen gemanipuleerd worden zodat ze neurotransmitters, neuromodulators of neuropeptiden secreteren. Nadien worden de stamcellen getransplanteerd in de patiënt, waar ze moeten overleven en klinische voordelen moeten bieden door lokale toediening van een endogene therapeutische stof.

Het voordeel van ex vivo genterapie is dat de cellen gescreend kunnen worden voor transductiegeïnduceerde defecten voordat transplantatie plaatsvindt. Het nadeel is de beperkte capaciteit van stamcellen om te integreren in de hersenen en specifieke neuronale fenotypes te bewerkstelligen (18, 19).

6.1.2. In vivo celgemedieerde vrijstelling

In vivo celgemedieerde vrijstelling houdt in dat in vivo directe transfer van genetisch materiaal in cellen plaatsvindt, gebruik makend van virale en chemische agentia. Zoals bij andere vormen van in vivo genterapie zijn virale vectoren de meest efficiënte methode. Meestal worden AAV's, retrovirussen (voornamelijk lentivirussen) en HSV gebruikt (18, 19).

6.2. Endogene stoffen

De endogene stoffen die reeds getest zijn en die neuronale exciteerbaarheid verlagen zijn adenosine, galanine, neuropeptide Y (NPY), GABA en norepinefrine.

6.2.1. Adenosine

Adenosine is een endogene neuromodulator die aanwezig is in het intra- en extracellulair milieu van de hersenen. In normale fysiologische omstandigheden is de adenosineconcentratie in cellen en weefselvocht zeer laag, maar in situaties van celnood – bijvoorbeeld ischemie of epileptische aanvallen – verhoogt de concentratie zeer snel. ATP wordt dan namelijk vrijgesteld in het extracellulair milieu en snel omgezet tot adenosine (18).

Adenosine werkt via binding op specifieke GPCR's voor adenosine. De A₁- en A_{2A}-receptoren zijn het meest overvloedig aanwezig in de hersenen. Het inhiberend effect van adenosine is gemedieerd door binding op de hoge-affiniteit A₁-receptor die aanwezig is in de cerebrale cortex, hippocampus, thalamus, cerebellum, hersenstam en ruggenmerg. Activatie van presynaptische A₁-receptoren leidt tot inhibitie van vrijstelling van de excitatoire neurotransmitter glutamaat; activatie van postsynaptische A₁-receptoren hyperpolariseert neuronen (18).

In studies werd verhoogde aanwezigheid van adenosine zowel ex vivo als in vivo reeds bereikt. Bij de ex vivo methode werden nierfibroblasten, myoblasten van muizen en embryonale stamcellen van muizen genetisch gemanipuleerd zodat ze adenosine zouden vrijstellen door het gen voor adenosinekinase (ADK) – een enzym dat adenosine metaboliseert – te verstoren door middel van chemische mutagenese of via homologe recombinatie. De afwezigheid van ADK-expressie leidde tot daling van fosforylatie van adenosine tot AMP, zodat intracellulaire accumulatie van adenosine plaatvond. Adenosine werd dan passief gesecreteerd door de genetisch gemanipuleerde adenosinekinase-knock-out-cellen via nucleosidetransporters (18, 19).

Ook gebruik van een lentiviraal systeem als vector voor inhibitor micro-RNA gericht tegen ADK resulteerde in een sterke downregulatie van ADK-expressie in humane mesenchymale stamcellen (hMSC's), wat resulteerde in langdurige secretie van adenosine door de hMSC's (18, 19).

In vivo werden AAV-vectoren gebruikt om de ADK-expressie te verlagen (20, 21).

6.2.2. Galanine

Galanine is een neuropeptide dat een inhibitor effect heeft op neuronen en fysiologisch actief is als endogeen anticonvulsivum. In vivo transfer van de neuropeptidegenen in endogene neuronen werd reeds bereikt door lokale injectie van virale vectoren in hersenen van dieren. Dit bleek de exciteerbaarheid van de neuronen te verlagen (19).

6.2.3. Neuropeptide Y

Neuropeptide Y (NPY) is een tyrosinerijk neuropeptide dat onder andere betrokken is in de regulatie van neuronale exciteerbaarheid en een rol zou spelen in epilepsie als endogeen anticonvulsivum. In studies werd reeds aangetoond dat neuronale overexpressie van NPY in de hersenen leidt tot een verlaagde exciteerbaarheid van de neuronen (19).

6.2.4. GABA

GABA (γ -aminoboterzuur) is de belangrijkste inhibitor neurotransmitter in de hersenen. Het wordt gevormd door het enzym glutamaatdecarboxylase (GAD), dat glutamaat decarboxyleert tot GABA. Bij verlies van GAD-positieve interneuronen – zoals gezien kan worden in ziekten met

verhoogde exciteerbaarheid – ontstaat verstoorde inhibitoire GABA-signalisatie en bijgevolg hyperexciteerbaarheid.

In verscheidene studies werden cellen die rijk waren aan GABA getransplanteerd in hersenen van ratten. Er werd aangetoond dat dit leidde tot verlaagde exciteerbaarheid van de neuronen (19).

6.2.5. Norepinefrine

De locus coeruleus (LC) is de voornaamste bron van norepinefrine (NE) in de hersenen. Verhoging van extracellulaire NE-concentraties door zijn opname te blokkeren of door elektrische stimulatie van de LC induceert een verzwakking van het proces in de amygdala dat hyperexciteerbaarheid bevordert (19).

Transplantatie van NE-rijke neuronen in de hersenen van NE-gedepleteerde ratten heeft in meerdere studies aangetoond dat dit de exciteerbaarheid van neuronen verlaagt, maar is minder effectief dan adenosine en andere geteste endogene stoffen (19).

7. Diermodellen van epilepsie

Er bestaan verscheidene manieren om diermodellen van epilepsie te genereren. Aanvallen kunnen chemisch geïnduceerd worden door middel van injectie van tetanustoxine, kaïnaat of pilocarpine, of elektrisch. Als men herhaaldelijk acute aanvallen induceert, dan spreekt men van het ‘kindling’-model, waarbij de aanvallen toenemen in ernst. Tetanustoxine wordt voornamelijk gebruikt om een model van focale neocorticale epilepsie te induceren, de andere voornamelijk om een model van temporalekwabepilepsie te induceren. De hoofdkenmerken van dit laatste type epilepsie – waaraan voldaan moet worden in de diermodellen – zijn (i) epileptische foci in het limbisch systeem (het limbisch systeem is een geheel van hersenstructuren waartoe onder andere de hippocampus, amygdala, gyrus cinguli, hypothalamus, bulbus olfactorius, cortex orbitofrontalis en septum pellucidum behoren, en is verantwoordelijk voor onder andere geheugen, emoties en gedrag); (ii) een ‘initieel letsel’; (iii) de ‘latente periode’; en (iv) de aanwezigheid van hippocampale sclerose die leidt tot reorganisatie van neuronale netwerken (22).

7.1. Tetanustoxine

Tetanustoxine (TT) wordt frequent gebruikt om een model van focale neocorticale epilepsie te genereren. Injectie van TT in de motorische neocortex van ratten resulteert in spontane milde gedragsmatige aanvallen die permanent persisteren. Afwijkende EEG-signalen treden tot tachtig procent van de tijd op, gelijktijdig met klinische aanvallen bestaande uit verstoord gedrag, ritmische bilaterale spiercontracties van het aangezicht en periodes van abrupte motorische uitval. (23).

7.2. Kaïnaat

Toediening van KA in de amygdala resulteert in bilaterale hippocampale letsels en het optreden van een status epilepticus, gevolgd door een chronische fase met spontane epileptische aanvallen. Intracerebrale injectie van KA in de hippocampus of amygdala resulteert in een goed model van temporalekwabepilepsie, aangezien in de chronische fase van het model de typische histopathologische en elektro-encefalografische afwijkingen aanwezig zijn die ook gezien worden in patiënten met dit type epilepsie.

Ook systemische injectie van KA is mogelijk. Hierbij is het echter moeilijker om de juiste dosis in de hersenen te verkrijgen. Ook bij systemische injectie treedt status epilepticus op. De letsels geïnduceerd door systemische toediening van KA lijken op die na intracerebrale toediening, maar zijn uitgebreider. Neuronenverlies treedt hier bilateraal op en zowel in temporale als extratemporale hersenzones. De schade in elke regio is echter wel meer beperkt dan lokale letsels veroorzaakt door intracerebrale injecties.

Bij de status epilepticus geïnduceerd door systemische of intracerebrale injectie van KA worden automatismen en een katatonische houding waargenomen, die vaak overgaan naar myoclonische spiercontracties van het hoofd, de voorpoten en achterpoten. Op het EEG worden afwijkingen gezien tijdens en tussen de waarneembare gedragsmatige aanvallen (24).

7.3. Pilocarpine

Pilocarpine geeft een gelijkaardig model van epilepsie, dat bijgevolg ook goed strookt met de menselijke temporalekwabepilepsie. Injectie ervan induceert na ongeveer tien minuten een status epilepticus gekenmerkt door tonisch-clonische gegeneraliseerde aanvallen. Deze status epilepticus kent een spontaan einde na enkele uren, waarna een aanvalsvrije periode optreedt – de ‘latente periode’. Na deze latente periode treden spontane recurrenente aanvallen op. Deze aanvallen beginnen ongeveer zeven dagen na de status epilepticus als partiële aanvallen, waarna zich in de daaropvolgende dagen ook gegeneraliseerde aanvallen ontwikkelen (22).

7.4. Kindling

‘Kindling’ houdt in dat elektrische stimulatie van bepaalde hersenzones leidt tot epileptische aanvallen. Partiële en gegeneraliseerde aanvallen worden uitgelokt door toediening van elektrische stimuli aan limbische structuren, waarbij steeds complexere elektro-encefalografische en gedragsmatige afwijkingen ontstaan.

De gedragsmatige respons in het kindlingmodel wordt gekenmerkt door vijf progressieve en cumulatieve stadia – de stadia van Racine. Het eerste stadium omvat aangezichtsbevingen zoals knipperen met de ogen of kauwbevingen. In het tweede stadium worden oscillatoire bevingen

van het hoofd waargenomen. In het derde stadium vertoont het dier myoclonische bewegingen van de voorpoten – initieel contralateraal, vervolgens bilateraal. Het vierde stadium wordt gekenmerkt door het oprichten van het lichaam en het staan op de achterpoten. In het vijfde stadium treden gegeneraliseerde tonisch-clonische aanvallen op en is er een verlies van lichaamsevenwicht (25).

METHODOLOGIE

De zoektocht naar literatuur over de verschillende types genterapie gebeurde met behulp van Mesh en PubMed.

Om artikels te vinden over optogenetica werd via MeSH gezocht naar het trefwoord ‘optogenetics’. De filters ‘review’ en ‘publication dates: 5 years’ werden doorgevoerd om artikels te vinden die een algemene werking van optogenetica beschreven, zodat dit in de inleiding verwerkt kon worden. Voor het onderdeel ‘resultaten’ werden de MeSH-trefwoorden ‘optogenetics’ en ‘epilepsy’ gecombineerd met dezelfde filters. In beide gevallen leidde de sneeuwbal methode tot de verzameling van artikels.

Wat betreft chemogenetica werd gezocht naar het trefwoord ‘chemogenetics’, opnieuw met dezelfde filters en vervolgens gecombineerd met het trefwoord ‘epilepsy’. Ook hier werd de sneeuwbal methode gebruikt.

Artikels over spanningsafhankelijke ionenkanaal genterapie werden enerzijds gevonden in referenties van andere reviews en anderzijds door de MeSH-termen ‘genetic therapy’ en ‘ion channel’ te combineren met opnieuw dezelfde filters en door vervolgens de sneeuwbal methode toe te passen.

Artikels over celgemedieerde vrijstelling werden om te beginnen gevonden door gebruik van de MeSH-termen ‘genetic therapy’ en ‘epilepsy’. Vervolgens werden deze termen gecombineerd met verscheidene termen die verwijzen naar stoffen die toegepast worden in deze methode zoals ‘adenosine’, ‘galanin’, ‘gamma-aminobutyric acid’ en ‘neuropeptide Y’. Dezelfde filters werden toegepast. Ook hier gaf de sneeuwbal methode verscheidene extra artikels.

Informatie over de transfer van genen in neuronen werd verkregen in de reviews over de verschillende types genterapie en door erin gerefereerde artikels.

RESULTATEN

1. Optogenetica

De meeste optogenetische studies bij epilepsie maakten gebruik van een model van temporalekwabepilepsie. Er werden echter ook reeds studies verricht die modellen van neocorticale epilepsie, thalamocorticale epilepsie en astrocytgerelateerde epilepsie gebruikten.

Om te beginnen zal een overzichtstabel (tabel 1) worden weergegeven van de verschillende preklinische studies die reeds werden uitgevoerd met betrekking tot optogenetica bij epilepsie; vervolgens zullen deze studies meer uitgebreid besproken worden.

Type epilepsie	Opsine	Diermodel	Effect	Referentie
Temporalekwab-epilepsie	NpHR	STIB	↓ epileptiforme activiteit in vitro	26
		Kaïnaat	Aanvalsarrest	27
			↓ aanvalsduur	28
	eNpHR	Lithium-pilocarpine	↑ latentietijd tot klinische en EEG-aanvallen, ↓ epileptiforme EEG-activiteit	29
	NpHR3.0	In vitro: 4-AP + picrotoxine	In vitro: ↓ epileptiforme activiteit, ↓ aanvalsduur, ↓ aanvalsfrequentie (met reboundeffect)	32
		In vivo: BM	In vivo: ↓ aanvalsfrequentie (met reboundeffect)	
	ChR2	Kaïnaat	Aanvalsarrest	27
			↓ aanvalsduur, ↓ aanvalsfrequentie	28
			↓ epileptiforme activiteit, ↓ frequentie ernstige aanvallen, ↑ overleving	33
		4-AP	↓ epileptiforme activiteit	30
		↓ epileptiforme activiteit, ↓ ontladingsfrequentie (in vitro)	31	
Neocorticale epilepsie	NpHR2.0	Tetanus-toxine	↓ epileptiforme EEG-activiteit	16
Thalamocorticale epilepsie	eNpHR3.0	Fototrombose	Klinisch en EEG-aanvalsarrest	34
Astrocytgerelateerde epilepsie	ArchT	Hypothese	Hypothetische ↓ epileptiforme activiteit	35
	ChR2			

Tabel 1: Overzicht van resultaten van preklinische optogenetische studies. Afkortingen: STIB = stimulation train-induced bursting; 4-AP = 4-aminopyridine; BM = bicuculline-methiodide

1.1. Optogenetische modulatie van neuronen in modellen voor temporalekwabepilepsie

De eerste studie die optogenetica toepaste op een model van epilepsie (2009) gebruikte een lentivirale vector die het NpHR-gen overbracht naar principale hippocampale cellen van muizen (26). Bij deze cellen werd vervolgens in vitro epileptische activiteit geïnduceerd door middel van ‘stimulation train-induced bursting’ (STIB). Bij belichting met oranje licht vertoonden de cellen hyperpolarisatie, wat resulteerde in een preventie van de generatie van actiepotentialen en van epileptiforme activiteit – wat niet werd gezien in controledieren. (26).

Een studie van Krook-Magnuson et al. (2013) gebruikte een optogenetisch closed-loop systeem bij muizen met real-time detectie van aanvallen, zodat onmiddellijk lichttoediening geactiveerd werd (27). Zowel inhibitie van excitatoire piramidale cellen als activatie van een subpopulatie van GABA-erge cellen – die minder dan vijf procent van de hippocampale neuronen vertegenwoordigen – stopte spontane aanvallen – geïnduceerd door kainaats – snel na toepassing van licht. Voor de inhibitoire optogenetica werd halorhodopsine tot expressie gebracht in piramidale cellen en werd een enkele optische vezel geïmplanteerd dorsaal van de ipsilaterale hippocampus dichtbij de plaats van geïnduceerde hippocampale sclerose, zodat licht kon worden toegediend aan een klein volume weefsel. Toediening van rood licht bij de start van aanvallen stopte de aanvallen snel. Excitatie van inhibitoire parvalbuminebevattende GABA-erge cellen na induceren van selectieve expressie van het excitatoire channelrhodopsine ChR2 in deze cellen leidde tot een stop van de aanvallen bij toediening van blauw licht. Aangezien een deel van de aanvallen ook kan ontstaan in de contralaterale hippocampus (‘mirror focus’), werd het effect van lichttoediening aan de contralaterale hippocampus getest. Ook dit onderdrukte aanvallen. De ipsilaterale hippocampus is dus niet de enige potentiële target voor optogenetische interventie (27). In een andere studie van Krook-Magnuson et al. (2014) werd aangetoond dat ‘on-demand’ optogenetische interventie gericht op het cerebellum kainaatsgeïnduceerde spontane aanvallen uit een hippocampale focus bij temporalekwabepilepsie inhield tijdens de chronische fase van de ziekte – dit is de fase waarin spontane aanvallen optreden (28). In deze studie werden halorhodopsine en ChR2 tot expressie gebracht in parvalbuminebevattende cellen – waaronder cerebellaire Purkinjecellen – in muizen. Er werd gebruik gemaakt van een ‘closed-loop’-systeem van aanvalsdetectie en lichttoediening. Zowel bij on-demand belichting van het laterale deel van het cerebellum als van het mediane deel ervan, werd een significante daling in aanvalsduur vastgesteld. Een consistente reductie in frequentie van spontane aanvallen trad echter enkel op met on-demand optogenetische excitatie van het mediane deel van het cerebellum, en werd niet gezien bij interventie die zich rechtstreeks richtte op de hippocampale formatie of op het laterale

cerebellum. Deze studie heeft met andere woorden aangetoond dat het cerebellum beschouwd kan worden als een potentiële target voor genterapie bij temporalekwabepilepsie (28).

Een studie van Sukhotinsky et al. (2013) gebruikte optogenetica om de rol van hippocampale excitatoire neuronen in vivo te testen in een lithium-pilocarpinemodel van acute uitgelokte aanvallen bij ratten, dat sterk lijkt op status epilepticus bij de mens (29). Hippocampale piramidale neuronen werden hiervoor in vivo getransfecteerd met een virus dat een gen voor eNpHR overbracht. Acute aanvalsprogressie werd gedragsmatig en elektrofysiologisch in beeld gebracht in aan- en afwezigheid van belichting die toegediend werd via een optische vezel. In het experiment werden twee protocollen gebruikt: enerzijds werd continue belichting toegepast en anderzijds intermitterende belichting waarbij de belichting ingeschakeld was gedurende 1 à 2 minuten met intervallen van 1 tot 3 minuten. In beide protocollen werd de belichting gestart 5 tot 10 minuten na de pilocarpine-injectie en enkele minuten voor het verwachte begin van de eerste aanval (afgaand op gegevens van een controlegroep). Beide belichtingsmethoden stelden op dezelfde manier het elektrografische en gedragsmatige begin van de aanval uit en veranderden de dynamiek van de evolutie van de aanval. Na het begin van de epileptiforme activiteit vertraagde de optogenetische inhibitie de ontwikkeling van continue oscillaties van hoge amplitude die bij een volledig ontwikkelde aanval optreden. De aanvallen van de dieren werden gekenmerkt door een initiële periode van oscillaties met lage amplitude en lage frequentie met episodes van remissie waarbij een bijna normale EEG-activiteit waargenomen werd – dit in tegenstelling tot controledieren die aanhoudende en vroege transitie vertoonden naar EEG-activiteit met hoge frequentie en hoge amplitude (29).

Een studie van Chiang et al. (2014) bestudeerde in vitro en vivo het effect van optische stimulatie aan hoge frequentie ('high frequency stimulation', HFS) op hippocampale cellen van muizen (30). Deze transgene muizen brachten ChR2 tot expressie – voornamelijk in interneuronen in de hippocampus – en vertoonden epileptiforme activiteit geïnduceerd door 4-aminopyridine (4-AP). In vivo werd optische stimulatie met blauw licht aan frequenties van 20 Hz en 50 Hz toegepast met verschillende niveaus van laservermogen. Het onderdrukkingspercentage in de ipsilaterale hippocampus bij stimulatie gedurende vijf seconden steeg met het niveau van vermogen, maar bereikte zowel bij stimulatie aan 20 Hz als aan 50 Hz een maximum bij 80% van het maximaal vermogen. Contralateraal was er telkens een lager onderdrukkingspercentage, dat iets lager was bij belichting aan 20 Hz dan bij die aan 50 Hz. Om langetermijneffecten van optische HFS te bestuderen werd de stimulatie vervolgens gedurende 20 seconden toegepast. Daarbij werd zowel bij stimulatie aan 20 Hz als aan 50 Hz eerst een periode van aanvalsonderdrukking vastgesteld gedurende de periode van stimulatie, vaak al na 5 seconden gevolgd door een daling van het

onderdrukkingspercentage. Lichtstimulatie met een laag vermogen leidde overigens tot een langduriger effect dan met een hoog vermogen – hoewel er initieel wel een lager onderdrukkingspercentage was. Aangezien dus waargenomen werd dat het aanvalsonderdrukkend effect daalde na 5 seconden continue stimulatie, werd vervolgens onderzocht of intermitterende stimulatie een langduriger effect had. Bij het uitvoeren van een serie van drie stimulatietreinen – die elk 5 seconden duurden – bleek dat het effect inderdaad significant hoger was wanneer de periode tussen de eerste en tweede stimulatie minstens 5 seconden duurde en de periode tussen de tweede en derde stimulatie minstens 3 seconden duurde. Ten slotte werd in deze studie aangetoond dat ook in vitro HFS een significante reductie van epileptiforme activiteit teweegbracht, die duurde tot 45 seconden na de stimulatie (30).

Een studie van Ledri et al. (2014) onderzocht welke invloed gelijktijdige optogenetische activatie van gemengde populaties van interneuronen had op epileptiforme activiteit in hippocampale coupes van muizen (31). Om grote populaties van inhibitoire interneuronen optogenetisch te kunnen activeren, werd een transgene muislijn gebruikt die Cre tot expressie bracht in verscheidene subpopulaties van interneuronen, met name cellen die parvalbumine, cholecystokinine (CCK), neuropeptide Y (NPY) of somatostatine (SST) bevatten. De muizen kregen bilateraal een injectie in de ventrale en mediale hippocampus met een Cre-afhankelijke virale vector die het gen voor ChR2 droeg, zodat dit opsine tot expressie gebracht werd in de voorgenoemde interneuronen. Drie tot vijf weken na de injectie werden de hersenen verwijderd en horizontale coupes van de hippocampus en entorhinale cortex genomen. Vervolgens werd perfusie van de coupes uitgevoerd met Mg^{2+} -vrij artificieel cerebrospinaal vocht (aCSF) dat 4-aminopyridine (4-AP) bevatte voor inductie van epileptiforme activiteit. De frequentie van epileptiforme ontladingen in de CA3-regio van de hippocampus werd significant gereduceerd door belichting van de coupes met blauwlichtpuls met een frequentie van 10, 20, 40, 50 of 100 Hz gedurende 5 seconden of met constant licht gedurende 5 seconden. Een belangrijke observatie was echter dat het inschakelen van het blauw licht resulteerde in een initiële ontlading voordat een reductie van epileptiforme activiteit optrad. Deze initiële ontlading kwam niet voor bij activatie van interneuronen door een enkelvoudige blauwlichtpuls. Bij deze enkelvoudige lichtpuls werd echter ook een minder sterke reductie van epileptiforme activiteit geobserveerd. Vervolgens werd in een andere groep muizen, die Cre enkel tot expressie brachten in parvalbuminebevattende interneuronen, op dezelfde manier activatie van deze kleinere subpopulatie interneuronen uitgevoerd. Hier trad geen initiële ontlading van piramidale neuron op, maar er werd wel opnieuw een kleiner reducerend effect op epileptiforme activiteit waargenomen (31).

In een studie van Berglind et al. (2014) werd in vitro en in vivo nagegaan of NpHR-gebaseerde optogenetische hyperpolarisatie en dus inactivatie van piramidale neuronen in de CA3-regio van de hippocampus op een effectieve wijze epileptiforme activiteit kan verzwakken (32). Hiervoor werd een virus dat een gen coderend voor eNpHR3.0 droeg, geïnjecteerd in de ventrale hippocampus. Voor de in vitro testen werd nagegaan of belichting van NpHR3.0-getransfecteerde hippocampale coupes met geel licht epileptiforme activiteit in coupes van CA3 kon onderdrukken. De epileptiforme activiteit werd in vitro geïnduceerd door perfusie van de coupes met Mg^{2+} -vrij aCSF dat picrotoxine (PTX) – een GABA_A-receptorblokker – en 4-AP – een stof die het effect van PTX potentieert – bevatte. Er werd geobserveerd dat het aantal ontladingen per 30 seconden significant gedaald was in vergelijking met de pre- en post-belichtingsperiodes. In de periode na de belichting werd bij de experimentele groep een stijging van ontladingsfrequentie geregistreerd in vergelijking met de periode vóór de belichting, wat wijst op een soort van reboundeffect. Vervolgens werd nagegaan of NpHR3.0 ook ontladingsactiviteit kon inhiberen in epileptisch weefsel. Dit weefsel wordt gekenmerkt door een verhoogde exciteerbaarheid van CA3-piramidale neuronen en axonale ‘sprouting’ die excitatoire interconnectiviteit tussen principale neuronen versterkt. Hiervoor werden hippocampale coupes van dieren die geïnjecteerd waren met kaïnaat gebruikt – bijgevolg een post-status-epilepticus-model voor temporalekwabepilepsie. Tijdens blootstelling aan geel licht werd een verzwakking van epileptiforme activiteit en een reductie van de duur van de ontladingen geobserveerd. De in vivo experimenten focusten zich op niet-epileptische NpHR3.0-getransfecteerde dieren, aangezien de in vitro testen hadden aangetoond dat optogenetica een gelijkaardig effect had op normaal en epileptisch weefsel. Hier werd bicuculline-methiodide (BM) – een competitieve GABA_A-receptorantagonist – gebruikt om epileptiforme activiteit te induceren. Bij toediening van licht gedurende 40 seconden werd een reductie van het aantal ontladingen gezien vergeleken met de pre- en postbelichtingsperiodes. Ook hier werd echter een verhoogde ontladingsfrequentie gezien net na het uitschakelen van de belichting (32).

Een studie van Lu et al. (2016) onderzocht de ictale propagatie van ontladingen in de structuren van de hippocampale-entorhinale cortex (HP-EC) door middel van optogenetica in meerdere hersenzones van muizen die Chr2 tot expressie brachten en epilepsie vertoonden geïnduceerd door kaïnaatinjectie in de dorsale hippocampus – een model van temporalekwabepilepsie (33). Hierbij werd een propagatieweg van ictale ontladingen gevonden vanuit de gyrus dentatus/hilus (DGH) naar de mediale entorhinale cortex (MEC). Ook werd onderzocht of activatie van GABA-erge interneuronen in de DGH de verspreiding van ictale activiteit kan inhiberen en de gedragsverstoringen kan tegenhouden in post-kaïnaatdieren. Bij selectieve excitatie van GABA-erge interneuronen in de DGH werd een gedeeltelijke verandering van de distributie van ictale

MEC-DGH-ontladingen opgemerkt, wijzend op het optreden van een partiële inhibitie van ictale propagatie van de DGH naar de MEC. Dit toont aan dat de DGH 'upstream' van de MEC ontladend tijdens ictale propagatie en dat activatie van GABA-erge interneuronen in de DGH rechtstreeks de verspreiding van aanvallen in de HP-EC-structuren kan tegenhouden. Vervolgens werd nagegaan of cyclische optogenetische activatie van GABA-erge interneuronen in de DGH een langdurig inhibitorisch effect had op ictale propagatie. Hiervoor werden cyclische blauwlichtpulsjes (130 Hz, 5 ms duur, 1 minuut per cyclus) toegediend om deze interneuronen te activeren na het begin van aanvallen. Het interval tussen stimulaties was 5 minuten. Er werd geobserveerd dat slechts na verscheidene stimulatiecycli een inhibitie van de aanvallen optrad. Ook het gedrag van epileptische dieren werd geanalyseerd tijdens de optische stimulatie. Hierbij werd opgemerkt dat het gemiddeld aantal aanvallen van de gestimuleerde groep niet significant gedaald was in het eerste stadium van Racine, maar wel in het tweede tot vierde stadium. Bovendien overleefden alle muizen in de gestimuleerde groep de aanvallen, terwijl 36,4 procent van de controlegroep met epilepsie overleed tijdens het twee uur durende experiment (33).

1.2. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor neocorticale epilepsie

In een studie van Wykes et al. (2012) werd het effect van optogenetische therapie op een model van focale neocorticale epilepsie getest (16). Voor deze studie werd tetanustoxine geïnjecteerd in de motorcortex van ratten, in combinatie met een lentivirus dat NpHR2.0 droeg onder controle van een Camk2 α -promoter. De injectie van het tetanustoxine veroorzaakte een model van focale neocorticale epilepsie vergelijkbaar met de menselijke epilepsia partialis continua, een soort van 'motorische status epilepticus', waarbij continue of bijna continue motorische aanvalsactiviteit optreedt. Na implantatie van een optische vezel werd cyclische stimulatie uitgevoerd (20 seconden aan / 20 seconden uit). Het EEG en gedrag werden geobserveerd gedurende een eerste 'baseline'-periode van 1000 seconden, gevolgd door een 1000 seconden durende intermitterende belichting en ten slotte tot 1000 seconden na het beëindigen van de belichting. Het gedrag van de dieren was niet zichtbaar beïnvloed, maar laserbelichting resulteerde wel in een significante reductie van de epileptiforme EEG-activiteit vergeleken met controledieren (16).

1.3. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor thalamocorticale epilepsie

Een studie van Paz et al. (2013) bestudeerde een model van epilepsie na corticale stroke, die hier geïnduceerd werd door middel van corticale fototrombose (34). In dit model van epilepsie wordt gereduceerde exciteerbaarheid gezien in de inhibitorische reticulair thalamische neuronen en retrograde celdood en gliose in de ipsilaterale ventroposterolaterale thalamische nucleus. Verder is er een verhoogde exciteerbaarheid van thalamocorticale cellen die leidt tot epileptiforme oscillaties

in de gliale cellen in de thalamus. Dit wijst erop dat corticale stroke op termijn leidt tot een hyperexciteerbaar intrathalamisch netwerk van de overlevende cellen dat in staat is epileptiforme activiteit te genereren. Deze epileptiforme activiteit verspreidt zich gewoonlijk ook naar de contralaterale hemisfeer. Om te testen of de aanvallen beëindigd konden worden door thalamocorticale excitatoire neuronen selectief te inhiberen, werd eNpHR3.0 tot expressie gebracht in deze cellen bij ratten. Belichting van deze ratten onderbrak zowel elektro-encefalografische epileptische activiteit in de thalamus en cortex, als epileptisch gedrag. Selectieve inhibitie van thalamocorticale output was dus voldoende om een elektro-encefalografische en gedragsmatige aanval te beëindigen. Inhibitie van ipsilaterale thalamocorticale neuronen onderbrak niet alleen ipsilaterale, maar ook contralaterale aanvallen. Een voordeel van inhibitie van het thalamocorticale netwerk is dat dit mechanisme van snelle disruptie van aanvallen gecombineerd kan worden met andere behandelingen die bijvoorbeeld de initiatie van de aanval, de verspreiding ervan of secundaire epileptogenese als doel hebben (34).

1.4. Optogenetische modulatie van neuronen in een model voor astrocytgerelateerde epilepsie

Omdat meer en meer evidentie bestaat dat astrocyten een rol spelen in epilepsie, heeft een studie van Ji et al. (2015) de effecten van optogenetische technieken gericht op astrocyten onderzocht (35). Er werden verschillende methoden van optogenetica toegepast op astrocyten (figuur 8 in bijlage). De eerste methode was het gebruik van depolariserende actuatoren zoals ChR2. Bij belichting met blauw licht laat dit opsine toe dat natrium, protonen en calcium de cel binnenkomen. De inwaartse stroom van deze ionen kan leiden tot drie effecten: depolarisatie van de membraanpotentiaal, reductie van de intracellulaire pH en stijging van de intracellulaire calciumconcentratie. Deze effecten veranderen de activiteit van astrocyten en verhogen de vrijstelling van bepaalde gliotransmitters, met name ATP en glutamaat. Aangezien glutamaat excitatie van neuronen veroorzaakt, is het van belang – voornamelijk bij ziekten met verhoogde excitatie van neuronen – om dit glutamaat snel te verwijderen uit de extracellulaire ruimte na vrijstelling ervan. Dit gebeurt door glutamaattransporters – namelijk GLAST en GLT1 – in de membraan van astrocyten. Activatie van deze transporters is verhoogd bij hyperpolarisatie van de celmembraan. De tweede onderzochte optogenetische methode richtte zich hierop door het hyperpolariserende opsine ArchT (archaerhodopsine-T) tot expressie te laten brengen door astrocyten en op die manier de opname van glutamaat door astrocyten te verhogen. De derde methode richtte zich op kaliumkanalen in de membraan van astrocyten, die excitatie van naburige neuronen verlagen door via opname van kalium de extracellulaire concentratie van dit ion te verlagen. Deze kaliumkanalen – in het bijzonder Kir4.1- en Kir4.1/Kir5.1-kanalen – mediëren –

grotendeels afhankelijk van de membraanpotentialiaal en pH – de influx en efflux van kalium. ArchT kan door zijn alkaliserend en hyperpolariserend effect in astrocyten de opname van kalium doorheen Kir-kanalen verhogen bij belichting en op die manier excitatie van naburige neuronen inhiberen (35).

2. Chemogenetica

Een studie van Katzel et al. (2014) onderzocht het effect van de inhibitoire DREADD hM4Di op epileptiforme activiteit bij systemische toediening van CNO (36). Voor transductie van de DREADD werd een AAV-vector geïnjecteerd in de primaire motorische cortex van ratten. Om te beginnen werd chemogenetische inhibitie van pilocarpinegeïnduceerde aanvallen getest. Vlak na intracerebrale pilocarpine-infusie werd CNO toegediend via intraperitoneale injectie. Er werd een significante reductie van zowel elektrografische afwijkingen als convulsies vastgesteld. Vervolgens werd nagegaan of op dezelfde manier picrotoxinegeïnduceerde aanvallen geïnhibeerd konden worden. Hierbij werd hetzelfde aanvalsonderdrukkend effect vastgesteld. Ten slotte werd nagegaan of hM4Di-activatie ook reeds bestaande epilepsie kan onderdrukken. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een tetanustoxinemodel van chronische epilepsie – een model dat lijkt op de humane epilepsia partialis continua. Toediening van CNO leidde hierbij tot een significante reductie van EEG-afwijkingen en frequentie van epileptiforme ontladingen (36).

In een studie van Avaliani et al. (2016) werd nagegaan of hM4Di epileptiforme activiteit geïnduceerd door elektrische stimulatie ('stimulation train induced bursting', STIB) kon inhiberen in organotypische hippocampale coupes ('organotypic hippocampal slice cultures', OHSC's) – een model dat kenmerken vertoont gelijkaardig aan humaan medicatieresistent epileptisch temporalekwabweefsel (37). Eerst werd bevestigd dat expressie van hM4Di in OHSC-neuronen van muizen leidde tot hyperpolarisatie van deze neuronen. Vervolgens werd nagegaan of STIB onderdrukt kon worden op deze manier. Bij CNO-toediening aan OHSC-neuronen die hM4Di tot expressie brachten, werd een significante daling in duur van STIB – en zelfs een volledige blok in vijf van de acht coupes – geobserveerd (37).

Een studie van Wicker et al. (2016) richtte zich op interventie in de middellijn thalamische nuclei ('midline thalamus') en intralaminaire thalamus van ratten bij kindling-geïnduceerde epileptiforme activiteit van de amygdala (38). Aangezien middellijn thalamische nuclei zeer vroeg in amygdala-kindled aanvallen een rol spelen en de amygdala een sterke bidirectionele connectiviteit heeft met de thalamus, is dit een nuttig model voor temporalekwabepilepsie. Voor deze studie werden ratten geïnjecteerd met een virus dat het gen voor hM4Di bevatte en werden aanvallen vervolgens uitgelokt door middel van kindling van de amygdala. Bij toediening van CNO werd een

significante onderdrukking van de ernst van aanvallen en reductie van de duur van EEG-afwijkingen geobserveerd. Ten slotte werd in deze studie nagegaan of inactivatie van de middellijn thalamische nuclei het werkgeheugen van de dieren zou verstoren. Bij het uitvoeren van een spontane alternatietaak werd geen significant verschil gevonden in snelheid van spontane alternatie tussen experimentele en controledieren, wat betekent dat het werkgeheugen niet verstoord werd door activatie van hM4Di in de middellijn thalamische nuclei (38).

3. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie

Preklinische studies die spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie onderzochten als behandeling van epilepsie, verhoogden de expressie van de GABA_A-receptor, een subunit van de NMDA-receptor of bepaalde kaliumkanalen.

Om te beginnen wordt een overzichtstabel (tabel 2) van deze studies weergegeven; vervolgens worden de studies meer gedetailleerd besproken.

Ionenkanaal	Model	Effect	Referentie
GABA _A -receptor (overexpressie)	Pilocarpine: Status epilepticus gevolgd door spontane aanvallen	↑ latentietijd tot spontane aanvallen, ↓ aantal dieren dat spontane aanvallen ontwikkelt	39
NMDA-receptor (NR1-subunit)	Kaïnaat: Status epilepticus gevolgd door spontane aanvallen	NR1-knock-down: Initieel: ↓ aanvalsfrequentie, ↑ interval tussen aanvallen, klinisch aanvalsarrest Na 60 minuten: EEG-aanvalsarrest	40
		NR1-overexpressie: ↓ ernstige klinische aanvallen	
Kaliumkanaal (Kv1.1) (overexpressie)	Tetanustoxine: Spontane aanvallen (ontwikkende focale neocorticale epilepsie)	Klinisch en EEG-aanvalsarrest	16
	Tetanustoxine: Spontane aanvallen (reeds ontwikkelde focale neocorticale epilepsie)	↓ EEG-afwijkingen, ↓ aanvalsfrequentie	
Kaliumkanaal (TREK-M) (overexpressie)	Pilocarpine: Status epilepticus gevolgd door spontane aanvallen	↓ duur van status epilepticus, ↓ totale duur van aanvallen, ↓ neuronale celdood	17

Tabel 2: Overzicht van resultaten van preklinische studies over spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie.

Een studie van Raol et al. (2006) ging na of verhoging van de concentratie van de $\alpha 1$ -subunit van de GABA_A-receptor in de gyrus dentatus de ontwikkeling van epilepsie kon inhiberen (39).

Hiervoor werd een AAV-vector die het gen voor de $\alpha 1$ -subunit droeg onder een GABRA4-promotor geïnjecteerd in de gyrus dentatus van ratten – er werd gekozen voor de GABRA4-promotor omdat de activiteit ervan verhoogd is in de gyrus dentatus na status epilepticus. Twee weken later werd status epilepticus geïnduceerd door intraperitoneale pilocarpine-injectie. Zoals verwacht, was de expressie van de GABA $\alpha 1$ -subunit selectief verhoogd in de gyrus dentatus na status epilepticus. Bij deze ratten werd een inhibitie van de ontwikkeling van spontane aanvallen na status epilepticus vastgesteld: de gemiddelde tijd tot het begin van de eerste spontane aanval na status epilepticus was significant langer dan bij controleratten, en een significant lager aantal ratten ontwikkelde spontane aanvallen. Bij experimentele ratten die wel spontane aanvallen ontwikkelden, verschilden de ernst en frequentie van de aanvallen niet van de controleratten. Naast het effect op aanvallen werd bij 30% van de experimentele ratten abnormaal gedrag – zoals sedatie, anorexia en gewichtsverlies – opgemerkt, dat dagen tot weken na de status epilepticus persisteerde. Dit afwijkend gedrag werd niet gezien bij de controleratten en was waarschijnlijk te wijten aan de verhoogde $\alpha 1$ -expressie, aangezien GABA-receptoren belangrijke mediators van sedatie zijn in het centraal zenuwstelsel (39).

In een studie van Kalev-Zylinska et al. (2009) werden de effecten van overexpressie en knock-down van de NR1-subunit van de NMDA-receptor in de hippocampus nagegaan (40). Om in vivo overexpressie of knock-down van NR1 te bereiken, werd een AAV-vector met respectievelijk NR1 of shNR1 geïnjecteerd in de dorsale hippocampus van ratten. De gevolgen van de gewijzigde NR1-expressie op aanvallen werden nagegaan in een intrahippocampaal kaïnaatmodel. Ratten met gereduceerde NR1-expressie bleken significant minder elektro-encefalografische aanvallen te ontwikkelen en vertoonden langere intervallen tussen de aanvallen in vergelijking met controleratten. Gedragmatig vertoonden deze knock-downratten geen clonus of tonisch-clonische convulsies, in tegenstelling tot de andere dieren. Bovendien werden enkel bij deze dieren geen elektro-encefalografische of gedragsmatige aanvallen meer waargenomen vanaf 60 minuten na de kaïnaatinjectie. Ratten met NR1-overexpressie vertoonden geen verschil in aantal, duur of interval van EEG-afwijkingen in vergelijking met de controledieren. Ook gedragsmatig traden de tweede tot vijfde stadia van Racine even vaak op bij beide groepen. Bij de ratten met NR1-overexpressie werd echter wel een langere latentietijd gezien tot het optreden van aanvallen van het tweede en derde stadium van Racine. Bij deze ratten werd dus een licht anti-epileptisch effect gezien op ernstigere aanvallen. In deze studie werd eveneens het effect van NR1-overexpressie en -knock-down op angstgeheugen – een vorm van associatief leren waarin de hippocampus en NMDA-receptoren een belangrijke rol spelen – en neurogenese nagegaan. Er werd opgemerkt dat beide

processen sterk verstoord waren bij NR1-knock-down en gestimuleerd waren bij NR1-overexpressie in vergelijking met controleratten (40).

Een studie van Wykes et al. (2012) onderzocht het effect van kaliumkanaalgentherapie in een model van focale neocorticale epilepsie (16). Om te beginnen werd een lentivirus dat het kaliumkanaal Kv1.1 tot expressie brengt onder een CMV-promotor geïnjecteerd in de motorische cortex. Dit leidde tot lokale transductie van de vijfde laag neuronon van de motorische cortex. Deze Kv1.1-getransduceerde neuronon vereisten meer depolarisatie om actiepotentialen af te vuren. Bij nagaan van celtypespecificiteit werd opgemerkt dat preferentiële transductie van excitatoire neuronon had plaatsgevonden. Vervolgens werd het Kv1.1-lentivirus gelijktijdig geïnjecteerd met tetanustoxine om een model van focale neocorticale epilepsie te genereren. Hierbij werd een volledige preventie van tetanustoxine-geïnduceerde gedragsmatige en EEG-afwijkingen waargenomen in vergelijking met controledieren. Ten slotte werd nagegaan of Kv1.1 ook reeds ontwikkelde epilepsie kan tegenhouden. Hiervoor werd één week na tetanustoxine-injectie een Kv1.1-vector geïnjecteerd in de aanvalsfocus. De dieren die Kv1.1 tot expressie brachten, vertoonden een reductie van EEG-afwijkingen en van aanvalsfrequentie vergeleken met controledieren. De frequentie van epileptiforme activiteit keerde bij de experimentele dieren na vier weken terug naar de baseline, terwijl deze verhoogd bleef in de controlegroep. Uit deze studie kan besloten worden dat overexpressie van Kv1.1 niet alleen de ontwikkeling van epilepsie kan blokkeren, maar ook reeds aanwezige epilepsie kan tegenhouden. Bovendien werd aangetoond dat lokale expressie van Kv1.1 in vivo minstens zes maanden persisteerde (16).

Een studie van Dey et al. (2014) onderzocht het effect van een kaliumlekkanaal op status epilepticus (17). Er werd een constitutief actief kaliumlekkanaal ontwikkeld – genaamd TREK-M – dat resistent is aan compensatoire downregulatie door ‘second messenger’-cascades. Dit kanaal is een mutant van het kaliumkanaal TREK-1, dat een hoge expressie vertoont in het zenuwstelsel en hyperpolarisatie van neuronon veroorzaakt. Wanneer deze kanalen tot expressie werden gebracht in HEK-293-cellen (‘human embryonic kidney cells’), werd geobserveerd dat deze kanalen een zevenvoudig verhoogde geleiding hadden vergeleken met TREK-1-kanalen. Bovendien bleek dat de rustmembraanpotential sterk verlaagd werd door TREK-M – sterker dan door TREK-1 – wat het hyperpolariserend effect ervan bevestigde. Vervolgens werd nagegaan of TREK-M veranderingen van de membraanspanning kon onderdrukken. Injectie van stroompulsen produceerde grote membraanpotentialveranderingen in controle-HEK-293-cellen, kleinere veranderingen in TREK-1-bevattende cellen en zeer kleine veranderingen in cellen die TREK-M tot expressie brachten. Omdat mutaties in een gen dat codeert voor een T-type calciumkanaal (Cav3.2) volgens sommige studies aanvalsgevoeligheid kan verhogen, werd expressie van de

C456S-mutatie gebruikt om spontane aanvalsactiviteit uit te lokken in culturen van hippocampale neuronen. Na transfectie van deze hyperexciteerbare neuronen met TREK-M werd een significante daling van actiepotentiaalgeneratie en spontane aanvalsactiviteit geobserveerd in vergelijking met controlecellen. Vervolgens werd het effect van TREK-M-transfectie in vivo in een model van temporalekwabepilepsie bestudeerd. TREK-M werd in de hippocampus getransduceerd door een AAV-vector onder een CMV-GABRA4-promotor. Vier weken later werd status epilepticus geïnduceerd door pilocarpine-injectie in de CA3-regio van de hippocampus en in de entorhinale cortex – die belangrijke input- en outputwegen van de hippocampus bevat. In ratten die TREK-M tot expressie brachten, werd een significante reductie van de duur van de status epilepticus waargenomen. Ook de totale duur van de aanvallen gedurende 24 uur na de pilocarpine-injectie was significant gereduceerd. Ten slotte werd histologisch nagegaan of TREK-M een reductie van excitotoxische neuronale celdood kon teweegbrengen. Hersencoupees van experimentele en controledieren 48 uur na inductie van status epilepticus toonde aan dat ratten die TREK-M tot expressie brachten minder neuronale celdood vertoonden in de entorhinale cortex, CA3- en CA1-regio dan controledieren, maar er werd geen reductie van celdood geobserveerd in de gyrus dentatus (17).

4. Celgemedieerde vrijstelling

4.1. Adenosine

Een studie van Ren et al. (2007) en een studie van Li et al. (2009) verhoogden de vrijstelling van adenosine in humane mesenchymale stamcellen (hMSC's) door de expressie van adenosinekinase (ADK) – het belangrijkste enzym dat adenosine afbreekt – te verlagen (41, 42). Dit werd bereikt door lentivirale transductie van de cellen met anti-ADK-microRNA-expressievectoren, een methode van RNA-interferentie (RNAi). In de studie van Ren et al. werden de getransfecteerde hMSC's – H239-cellen genoemd – vervolgens getransplanteerd in de hippocampus van muizen. Eén week later werd bij deze muizen kaïnaat geïnjecteerd in de basolaterale amygdalakern. Bij de dieren die hMSC-cellen bezaten, werd een significante reductie in duur van ernstige EEG-afwijkingen gezien in vergelijking met een controlegroep. Ten slotte werd 24 uur na kaïnaatinjectie histologisch onderzoek uitgevoerd op coupes van de hippocampi om de uitgebreidheid van weefselschade te bepalen. Dit onderzoek toonde aan dat in de CA3-regio van ratten die een hMSC-greffe hadden ontvangen, een significante reductie van weefselschade aanwezig was in vergelijking met controledieren (41). In de studie van Li et al. werden de H239-cellen getransplanteerd in de infrahippocampale fissuur van muizen nadat kaïnaatgeïnduceerde epileptogenese reeds begonnen was. Hier werd een significante reductie van aanvalsfrequentie en -duur waargenomen in

vergelijking met controledieren. Dit neuroprotectief effect viel weg bij injectie van de selectieve A1-receptorantagonist DPCPX, bewijzend dat de reductie van aanvalsintensiteit het gevolg was van verhoging van de adenosineconcentratie die aanvalsonderdrukking medieert via activatie van A1-receptoren (42).

Een studie van Theofilas et al. (2011) gebruikte een AAV8-vector om selectief ADK te moduleren in astrocyten (20). De expressie van ADK werd ofwel verhoogd door Adk-cDNA in 'sense'-oriëntatie te transduceren, ofwel verlaagd door dit cDNA in 'antisense'-oriëntatie te transduceren in astrocyten. Verhoging van de expressie van ADK in de CA3-regio van wildtype muizen bleek te leiden tot spontane recurrenente elektro-encefalografische aanvallen, wat erop wijst dat overexpressie van ADK in astrocyten zelfs in afwezigheid van astrogliose of andere epileptogene factoren, voldoende is voor inductie van chronische recurrenente aanvallen. Voor verlaging van de expressie van ADK in astrocyten, werd de AAV8-vector met antisense-Adk-cDNA unilateraal geïnjecteerd in de CA3-regio van Adk-tg transgene muizen die ADK tot overexpressie brachten in de hersenen – een model van spontane recurrenente hippocampale aanvallen. Aanvallen treden in dit diermodel frequent en gelijktijdig in beide hippocampi op. De experimentele muizen vertoonden een significante daling in aanvalsactiviteit ipsilateraal aan de virusinjectieplaats – maar niet contralateraal – vergeleken met controlemuizen. Deze gegevens tonen aan dat een antisense-gemedieerde knock-down van ADK in astrocyten voldoende is om aanvallen te onderdrukken in Adk-tg muizen (20).

Een studie van Young et al. (2014) onderzocht eveneens of verlaging van expressie van ADK in hippocampale astrocyten van ratten de gevoeligheid voor aanvallen en neuronenvlies kon moduleren (21). De expressie van ADK werd verlaagd door bilaterale hippocampale injectie van een AAV-vector die miRNA gericht tegen ADK transduceerde. De ratten werden vervolgens intrahippocampaal geïnjecteerd met kaïnaat. De totale duur van aanvallen was bij de experimentele ratten met 50% gereduceerd in vergelijking met controleratten. Omdat intrahippocampale kaïnaatgeïnduceerde aanvallen lokale neurodegeneratie kunnen uitlokken die zich zelfs kan uitbreiden naar distale limbische structuren, werd nagegaan of de toegepaste experimentele behandeling ook bescherming kon bieden tegen deze kaïnaat- en aanvalsgeïnduceerde neurotoxiciteit. Bij histologisch onderzoek bleek er geen verschil te zijn tussen de experimentele en de controlegroep wat betreft aantal degenererende neuronen in de CA3-regio van de hippocampus. Bij de experimentele dieren was er echter wel een significante reductie van celverlies in de hilus van de gyrus dentatus (21).

4.2. Galanine

Een studie van Haberman et al. (2003) en een studie van McCown (2006) verhoogden de expressie van galanine om aanvalsactiviteit in vivo te onderdrukken (43, 44). Hiervoor werd een AAV-vector (AAV-FIB-GAL) geïnjecteerd die zowel het gen voor galanine als dat voor de secretoire signaalsequentie van fibronectine bevatte – het eiwit fibronectine wordt gesecreteerd via een constitutieve pathway en inclusie van de secretoire signaalsequentie ervan in de AAV-vector veroorzaakte significante secretie van het genproduct. In de studie van Haberman et al. werd de AAV-FIB-GAL-vector geïnjecteerd in de inferieure colliculus van ratten. Om aanvalsactiviteit te stimuleren werd vervolgens een stimulatie-elektrode geïmplantéerd in de inferieure colliculaire cortex. De stimulatierempel voor aanvalsontwikkeling bleek significant verhoogd. Aangezien een AAV-vector met enkel galanine (AAV-GAL) en een AAV-vector met fibronectine en het fluorescente eiwit GFP (AAV-FIB-GFP) geen significante invloed hadden op de drempel voor aanvalsontwikkeling, was aangetoond dat het aanvalsontdrukkend effect afhankelijk was van FIB-gemedieerde galaninesecretie. Vervolgens werd de invloed van verhoogde galaninesecretie onderzocht in een diermodel van temporalekwabepilepsie geïnduceerd door perifere toediening van kaïnaat, waarbij neuronale celdood typisch optreedt in de hilus van de hippocampus. Hiervoor werd AAV-FIB-GAL hilaire geïnjecteerd. Dit had geen invloed op het aanvangsmoment of de ernst van de gedragsmatige aanvallen, maar bij histologische evaluatie werd aangetoond dat hilaire neuronen rond de plaats van AAV-FIB-GAL-injectie gespaard bleven, terwijl contralateraal wel neuronaal celverlies had plaatsgevonden (43). In de studie van McCown werd AAV-FIB-GAL geïnjecteerd in de piriforme cortex van ratten. Bij een eerste groep ratten werd aanvalsactiviteit geïnduceerd door intraperitoneale kaïnaatinjectie. 11 van de 12 experimentele ratten vertoonden geen limbische aanvallen – een significant verschil met controleratten – en de andere rat vertoonde enkel één korte aanval van stadium 3 van Racine. In een tweede groep ratten werd AAV-FIB-GAL pas geïnjecteerd nadat aanvalsactiviteit reeds ontwikkeld was ten gevolge van dagelijkse elektrische stimulatie van de piriforme cortex. De ratten vertoonden een significante verhoging van stimulatierempel voor limbische aanvalsontwikkeling. Dit wijst erop dat voorafgaande aanvalsactiviteit geen verandering teweegbracht in het effect van de AAV-FIB-GAL-vector (44). In een studie van Lin et al. (2003) werd AAV-vectorgemedieerde overexpressie van galanine (AAV-GAL) geïnduceerd in de dorsale hippocampus van ratten (45). De frequentie van kaïnaatgeïnduceerde aanvallen en bijgevolg ook de totale tijd van de aanvallen bleek significant gedaald in AAV-GAL-geïnjecteerde ratten (45). Ook in een studie van Kanter-Schlifke et al. (2007) werd een AAV-vector gebruikt om galanineoverexpressie te induceren in de hippocampus van ratten in een model van

temporalekwabepileptogenese geïnduceerd door hippocampale kindling (46). Bij deze ratten werd een significante reductie in duur van epileptiforme activiteit ('after-discharges') en een significante stijging van de latentie tot ontwikkeling van convulsies waargenomen bij gegeneraliseerde aanvalsstadia (stadium 4 en 5 van Racine). Dit fenomeen werd niet gezien bij lagere stadia. De ontwikkeling van aanvallen bij kindling werd dus niet beïnvloed door galanineoverexpressie, maar gegeneraliseerde aanvalsactiviteit werd wel verzwakt (46).

4.3. Neuropeptide Y (NPY)

Een studie van Richichi et al. (2004) bestudeerde het effect van AAV-gemedieerde NPY-overexpressie in de hippocampus van ratten in een model van kaïnaat- of kindling-geïnduceerde aanvallen (47). Twee AAV-vectoren die NPY-expressie verhoogden onder een NSE-promotor (AAV-NSE-NPY) werden gebruikt: enerzijds een serotype 2-AAV-vector (AAV2-NSE-NPY) en anderzijds een chimeer serotype dat kapselwitte van AAV1 en AAV2 bevat (AAV1/2-NSE-NPY). Bij ratten die intrahippocampale kaïnaatinjecties hadden ontvangen, werd een significante reductie van EEG-aanvalsactiviteit gezien (50% reductie bij AAV2-serotype, 75% reductie bij AAV1/2-serotype). In beide groepen was de latentietijd tot de aanvang van de eerste aanval verdubbeld. AAV1/2-NSE-NPY-geïnjecteerde ratten die intraventriculaire kaïnaatinjecties hadden ontvangen, vertoonden een verdubbeling van latentietijd tot aanvang van de eerste aanval en tot 76% reductie in totale tijd van EEG-aanvallen dankzij onderdrukking van elektro-encefalografische status epilepticus. Deze ratten vertoonden geen gegeneraliseerde gedragsmatige clonische aanvallen, maar wel 'wet dog shakes'. Vervolgens werd hippocampale kindling-geïnduceerde epileptogenese bestudeerd bij AAV1/2-NSE-NPY-ratten. Deze ratten vertoonden een verhoogde stroomsterktedrempel voor inductie van epileptiforme activiteit en een verhoogd aantal stimuli nodig voor inductie van aanvallen van stadia 3 tot 5 van Racine. Het aantal aanvallen van stadium 4 en 5, evenals de totale duur van epileptiforme activiteit tijdens kindling waren gereduceerd (47). In een studie van Foti et al. (2007) werden de effecten van overexpressie van NPY vergeleken met die van overexpressie van het C-terminaal peptidefragment NPY13-36 (48). Deze laatste activeert enkel de NPY-Y2-receptor – die de belangrijkste NPY-gerelateerde mediator is van aanvalsonderdrukkende activiteit – en zou daarom misschien minder bijwerkingen veroorzaken. De overexpressie van deze stoffen werd geïnduceerd door bilaterale injectie van AAV-vectoren (AAV-FIB-NPY en AAV-FIB-NPY13-36) in de piriforme cortex van ratten. Een week later werden de ratten intraperitoneaal geïnjecteerd met kaïnaat. In beide AAV-groepen werd een significante verlenging van de latentietijd tot limbische aanvallen van stadium 3 en 4 waargenomen. De meeste ratten vertoonden – in tegenstelling tot de controleratten – zelfs geen aanvallen van deze stadia.

Deze studie toont aan dat het mogelijk is om actieve fragmenten van peptiden tot expressie te brengen en te secreteren, wat enerzijds meer selectieve gentherapie en anderzijds combinatie van verschillende therapeutische peptiden in een enkele vector mogelijk maakt (48).

In een studie van Noe et al. (2008) werd AAV-vectorgemedieerde overexpressie van NPY toegepast in een model van temporalekwabepilepsie geïnduceerd door elektrische stimulatie van de hippocampus van ratten (49). Het percentage ratten met secundaire gegeneraliseerde gedragsmatige aanvallen (stadia 4 en 5 van Racine) was gelijkaardig in de experimentele als in de controlegroep, maar de progressie van het aantal aanvallen van deze stadia was veel trager bij de experimentele ratten. Verder werd in de experimentele groep geen stijging in frequentie van spontane aanvallen opgemerkt, wat wel optrad in de controlegroep. Ook de totale tijd van de aanvallen was significant lager in de AAV-NPY-ratten dan in de controlegroep (49).

Een andere studie van Noe et al. (2010) gebruikte een AAV-vector serotype 1 (AAV1) en een sterke constitutieve hybride CBA-promotor om de expressie van NPY te verhogen in ratten (50). De NPY-expressie en het geassocieerde anticonvulsieve effect van deze nieuwe vector werd vergeleken met de AAV1/2-vector. Het aantal elektro-encefalografische aanvallen na intrahippocampale kaïnaatinjectie was in beide experimentele groepen significant gereduceerd in vergelijking met controledieren, en de groep geïnjecteerd met de AAV1-vector vertoonde een significant sterkere reductie dan de groep die geïnjecteerd was met de AAV1/2-vector. De totale tijd van de EEG-aanvalsactiviteit was eveneens significant verlaagd in beide experimentele groepen vergeleken met de controlegroep, en ook hier was de reductie significant groter in AAV1-CBA-NPY-ratten dan in AAV1/2-CBA-NPY-ratten (50).

In een studie van Woldbye et al. (2010) werd nagegaan of AAV-gemedieerde overexpressie van de NPY-Y2-receptor in de hippocampus – alleen of gecombineerd met een overexpressie van NPY – een aanvalsonderdrukkend effect kon uitoefenen (51). Hiervoor werden twee modellen van temporalekwabepilepsie gebruikt: het kindling-model en het kaïnaatmodel. In het kindling-model werd bij de ratten geïnjecteerd met de AAV-Y2-vector een significant aanvalsonderdrukkend effect geobserveerd: er was een daling van duur van epileptiforme activiteit, een vertraging van kindling-progressie, een reductie van aantal ernstige aanvallen (stadia 4 en 5 van Racine) en een verhoging van het nodige aantal stimulaties om aanvallen van stadia 3 tot 5 te bereiken. Vervolgens werd nagegaan of Y2-overexpressie ook de chronisch verhoogde exciteerbaarheid kon beïnvloeden, die zich gradueel ontwikkelt 4 weken na de initiële blootstelling van dieren aan kindling. Hiervoor werden 5 ‘re-kindling’-stimulaties uitgevoerd 4 weken na de initiële kindling-stimulaties. Bij de experimentele ratten werd een significante reductie in aantal en duur van ontladingen geobserveerd vergeleken met een controlegroep. Ook de kindling-progressie en het aantal ernstige aanvallen was

verlaagd, en het aantal stimulaties nodig voor ontwikkeling van aanvallen van stadia 2 tot 5 was verhoogd. Vervolgens werd een combinatie van AAV-Y2 en AAV-NPY toegediend aan een groep ratten die daarna werden onderworpen aan kindling. Deze ratten vertoonden dezelfde resultaten, met nog enkele additionele beïnvloede parameters: er werd een stijging van de drempelstroomsterkte nodig voor inductie van ontladingen en een gereduceerde duur van de ontladingen aan drempelstroomsterkte waargenomen. Bovendien was er een significante reductie van de gemiddelde duur van epileptiforme activiteit van zowel milde (stadium 1 tot 3) als ernstige (stadium 4 en 5) aanvallen. In een kainaatgeïnduceerd diermodel van status epilepticus, werd een gelijkaardig aanvalsonderdrukkend effect gezien bij Y2-overexpressie. Er was een stijging van de latentietijd tot de eerste motorische aanval en tot status epilepticus en een reductie van de totale tijd van de aanvallen. Ook de ernst van de aanvallen was significant gedaald, wat duidelijk werd door een verhoogde overleving van de ratten (51).

In een studie van Gotzsche et al. (2012) werd een gelijkaardig experiment uitgevoerd (52). Hier werd echter de Y5-receptor tot overexpressie gebracht in de hippocampus. Deze overexpressie bleek geen effect te hebben op kainaatgeïnduceerde motorische aanvallen in ratten. Gecombineerde overexpressie van Y5-receptoren en NPY leidde dan weer wel tot significante onderdrukking van aanvallen: er was een verhoogde latentietijd tot het begin van de eerste motorische aanval en status epilepticus, een gereduceerde totale tijd van aanvallen en een gedaalde ernst van aanvallen. Dit aanvalsonderdrukkend effect was significant sterker dan dat van enkel NPY-overexpressie (52). Een studie van Dong et al. (2012) en een studie van Zhang et al. (2013) bevestigden opnieuw het aanvalsonderdrukkend effect van AAV-gemedieerde NPY-overexpressie toe bij ratten met kainaatgeïnduceerde epilepsie en onderzochten achterliggende mechanismen (53, 54). In de studie van Dong et al. werd door middel van kwantitatieve PCR en 'western blot'-assays aangetoond dat mRNA- en eiwitexpressie van bepaalde subunits van de NMDA-receptor – namelijk NR1, NR2A en NR2B – in de eerste weken na injectie met de virale vector significant verhoogd waren in de AAV-NPY-groep en in een controlegroep geïnjecteerd met een AAV-empty-vector, die beiden onderworpen waren aan kindling. Vier weken na injectie van de virale vector werd in de AAV-NPY-groep een significante daling van de expressie van deze NMDAR-subunits gezien vergeleken met de controlegroep. Dit wijst erop dat het aanvalsonderdrukkend effect van NPY gemedieerd wordt door downregulatie van subunits van NMDA-receptoren (53). In de studie van Zhang et al. werd het effect van NPY-overexpressie op hippocampale mossy fibers nagegaan – dit zijn cellen die post-epileptische synaptische reconstructie ondergaan, genaamd 'mossy fiber sprouting'. Er wordt vermoed dat mossy fiber sprouting synaptische connecties of synaptische remodelling in piramidale cellen van de CA3-regio veroorzaakt, wat zou kunnen leiden tot de vorming van

excitatoire synaptische circuits en zo de gevoeligheid voor epileptische aanvallen zou kunnen verhogen. Er werd aangetoond dat mossy fiber sprouting in de CA3-regio van AAV-NPY-geïnjecteerde ratten gereduceerd was. Vervolgens werd de expressie van synaptofysine (p38) nagegaan in de ratten. Dit is een eiwit dat bijdraagt aan synaptische structuur en functie en waarvan de expressie gebruikt kan worden om dynamische veranderingen van de synapsen – zoals synaptogenese en synaptische remodelling – te beoordelen. Bovendien is dit eiwit een sensitieve marker van hippocampale plasticiteit. In de ratten die NPY tot overexpressie brachten, werd een reductie van de expressie van synaptofysine waargenomen, gelijktijdig met het verdwijnen van mossy fiber sprouting (54).

Een studie van Ledri et al. (2016) paste AAV-gemedieerde unilaterale NPY/Y2-overexpressie toe in ratten met kaïnaatgeïnduceerde aanvallen (55). EEG-registraties toonden aan dat dit resulteerde in preventie van de progressieve stijging in aanvalsfrequentie die typisch in dit epilepsiemodel gezien wordt, en zelfs een significante daling van aanvalsfrequentie teweegbracht bij 80% van de ratten (55).

4.4. GABA

In een studie van Thompson et al. (2000), Gernert et al. (2002), Thompson en Suchomelova (2004) en Thompson (2005) werden neuronale precursorcellen genetisch gemanipuleerd zodat de GAD₆₅-expressie verhoogd werd – en bijgevolg GABA-concentratie verhoogd werd (56-59). In de studie van Thompson et al. (2000) werden de cellen getransplanteerd in de substantia nigra pars reticulata (SNr). Na kindling van de entorhinale cortex werd in een groep waarbij transplantatie van de cellen in de posterieure SNr had plaatsgevonden, een significante reductie van het aantal stimulaties nodig voor het bereiken van kindling geobserveerd. Bij transplantatie in de anterieure SNr werd daarentegen een stijging van het aantal stimulaties nodig voor kindling vastgesteld, die echter niet significant was vergeleken met een controlegroep. Er was dus een significant verschillend effect van GABA-producerende cellen afhankelijk van de plaats van transplantatie (56). In de studie van Gernert et al. (2002) werden de cellen getransplanteerd in de piriforme cortex van ratten. Na kindling van de amygdala werd geobserveerd dat de drempel tot het ontstaan van gedragsmatige aanvallen bij elektrische stimulatie vóór de aanvang van de kindling significant verhoogd was in de experimentele ratten. Na kindling waren de drempels voor het ontstaan van gedragsmatige en gegeneraliseerde aanvallen nog steeds verhoogd vergeleken met een controlegroep, maar dit resultaat was niet statistisch significant. De gemiddelde drempel voor het ontwikkelen van gedragsmatige aanvallen na kindling was lager dan die vóór kindling – een typisch kenmerk van kindling. Er werd geen significant effect op aanvalsduur en -ernst vastgesteld vóór of na kindling.

Wel werd een significant verhoogde latentietijd tot het ontwikkelen van de eerste gegeneraliseerde aanval na kindling opgemerkt in de experimentele groep. Dit effect bleek slechts tijdelijk te zijn, aangezien bij de volgende gegeneraliseerde aanvallen geen significant verschil in latentietijd meer aanwezig was (57). Thompson en Suchomelova (2004) transplanteerden de GAD₆₅-cellen opnieuw in de SNr van ratten. In deze studie werd de methode echter toegepast op een model van spontane aanvallen na status epilepticus geïnduceerd door intraperitoneale lithium- en pilocarpine-injectie. De experimentele dieren vertoonden een significant lagere aanvalsfrequentie en een significante onderdrukking van ontladingen vergeleken met dieren waarbij controlecellen getransplanteerd waren of dieren die GABA-producerende cellen gecombineerd met doxycycline ontvangen hadden (58). In de studie van Thompson (2005) werden de GABA-producerende cellen – onder controle van doxycycline – getransplanteerd in de gyrus dentatus in een model van entorhinale kindling. Opnieuw werd een aanvalsonderdrukkend effect waargenomen, bestaande uit een verhoogde drempel voor ontwikkeling van aanvallen en een verkorting van de duur van hippocampale ontladingen. Ook werd het optreden van aanvallen van stadium 5 van Racine vertraagd in de experimentele ratten. Het aanvalsonderdrukkend effect van de GABA-producerende cellen viel weg bij toediening van doxycycline (59).

In een studie van Nolte et al. (2008) werden de voordelen en risico's van transplantatie van GABA-producerende cellen in de SNr in een model van reeds ontwikkelde epilepsie na kindling nagegaan (60). Enerzijds werd bevestigd dat transplantatie van de cellen resulteerde in significante – maar tijdelijke – anticonvulsieve effecten. Anderzijds werden echter sterke weefselreacties geobserveerd in de hersenen van dieren die onderworpen waren aan kindling – maar niet bij controledieren die hier niet aan onderworpen waren – en hierbij enkel in dieren die transplantaties van GABA-producerende cellen gekregen hadden. De weefselreacties bestonden uit afstoting van het transplant, massieve infiltratie van inflammatoire immuuncellen en gliose (60).

DISCUSSIE

1. Bedenkingen bij translatie naar de kliniek

De effectiviteit van de besproken types gentherapie is reeds in talrijke preklinische studies bewezen. De vraag rest echter of deze methoden ook kunnen worden toegepast op mensen. Daarom zullen hier de voor- en nadelen van de verschillende methoden besproken worden met hun implicaties voor translatie naar de menselijke kliniek.

1.1. Algemeen

Bij alle besproken methoden van genterapie wordt gebruik gemaakt van virale vectoren. Zoals besproken in de inleiding, moeten de voor- en nadelen van de verschillende vectoren steeds in acht genomen worden voor een geschikte keuze. Hierbij moet rekening gehouden worden met de transgencapaciteit, de immunogeniciteit, de mogelijke toxiciteit en zelfs carcinogeniciteit van deze methode.

Wat betreft transgencapaciteit is gebleken dat bepaalde promotoren goed passen in AAV-vectoren – meestal de vector van keuze – maar dat andere promotoren – zeker deze die gericht zijn op inhibitoire neuronen – moeilijker in te passen zijn in een virale vector. Daarom werd in preklinische studies frequent gebruik gemaakt van transgene dieren voor deze indicatie. DREADD's bleken steeds goed transduceerbaar via AAV-vectoren. Verder is het nuttig om rekening te houden met het tropisme van de virale vectoren. Voornamelijk AAV2, AAV5 en AAV8 hebben een bijna volledig neuronaal tropisme; AAV9 heeft enkel een bijna exclusief neuronale transductie wanneer het rechtstreeks in het centraal zenuwstelsel wordt geïnjecteerd (61). Een ideale vector voor een klinische studie zou bestaan uit een virus die hetzelfde tropisme heeft als de promotor die hij draagt – en die dus beiden gericht zijn op de pathologische cellen bij de onderzochte aandoening (62).

Immunogeniciteit blijkt in het geval van AAV-vectoren zelden een probleem te vormen op het vlak van veiligheid. Wel valt op te merken dat een vooraf bestaande immuniteit voor AAV – waarvoor een groot deel van de bevolking seropositief is – kan leiden tot een verlies van effectiviteit: circulerende antilichamen kunnen verschillende serotypes van AAV – onder andere serotype 1 en 2 – neutraliseren (61). Deze circulerende antilichamen blijken echter geen significant effect op transductie te hebben bij intracranieële toediening van de virale vector (62).

Wat betreft toxiciteit is nog niet helemaal opgehelderd op welke manier virale vectoren het genoom veranderen – naast de beoogde genetische wijzigingen. Aangezien celfunctie afhankelijk is van specifieke controle van genexpressie en eiwitlokalisatie en -concentratie, zou transgenexpressie kunnen resulteren in eiwitaccumulatie of verstoorde regulatie van cellulaire biochemische processen. Bovendien zou het gebruik van promotoren sekwestratie van transcriptiefactoren kunnen veroorzaken en genetische 'pathways' in de cel kunnen veranderen. Zo zou transgenoverexpressie getransduceerde cellen op een manier kunnen veranderen die de celfunctie verstoort en zelfs celdood zou kunnen veroorzaken (63).

Het probleem van carcinogeniciteit stelt zich voornamelijk bij virale vectoren die sterk integreren in het genoom van de gastcel – met name lentivirussen – en zo een groter risico op insertiemutagenese vormen. Een interactie tussen integrase en bepaalde cellulaire factoren kan

namelijk leiden tot oncogene activatie – in het bijzonder bij bepaalde promotoren – of tot verstoring van tumorsuppressorgenen (63).

Onderzoek naar de geschikte vector voor klinische studies bij de mens zou nuttig zijn om meer te weten te komen over de verschillende probleemstellingen voordat een klinische studie bij de mens plaatsvindt. Dit onderzoek zou kunnen gebeuren bij niet-humane primaten – die een meer gelijkaardig hersenvolume hebben als de mens – en/of door middel van wiskundige modellen die juiste volumes, doses en titers in rekening brengen op basis van preklinische resultaten bij ratten en muizen. Studies met niet-humane primaten zouden eveneens nuttig zijn om sommige fysiologische verschillen tussen mensen en knaagdieren te overkomen, die onverwachte resultaten zouden kunnen veroorzaken in klinische studies (5).

Ook de mogelijke nevenwerkingen van de expressie van exogene stoffen of overexpressie van endogene stoffen kunnen in vraag gesteld worden. Zo kunnen bijvoorbeeld immunoreacties ontstaan tegen het transgenproduct wanneer deze niet herkend worden als lichaamseigen antigenen (62, 63). Deze immunoreacties kunnen leiden tot de dood van getransduceerde cellen, wat resulteert in enerzijds verlies van genexpressie en anderzijds inflammatie in het centraal zenuwstelsel. De immunoreacties blijken minder voor te komen bij AAV-vectoren met sterk neuronaal tropisme zoals AAV2 (62). Verder zou de verandering van cellulaire pathways met verstoring van fysiologische processen eveneens een probleem kunnen vormen. Ook hier vormen klinische studies bij niet-humane primaten een nuttig medium voor verder onderzoek.

1.2. Optogenetica

Een voordeel van optogenetica – dat bij de andere methoden niet van toepassing is – is de mogelijkheid om onmiddellijk na het begin van aanvallen, deze stil te leggen door middel van lichttoediening. Naast deze sterke temporele precisie, wordt ook spatiale precisie bereikt. Verschillende celtypes kunnen gestimuleerd of geïnhibeerd worden door gebruik van verschillende promotoren en recombinasen en door belichting met licht van verschillende golflengten.

Voor optimale werking zullen optogenetische eiwitten bepaalde eigenschappen moeten hebben. Ten eerste moeten de stromen die door het kanaal geleid worden hoog genoeg zijn voor een efficiënte depolarisatie of hyperpolarisatie van neuronen en moet ionenselectiviteit geoptimaliseerd worden. ChR2 geleidt bijvoorbeeld monovalente kationen zoals natrium, kalium en protonen, maar ook calcium. De natriumgeleiding draagt vooral bij tot de depolarisatie van het neuron, maar de additionele calciumgeleiding compliceert het gebruik van ChR2 – calcium kan rechtstreeks secondmessengerpathways of synaptische transmissie activeren. Ten tweede is de golflengte om het opsine te activeren van belang. Dit is enerzijds nuttig voor gelijktijdig gebruik van opsines met

verschillende golflengten – wat een mogelijkheid tot combinatietherapie biedt – en anderzijds nuttig voor combinatie met fluorescente eiwitten met andere golflengten – wat gelijktijdige optische beeldvorming van de neuronale activiteit mogelijk maakt (64).

Bepaalde fysiologische problemen kunnen zich nog steeds ontwikkelen bij gebruik van opsines. Zo zou de mogelijkheid bestaan dat optogenetische inhibitie van neuroneneen niet-fysiologische hyperpolarisatie induceert, die een reboundexcitatie kan veroorzaken bij wegnahme van de inhibitie. Ook zou rechtstreekse belichting en stimulatie van axonale membranen antidrome activatie van neuronale cellichamen en collateralen naar andere hersenzones kunnen veroorzaken, wat resulteert in activatie van verschillende circuits en reductie van de specificiteit van manipulatie. Ook zal de lichttoediening waarschijnlijk niet uniform zijn doorheen de hele doelpopulatie van neuroneneen, wat waarschijnlijk resulteert in verschillende activiteitsniveaus in de verschillende cellen. Ten slotte zou de insertie van een groot aantal exogene ionenkanalen of pompen in het celmembraan fysiologische veranderingen kunnen teweegbrengen (4). Onderzoek naar al deze factoren zou nuttig zijn om de werking van opsines in de mens te optimaliseren en bijwerkingen te minimaliseren.

Er stellen zich ook verscheidene praktische uitdagingen voor de uitvoering van optogenetica bij mensen. Om te beginnen is miniaturisatie van de stimulatie-apparaten nodig. Gebruik van step-function opsines is hierbij voordelig: door hun verlengde open staat hebben ze minder frequente stimulatie nodig, wat in de kliniek kan leiden tot een grote energiebesparing en zo een sterke reductie van de grootte van het stimulatieapparaat toelaat. Er zou namelijk langdurige (tientallen minuten) modulatie van neuronale exciteerbaarheid zijn bij zeer kortdurende (tientallen milliseconden) optische stimulatie. Verder is bij een closed-loop systeem nood aan selectie van een geschikt aanvalsdetectie-algoritme dat zowel snel als accuraat is. Hiervoor moeten EEG-registraties bestudeerd worden om op een betrouwbare manier automatische detectie van epileptiforme activiteit toe te laten. Ook is er het probleem van de slechte penetratie van zichtbaar licht doorheen hersenweefsel. De oplossing hiervoor lijkt verhogen van de sterkte en/of aantal van optische stimuli, maar lokale hitte-effecten ten gevolge van langdurige stimulatie met hoge lichtvermogens of implantatie van meerdere optische vezels zou dan leiden tot irreversibele weefselschade. Als oplossing zou genetische modificatie van de opsines een mogelijkheid zijn, die de opsines meer gevoelig zou maken voor optische activatie op de gewenste golflengte, zodat zwakkere signalen verder van de stimulatiebron in staat zouden zijn om neuronale exciteerbaarheid te moduleren. Een andere benadering is het verhogen van de gevoeligheid van opsines voor langere golflengten van

licht – de zogenaamde ‘red-shifted’ opsines – die, zoals eerder uitgelegd, diepe lichtpenetratie in weefsel mogelijk maken met minder verstrooiing (7).

1.3. Chemogenetica

DREADD's bieden een voordeel tegenover optogenetica omdat ze minder invasief zijn – er wordt geen optische vezel geïmplant, er moet geen belichting gebeuren en er is dus geen stimulatie-apparaat nodig. Hun nadeel is echter dat ze slechts een beperkte temporele controle bieden: neuronale modulatie door middel van DREADD's duurt minuten – waar dit bij optogenetica slechts milliseconden duurt (9).

Voorlopig zijn slechts een beperkt aantal preklinische studies uitgevoerd die DREADD's toepassen in een model van epilepsie. Hier bleek dat CNO een ligand is met goede doeltreffendheid, uitstekende selectiviteit en hoge potentie. Het is echter mogelijk dat deze stof bij de mens een sterke metabole omzetting zou ondergaan, wat de effectiviteit van deze methode uiteraard sterk zou reduceren (65). Bovendien kan terugtransformatie van CNO tot clozapine bij de mens bepaalde bijwerkingen veroorzaken – zoals hypotensie, sedatie en anticholinerg syndroom. Dit kan voorkomen worden door de dosis zo laag mogelijk te houden en voldoende controles uit te voeren (13). Ook zou identificatie van andere liganden met goede farmacokinetische en toxicologische eigenschappen en goede penetratie van het centraal zenuwstelsel nuttig zijn. Verder is het mogelijk dat hoge expressie van DREADD's effecten kan hebben in afwezigheid van chemische activatie. Onder andere voor hM4Di – de meest gebruikte DREADD in preklinische studies bij epilepsie – is echter aangetoond dat zeer langdurige en hoge expressieniveaus bereikt werden zonder anatomische of basale elektrofysiologische afwijkingen en zonder gedragsverstoring. Als toch basale activiteit geobserveerd zou worden, zou het verstandig zijn om het niveau van DREADD-expressie te verlagen door een lagere virustiter te gebruiken, een zwakkere promotor te gebruiken of post-transcriptionele expressie te modificeren. Desensitisatie – het dalen van de gevoeligheid van een DREADD na herhaalde dosering met zijn ligand – is een ander probleem dat zich zou kunnen stellen. Hoewel dit zich niet heeft voorgedaan in preklinische studies, is verder onderzoek hiernaar nuttig. Verder is ongekend of activatie van DREADD's ook ongewenste downstream effectorpathways activeert. Resultaten van preklinische studies wijzen hier voorlopig niet op (13). Het lijkt aangewezen om meer preklinische studies uit te voeren – eventueel ook met DREADD's die door andere liganden dan CNO geactiveerd worden – voordat chemogenetica wordt toegepast bij mensen in klinische studies.

1.4. Spanningsafhankelijke ionenkanaalgentherapie

Deze vorm van gentherapie zou snel naar de kliniek kunnen evolueren, aangezien hier geen hindernissen zijn zoals de nood om activerend licht of chemische stimuli toe te dienen, en aangezien er zich bij inbrengen van humane genen waarschijnlijk minder problemen stellen wat betreft klinische veiligheid en verdraagbaarheid dan bij genen afgeleid van andere diersoorten. Toch kunnen zich ook hier nog bepaalde problemen stellen. Ten eerste zou constitutieve manipulatie van neuronale exciteerbaarheid tegengewerkt kunnen worden door homeostatische compensatoire mechanismen – meer dan bij intermitterende vormen van gentherapie. Dit zou ofwel de gewenste effecten kunnen tenietdoen, ofwel de exciteerbaarheid in andere delen van het netwerk nadelig kunnen beïnvloeden. Ten tweede zou constitutieve verhoogde expressie van de ionenkanalen kunnen leiden tot een permanente onderdrukking van neuronale activiteit. Voor epilepsia partialis continua – waar bijna continue aanvalsactiviteit plaatsvindt – zou dit geen probleem zijn, maar bij andere vormen van epilepsie met intermitterende periodes van hyperexcitatie, zal verder onderzoek nodig zijn naar de effecten op interictale neuronale activiteit. Ten slotte is het belangrijk dat bijwerkingen van constitutieve neuronale modulatie onderzocht worden, aangezien deze vorm van interventie niet eenvoudigweg ‘uitgeschakeld’ kan worden – wat in optogenetica en chemogenetica wel kan worden gedaan door wegname van de activerende stimulus (7).

1.5. Celgemedieerde vrijstelling

Zowel de ex vivo als de in vivo methoden van celgemedieerde vrijstelling werden reeds in talrijke studies onderzocht. Beiden bleken een goede effectiviteit te hebben. Het grootste voordeel van ex vivo gentherapie is de mogelijkheid om de cellen te modificeren naar een specifiek fenotype en om te screenen voor transductiegeïnduceerde defecten voordat de transplantatie wordt uitgevoerd. Het nadeel is de beperkte capaciteit van stamcellen om te integreren in de hersenen en specifieke neuronale fenotypes te genereren (19). Overleving van de getransplanteerde cellen zou bijvoorbeeld verbeterd kunnen worden via toevoeging van anti-apoptotische of neurotrofe factoren (18). Verder werd – zoals eerder besproken – een sterke immunologische weefselreactie geobserveerd bij dieren die GABA-producerende celtransplanten gekregen hadden en onderworpen werden aan kindling (60).

Wat betreft in vivo celgemedieerde vrijstelling, hebben verschillende studies reeds de fysiologische en gedragsmatige bijwerkingen onderzocht. Een studie van Sørensen et al. (2009) toonde aan dat ‘long-term potentiation’ – een vorm van geheugen – wel verstoord was in dieren met kindling geïnduceerde aanvallen en AAV-gemedieerde NPY-overexpressie, maar dat deze verstoring enkel te wijten was aan de kindling en niet verder beïnvloed werd door de gentherapie (66). Een studie

van Noe et al. (2010) rapporteerde dat AAV-gemedieerde NPY-overexpressie geen gedragsveranderingen veroorzaakte in ratten. Hiervoor werden experimenten uitgevoerd die fysiologische functies zoals leerprocessen, geheugen, angst en locomotorische activiteit testten (50).

2. Conclusie

Dankzij de spatiale en cellulaire – en bij optogenetica zelfs temporele – precisie vormt genterapie een aantrekkelijk alternatief met weinig verwachte bijwerkingen voor patiënten met refractaire epilepsie, en in het bijzonder voor deze patiënten bij wie de focus van de aanvallen niet reseceerbaar is. Omdat sommige effecten van virale vectoren en van de inbreng van bepaalde exogene eiwitten of verhoging van expressie van bepaalde endogene eiwitten bij de mens nog niet helemaal gekend zijn, zou het echter nuttig zijn om een eerste klinische studie uit te voeren bij patiënten die een focale, operabele epilepsie hebben. Indien de behandeling dan niet succesvol is of als er veel nevenwerkingen zijn, kan de regio met getransduceerde neuronen in zijn geheel chirurgisch verwijderd worden.

REFERENTIES

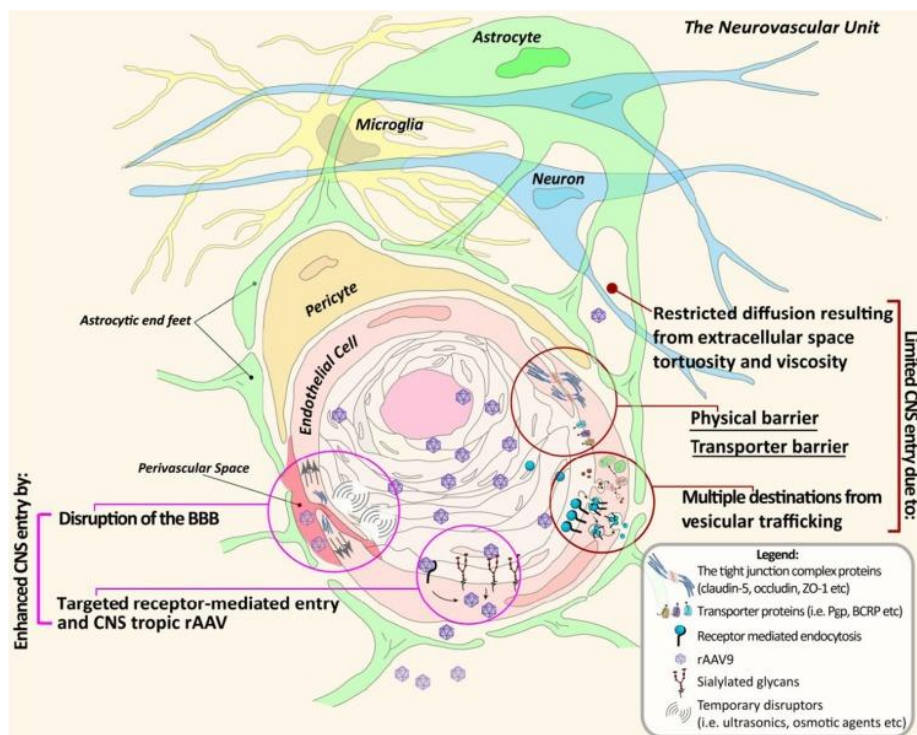
1. French JA. Refractory epilepsy: one size does not fit all. *Epilepsy Curr.* 2006;6(6):177-80.
2. Schmidt D, Loscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia.* 2005;46(6):858-77.
3. Rogawski MA, Johnson MR. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr.* 2008;8(5):127-30.
4. Guru A, Post RJ, Ho YY, Warden MR. Making Sense of Optogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015;18(11):pyv079.
5. Maguire CA, Ramirez SH, Merkel SF, Sena-Estevés M, Breakefield XO. Gene therapy for the nervous system: challenges and new strategies. *Neurotherapeutics.* 2014;11(4):817-39.
6. Gray SJ, Woodard KT, Samulski RJ. Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy. *Ther Deliv.* 2010;1(4):517-34.
7. Snowball A, Schorge S. Changing channels in pain and epilepsy: Exploiting ion channel gene therapy for disorders of neuronal hyperexcitability. *FEBS Lett.* 2015;589(14):1620-34.
8. Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in neural systems. *Neuron.* 2011;71(1):9-34.
9. Urban DJ, Roth BL. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:399-417.
10. Sineshchekov OA, Govorunova EG, Li H, Spudich JL. Gating mechanisms of a natural anion channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(46):14236-41.
11. Wietek J, Broser M, Krause BS, Hegemann P. Identification of a Natural Green Light Absorbing Chloride Conducting Channelrhodopsin from *Proteomonas sulcata*. *J Biol Chem.* 2016;291(8):4121-7.
12. Govorunova EG, Sineshchekov OA, Spudich JL. *Proteomonas sulcata* ACR1: A Fast Anion Channelrhodopsin. *Photochem Photobiol.* 2015.
13. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron.* 2016;89(4):683-94.
14. Sternson SM, Roth BL. Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci.* 2014;37:387-407.
15. Vardy E, Robinson JE, Li C, Olsen RH, DiBerto JF, Giguere PM, et al. A new DREADD facilitates the multiplexed chemogenetic interrogation of behavior. *Neuron.* 2015;86(4):936-46.
16. Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L, Zheng K, MacDonald DC, Deisseroth K, et al. Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Sci Transl Med.* 2012;4(161):161ra52.

17. Dey D, Eckle VS, Vitko I, Sullivan KA, Lasiecka ZM, Winckler B, et al. A potassium leak channel silences hyperactive neurons and ameliorates status epilepticus. *Epilepsia*. 2014;55(2):203-13.
18. Van Dycke A, Raedt R, Vonck K, Boon P. Local delivery strategies in epilepsy: a focus on adenosine. *Seizure*. 2011;20(5):376-82.
19. Boon P, Raedt R, Stefan H. Innovative treatments for epilepsy: radiosurgery and local delivery. *Handb Clin Neurol*. 2012;108:971-81.
20. Theofilas P, Brar S, Stewart KA, Shen HY, Sandau US, Poulsen D, et al. Adenosine kinase as a target for therapeutic antisense strategies in epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(3):589-601.
21. Young D, Fong DM, Lawlor PA, Wu A, Mouravlev A, McRae M, et al. Adenosine kinase, glutamine synthetase and EAAT2 as gene therapy targets for temporal lobe epilepsy. *Gene Ther*. 2014;21(12):1029-40.
22. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):143-57.
23. Nilsen KE, Walker MC, Cock HR. Characterization of the tetanus toxin model of refractory focal neocortical epilepsy in the rat. *Epilepsia*. 2005;46(2):179-87.
24. Levesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10 Pt 2):2887-99.
25. Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Marquez S, Veronica Custodio ML, Paz C. In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010;10(4):298-309.
26. Tonnesen J, Sorensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12162-7.
27. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun*. 2013;4:1376.
28. Krook-Magnuson E, Szabo GG, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. Cerebellar Directed Optogenetic Intervention Inhibits Spontaneous Hippocampal Seizures in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro*. 2014;1(1).
29. Sukhotinsky I, Chan AM, Ahmed OJ, Rao VR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Optogenetic delay of status epilepticus onset in an in vivo rodent epilepsy model. *PLoS One*. 2013;8(4):e62013.
30. Chiang CC, Ladas TP, Gonzalez-Reyes LE, Durand DM. Seizure suppression by high frequency optogenetic stimulation using in vitro and in vivo animal models of epilepsy. *Brain Stimul*. 2014;7(6):890-9.
31. Ledri M, Madsen MG, Nikitidou L, Kirik D, Kokaia M. Global optogenetic activation of inhibitory interneurons during epileptiform activity. *J Neurosci*. 2014;34(9):3364-77.
32. Berglind F, Ledri M, Sorensen AT, Nikitidou L, Melis M, Bielefeld P, et al. Optogenetic inhibition of chemically induced hypersynchronized bursting in mice. *Neurobiol Dis*. 2014;65:133-41.
33. Lu Y, Zhong C, Wang L, Wei P, He W, Huang K, et al. Optogenetic dissection of ictal propagation in the hippocampal-entorhinal cortex structures. *Nat Commun*. 2016;7:10962.
34. Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, et al. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nat Neurosci*. 2013;16(1):64-70.
35. Ji ZG, Wang H. Optogenetic control of astrocytes: is it possible to treat astrocyte-related epilepsy? *Brain Res Bull*. 2015;110:20-5.
36. Katzel D, Nicholson E, Schorge S, Walker MC, Kullmann DM. Chemical-genetic attenuation of focal neocortical seizures. *Nat Commun*. 2014;5:3847.
37. Avaliani N, Andersson M, Runegaard AH, Woldbye D, Kokaia M. DREADDs suppress seizure-like activity in a mouse model of pharmacoresistant epileptic brain tissue. *Gene Ther*. 2016.
38. Wicker E, Forcelli PA. Chemogenetic silencing of the midline and intralaminar thalamus blocks amygdala-kindled seizures. *Exp Neurol*. 2016;283(Pt A):404-12.
39. Raol YH, Lund IV, Bandyopadhyay S, Zhang G, Roberts DS, Wolfe JH, et al. Enhancing GABA(A) receptor alpha 1 subunit levels in hippocampal dentate gyrus inhibits epilepsy development in an animal model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2006;26(44):11342-6.
40. Kalev-Zylinska ML, Symes W, Young D, Doring MJ. Knockdown and overexpression of NR1 modulates NMDA receptor function. *Mol Cell Neurosci*. 2009;41(4):383-96.
41. Ren G, Li T, Lan JQ, Wilz A, Simon RP, Boison D. Lentiviral RNAi-induced downregulation of adenosine kinase in human mesenchymal stem cell grafts: a novel perspective for seizure control. *Exp Neurol*. 2007;208(1):26-37.
42. Li T, Ren G, Kaplan DL, Boison D. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 2009;84(2-3):238-41.
43. Haberman RP, Samulski RJ, McCown TJ. Attenuation of seizures and neuronal death by adeno-associated virus vector galanin expression and secretion. *Nat Med*. 2003;9(8):1076-80.
44. McCown TJ. Adeno-associated virus-mediated expression and constitutive secretion of galanin suppresses limbic seizure activity in vivo. *Mol Ther*. 2006;14(1):63-8.
45. Lin EJ, Richichi C, Young D, Baer K, Vezzani A, Doring MJ. Recombinant AAV-mediated expression of galanin in rat hippocampus suppresses seizure development. *Eur J Neurosci*. 2003;18(7):2087-92.

46. Kanter-Schlifke I, Toft Sorensen A, Ledri M, Kuteeva E, Hokfelt T, Kokaia M. Galanin gene transfer curtails generalized seizures in kindled rats without altering hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience*. 2007;150(4):984-92.
47. Richichi C, Lin EJ, Stefanin D, Colella D, Ravizza T, Grignaschi G, et al. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 2004;24(12):3051-9.
48. Foti S, Haberman RP, Samulski RJ, McCown TJ. Adeno-associated virus-mediated expression and constitutive secretion of NPY or NPY13-36 suppresses seizure activity in vivo. *Gene Ther*. 2007;14(21):1534-6.
49. Noe F, Pool AH, Nissinen J, Gobbi M, Bland R, Rizzi M, et al. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2008;131(Pt 6):1506-15.
50. Noe F, Vaghi V, Balducci C, Fitzsimons H, Bland R, Zardoni D, et al. Anticonvulsant effects and behavioural outcomes of rAAV serotype 1 vector-mediated neuropeptide Y overexpression in rat hippocampus. *Gene Ther*. 2010;17(5):643-52.
51. Woldbye DP, Anghagen M, Gotzsche CR, Elbrond-Bek H, Sorensen AT, Christiansen SH, et al. Adeno-associated viral vector-induced overexpression of neuropeptide Y Y2 receptors in the hippocampus suppresses seizures. *Brain*. 2010;133(9):2778-88.
52. Gotzsche CR, Nikitidou L, Sorensen AT, Olesen MV, Sorensen G, Christiansen SH, et al. Combined gene overexpression of neuropeptide Y and its receptor Y5 in the hippocampus suppresses seizures. *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):288-96.
53. Dong C, Zhao W, Li W, Lv P, Dong X. Anti-epileptic effects of neuropeptide Y gene transfection into the rat brain. *Neural Regen Res*. 2013;8(14):1307-15.
54. Zhang F, Zhao W, Li W, Dong C, Zhang X, Wu J, et al. Neuropeptide Y gene transfection inhibits post-epileptic hippocampal synaptic reconstruction. *Neural Regen Res*. 2013;8(17):1597-605.
55. Ledri LN, Melin E, Christiansen SH, Gotzsche CR, Cifra A, Woldbye DP, et al. Translational approach for gene therapy in epilepsy: Model system and unilateral overexpression of neuropeptide Y and Y2 receptors. *Neurobiol Dis*. 2016;86:52-61.
56. Thompson K, Anantharam V, Behrstock S, Bongarzone E, Campagnoni A, Tobin AJ. Conditionally immortalized cell lines, engineered to produce and release GABA, modulate the development of behavioral seizures. *Exp Neurol*. 2000;161(2):481-9.
57. Gernert M, Thompson KW, Loscher W, Tobin AJ. Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats. *Exp Neurol*. 2002;176(1):183-92.
58. Thompson KW, Suchomelova LM. Transplants of cells engineered to produce GABA suppress spontaneous seizures. *Epilepsia*. 2004;45(1):4-12.
59. Thompson KW. Genetically engineered cells with regulatable GABA production can affect afterdischarges and behavioral seizures after transplantation into the dentate gyrus. *Neuroscience*. 2005;133(4):1029-37.
60. Nolte MW, Loscher W, Herden C, Freed WJ, Gernert M. Benefits and risks of intranigral transplantation of GABA-producing cells subsequent to the establishment of kindling-induced seizures. *Neurobiol Dis*. 2008;31(3):342-54.
61. Weinberg MS, McCown TJ. Current prospects and challenges for epilepsy gene therapy. *Exp Neurol*. 2013;244:27-35.
62. Ojala DS, Amara DP, Schaffer DV. Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *Neuroscientist*. 2015;21(1):84-98.
63. Serguera C, Bemelmans AP. Gene therapy of the central nervous system: general considerations on viral vectors for gene transfer into the brain. *Rev Neurol (Paris)*. 2014;170(12):727-38.
64. Fiala A, Suska A, Schluter OM. Optogenetic approaches in neuroscience. *Curr Biol*. 2010;20(20):R897-903.
65. Wess J, Nakajima K, Jain S. Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(7):385-92.
66. Sorensen AT, Nikitidou L, Ledri M, Lin EJ, During MJ, Kanter-Schlifke I, et al. Hippocampal NPY gene transfer attenuates seizures without affecting epilepsy-induced impairment of LTP. *Exp Neurol*. 2009;215(2):328-33.
67. Zhu H, Roth BL. DREADD: a chemogenetic GPCR signaling platform. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(1).

BIJLAGEN

Figuur 1

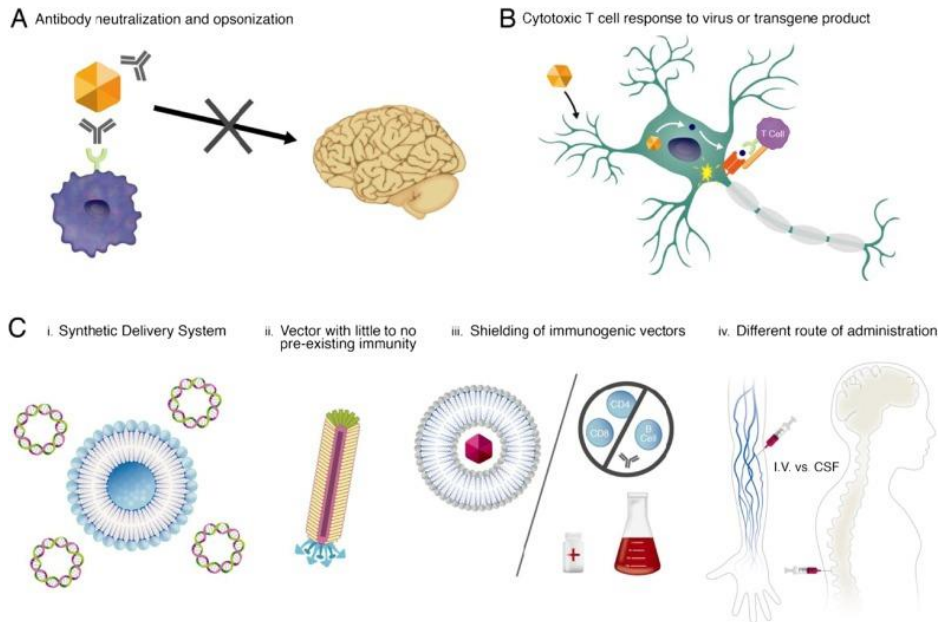


De uitdagingen voor genetherapie die gevormd worden door de BBB. In tegenstelling tot bloedvaten in andere orgaansystemen, vormt het endotheel in de hersenen intercellulaire ‘tight junctions’ die de paracellulaire toegang van stoffen die zich in het bloed bevinden tot hersenparenchym beperken. Als gevolg van deze fysieke barrière worden genstervectoren die in het CZS proberen binnen te raken, verplicht om transcellulair te bewegen. Gespecialiseerde effluxtransporters aan de lumenale zijde dragen bij tot de formatie van de transportbarrière die xenobiotische stoffen toegang tot de neuronale omgeving verhinderen. In het geval van niet-virale gentoedieningconstructies, kunnen effluxtransporters stabiliserende moleculen elimineren en vroege ont kapseling induceren, zodat de kans op intacte transendotheliale passage naar de hersenen daalt.

Een ander obstakel dat gedeeltelijk de endotheliale passage van genvectoren verhindert is de transcytotische/endosomale sortering, die kan leiden tot degradatie. Hoewel het endotheel het grootste obstakel is in beperking van toegang tot het CZS, verhinderen de aanwezigheid van een complexe extracellulaire ruimte, moleculaire compositie en geometrie ook op een significante manier de diffusie van niet-virale en viraal gebaseerde gentoedieningssystemen.

Links op de figuur worden nieuwe ontwikkelingen in virale constructie getoond die gebruik maken van receptorgemedieerde endocytose, ontdekking van virale serotypes (zoals AAV9) met verbeterde CZS-penetratie, en methoden die tijdelijk de barrière doorbreken om de efficiëntie van gentransfer in de hersenen te verhogen. (Figuur uit Maguire et al., 2014) (5)

Figuur 2



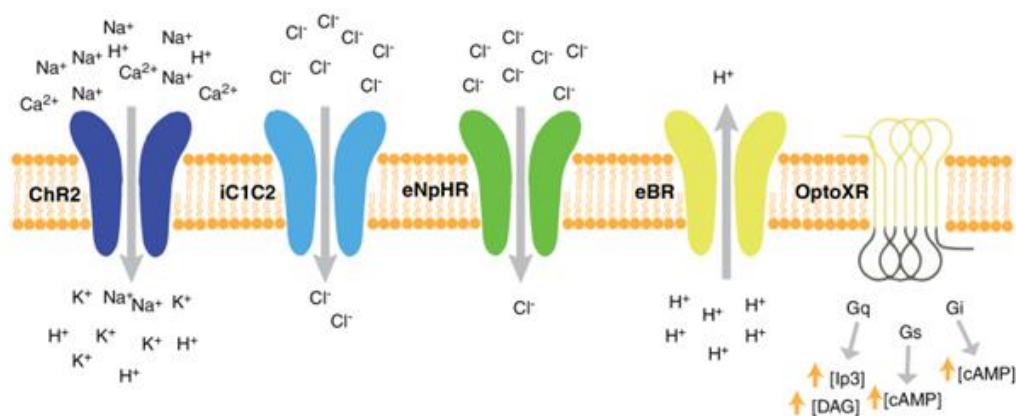
De uitdagingen voor gentherapie in het centraal zenuwstelsel wat betreft immuunsysteem.

(a) Reeds bestaande antilichamen tegen wild-type virussen in de periferie kunnen de vector herkennen en neutraliseren om binding aan receptoren en transport naar de hersenen te verhinderen. Ook kan binding van antilichamen aan het oppervlak van de vector leiden tot opsonisatie door fagocyten.

(b) Cytotoxische T-celgemedieerd doden van cellen (bijvoorbeeld neuronen) die virale antigenen of antigenen van het transgenproduct presenteren.

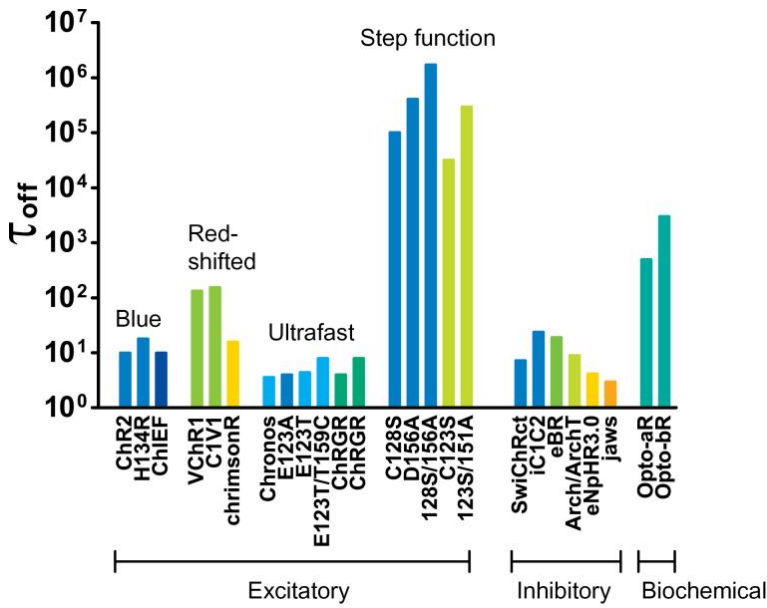
(c) Nieuwe strategieën: (i) synthetisch getoedieningsvehikel (bijvoorbeeld liposoom en plasmide DNA) zonder reeds bestaande immuniteit; (ii) vectoren waarvoor weinig of geen immuniteit reeds bestaat (bijvoorbeeld bacteriofaag); (iii) immuunevasie door gebruik van immunogene vectoren die afgeschermd worden door endogene of synthetische stoffen (bijvoorbeeld polyethyleenglycol (PEG) of endogene extracellulaire vesikels), als alternatief kan de patiënt medicamenteuze immunosuppressie krijgen vóór begin van de therapie om de immunrespons te dempen; (iv) gewijzigde toedieningswegen om hoge titers van antilichamen in het bloed te vermijden. (Figuur uit Maguire et al., 2014) (5)

Figuur 3



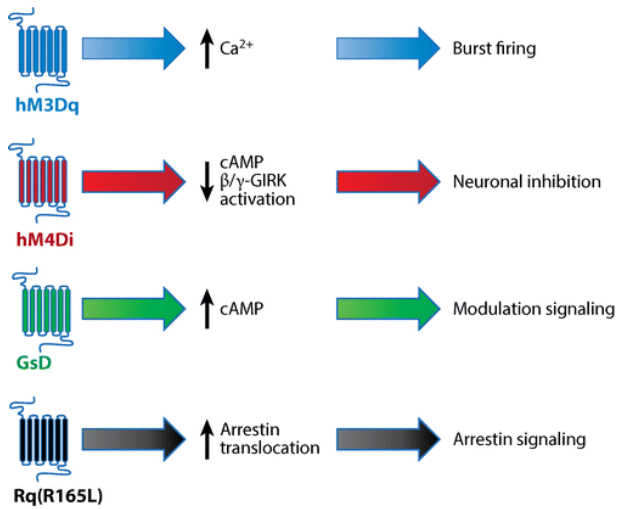
Opsines zijn membraangebonden eiwitten die na activatie door licht leiden tot celactivatie (depolarisatie), -inhibitie (hyperpolarisatie) of modulatie van intracellulaire signalisatiecascades. Afgebeeld zijn ChR2 (een kationkanaal gebruikt om neurale activiteit te stimuleren), iC1C2 (een nieuw ontwikkeld chloorkanaal gebruikt om neurale activiteit te inhiberen), eNpHR3.1 (een chloorkanaal gebruikt om neurale activiteit te inhiberen), eBR (een protonpomp gebruikt om neurale activiteit te inhiberen) en OptoXR (een GPCR gebruikt om intracellulaire signalisatie te moduleren). (Figuur uit Guru et al., 2015) (4)

Figuur 4



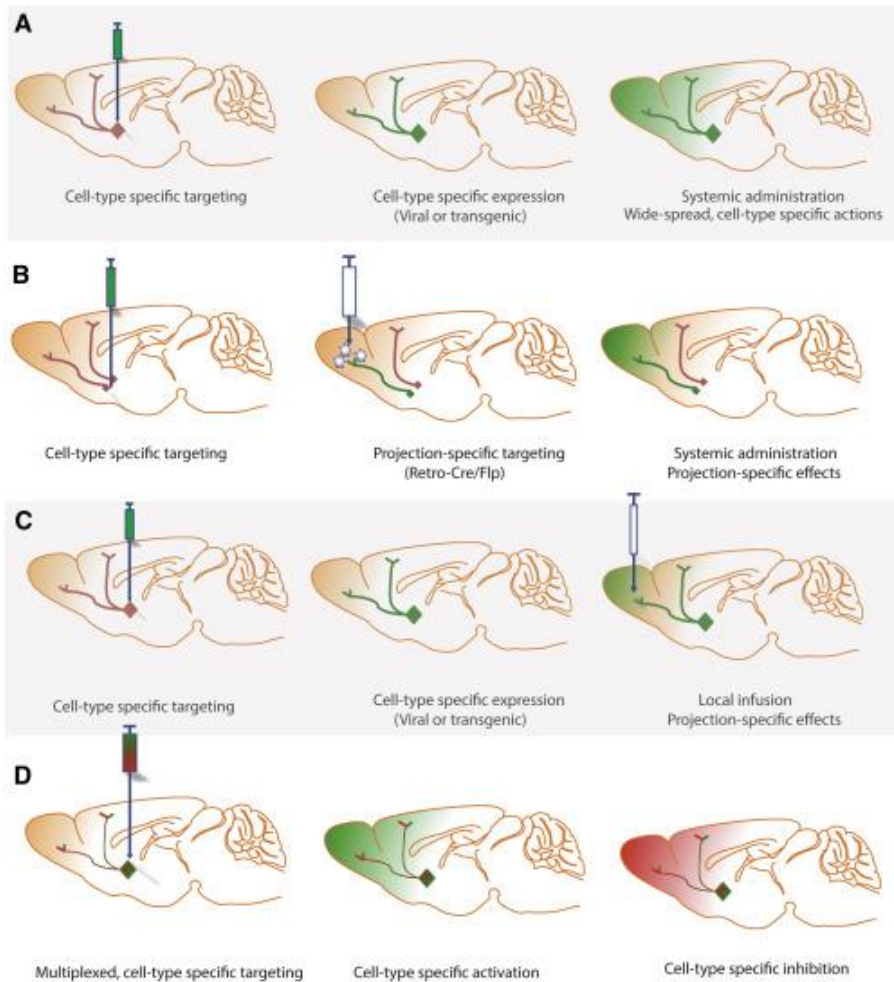
Een illustratie van enkele opsines. De verschillende kleuren indiceren de optimale frequentie van licht gebruikt voor activatie; toff indiceert snelheid van deactivatie (snelle opsines hebben een lage toff, trage opsines hebben een hoge toff). (Figuur uit Guru et al., 2015) (4)

Figuur 5



Een voorbeeld van elke soort DREADD met zijn effect: hM3Dq (een Gq-DREADD), hM4Di (een Gi-DREADD), GsD (de Gs-DREADD) en Rq(R165L) (een β-arrestine-DREADD). (Figuur uit Sternson et al., 2014) (14)

Figuur 6



Mogelijke benaderingen voor celtypespecifieke en projectiespecifieke modulatie van neuronale activiteit bij gebruik van DREADD's.

(A) De standaardbenadering waarbij DREADD's tot expressie worden gebracht op een celtypespecifieke manier (viraal of transgenisch) en dan geactiveerd worden door systemische toediening van een chemische actuator.

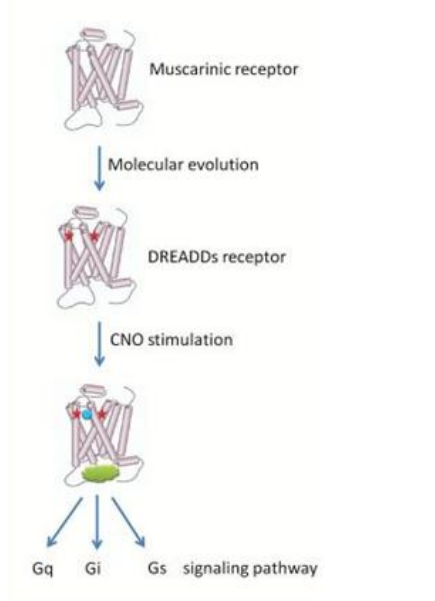
(B) Een combinatie van celtypespecifieke expressie (bijvoorbeeld lokale injectie van AAV-FLEX-hSyn-DREADD) en projectiespecifieke infusie van CAV-Cre laat projectiespecifieke expressie en activatie van DREADD's toe.

(C) Lokale infusie van een chemische actuator leidt tot projectiespecifieke effecten met een beperkte zone van activatie.

(D) Verschillende DREADD's kunnen tot expressie worden gebracht op een celtypespecifieke manier, wat verschillende vormen van chemogenetische modulatie van neurale activiteit en fysiologie gelijktijdig mogelijk maakt.

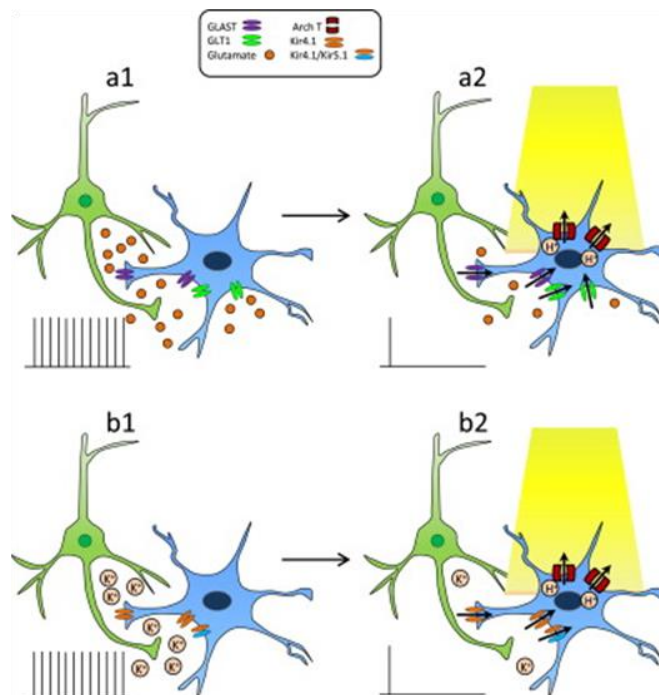
(Figuur uit Roth et al., 2016) (13)

Figuur 7



Introductie van twee mutaties in transmembraan III en V van muscarinereceptoren leidde tot het ontstaan van DREADD's die op een precieze manier Gq-, Gi- of Gs-signalisatiepathways kunnen controleren. (Figuur uit Zhu et al., 2015) (67)

Figuur 8



Optogenetische controle van astrocyten. (a1) Hoge concentratie van glutamaat in de extracellulaire ruimte van een principale neuron resulteert in hyperexcitatie. (a2) Fotoactivatie van ArchT in astrocyten leidt tot hyperpolarisatie en alkalisatie, waardoor de opname van glutamaat doorheen GLAST- en GLT1-transporters zou kunnen verhogen en op die manier hyperexcitatie van neuronen zou kunnen onderdrukken. (b1) Hoge concentratie van kalium in de extracellulaire ruimte van een principaal neuron leidt tot hyperexcitatie. (b2) Fotoactivatie van de ArchT-kanalen in astrocyten leidt tot hyperpolarisatie en alkalisatie van astrocyten, wat de opname van kalium doorheen Kir4.1-kanalen en/of Kir5.1-kanalen zou kunnen versterken en op die manier hyperexcitatie van neuronen zou kunnen reduceren. (Figuur uit Ji et al., 2015) (35)