

Epilepsy surgery and biomarkers from history to molecular imaging

Citation for published version (APA):

Schijns, O. (2016). *Epilepsy surgery and biomarkers from history to molecular imaging*.

Document status and date:

Published: 01/01/2016

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 8

Summary

Summary

Epilepsy is defined by the World Health Organization (WHO) as a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures, which are brief episodes of involuntary movement of a part of the body (partial) or the entire body (generalized), that can be accompanied by a loss of consciousness and control of bowel and/or bladder function. Patients with epilepsy have a higher (seizure-induced) morbidity ratio and a two to three times higher mortality risk compared with healthy individuals. Epilepsy also has a devastating influence on the life of the patients, affecting nearly all domains of daily living. This still leads to stigmatisation and discrimination of patients in many parts of the world, which further contributes to a deterioration of their quality of life.

Chapter 1 is a general introduction to epilepsy with an emphasis on temporal lobe epilepsy (TLE), as the most prevalent form of the focal epilepsies. Next to the clinical diagnosis and epidemiology, it describes the outline of this thesis. In this respect, it discusses literature about temporal pole gray-white matter abnormalities (GWMA) as a possible biomarker and its significance for clinical characteristics, the underlying pathological substrate and postoperative seizure outcome. The second part focusses on the GABA-transporter (GAT) as a second possible biomarker and discusses GABAergic alterations in epilepsy. In TLE patients, seizure-associated alterations in extracellular GABA concentrations have been suggested to arise from changes in transporter quantity and/or function. Different electrophysiological, microdialysis and immunohistochemical studies demonstrated respectively disturbed GABA-responses in dentate granule cells of hippocampal sclerosis (HS)-associated TLE and a regional loss of hippocampal GATs. Thus, the aim of this thesis was to identify potential biomarkers in TLE.

Chapter 2 provides a detailed description of the history of epilepsy and the development of its surgical treatment in Europe. The foundation of “modern” epileptology and epilepsy surgery in Europe started in the second half of the nineteenth century synchronously in the UK with neurologist Hughlings Jackson in collaboration with neurosurgeon Sir Victor Horsley and in Germany with neurosurgeon Fedor Krause. The same period was marked by a transition from skull surgery to brain surgery and the insight of epilepsy as a cortical disorder of the brain emerged. The introduction of the operation microscope and implantable electrodes for intra- and extraoperative electrocorticography between 1950 and 1960 provided new diagnostic and therapeutic possibilities. After the advent of MR imaging, it became clear that many epilepsy patients exhibit a structural lesion as a substrate of their drug-resistant seizures and often amenable for surgery. At the same time, the 1970’s, multidisciplinary epilepsy surgery groups arose which aimed at optimizing the selection of epilepsy surgical candidates.

Chapter 3 describes the occurrence of temporal pole GWMA in 370 patients with drug-resistant TLE. These temporal lobe GWMA are frequent (32-68%) MRI-detected morphological aberrances in patients with HS-associated TLE. A definitive histopathological correlate has yet to be established and the question if these GWMA are epileptogenic is also still unanswered. This cohort study demonstrated that the HS plus GWMA patients were significantly younger at epilepsy onset than those without GWMA. In the GWMA group, 41% of patients were younger than 2 years when they experienced their first seizure, in contrast to only 17% of patients without GWMA ($p=0.004$). The seizure outcome was not statistically different between the groups with and without GWMA, i.e., 75.9% of the patients with GWMA were seizure free (Engel class I) compared with 81% of patients without GWMA. Also the seizure outcome of selective amygdalohippocampectomy and anterior temporal lobectomy was similar in both patient groups. Finally, we recognized that the neuropathological distinction between GWMA and focal cortical dysplasia type I and other mild malformations of cortical development was difficult. However, the extrahippocampal histological findings in these specimens did not reach the level of neuropathological alterations referred to as FCD type I or mMCD. In conclusion, the presence of GWMA can be a radiological biomarker for TLE.

In **Chapter 4**, we focused on the hippocampal expression of neuronal GAT-1 and glial GAT-3 in TLE patients. The abnormal neuronal discharges characterizing epilepsy are thought to be due to potentiation of excitatory and failure of inhibitory neurotransmission. It has therefore been suggested that GABA, the predominant inhibitory neurotransmitter in the mammalian nervous system, plays an important role in seizure induction and propagation. The hypothesis in this study was that a reduced number and/or dysfunctioning of GATs characterizes the epileptic sclerotic hippocampus of drug-resistant TLE patients. The main findings of this study demonstrate that severe sclerotic hippocampi from TLE patients are characterized by a locally decreased GAT-1 (i.e., hilar region) and an overall decreased GAT-3 expression. The implication of the above finding is that, as both forward and reverse transport into the synaptic cleft are disturbed, this contributes differentially to the interictal and ictal states.

In order to visualize GATs *in vivo*, as a potential radiological biomarker, a novel radioligand for GAT-1 was developed and described in **chapter 5**. Until now, there were no radioligands for *in vivo* imaging of GATs. One specific patient group that may benefit from visualization of the GABAergic-system are patients with drug-resistant, MRI-negative TLE. At a molecular level, several lines of evidence suggest that TLE patients exhibit a reduced hippocampal GAT expression. Molecular imaging of neurotransmitter systems can be of paramount importance in understanding the underlying

pathophysiology. Thus, the GABA-transporter, visualized by a radioligand, in the initial stage of TLE as a possible epileptogenic focus may therefore be classified as a radiologic biomarker. Tiagabine, a well-known GAT binding antiepileptic drug, was studied as candidate radioligand. Thus from a translational perspective, a successful labelling and visualization of cerebral GATs would permit a rapid use of this new radioligand in patients. In this study, we first labelled tiagabine with ^{123}I and then evaluated its capacity to pass the blood-brain barrier *in vivo* by using a dedicated ultra-high-resolution small-animal single-photon emission computed tomography machine with integrated CT. This study demonstrated a novel chemical pathway to synthesize a radioligand for GAT-1. However, in this labelled configuration, tiagabine does not pass the blood-brain barrier and is not yet suitable for visualization cerebral GATs.

Chapter 6 describes the distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2697153 (A/G in the GAT-1 gene SLC6A1) and rs2272400 (C/T in the GAT-3 gene SLC6A11) on chromosome 3p25.3, in a cohort of 94 drug-resistant TLE patients and 94 healthy controls.

In this study, we found that both, the GAT-1 and GAT-3 SNP were differently distributed in patients ($p < 0.05$). The GAT-1 GG genotype was found in 11% of the patients, compared to 21% of controls and a CT genotype of GAT-3 was found in 6% of the patients, whereas none of the controls expressed this variant ($p < 0.05$). When TLE patients were further divided in those with (FS+; $n=24$) and those without (FS-; $n=68$) a history of febrile seizures, it learned that the CT variant was found in 19% of the FS+ patients and in only 2% of the FS- patients ($p < 0.05$). The results suggest that GAT-1 and -3 SNPs are associated with TLE. The GAT-3 SNP is synonymous, meaning that it does not cause an amino acid change in the protein. It remains to be elucidated if this SNP can result in alternative mRNA, change the turnover or capacity of GAT-3 protein or is merely an indicator of a cosegregating functional SNP. Thus, the exact pathophysiological mechanism of this SNP to TLE and febrile seizures remains to be clarified.

The general discussion in **chapter 7** focuses on the roles of GWMA and GATs as potential biomarkers in epilepsy. The inability to precisely localize the epileptogenic zone by a biomarker is one of the reasons for an unsatisfactory postoperative seizure outcome. The process to develop antiepileptogenic interventions may also be facilitated by the identification of a reliable biomarker of epileptogenesis. This chapter ends with the description of the main purpose and the findings of the studies in this thesis.

Samenvatting

Samenvatting

Epilepsie wordt door de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO) gedefinieerd als een chronische, neurologische stoornis gekenmerkt door recidiverende aanvallen met korte periodes van onvrijwillige bewegingen in een deel van het lichaam of het gehele lichaam hetgeen soms gepaard gaat met bewustzijnsverlies en verlies van controle over blaas en/of darmfunctie. Patiënten met epilepsie hebben een hogere kans op (aanvalsgerelateerde) comorbiditeit en een twee tot drie keer zo hoge sterftekans in vergelijking met gezonde individuen. Epilepsie heeft een zeer negatieve invloed op meerdere gebieden van het algemeen dagelijks leven (ADL) van patiënten. De ziekte leidt nog steeds tot stigmatisatie en discriminatie van epilepsie patiënten in grote delen van de wereld met als directe consequentie een verslechtering van de kwaliteit van leven.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene introductie over epilepsie, met de nadruk op slaapkwab epilepsie (temporale epilepsie), als meest voorkomend subtype binnen de groep van de focale epilepsie. Naast een beschrijving van de klinische diagnosestelling en de epidemiologie, wordt een uiteenzetting gegeven over de inhoud van dit proefschrift. In dit kader wordt de beschikbare literatuur over differentiatie stoornissen van de grijze en witte stof, een potentiële biomarker, in de punt van de slaapkwab en de relatie van deze afwijking met klinische kenmerken, de pathologische diagnose van het bij de operatie verwijderde weefsel en de postoperatieve aanvalsuitkomst besproken. Het tweede deel richt zich op een andere potentiële biomarker, de GABA-transporter, en geeft een literatuur overzicht van de veranderingen in het GABA-erge systeem. Er wordt gesuggereerd dat veranderingen in de kwantiteit en/of functie van de GABA-transporter bij patiënten met slaapkwab epilepsie oorzakelijk verbonden zijn met aanvalsgeassocieerde extracellulaire GABA concentratie veranderingen. Meerdere elektro-fysiologische, microdialyse en immunohistochemische studies hebben aangetoond dat respectievelijk GABA potentialen in de granulaire cellen van de gyrus dentatus van patiënten met sclerose-gerelateerde slaapkwab epilepsie gestoord zijn en dat er een regio specifiek verlies van de GABA-transporter in de hippocampus bestaat.

Het onderzoek in dit proefschrift heeft primair als doel de identificatie en visualisatie van potentiële biomarkers in slaapkwab epilepsie.

Hoofdstuk 2 geeft een gedetailleerde beschrijving over de geschiedenis van de epilepsie als ziekte entiteit en de historische ontwikkeling van de epilepsiechirurgie in Europa. Het fundament van de “moderne” epileptologie en epilepsiechirurgie in Europa werd in de tweede helft van de 19^e eeuw synchroon gelegd door neuroloog Hughlings Jackson in samenwerking met neurochirurg Sir Victor Horsley in het Verenigd

Koninkrijk en door neurochirurg Fedor Krause in Duitsland. Deze tijdsperiode werd ook gekenmerkt door de overgang van “schedelchirurgie” naar hersenchirurgie, nadat het inzicht was ontstaan dat epilepsie een functiestoornis van de hersenschors was. De komst van de operatie microscoop en implanteerbare elektroden voor intra- en extraoperatieve electrocorticografie in de jaren 1950-1960, introduceerde nieuwe diagnostische en therapeutische mogelijkheden. Door de komst van MRI-beeldvorming, werd duidelijk dat een aanzienlijk deel van de epilepsie patiënten een structurele laesie in de hersenen had, die verantwoordelijk kon worden gehouden voor de medicamenteus niet-behandelbare aanvallen en die toegankelijk was voor neurochirurgische resectie. In dezelfde tijdsperiode, de jaren '70, werden multidisciplinaire epilepsiechirurgie werkgroepen gevormd met als hoofddoel optimalisatie van de selectie van kandidaten voor epilepsiechirurgie.

In **hoofdstuk 3** wordt het voorkomen van grijs-witte stof differentiatie stoornissen in de punt van de slaapkwab beschreven in 370 patiënten met medicatie resistente slaapkwabepilepsie. Deze grijs-witte stof differentiatie stoornissen zijn afwijkingen die vaak (32-68%) gezien worden op de MRI-scan van patiënten met slaapkwabepilepsie en hippocampus sclerose (HS). Een definitief histopathologisch substraat voor deze afwijking is er tot op heden niet, evenmin als de zekerheid dat deze afwijkingen epileptogeen zijn.

Deze cohort studie heeft aangetoond dat patiënten met HS plus GWMA significant jonger waren ten tijde van de start van de epilepsie in vergelijking met patiënten zonder GWMA. In de groep met HS plus GWMA was 41% van de patiënten jonger dan 2 jaar toen ze hun eerste aanval kregen in contrast met slechts 17% van de patiënten zonder GWMA ($p=0.004$). De postoperatieve aanvalsuitkomst was statistisch niet significant verschillend tussen de twee groepen: 75.9% van de patiënten met GWMA waren aanvalsvrij (Engel klasse I) vergeleken met 81% van de patiënten zonder GWMA. De aanvalsuitkomst was in beide groepen even succesvol, onafhankelijk of er een selectieve amygdalohippocampectomie of een anterieure temporale lobectomie uitgevoerd werd. Tot slot is het duidelijk dat de differentiatie tussen GWMA en FCD type I en micro malformaties van de corticale ontwikkeling (mMCD) moeilijk is. Echter, in deze studie kon de diagnose FCD of mMCD in de histologie van het extra hippocampale weefsel niet gesteld worden. Concluderend kan de aanwezigheid van GWMA een radiologische biomarker voor TLE zijn.

In **hoofdstuk 4** werd de expressie van de neuronale GABA-transporter (GAT-1) en de gliale GABA-transporter (GAT-3) onderzocht bij patiënten met slaapkwab epilepsie. De abnormale elektrische ontladingen van zenuwcellen, kenmerkend voor

epilepsie, lijken het resultaat te zijn van een disbalans tussen excitatoire en inhibitoire neurotransmissie. Er is om die reden gesuggereerd dat gamma-aminoboterzuur, de meest voorkomende inhibitoire neurotransmitter in het menselijk zenuwstelsel, een wezenlijke rol speelt bij het ontstaan en in stand houden van epileptische aanvallen. De hypothese in deze studie was dat een verminderd aantal dan wel een disfunctie van de hippocampale GABA-transporter kenmerkend is voor de sclerotische hippocampus bij patiënten met medicatie resistente slaapkwabepilepsie. De voornaamste bevindingen uit deze studie laten zien dat een regionaal (hilus) verminderde expressie van GAT-1 en een meer diffuus verminderde expressie van GAT-3 kenmerkend is voor het hippocampale weefsel van patiënten met slaapkwab epilepsie en ernstige sclerose. Aangezien zowel de heropname als de afgifte van GABA door deze transporter in de synapspleet verstoord is, leidt dit tot verschillende effecten in de interictale en ictale fase.

Om de GABA-transporter in vivo, als potentiële radiologische biomarker, te visualiseren, wordt in **hoofdstuk 5** de ontwikkeling van een nieuw radioligand, namelijk die voor de GAT-1, beschreven. Tot op heden bestaan er geen radioliganden voor in vivo beeldvorming van GATs. Een specifieke patiënten groep die profijt kan hebben van visualisatie van het GABAerge systeem zijn patiënten met medicatie resistente, MRI-negatieve slaapkwab epilepsie. Er bestaan, op moleculair niveau, sterke aanwijzingen dat patiënten met medicatie resistente slaapkwab epilepsie een verminderde hippocampale GAT expressie hebben. Moleculaire visualisatie van neurotransmitter systemen kan heel belangrijk zijn voor het begrip van het onderliggende pathofysiologisch mechanisme. Dus, de GABA-transporter, gevisualiseerd door een radioligand, in het beginstadium van slaapkwab epilepsie, kan geclassificeerd worden als radiologische biomarker. Tiagabine, een bekend antiepilepticum dat selectief aan GAT-1 bindt, werd gekozen als kandidaat radioligand. Vanuit een translationeel perspectief, zou een succesvolle labeling en visualisatie van cerebrale GATs een snelle toepassing van dit nieuwe radioligand in patiënten betekenen. In deze studie werd tiagabine primair radiochemisch gelabeld met ^{123}I , en daarna werd in vivo, in een dier experimentele studie, gekeken of dit nieuwe radioligand de bloed-hersen barrière kon passeren. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een ultra-hoge-resolutie small-animal single-photon emission computed tomography en CT. Deze studie toonde een nieuwe chemische route aan om een stabiele tiagabine radioligand voor de GAT-1 te synthetiseren. Echter, in de huidige gelabelde configuratie, passeert tiagabine de bloed-hersen barrière niet en is dus nog niet geschikt voor het visualiseren van cerebrale GABA-transporters.

Hoofdstuk 6 beschrijft het vóórkomen van twee enkel-nucleotide polymorfismen (SNPs) rs2697153 (A/G in het GAT-1 gen SLC6A1) en rs2272400 (C/T in het GAT-3

gen SLC6A11) op chromosoom 3p25.3, in een cohort van 94 patiënten met medicatie resistente slaapkwab epilepsie en 94 gezonde controles. In deze studie werd gevonden dat zowel de GAT-1 als de GAT-3 SNP significant verschillend verdeeld waren in de patiënten groep ($p < 0.05$). Het GAT-1 GG genotype werd bij 11% van de patiënten vastgesteld terwijl het bij 21% van de controles voorkwam. Het CT genotype van GAT-3 werd bij 6% van de patiënten gevonden, terwijl de controles deze variant niet hadden ($p < 0.05$). Een verdere onderverdeling van de TLE patiënten in een subgroep met (FS+; $n=24$) en zonder (FS-; $n=68$) een voorgeschiedenis van koortsconvulsies, liet zien dat de CT variant gevonden werd bij 19% van de FS+ patiënten en slechts bij 2% van FS- patiënten ($p < 0.05$). De resultaten suggereren dat de GAT-1 en GAT-3 SNPs geassocieerd zijn met TLE. De GAT-3 SNP, rs2272400, is een zogenaamde synonieme SNP. Dit betekent dat er tijdens het translatie proces geen aminozuur verandering optreedt in het eiwit eindproduct. Het is tot op heden niet duidelijk of dit polymorfisme leidt tot een ander type boodschapper RNA, een veranderde levensduur of capaciteit van het GAT-3 eiwit of dat het een biomarker is van een ander polymorfisme dat – in tegenstelling tot het hier geanalyseerde GAT-3 polymorfisme – wel inbouw van een ander aminozuur veroorzaakt. Het exacte pathofysiologische mechanisme van deze SNP in TLE met koortsconvulsies moet nog opgehelderd worden.

De algemene discussie in **hoofdstuk 7** bespreekt de rol van grijs-witte stof differentiatie stoornissen en de GABA-transporter als potentiële biomarkers voor epilepsie. Het nog niet exact kunnen localiseren van de epileptogene zone door een biomarker, is mogelijk één van de redenen van een onbevredigende postoperatieve aanvalsuitkomst. Het proces om antiepileptogene interventies te ontwikkelen zou gefaciliteerd kunnen worden door de identificatie van betrouwbare epileptogenese biomarkers. Het hoofdstuk eindigt met de beschrijving van het centrale doel en de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift.