

DISS ETH NO. 16609

**Adenosine Kinase: a key regulator of
hippocampal inhibition, seizure susceptibility,
and neuronal development**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
DENISE E. FEDELE
M.Sc., Pennsylvania State University
born 29 Sep, 1976
citizen of
The United States of America

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Hans Möhler, examiner
Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy, co-examiner

2006

Summary

Adenosine is a purine ribonucleoside that plays a neuromodulatory role as an inhibitor of brain excitability by activating adenosine A1 receptors (A1Rs). Adenosine kinase (ADK) is a key enzyme in the metabolism of adenosine and consequently serves as a regulator of extracellular adenosine available for activation of A1Rs. Since adenosine has been proposed as the brain's natural anticonvulsant, the first aim of this thesis was to determine if adenosine regulation by ADK and A1R activation directly influence an epileptic state. Genetically altered mice greatly facilitate the study of specific effects of receptors and enzymes; therefore, the kainic acid (KA) mouse model of temporal lobe epilepsy (TLE) was used for most of the experiments presented herein. A unilateral intrahippocampal injection of a small dose of KA elicits immediate status epilepticus and, approximately three weeks thereafter, chronic focal seizures develop. Here, studies on the effects of KA in mice lacking the A1R have proven the important role of the A1R in preventing status epilepticus-induced mortality and in keeping neuronal damage localized to the epileptic focus. In addition, mice with an overexpression of ADK in the brain were generated and characterized. As a consequence of the overexpression of ADK, the mice exhibited spontaneous seizures, and KA-induced seizures were exacerbated. These studies have proven that, within the context of a mouse model of TLE, adenosinergic signaling plays an important role in seizure inductive and neuroprotective mechanisms.

The above results indicate that adenosinergic signaling may provide a novel therapeutic target for seizure suppression. Since peripheral side effects preclude the use of systemic adenosine treatment, the second aim of this dissertation was to develop and evaluate stem cell mediated approaches to achieve the local administration of adenosine within the brain or at the site of the epileptic focus. Adenosine-releasing stem cells were generated and their differentiation into glial and neuronal precursor cells was characterized. Initial studies with these cells in the rat kindling model of epilepsy proved that adenosine-releasing stem cells were seizure suppressive when encapsulated and implanted into the ventricles. However, poor cell viability in the capsules necessitated further experimentation, which is presented here, in the direction of matrix-mediated introduction of cells to the host tissue or direct grafting of the cells into the hippocampus. These studies have shown that biomaterials, such as silk films, can provide a matrix to support the growth of adenosine-releasing glial precursor cells. In addition, direct grafting studies have

revealed important differences between the behavior of cells implanted into healthy tissue versus lesioned tissue which should be considered when doing further experimentation on direct grafting approaches.

Finally, since the immature brain reacts differently to seizure inductive stimuli, namely with an increased susceptibility to seizure induction but a decreased sensitivity to associated neurotoxicity, alterations in adenosinergic signaling in the immature brain may exist and explain these differences. Therefore, a developmental study on ADK was conducted to determine the role that adenosine signaling may play in these conditions. These experiments unexpectedly revealed that transient neuronal expression of ADK is important for the proper development of the brain, namely in neuronal differentiation and maturation. Future work aimed at delineating the developmental mechanisms that ADK is involved in are enticing and may provide insight into a distinct role of ADK in cellular functions as well as in seizure susceptibility and excitotoxicity.

Zusammenfassung

Adenosine ist ein Purin Ribonucleosid mit neuromodulatorischen Eigenschaften, die, über den Adenosin A1 Rezeptor (A1R) vermittelt, die Erregbarkeit des Gehirns vermindern. Adenosine kinase (ADK) ist das Schlüsselenzym des Adenosin-Metabolismus und ist daher Regulator der Menge an extrazellulärem Adenosine, welches für die Aktivierung der A1 Rezeptoren verfügbar ist. Da Adenosin auch als körpereigene antiepileptische Substanz bezeichnet wurde, bestand das erste Ziel dieser Arbeit darin, herauszufinden ob die Adenosin-Regulation durch ADK und A1R Aktivierung einen direkten Einfluss auf die Epilepsie haben. Genetisch veränderte Mäuse erleichtern dabei das Studium spezifischer Effekte von Rezeptoren und Enzymen; daher wurde für die hier beschriebenen Experimente ein Maus-Modell der Temporallappenepilepsie (TLE) verwendet: Eine unilaterale Injektion einer kleinen Dosis Kaininsäure (KA) in den Hippocampus löst unmittelbar einen Status epilepticus aus und, ungefähr drei Wochen später, kommt es zur Entwicklung chronischer fokaler Anfälle. In dieser Arbeit hat die Untersuchung KA-vermittelter Effekte in A1R defizienten Mäusen gezeigt, dass der A1R notwendig ist, um eine Status epilepticus abhängige Mortalität zu verhindern und um das Absterben von Neuronen auf den epileptischen Focus zu beschränken. Darüberhinaus wurden in dieser Arbeit Mäuse mit einer hirnspezifischen Überexpression der ADK generiert und charakterisiert. Als Konsequenz der ADK Überexpression, entwickelten diese Mäuse spontane Anfallsaktivität und KA-induzierte Anfälle wurden verstärkt. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass – zumindest innerhalb des Kontexts eines Maus-Modells der TLE – die adenosinergen Signalwege eine wichtige Rolle in den anfallsinduzierenden und neuroprotektiven Mechanismen spielen.

Obige Ergebnisse legen nahe, dass die adenosinergen Signalwege ein neues therapeutisches Prinzip für die Anfallsunterdrückung darstellen. Da periphere Nebenwirkungen die systemische Verabreichung von Adenosin ausschliessen, bestand das zweite Ziel dieser Dissertation darin, Stammzell-vermittelte Therapie-Ansätze zu entwickeln und zu evaluieren, um dadurch, eine lokale Quelle für Adenosin im Gehirn oder in der Umgebung eines epileptischen Focus zu erzeugen. Mit diesem Ziel wurden Adenosin-freisetzende embryonale Stammzellen hergestellt und deren Differenzierung in gliale und neuronale Vorläuferzellen wurde charakterisiert. Erste Anwendungen dieser Zellen im Kindling Modell der Epilepsie in der Ratte haben gezeigt, dass diese Adenosin-freisetzenden Stammzellen Anfälle

unterdrücken, wenn die Zellen in Form von verkapselten Zellimplantaten in einen Hirnventrikel transplantiert werden. Jedoch zeigten diese verkapselten Implantate ein geringes Überlebenspotential, wodurch sich die Notwendigkeit ergab, wie in dieser Arbeit beschrieben, Stammzellen entweder unter Verwendung verbesserter Matrixmaterialien oder als direkte Zellimplantate in den Hippocampus zu transplantieren. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Biomaterialien, wie z.B. Seidenfilme, eine Matrix darstellen, die das Wachstum von Adenosin-freisetzenden glialen Vorläuferzellen unterstützt. Darüberhinaus haben direkte Transplantationsstudien gezeigt, dass wichtige Unterschiede im Integrationsverhalten transplantierter Zellen in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand des Wirtsgewebes bestehen. Diese Erkenntnisse sollten in weiterführenden Transplantationsstudien berücksichtigt werden.

Da das unreife Gehirn charakterisiert ist durch (a) einer erhöhten Anfallsbereitschaft und durch (b) einer verminderten Empfindlichkeit für Neurotoxizität, ist davon auszugehen, dass die adenosinerge Neuromodulation im unreifen Gehirn verändert ist und für diese Unterschiede verantwortlich ist. Daher wurde hier die Expression der ADK im Verlaufe der neonatalen Hirnentwicklung untersucht, um herauszufinden, welche Rolle die Adenosin-vermittelten Signalwege im unreifen Hirn spielen. Diese Experimente haben unerwarteterweise gezeigt, dass eine transiente neuronale Expression der ADK, essentiell ist für eine normale Entwicklung des Gehirns, vor Allem in Hinblick auf neuronale Ausreifung und Differenzierung. Weiterführende Arbeiten, mit dem Ziel, die entwicklungspezifischen Funktionen der ADK zu untersuchen sind vielversprechend und geben wahrscheinlich Aufschluss über die Rolle der differenziellen ADK-Expression für Anfallsbereitschaft und Neuroprotektion.