

Redaktionskommission

Thomas Dorn | Zürich
 Jean-Marc Fritschy | Zürich
 Hennric Jokeit | Zürich
 Günter Krämer | Zürich (Vorsitz)
 Margitta Seeck | Genf
 Adrian M. Siegel | Zürich
 Gabriele Wohlrab | Zürich

Beirat

Fabio Baronti | Tschugg
 Paul-André Despland | Lausanne
 Giovanni B. Foletti | Lavigny
 Jean-Marc Fritschy | Zürich
 Regina Henggeler-Dimmler | Unterägeri
 Christian W. Hess | Bern
 Kazimierz Karbowski | Muri b. Bern
 Max Kaufmann | Basel
 Günter Krämer | Zürich
 Theodor Landis | Genf
 Christoph Pachlatko | Zürich
 Markus Schmutz | Basel
 Franco Vassella | Bremgarten
 Jean-Guy Villemure | Lausanne
 Markus Weissert | St. Gallen
 Heinz-Gregor Wieser | Zürich

Inhalt

Editorial	1
La plasticité des fonctions et structures synaptiques	
<i>Dominique Muller</i>	2 – 6
Epileptogenesis <i>in vitro</i>: Sprouting and Neurotrophins	
<i>R. Anne McKinney</i>	7 – 12
Circuits in a Dish: A Rodent Slice Preparation as Model for the Development of Epileptiform Activity in the Temporal Lobe	
<i>Ron Stoop</i>	13 – 20
A New Animal Model of Temporal Lobe Epilepsy	
<i>Jean-Marc Fritschy</i>	21 – 28
Adenosin-Zelltherapie der Epilepsie	
<i>Detlev Boison</i>	29 – 36
MR-Spektroskopie: Eine non-invasive Methode zur Untersuchung der neurochemischen Veränderungen im epileptischen Gehirn	
<i>Susanne G. Müller</i>	37 – 43
Liga-Mitteilungen	44 – 46
Kongresskalender	47 – 48



Allgemeines

Epileptologie veröffentlicht sowohl angeforderte als auch unaufgefordert eingereichte Manuskripte über alle Themen der Epileptologie. Es werden in der Regel nur bislang unveröffentlichte Arbeiten angenommen. Die Manuskripte oder wesentliche Teile daraus dürfen auch nicht gleichzeitig anderen Zeitschriften angeboten werden oder anderweitig bereits zur Publikation angenommen worden sein. Alle Manuskripte werden zweifach begutachtet. Von den Beiträgen werden keine Sonderdrucke erstellt, sie werden jedoch als pdf-Datei zusätzlich auf der Liga-Homepage (www.epi.ch) veröffentlicht und können von dort heruntergeladen werden.

Redaktionsanschrift

Unaufgefordert eingereichte Manuskripte (incl. Briefe an die Herausgeber) sind zu richten an:

Frau M. Becker, Redaktion Epileptologie, Schweizerische Liga gegen Epilepsie, Seefeldstr. 84, Postfach 1084, 8034 Zürich. Tel. 0041 43 488 67 79, Fax 0041 43 488 67 78, e-mail: becker@epi.ch.

Hinweise zur Manuskripterstellung

Manuskripte werden nur akzeptiert, wenn sie den folgenden Kriterien entsprechen. Nicht entsprechend abgefasste Manuskripte werden vor der Begutachtung zurückgesandt.

- **Sprache:** Neben deutsch auch englisch und französisch möglich
- **Schreibweise (deutsch):** Als Schreibweise gilt die deutsche Form mit „z“ und „k“ (also z.B. Karzinom), lateinische Fachtermini behalten aber ihre Schreibweise (also z. B. Arteria carotis).
- **Form:** Der gesamte Text, einschliesslich Literaturverzeichnis, Tabellen und Abbildungslegenden, ist folgendermassen zu formatieren:
 - DIN-A4-Papier, einseitig (1 1/2- oder 2-zeilig mit max. 30 Zeilen je Seite)
 - Literaturverweise werden gemäss der Reihenfolge, in der sie im Text vorkommen, arabisch nummeriert; im Text erscheinen die Verweiszahlen in eckigen Klammern
 - Tabellen und Abbildungen haben eine jeweils fortlaufende arabische Nummerierung
- **Reihenfolge:** 1. Titelblatt (ggf. incl. Danksagung, Förderung durch Hilfe anderer oder Drittmittelfinanzierung), 2. Zusammenfassung in Deutsch und Summary in Englisch, 3. Text, 4. Literatur, 5. Tabellen, 6. Abbildungslegenden und 7. Abbildungen:
 - Das Titelblatt enthält den vollen Titel der Arbeit (deutsch und englisch), Namen und Titel der Autoren,

die Kliniken bzw. Institutionen, an denen alle Autoren arbeiten, sowie die vollständige Adresse des federführenden Autors mit Telefon- und Faxnummer sowie e-mail.

- Zusammenfassung und englischer Abstract (mit Titel der Arbeit): Ohne Literaturzitate und Akronyme sowie unübliche Abkürzungen (maximal 250 Wörter).
- Text: Dabei bei Originalarbeiten Gliederung in Einleitung, Methode (incl. Untersuchungsmaterial, Patienten, Versuchstiere etc., ggf. auch Angabe über Einwilligung bzw. Einhaltung der Deklaration von Helsinki inkl. Votum einer Ethikkommission), Ergebnisse und Diskussion. Abkürzungen sind bei ihrem ersten Erscheinen im Text voll auszuschreiben.
- Literaturverzeichnis: Am Ende der Arbeit werden die Literaturstellen in der im Text zitierten Reihenfolge aufgeführt und nach untenstehendem Muster zitiert. Persönliche Mitteilungen, unveröffentlichte Befunde oder zur Publikation eingereichte Manuskripte werden nicht aufgenommen, sondern entsprechend im Text vermerkt. Zitierungen „im Druck“ bzw. „in press“ beziehen sich nur auf von einer Zeitschrift bereits angenommene Arbeiten (mit Angabe von Zeitschrift und – soweit bekannt – Band und Erscheinungsjahr). Das Zitieren von Arbeiten als „in Vorbereitung“ oder „in preparation“ ist nicht zulässig. Kongressmitteilungen können nur als zitierbare Abstracts oder Beitrag in Proceedings-Bänden berücksichtigt werden.
- Tabellen: Jede Tabelle steht auf einer neuen Seite und hat eine kurze erklärende Überschrift. Abkürzungen oder Zeichen sind in einer Fussnote zu erklären.
- Abbildungslegenden: Die Legende für jede Abbildung steht auf einer neuen Seite; alle Abkürzungen oder Zeichen sind darin zu erklären.
- Abbildungen: Strichzeichnungen, schattierte Zeichnungen oder Fotografien (SW oder Farbe).
- Zitierweise: Zeitschriftenartikel: Daoud AS, Batieha A, Abu-Ekteish F et al. Iron status: a possible risk factor for the first febrile seizure. *Epilepsia* 2002; 43: 740-743 (bei bis zu vier Autoren werden alle genannt; Abkürzungen der Zeitschriften nach der „List of Journals indexed in Index Medicus“); Bücher: Shorvon S. Status Epilepticus. Its Clinical Features and Treatment in Children and Adults. Cambridge: Cambridge University Press, 1994; Buchkapitel: Holthausen H, Tuxhorn I, Pieper T et al. Hemispherectomy in the treatment of neuronal migrational disorders. In: Kotagal P, Lüders HO (eds): *The Epilepsies. Etiologies and Prevention*. San Diego, London, Boston et al: Academic Press, 1999: 93-102

Was ist an die Redaktion einzureichen?

Alle Manuskripte sind inklusive Abbildungen und Tabellen in dreifacher Ausführung einzureichen. Bevorzugt wird eine elektronische Manuskripteinreichung per e-mail (Textverarbeitung: MS Word), alternativ die Zusendung von drei Ausdrucken und einer Diskette (für Abb. und Tab. ist das verwendete Programm anzugeben).



Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy

Übertragung entstehen rhythmische, epileptogene Entladungen, die nach einer gewissen Zeit spontan erhalten bleiben. Er zeigt, dass die Aufrechterhaltung der Epilepsie in seinem Präparat von funktionellen Anpassungen während der pharmakologischen Behandlung abhängig ist. Die Natur dieser Anpassungen wird auf molekularbiologischer Ebene diskutiert.

Die zwei nächsten Berichte befassen sich mit *in vivo*-Untersuchungen der Schläfenlappenepilepsie und deren medikamentösen Therapie. Prof. Jean-Marc Fritschy präsentiert ein neues Modell dieser Erkrankung, in dem die Epilepsie durch eine kleine Läsion im Hippokampus einer erwachsenen Maus verursacht wird. Mit der Zeit entwickelt sich diese Läsion weiter, bis schliesslich spontane, fokale Anfälle entstehen. Diese Anfälle lassen sich mit klassischen Antiepileptika nicht unterdrücken, und somit können die Ursachen der Therapieresistenz untersucht werden.

Das Ziel von Dr. Detlev Boison ist, die potente anti-ikonvulsive Wirkung von Adenosin (einem endogenen Botenstoff) therapeutisch bei pharmakoresistenten Epilepsien auszunutzen. Wegen gefährlicher Nebenwirkungen kann Adenosin nicht systemisch verabreicht werden. Eine direkte Applikation ins Gehirn genügt aber im Tiermodell, um evozierte Anfälle zu unterdrücken. Er erläutert, wie Zellen genetisch verändert werden können, um Adenosin langfristig freizusetzen, und diskutiert, wie die Implantation solcher Zellen ins Gehirn eine klinische Anwendung finden könnte.

Die klinische Forschung wird am Schluss erwähnt. Dr. Susanne Müller erläutert, wie die Magnetresonanz-Spektroskopie uns erlaubt, nicht-invasiv die neurochemischen Veränderungen in einem epileptischen Herd und in seiner Umgebung zu messen. Dieses Verfahren bietet vielfältige Möglichkeiten für die Diagnostik der Epilepsie, die Lokalisation des epileptischen Herdes und das Untersuchen der Wirkungen von Antiepileptika.

Diese Berichte zeigen, wie die Epilepsieforschung verschiedenste Methoden der Biomedizin einbindet. Sie mögen den Eindruck erwecken, dass die Forschung vom Alltag der Betroffenen zu weit entfernt liegt. Wir hoffen aber, dass es uns gelungen ist aufzuzeigen, wie die nötige Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen von der Erweiterung unseres Verständnisses der Epilepsie abhängig ist.

Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy

Die vorliegenden Berichte geben einen Einblick in die heutige Epilepsieforschung in der Schweiz. Ihr Leitfaden ist, dass Anfälle durch Veränderungen der Struktur oder der Funktion von neuronalen Schaltkreisen entstehen. Der Begriff „Plastizität“ beinhaltet diese Anpassungsfähigkeit des Gehirns, sowohl unter physiologischen Bedingungen (z.B. beim Lernen) wie auch unter pathophysiologischen Umständen. Weil die Epilepsien trotz zahlreicher Ursachen schliesslich zu ähnlichen Symptomen führen, wird vermutet, dass sie auf diese „Plastizitätsmechanismen“ zurückzuführen sind.

Als Einführung werden die Mechanismen der Plastizität im Bericht von Prof. Dominique Muller erläutert. Er zeigt, wie die Funktion von Synapsen (die Kontaktstellen zwischen Nervenzellen) sich nach wiederholter Stimulierung verstärken kann. Diese so genannte „Langzeit-Potenzierung“ stellt die zelluläre Basis des Gedächtnisses dar. Es gelang ihm zu zeigen, dass die synaptische Potenzierung mit strukturellen Anpassungen verbunden ist, und dass diese Plastizität unter pathologischen Umständen, wie die Ischämie, besonders ausgeprägt ist.

Dr. Anne McKinney führt diese Thematik mit einem Modell der posttraumatischen Epilepsie weiter. In ihrem Modell löst eine Läsion in einer Gewebescheibe des Hippokampus in Kultur das Spriessen von neu gebildeten Fasern aus und führt schliesslich zur Entstehung von epileptiformen Aktivitäten. Sie konnte nachweisen, dass Neurotrophine (Moleküle, die das Wachstum von Nervenfasern während der Entwicklung regulieren) das Spriessen von neuen Fasern beeinflussen, und postuliert, dass diese Moleküle infolge der Läsion „re-aktiviert“ werden. Die Hemmung der Neurotrophine stellt damit eine potenzielle therapeutische Richtung gegen die Entstehung einer posttraumatischen Epilepsie dar.

Dr. Ron Stoop demonstriert in einem eleganten *in vitro*-Präparat, wie die epileptogene Aktivität irreversible funktionelle Veränderungen in bestimmten neuronalen Schaltkreisen des Schläfenlappens verursachen kann. Durch Blockade der hemmenden synaptischen

Dominique Muller, Département de Neurosciences fondamentales, Centre Médical Universitaire, Genève

Résumé

De nombreux aspects du fonctionnement de notre système nerveux dépendent des capacités de plasticité exprimées au niveau des contacts synaptiques excitateurs glutamatergiques. Jusqu'à récemment, ce terme de plasticité était associé principalement à une propriété appelée potentialisation à long terme. Cette propriété, caractérisée par une augmentation durable de la transmission synaptique générée par une brève période d'activité intense, représente l'une des bases cellulaires des mécanismes d'apprentissage et de mémoire. L'étude des propriétés de cette forme de plasticité a mis en évidence à la fois un aspect extrêmement dynamique de l'expression des récepteurs excitateurs à la synapse et l'apparition de modifications morphologiques au niveau des contacts synaptiques. Sous l'influence de l'activité neuronale, des épines dendritiques et des contacts synaptiques nouveaux sont formés contribuant ainsi à remodeler l'architecture des réseaux neuronaux. La découverte de cette nouvelle forme de plasticité morphologique a modifié notre compréhension des capacités d'adaptation des circuits corticaux. Ces mécanismes contribuent vraisemblablement à des aspects fonctionnels importants comme la plasticité des cartes corticales ou le développement de circuits aberrants lors de crises épileptiques.

Plasticity of Synaptic Functions and Structures

Many aspects of the functioning of our brain depend upon properties of plasticity expressed by glutamatergic excitatory synapses. Until recently, synaptic plasticity was essentially associated with a property referred to as long-term potentiation. This property, characterized by an increase in synaptic transmission produced by a brief period of high frequency stimulation, has been shown to underlie learning and memory mechanisms. Studies of the properties underlying this form of plasticity have revealed both the highly dynamic nature of synaptic receptor expression at the synapse and the existence of morphological changes taking place at the level of synaptic contacts. Under the influence of neuronal activity, new dendritic spines and synaptic connections are formed, contributing in this way to remodel the architecture of neuronal networks.

The discovery of this new form of morphological plasticity has modified our understanding of the capacity of adaptation of cortical circuits. These new mecha-

nisms probably contribute to important functional aspects such as cortical map plasticity and/or formation of aberrant synaptic connections which occur in epileptic tissue.

Epileptologie 2004; 21: 2 – 6

*Soutien financier: subside 31-56852.99 du Fonds National de la Recherche Scientifique

Introduction

Il y a plus d'une trentaine d'année, T. Bliss et T. Lomo découvraient que l'activation de cellules nerveuses par des trains de stimulation à haute fréquence modifie de manière durable la transmission synaptique excitatrice^[1,2]. Cette propriété, appelée potentialisation à long terme (ou LTP selon l'abréviation anglaise) a suscité beaucoup d'intérêt et est considérée comme l'un des principaux mécanismes physiologiques responsables de l'apprentissage et la mémoire. Il faut dire que cette propriété correspond exactement à ce que l'on attendrait d'un mécanisme biologique pour permettre le traitement et le stockage d'information. Elle est générée en très peu de temps (quelques secondes), elle est stable et durable une fois induite (jusqu'à plusieurs semaines dans des expériences faites chez l'animal vivant), elle est produite par des modes d'activation qui sont parfaitement physiologiques et reproduisent la décharge de neurones observée aussi bien chez l'animal que l'être humain. De plus, dans de nombreux modèles comportementaux, elle corrèle parfaitement avec la capacité d'apprentissage. Cela a particulièrement été mis en évidence grâce à la création de modèles d'animaux transgéniques, chez lesquels l'élimination ou au contraire le renforcement de la LTP empêche ou améliore l'apprentissage^[3]. La LTP est donc actuellement considéré comme le modèle cellulaire responsable du traitement de l'information par un réseau de neurones.

Une question importante a dès lors été de comprendre les mécanismes responsables de cette forme de plasticité. D'importants progrès réalisés ces dernières années ont mis en évidence un aspect additionnel de plasticité qui était auparavant insoupçonné. Il a en effet été découvert que la potentialisation à long terme s'accompagne non seulement d'un changement du fonctionnement des synapses, mais également d'une plasticité morphologique tout à fait remarquable qui

ouvrent la porte vers une nouvelle conception du rôle et de l'importance des propriétés de plasticité synaptique^[4,5].

Mécanismes responsables de la potentialisation à long terme

Une question clé concernant la potentialisation à long terme a été de comprendre si l'effet de potentialisation était de nature pré- ou post-synaptique, ou, en d'autres termes, si c'est la cellule émettrice qui devient plus performante ou la cellule cible plus sensible. Un élément de réponse important a été fourni par la découverte du rôle primordial joué par les récepteurs au glutamate de type NMDA et les flux de Ca^{2+} qui y sont

associés^[2]. Les récepteurs NMDA sont localisés au niveau de la cellule post-synaptique et leur activation s'est révélée nécessaire et même suffisante pour produire le phénomène de potentialisation. C'est donc bien la cellule post-synaptique qui initie le mécanisme. L'étape suivante a consisté à identifier les différentes cascades de signalisation intracellulaires activées par les ions Ca^{2+} et responsables du changement de la fonction synaptique. Parmi les nombreuses possibilités, les protéines kinases et plus particulièrement la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (CaMKII) se sont révélées comme des candidats intéressants^[6]. Cet enzyme est présent en grandes concentrations dans les synapses excitatrices et c'est une des protéines les plus abondantes des densités post-synaptiques, ces structures membranaires spécialisées qui

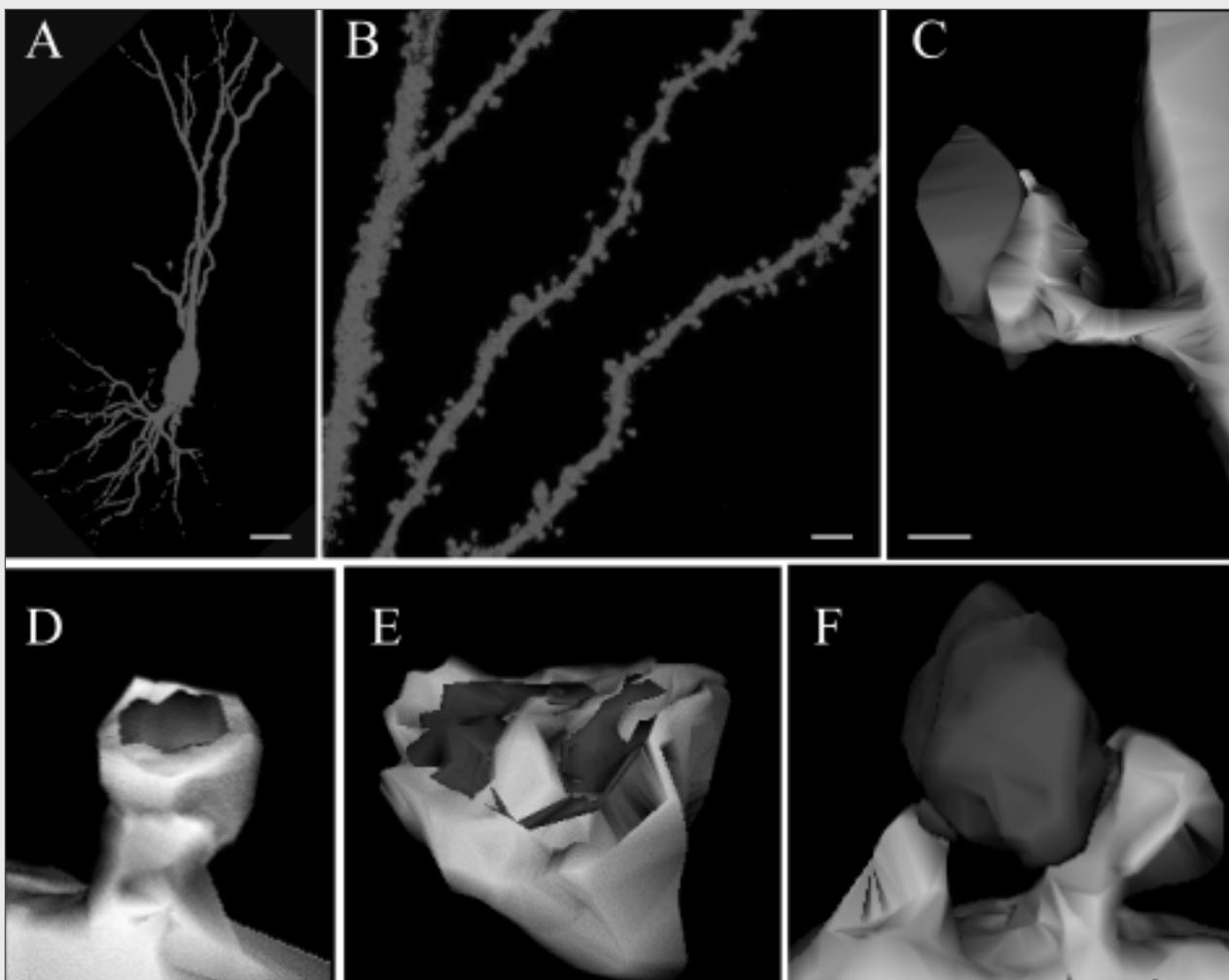


Figure 1: Organisation morphologique des synapses glutamatergiques excitatrices. A. Illustration d'une cellule pyramidale du cortex de l'hippocampe injectée avec une substance fluorescente (bar: 20 μ m). B. Agrandissement des arborisations dendritiques révélant la présence de nombreuses épines dendritiques. C. Reconstruction en trois dimensions d'un contact synaptique excitateur. La structure claire représente l'épine dendritique post-synaptique et la structure rouge la terminaison nerveuse. D. Reconstruction en trois dimensions d'une épine dendritique simple illustrant la disposition d'une densité post-synaptique (en rouge) contenant les récepteurs. E. Reconstruction en trois dimensions d'une épine dendritique de type perforée illustrant la présence de deux zones distinctes de transmission (rouge). F. Reconstruction tridimensionnelle d'une synapse multiple formée d'une terminaison nerveuse (rouge) contactant deux épines dendritiques sur le même neurone (bars: 0,5 μ m).

contiennent les récepteurs synaptiques (**figure 1**). La CaMKII est aussi particulière, car elle peut se phosphoryler elle-même et de cette manière se maintenir active durablement [6]. Elle fonctionne donc comme un « switch » moléculaire. Lorsqu'elle est activée, la CaMKII phosphoryle divers substrats dont les récepteurs au glutamate de type AMPA, modifiant leurs propriétés de manière à amplifier la transmission synaptique [7]. Mais elle pourrait également jouer un rôle important en modulant les mécanismes d'expression des récepteurs à la membrane synaptique et notamment des récepteurs de type AMPA.

Cette conclusion est basée notamment sur la découverte de l'existence de synapses silencieuses [8,9]. Ces synapses ont la particularité d'exprimer des récepteurs au glutamate de type NMDA, mais pas de type AMPA. Elles sont donc silencieuses dans des conditions d'activité habituelle, car les récepteurs NMDA sont alors non fonctionnels. Par contre, si la cellule est artificiellement dépolarisée ou activée par des stimulations à haute fréquence, les récepteurs NMDA deviennent fonctionnels et une réponse synaptique peut alors être enregistrée. Or, si l'on stimule des synapses silencieuses, dépourvues de récepteurs AMPA, de manière à induire la potentialisation à long terme, ces synapses se mettent brusquement à exprimer des courants de type AMPA. L'explication la plus vraisemblable de cette observation est donc que de nouveaux récepteurs ont été exprimés à ces synapses ou que leurs propriétés aient été modifiées. Des expériences réalisées soit en modifiant l'expression de sous-unités du récepteur AMPA, soit en mesurant les flux ioniques à travers le canal associés au récepteur, indiquent que ces deux hypothèses sont probablement correctes et donc que l'effet de potentialisation serait dû à la fois à des modifications de l'expression de récepteurs AMPA et des changements de leurs propriétés de conduction [4,10]. Un mérite important de ces études a notamment été de démontrer la nature extrêmement dynamique des mécanismes régulant l'insertion et le recyclage des récepteurs synaptiques [4,10].

Propriétés dynamiques des épines dendritiques

En parallèle à ces travaux, de nombreuses études récentes, notamment à l'aide de techniques de microscopie confocale, ont mis en évidence les propriétés de plasticité morphologiques qui caractérisent les synapses excitatrices. Lorsque l'on observe en continu des épines dendritiques sur des neurones vivants maintenus en cultures dissociées, on détecte clairement des modifications de la forme de ces épines [11]. Elles semblent osciller à une échelle de temps de quelques secondes. Ces mouvements peuvent être bloqués par des substances qui interagissent avec la polymérisation de l'actine et ils sont sensibles à de très faibles concentrations de glutamate. D'autre part, les composants de la synap-

se semblent également très dynamiques. Les zones de récepteurs synaptiques, appelées densités post-synaptiques, peuvent se former ou disparaître d'une manière très rapide en l'espace de quelques minutes [12]. Ces observations ont donc renforcé l'idée qu'une plasticité structurelle, morphologique pourrait être associée à la plasticité fonctionnelle.

Imagerie confocale des épines dendritiques pendant la LTP

Le développement récent des techniques d'imagerie confocale 2-photons permettant de visualiser des neurones vivants sans altérations de leur survie a amené d'importants progrès. Cela a permis d'observer que des paramètres comme l'activité neuronale ou les flux de calcium pouvaient affecter la formation et la morphologie des épines dendritiques [13]. De plus, l'induction de la LTP à ces synapses, entraîne en 10-15 minutes un phénomène de croissance de filopodes dendritiques [14] (**figure 2A, B**). Ces filopodes représentent vraisemblablement des précurseurs de contacts synaptiques, puisque, après une phase d'élongation, ils se rétractent habituellement pour former une nouvelle épine dendritique qui exprime alors une zone de récepteurs synaptiques. La croissance de ces filopodes dépend tout comme la LTP de l'activation des récepteurs NMDA ainsi que de flux calciques. Ils conduisent donc probablement à la création de nouveaux contacts synaptiques. Cette possibilité est également confirmée par l'observation que l'activité neuronale peut aussi entraîner directement la formation de nouvelles épines dendritiques [15] (**figure 2C**). Ce mécanisme est cependant un peu plus tardif, puisque les nouvelles épines apparaissent en général environ 30-60 minutes après la stimulation synaptique. Ce processus de formation d'épines est aussi dépendant de l'activation des récepteurs NMDA et requiert également des flux de calcium dans la cellule post-synaptique. Il apparaît donc que l'activité neuronale qui induit le phénomène de potentialisation à long terme s'accompagne également d'un mécanisme de synaptogenèse.

Caractéristiques morphologiques des synapses induites par l'activité neuronale

L'étude des caractéristiques morphologiques des synapses activées lors de l'induction de la potentialisation à long terme ne peut être effectuée avec précision qu'à l'aide d'approches en microscopie électronique. Une difficulté importante avec cette technique est de pouvoir reconnaître les synapses activées. Pour résoudre ce problème, nous avons développé une technique de marquage du calcium qui nous a permis d'identifier au sein d'un réseau synaptique complexe les synapses activées par un protocole de stimulation susceptible

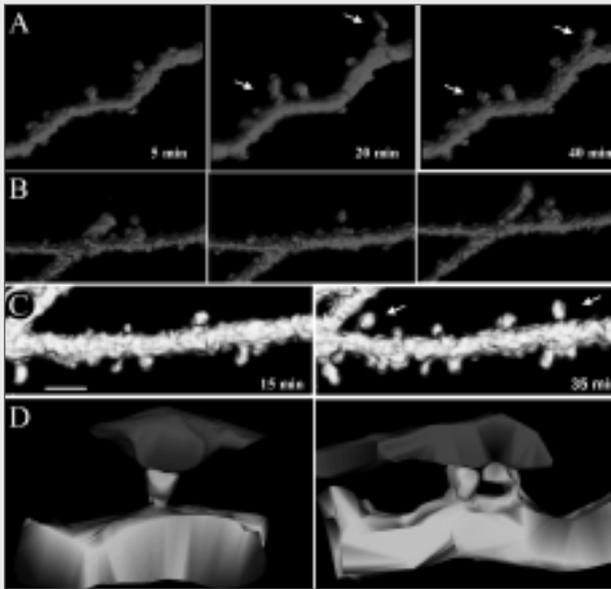


Figure 2: Plasticité morphologique de synapses excitatrices.
A. Séquence d'images prises en microscopie confocale illustrant la croissance de deux filopodes (flèches) suite à l'application d'une stimulation. **B.** Autre exemple de croissance de filopode observé suite à l'application d'une brève ischémie. **C.** Formation de deux nouvelles épines dendritiques induites par un protocole d'ischémie brève (bar: 5 µm).

d'induire la potentialisation à long terme. En effet, dans cette condition de stimulation, les récepteurs NMDA deviennent fonctionnels et du calcium s'accumule dans l'épine dendritique postsynaptique, calcium qui peut ensuite être révélé par un marquage spécifique. Cette approche nous a permis d'analyser de manière sélective les modifications ultrastructurales associées à l'induction de la LTP [16]. Ces études ont révélé deux phénomènes intéressants : la formation d'épines dendritiques caractérisées par la présence de deux zones de récepteurs aux neurotransmetteurs (ces synapses, appelées perforées, sont donc vraisemblablement plus efficaces ; **figure 1E**) et la création de synapses multiples où une terminaison nerveuse contacte deux épines dendritiques différentes (**figure 1F**).

L'apparition de synapses perforées en relation avec le développement ou la plasticité est un phénomène bien établi. Ces synapses peuvent être observées entre 10 et 30 minutes après la stimulation et leur formation n'est probablement que passagère, traduisant une réorganisation des zones de transmission. Ces synapses perforées sont intéressantes car elles ont en général une morphologie de type champignon, de relativement grande taille, elles expriment des zones de récepteurs très étendues, ce qui pourrait traduire l'expression à ces synapses de nouveaux récepteurs. Comme ces récepteurs sont organisés sur deux sites distincts, il est probable que la neurotransmission a lieu au niveau de ces deux sites, amplifiant ainsi la capacité de fonctionnement de ces synapses. Il semblerait donc vraisemblable que ces synapses perforées reflètent un processus de

transformation induit par l'activité dans le but d'augmenter l'efficacité de la signalisation [17]. Il est intéressant de noter, qu'au moment où ces synapses perforées sont générées, la microscopie confocale révèle l'apparition d'épines dendritiques de grande taille et la formation à la membrane de nouvelles zones de récepteurs. La formation de synapses perforées pourrait donc traduire un mécanisme de recyclage et expression de nouveaux récepteurs à la membrane synaptique.

Les synapses multiples induites par l'induction de la LTP sont également très intéressantes, puisqu'elles suggèrent clairement un processus de synaptogenèse. Des changements de synapses multiples ont été décrits également *in vivo*, suite à un paradigme d'apprentissage, ainsi qu'après une brève ischémie, qui reproduit de nombreux phénomènes liés à la LTP. De manière surprenante, nous avons découvert que les synapses multiples induites par l'activité étaient en majorité constituées d'une terminaison nerveuse contactée par deux épines dendritiques provenant du même neurone, ce qui suggère très clairement un processus de multiplication des contacts synaptiques entre cellules activées [17] (**figure 1F**). D'autre part, il se trouve que ces synapses multiples apparaissent exactement au même moment où la microscopie confocale observe la formation de nouvelles épines dendritiques (**figure 2C**). Ces expériences suggèrent donc fortement que les synapses multiples représentent bien le corrélat morphologique de la formation de nouvelles épines dendritiques et donc que ces nouvelles épines sont bien la traduction de mécanismes de synaptogenèse.

Rôles fonctionnels de la plasticité morphologique

Si la potentialisation à long terme est vraisemblablement le substrat physiologique des mécanismes d'apprentissage et de mémoire, le rôle de la plasticité morphologique reste plus obscur. Les deux formes de plasticité sont incontestablement liées et sont toutes deux induites par l'activité neuronale et l'activation des récepteurs NMDA. La potentialisation est cependant un mécanisme généré rapidement, alors que la croissance de filopode, la formation de nouvelles épines dendritiques ou de synapses multiples sont des événements plus tardifs survenant après 10-30 minutes. Une hypothèse intéressante est l'idée que la plasticité morphologique représenterait un mécanisme à long terme capable d'assurer la stabilité ou la durabilité du changement fonctionnel [4]. Cette hypothèse nécessiterait cependant que la plasticité morphologique survienne aux mêmes synapses que celles qui expriment la potentialisation, ce qui n'est pas encore démontré. Alternativement, il se pourrait également que les deux formes de plasticité, fonctionnelle et morphologique, correspondent à des mécanismes indépendants, contribuant chacun à leur manière à remodeler les circuits synaptiques [18]. C'est vraisemblablement le cas pour la potentialisation à

long terme, mais la question est ouverte en ce qui concerne la plasticité morphologique. Cela dépend clairement du nombre de contacts synaptiques ainsi remodelés. Des estimations réalisées dans le cortex somatosensoriel du rat suggèrent que l'activité neuronale pourrait contribuer à renouveler environ 10% des épines dendritiques en l'espace de quelques jours^[19]. Cela représente donc un mécanisme appréciable susceptible de jouer un rôle non négligeable dans la réorganisation des circuits corticaux. L'importance comportementale de cette plasticité morphologique reste cependant encore à démontrer. Il n'est pas impossible néanmoins qu'elle contribue substantiellement à la plasticité des cartes corticales mise en évidence dans de nombreux modèles d'apprentissages^[18] ou qu'elle participe aux réorganisations pathologiques mises en jeu lors de crises d'épilepsie.

Conclusion

Une des clés du fonctionnement cérébral repose sur la capacité des circuits neuronaux à modifier les propriétés de la transmission d'information au niveau de leurs contacts synaptiques. Cette fonction est assumée par les propriétés de plasticité exprimées par les synapses excitatrices. Jusqu'à récemment, la potentialisation à long terme était considérée comme le mécanisme principal jouant ce rôle. Cette propriété, induite par des rythmes d'activité bien particuliers, est vraisemblablement due à des mécanismes modifiant l'expression ou le fonctionnement des récepteurs au glutamate de type AMPA exprimés dans les zones synaptiques. Ces modifications de récepteurs entraînent vraisemblablement des changements morphologiques qui pourraient se traduire par l'apparition de synapses perforées, caractérisées par de multiples zones de transmission du signal synaptique. Cependant, les mêmes modes d'activité qui entraînent l'induction de la potentialisation à long terme s'accompagnent également d'un phénomène de synaptogenèse et d'une réorganisation morphologique des circuits synaptiques. Il est vraisemblable que ces deux mécanismes contribuent de manière importante à de nombreux aspects du fonctionnement cérébral, y compris à des aspects neuro-pathologiques.

Références

1. Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (London)* 1973; 232: 331-356
2. Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* 1999; 285: 1870-1874
3. Tang YP, Shimizu E, Dube GR et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999; 401: 63-69
4. Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 2000;

3: 545-550

5. Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1071-1089
6. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CAMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 175-190
7. Barria A, Muller D, Derkach V et al. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 1997; 276: 2042-2045
8. Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 1995; 15: 427-434
9. Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 1995; 375: 400-404
10. Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 103-126
11. Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 2001; 290: 754-758
12. Marrs GS, Green SH, Dailey ME. Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1006-1013
13. Segal I, Korkotian I, Murphy DD. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends Neurosci* 2000; 23: 53-57
14. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 1999; 283: 1923-1927
15. Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 1999; 399: 66-70
16. Buchs P-A, Muller D. LTP induction is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1996; 96: 8040-8045
17. Toni N, Buchs PA, Nikonenko I et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 1999; 402: 421-425
18. Mel BW. Have we been hebbing down the wrong path? *Neuron* 2002; 34: 175-177
19. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GK et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 2003; 420: 788-794

Correspondance à:

Prof. Dominique Muller
 Département de Neurosciences
 fondamentales, CMU
 CH 1211 Genève 4
 Tél. 0041 22 702 54 34
 Fax 0041 22 702 54 52
 Dominique.Muller@medecine.unige.ch

R. Anne McKinney, Brain Research Institute,
University of Zurich

Summary

Epilepsy is one of the most common neurological conditions with an estimated one in 20 people experiencing epileptic seizures within their lifetime. Normally in the brain there is a delicate balance between excitation and inhibition among the billions of neurons in the nervous system and action potential discharge of individual cells is usually not synchronized. A disturbance of this equilibrium is thought to be critical in the development of epileptic seizures and is common for all epilepsies. Since only some of the patients suffering from epileptic seizures can be effectively helped by anticonvulsants treatment, it is of considerable interest to better understand the complex sequence of events leading to epileptic discharge in order to find new and better therapeutic approaches. I am particularly interested in the recurring seizures that are a common consequence of traumatic brain injury. In order to investigate this phenomenon we have developed an *in vitro* model for post-traumatic epilepsy. To simulate brain injury we transected morphologically stable CA3 pyramidal cell axons in hippocampal slice cultures. The lesioned cultures exhibited an increase in excitability. We demonstrated that axon collaterals are newly sprouted by CA3 pyramidal cells as a response to axonal injury and suggest this underlies the development of posttraumatic epilepsy. We are currently trying to identify the factor(s) that are activated by injury and that induce axonal sprouting in the hope that interrupting this process will prevent the development of hyperexcitability in lesioned hippocampal slice cultures and, ultimately, the occurrence of human posttraumatic epilepsy.

Epileptogenese *in vitro*: Regeneration von Nervenfasern und Neurotrophine

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, wobei schätzungsweise 5% der Bevölkerung im Verlauf ihres Lebens epileptische Anfälle bekommen können. Zwischen den Milliarden von Neuronen im Gehirn besteht normalerweise ein komplexes Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung, und die elektrische Entladung einzelner Zellen ist normalerweise nicht synchronisiert. Es wird angenommen, dass eine Störung dieses Gleichgewichts eine kritische Komponente in der Entstehung von epileptischen Anfällen und allen Epilepsien gemein ist. Da einem grossen Anteil der Epilepsie-Patienten mit den gegenwärtig verfügbaren antiepileptischen Medikamenten nicht effektiv geholfen werden kann, ist es von besonderem In-

teresse, die komplexe Folge von Ereignissen, die zu einer epileptischen Entladung führen, besser zu verstehen. Dies ist eine Voraussetzung, um neue und bessere therapeutische Ansätze zu finden. Mich interessieren im Besonderen die wiederkehrenden Anfälle, die als eine häufige Folge von traumatischen Hirnverletzungen auftreten können. Zur Untersuchung dieses Phänomens haben wir ein *in vitro*-Modell für posttraumatische Epilepsie entwickelt. Zur Simulation einer Hirnverletzung wurden in Kulturen von Hippokampus-Schnitten die morphologisch erkennbaren stabilen CA3-Pyramidenzell-Axone durchtrennt. Dieser Eingriff führte zur Ausbildung neuer CA3-Nervenfasern und einer Zunahme der Erregbarkeit. Wir konnten zeigen, dass diese Axone von Pyramidenzellen neu gebildet wurden und zwar als Antwort auf die axonale Läsion, und vermuten, dass dies ein Grund für die Entstehung der posttraumatischen Epilepsie ist. Zur Zeit versuchen wir, die Faktoren zu identifizieren, die durch die Verletzung aktiviert werden und das axonale Wachstum auslösen, in der Hoffnung, dass eine Unterbrechung dieses Prozesses die Entwicklung der Übererregbarkeit in läsierte Schnittkulturen des Hippokampus und letztendlich die Entstehung der humanen posttraumatischen Epilepsie verhindert.

Epileptogenèse *in vitro*: pousse neuritique et neurotrophines

L'épilepsie est le trouble neurologique le plus répandu, touchant environ une personne sur 20 au cours de sa vie. Dans des conditions normales, il existe un équilibre entre l'excitation et l'inhibition des milliards de neurones du système nerveux central, et les décharges de potentiels d'actions ne sont habituellement pas synchronisées. Une perturbation de cet équilibre est susceptible d'induire des crises d'épilepsie. Seule une fraction des patients développant des crises d'épilepsie peuvent être efficacement traités au moyen d'anticonvulsifs, il est donc essentiel d'améliorer notre compréhension des événements complexes dont l'épilepsie résulte, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Je m'intéresse en particulier aux crises récurrentes, conséquence fréquente de lésions cérébrales d'origine traumatique.

Pour étudier ce phénomène, nous avons développé un modèle *in vitro* d'épilepsie post traumatique en simulant la lésion cérébrale par transection des axones de neurones pyramidaux de la région CA3 dans des cultures organotypiques d'hippocampe. Cette lésion induit la formation de nouvelles collatérales des axones

des neurones pyramidaux de CA3, et augmente l'excitabilité des neurones de la culture.

Nous avons démontré que ces nouvelles collatérales bourgeonnent des cellules pyramidales en réponse à la lésion des axones, suggérant que ce mécanisme soit à l'origine du développement de l'épilepsie posttraumatique.

Nous essayons actuellement d'identifier les facteurs activés lors de lésions et pouvant induire le bourgeonnement axonal. Interférer avec ce mécanisme pourrait prévenir le développement de l'hyperexcitabilité dans les cultures organotypiques d'hippocampe, et à terme, prévenir l'apparition d'épilepsie posttraumatique chez le patient humain.

Epileptologie 2004; 21: 7 – 12

Introduction

A relatively common type of epilepsy occurring as a consequence of acute damage to the brain is posttraumatic epilepsy. The severity of the head injury, particularly the occurrence of dural penetration, is correlated with the likelihood of developing posttraumatic epilepsy. Seizures can occur with various delays after the head trauma and different mechanisms may underlie the genesis of these different phases. Although a seizure may occur within the first hours or weeks after injury, epilepsy typically begins from 1 week to 3 years after the trauma. Unfortunately at present, little is known about the mechanisms underlying the generation of posttraumatic epilepsy.

The most probable injuries leading to epileptic seizures are hemiplegia, dural penetration, missile wounds or intracerebral hematomas. These injuries are more frequent in young adults and military personnel. Brain injury not only consists of mechanical damage but is also associated with neurochemical changes which facilitate the injury process and may contribute to generation of seizures. Liberated ions from hemoglobin of the blood can lead to the formation of free radicals disrupting membranes, subcellular organelles and normal flux of calcium, sodium and potassium. This leads to a progressive depolarization of the membrane, excessive glutamate release and subsequent opening of voltage-dependent calcium channels. The elevated intracellular calcium concentration then causes the release of even more glutamate thereby sustaining the increase in neuronal excitation. In addition, a reduction of synaptic inhibition by γ -aminobutyric acid (GABA) in cortical structures leads to the release of powerful recurrent excitation and the generation of synchronous epileptiform discharge in numerous experimental models of epilepsy^[1,2]. Decreases in GABA immunoreactivity have also been reported following cortical injury^[3].

Alternatively, Prince and colleagues^[4,5] have demonstrated the delayed development of epileptiform discharge after a form of neuronal injury, produced by undercutting a portion of neocortex, which is maintained in acutely prepared brain slices containing the lesion. It was suspected that a reorganization in excitatory and/or inhibitory synaptic circuits occur in such injured tissue, leading to the generation of posttraumatic epilepsy. Nonetheless it remained to be shown whether new axon collaterals are generated *de novo* or the existing axons become modified after injury. It was also not known whether the new axons are generated by cells whose axons are injured or by uninjured cells in response to the availability of vacant synaptic territory.

We have created an *in vitro* model to investigate what changes can take place slowly in the brain as a result of the insult, yet remain for the life of the patient, in order to give rise to epilepsy. As the situation is too complicated to analyze in a patient or in animal experiments, we were successful in developing a system in which we can simulate an injured brain developing post-traumatic epilepsy, using brain tissue in a test-tube. In order to answer these problems we produced axonal injury in an *in vitro* system of slices of rat hippocampus cultures and investigated possible mechanisms involved in axonal reorganization. From this model we have been able to identify the causes of posttraumatic epilepsy, a question, which has awaited an answer for many years. Currently we are investigating the role of neurotrophins in axonal sprouting after brain injury. Neurotrophins are a subfamily of neurotrophic factors, which are small soluble peptides that play crucial roles in inducing and supporting normal development and maintenance of neurons. The best-characterized neurotrophin is nerve growth factor. Other members of this family are called "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF), NT-3, and NT-4/5. They all act by binding receptors on the surface of cells that act by phosphorylating target proteins. These receptors are called Trk (the abbreviation of "Tyrosine kinase receptor"). TrkA is the receptor for nerve growth factor, TrkB the receptor for BDNF and NT-4/5. Several neurotrophins, in particular BDNF, have been shown to be expressed after experimentally induced epileptic seizures^[6,7]. It may therefore be that an increase in neurotrophin secretion in response to injury might trigger axonal sprouting.

Methods

Posttraumatic epilepsy model

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from six-day-old rat pups and maintained in culture for 14 days before starting the experiments. During this time cells will differentiate and form an extensive network of synaptic connections^[8,9]. Lesions were made of the so-called Schaffer collateral axons between

area CA3 and CA1 and changes in both axonal sprouting and excitability were assessed at different time points post-lesion.

During axonal sprouting and regeneration, a number of genes typically expressed during development become reactivated, such as growth-associated protein GAP-43^[10]. GAP-43 is a nervous system specific protein that is highly expressed in axons during development and regeneration^[11,12,13]. During the first 2 weeks of development high levels of the protein are expressed in the cell body and immediately transported into the axon and growth cones. As soon as the neurons mature, GAP-43 expression is reduced^[14,15]. At later stages, GAP-43 reappears in axons that regenerate after a lesion. GAP-43 thus serves as an excellent marker with which to monitor axotomy-induced neuronal regeneration and rearrangement of the mature CNS. In the present study, GAP-43 immunohistochemistry was employed to visualize regenerating axons in our slice cultures^[16] after lesioning the Schaffer collaterals. In addition, the morphological analysis was correlated with a functional alteration induced by the lesion: cells were recorded electrophysiologically, using a protocol facilitating the distinction of excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) and inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs). Pairs of monosynaptically connected CA3 pyramidal neurons were recorded and identified as previously described^[17].

Neurotrophin involvement

After 14 days *in vitro* the cultures were lesioned and then chronically treated with antibodies (200 ng/ml) against TrkB, the receptor for BDNF and NT-4/5, to block their function for 7 or 14 days in order to test whether reactive axonal sprouting can be prevented. Unlesioned sister cultures received the TrkB blocking antibody to control for the effects of the antibody. The cultures were then analyzed for axonal sprouting by GAP-43 immunohistochemistry. In the future electrophysiological analysis will also be performed to see if there is an increase of electrical activity.

Results

Three to 7 days after the Schaffer collateral lesions, numerous short immunopositive axons and growth cones were evident within area CA3. However by 14 days post-lesion there was a dramatic increase in both the number and length of immunopositive GAP-43 axons within area CA3 but no GAP-43 upregulation was detected in the CA1 region. Some immunoreactive axons were visible crossing the lesion into area CA1. In contrast, by 21 days after the lesion, GAP-43 immunopositive axons were no longer visible. We can conclude from this finding that new axon branches were created by the injured CA3 pyramidal cells within 3 days of the

lesion. These axons then ramified within area CA3 and became mature by 21 days after the lesion, as determined by the lack of staining for GAP-43 at this stage. The functional consequences of these morphological changes were examined with electrophysiological recordings from CA3 pyramidal cells. The frequency of spontaneous synaptic potentials in the control cultures was low (<10Hz) compared to 15Hz in 2-week post-lesion cultures. No decrease in the strength of synaptic inhibition was apparent in lesioned cultures. As there was an increase in the amount of axonal sprouting in area CA3, we could expect an increase in the probability that one CA3 cell will excite neighboring cells. Simultaneous recordings from pairs of CA3 cells were used to test this hypothesis. Normally, as tested in control cultures, the probability that any CA3 cell excites another CA3 cell is about 56% but this was significantly increased to 83% of cell pairs in cultures in which the Schaffer collateral pathway had been lesioned for 14 days. Epileptiform burst discharges could be evoked in several cultures examined 14 days post-lesion but in none of the sister control cultures. Although many of the cultures were not spontaneously epileptic, we investigated if they were more epilepsy-prone by applying a low concentration (0.1 μ M) of bicuculline methochloride, a GABA_A receptor antagonist. This treatment led to the generation of spontaneous and evoked epileptiform burst discharges in lesioned cultures. Application of the same concentration of bicuculline to control cultures did not induce epileptiform discharge.

Neurotrophin involvement

Addition of specific receptor binding antibodies to the receptor of the neurotrophins BDNF and NT-4/5, i.e., TrkB antibodies for 14 days to unlesioned cultures did not lead to the formation of GAP-43 immunopositive fibers. However GAP-43 fibers were evident in lesioned cultures that were not treated with TrkB antibodies, showing that the GAP-43 immunohistochemistry was working. Interestingly, addition of the TrkB antibodies to the lesioned cultures for 14 days prevented the upregulation of GAP-43 immunopositive fibers which could be seen in sister cultures which were lesioned but untreated during the 2 week period. This suggests that activation of the TrkB receptor is necessary for the upregulation of GAP-43 and axonal reorganization after brain injury.

Discussion

Lesion-induced axonal sprouting

We have successfully produced an *in vitro* model for posttraumatic epilepsy. We have demonstrated that

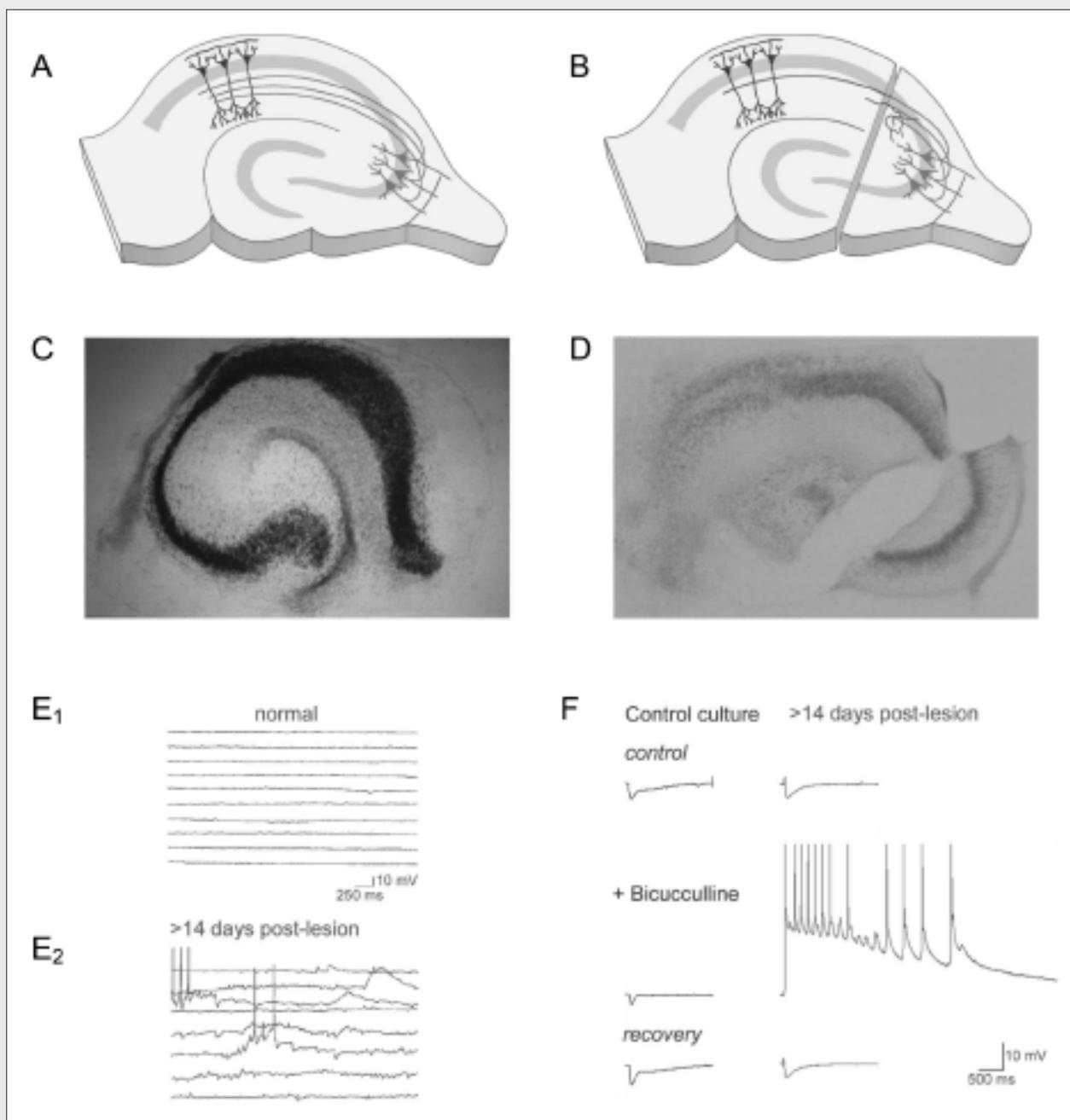


Figure 1: Slices of hippocampus (A, C) were used, as this is the area of the brain in which the synchronized electrical activity in epilepsy often originates. To simulate a brain injury we cut the nerve fibers with a scalpel (B, D). C and D show Nissl stained (revealing RNA within the cell bodies) hippocampal cultures *in vitro* for 14 days. CA3 pyramidal cells are shown in green, with their axons, the Schaffer collaterals innervating CA1 pyramidal cells (blue). The lesion of the Schaffer collaterals after the cut led into axonal sprouting in CA3 (red), but not to the replacement of the Schaffer collaterals. To determine whether this axonal sprouting was resulting in increased excitation and epileptic discharges in CA3, nerve cells in the cultures were tested after varying periods of time using electrophysiology (E). Cultures exhibited an increase in excitation two weeks after the injury (E₂). When inhibition was slightly reduced by chemical means (bicuculline), which had no effect on unlesioned cultures, all cultures with the injury had epileptic discharge (F).

new axon collaterals are generated by CA3 pyramidal cells at 7 and 14 days after the lesion of the Schaffer collateral pathway. These axons were GAP-43 immunopositive permitting us to state that they are indeed newly regenerated axons. As axons stained for GAP-43 were only visible in area CA3 and not in area CA1, this observation strongly suggests that the cells do not

sprout new axonal branches to occupy postsynaptic sites that have become vacant in CA1 following the degeneration of the lesioned Schaffer collateral pathway. This is quite different to what has been previously reported for the axons of the dentate granule cells and the septohippocampal cholinergic cells, which sprout after lesions that remove input to the dentate gyrus.

We also observed that the newly formed axons increase the connectivity of cells within area CA3. There was a high level of spontaneous synaptic activity and polysynaptic EPSPs in lesioned cultures, a phenomena never seen in sister control cultures. This increase in synaptic activity rendered the CA3 region more susceptible to generate epileptiform discharges. The hippocampal neuronal network generates epileptiform discharge when the balance between synaptic excitation and inhibition is disrupted in favor of excitation. We observed no functional or morphological change in GABAergic activity in the lesioned cultures to account for the observed increase in excitability in area CA3. Therefore, the increase in connectivity of the CA3 pyramidal cells, as seen in the paired recordings, could account for the observed increase in excitability. The spread of excitation between cells will be facilitated, as there is an increased chance that an action potential in another cell will successfully lead to the generation of an action potential in another cell. Furthermore, the facilitated spread of excitation via the newly sprouted axons will be even more prominent when the strength of GABAergic inhibition is reduced, thereby accounting for the observed occurrence of bursting in low concentration of the GABA_A antagonist.

Axonal sprouting and posttraumatic epilepsy

Anatomical studies of tissue from patients with intractable temporal lobe epilepsy have shown with Timm's stain, that granule cell axons (which are called mossy fibers) sprout collaterals into the inner molecular layer of the dentate gyrus in animal models and surgically resected human tissue [18,19]. These anatomical findings lead to the hypothesis that synaptic reorganization of the dentate gyrus resulting from mossy fiber sprouting leads to the formation of new excitatory synapses among granule cells. Hence, mossy fiber sprouting and the hypothetical formation of new recurrent excitatory circuits have been proposed as mechanisms for increased seizure susceptibility of the dentate gyrus [20,21]. Our data indicate that axonal sprouting is not limited to the granule cells. Previously, direct evidence that axons of hippocampal or cortical pyramidal cells can sprout in response to injury was impossible to establish due to lack of a specific marker.

These observations permit the formulation of a hypothesis for the development of epilepsy after traumatic brain injury in humans. We suggest that axonal sprouting from neocortical or hippocampal pyramidal cells are initiated by axonal injury. The time required for the elaboration of these new axonal collaterals and the formation of the new synapses may underlie the delay between the initial injury and the development of posttraumatic injury.

Neurotrophin involvement in axonal sprouting

We have begun to identify the factor(s) that are activated by injury to induce axonal sprouting in the hope that interrupting this process will prevent the development of hyperexcitability in lesioned hippocampal slice cultures. We hypothesized that an increase in neurotrophin secretion in response to the injury might trigger the axonal sprouting. We could successfully prevent the upregulation of GAP-43 immunoreactivity in lesioned cultures by adding the receptor blocker for TrkB. Although this is a very promising result, we still must determine whether blockade of the action of neurotrophins prevents the increase in excitability observed in lesioned cultures.

It has been previously reported that the expression of several neurotrophic factors is increased after experimentally induced epileptic seizures [22]. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with neuronal cell loss, neurogenesis, mossy fiber sprouting and reactive gliosis. Clinical studies on brain tissue removed during surgical intervention as therapy for intractable temporal lobe epilepsy revealed enhanced mRNA neurotrophin levels in the dentate granule cells, suggesting a correlation between these levels and the extent of mossy fiber sprouting [23].

Seizure activity leads to an increase of BDNF mRNA and protein level and activation of TrkB receptors, mainly in the granule cells of the dentate gyrus as well as in pyramidal cells of area CA1 and CA3 in the hippocampus. Additionally BDNF has been reported to potentiate neuronal excitability at the mossy fiber pathway, thereby leading to an imbalance between excitatory and inhibitory synaptic transmission [24,25]. The hyperexcitability induced by BDNF could be blocked by the administration of the general tyrosine kinase receptor antagonist K252a [26] thereby showing the feasibility of interfering with the action of neurotrophins to prevent epileptiform activity.

Conclusions

The observations permitted the formation of a hypothesis for the development of epilepsy after traumatic brain injury in humans. Axonal sprouting from neocortical or hippocampal pyramidal cells is initiated by axonal injury indirectly in the absence of dural penetration or directly in the case of penetrating wounds. The time required for the elaboration of these new axons and the formation of new synapses might underlie the delay between the initial injury and the development of posttraumatic epilepsy. This hypothesis suggests novel therapeutic possibilities. In particular, we are continuing to investigate the role of neurotrophins as the factors involved in axonal sprouting. If the release of growth factors promotes axonal sprouting in the vicinity of an injury, then interfering with their

action immediately after cortical injury in patients at risk of epilepsy may reduce posttraumatic axonal sprouting and thus reduce the risk of developing epilepsy.

References

1. Dichter MA, Ayala GF. Cellular mechanisms of epilepsy: A status report. *Science* 1987; 237: 157-164
2. Traub RD, Miles R. *Neuronal Networks of the Hippocampus*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991
3. Ribak CE, Reiffenstein RJ. Selective inhibitory synapse loss in chronic cortical slabs: A morphological basis for epileptic susceptibility. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60: 864-870
4. Prince DA, Tseng G-F. Epileptogenesis in chronically injured cortex: In vitro studies. *J Neurophysiol* 1993; 69: 1276-1291
5. Hoffman SN, Salin PA, Prince DA. Chronic neocortical epileptogenesis in vitro. *J Neurophysiol* 1994; 71: 1762-1773
6. Gall CM, Isackson PJ. Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science* 1989; 245: 758-761
7. Lowenstein DH, Seren MS, Longo FM. Prolonged increases in neurotrophic activity associated with kainate-induced hippocampal synaptic reorganization. *Neuroscience* 1993; 56: 597-604
8. Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981; 4: 329-342
9. Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D et al. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *TINS* 1997; 20: 471-477
10. Chong MS, Fitzgerald M, Winter J et al. GAP-43 mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia neurons: developmental changes and re-expression following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 883-895
11. Doster KS, Lozano AM, Aguayo AJ, Willard MB. Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* 1991; 6: 635-647
12. Baetge EE, Hammang JP, Gribkoff VK. The role of GAP-43 in the molecular reorganization of axonal outgrowth and electrical excitability. *Perspectives on Devel Neurobiol* 1992; 1: 21-28
13. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 1997; 20: 84-91
14. Meiri KF, Pfenniger KH, Willard MB. Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to a pp46, a major polypeptide of subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83: 3537-3541
15. Skene JHP. Axonal growth-associated proteins. *Ann Rev Neurosci* 1989; 12: 127-156
16. McKinney RA, Debanne D, Gähwiler BH, Thompson SM. Lesion-induced sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications of the genesis of posttraumatic epilepsy. *Nature Medicine* 1997; 3: 990-995
17. Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM. Physiology and pharmacology of unitary synaptic connections between pairs of cells in area CA3 and CA1 of rat hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 1995; 73: 1282-1294
18. Sutula T, Cascino G, Cavazos J et al. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989; 26: 321-330
19. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK et al. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentate. *Neuroscience* 1991; 42: 351-363
20. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid treated rats. *J Neurosci* 1985; 5: 1016-1022
21. Cronin J, Dudek FE. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatments in rats. *Brain Research* 1988; 474: 181-184
22. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 125-149
23. Mathern GW, Babb T, Micevych PE et al. Granule cells mRNA levels for BDNF, NGF and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neurobiol* 1997; 30: 53-76
24. Binder DK, Routbort MJ, McNamara JO. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1999; 19: 4616-4626
25. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 2001; 24: 47-53
26. Scharfman H. Hyperexcitability in combined entorhinal/hippocampal slices of adult rat after exposure to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol* 1997; 78: 1082-1095

Address for correspondence:
Dr. R. Anne McKinney
 Dept. of Neurophysiology
 Brain Research Institute
 University of Zurich
 Winterthurerstrasse 190
 CH 8057 Zurich
 Tel. 0041 1 635 33 34
 Fax 0041 1 635 33 03
 mckinney@hifo.unizh.ch

Ron Stoop, Centre de Neurosciences Psychiatriques
et Institut de Biologie Cellulaire et de Morphologie,
Université de Lausanne

Summary

Over the last ten years, an increasing number of genes have been associated with various epileptic syndromes. While these findings help to define the basic causes that can predispose an organism to epilepsy, they do not necessarily explain the variability in the onset and severity of this pathology, nor provide direct indications for its treatment and prognosis. In order to understand the complex relation between gene expression and pathological outcome, it is necessary to investigate how changes in neuronal function and connectivity in regions affected by epilepsy contribute to seizure generation, maintenance and propagation, using a well-defined *in vitro* preparation. Furthermore, such a preparation should be suitable for studying specific genetic mutations using appropriate transgenic animal models.

We have recently developed an *in vitro* slice preparation of the rodent temporal lobe that includes the hippocampal formation, entorhinal cortex, and amygdala. These three regions are heavily interconnected and have been implicated in temporal lobe epilepsy. In this so-called „horizontal slice preparation“ we could provoke, under specific pharmacological conditions, an interictal-like bursting activity that spread between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala. We furthermore found that 30 minutes of pharmacological exposure was sufficient to induce changes in the neuronal networks for this activity to become self-sustained after removal of the original pharmacological condition. This induction of permanent interictal bursting activity in the horizontal slice preparation provides us with a new model to study the mechanisms through which genes and environment influence the development and persistence of seizures in temporal lobe epilepsy.

Epilepsie in der Petrischale

Eine Vielzahl von Genen sind während den letzten zehn Jahren mit Epilepsie in Verbindung gebracht worden. Diese Ergebnisse sind hilfreich um die Grundursachen einer eventuellen Veranlagung zur Epilepsie zu identifizieren, sie können aber weder die grosse Variabilität der Schwere, noch der Dauer der Krankheit erklären. Sie sind daher bei der Prognose und Behandlung von Epilepsiepatienten nur sehr beschränkt einsetzbar. Um die komplexe Beziehung zwischen pathologischem Verlauf und Genaktivierung besser verstehen zu kön-

nen, ist ein *in vitro*-Modell erforderlich, das erlaubt, die Ausbreitung, Dauer oder Schwere von epileptischen Anfällen in verschiedenen Gehirnregionen auf zellulärer Ebene simultan zu messen. Dieses Modell sollte auch zur Erforschung von Veränderungen bei transgenen Tieren eingesetzt werden können.

Wir haben kürzlich ein neues *in vitro*-Gehirnschnittpräparat bei Nagetieren entwickelt, das den Hippokampus, die Amygdala und den entorhinalen Kortex enthält. Diese drei Hirnregionen sind stark miteinander verbunden und die Hauptelemente bei der Temporallappenepilepsie. Mit diesem „horizontalen Hirnschnittpräparat“ können wir unter bestimmten pharmakologischen Bedingungen eine „interiktal-ähnliche“ Aktivität auslösen, die sich vom Hippokampus über den Kortex bis in die Amygdala ausbreitet. Diese Behandlung führt bereits nach dreissig Minuten zu einer Veränderung neuronaler Verbindungen, die dann, auch nach Absetzung der Behandlung, eine permanente interiktal-ähnliche Aktivität zur Folge hat. Die Induktion dieser permanenten Aktivität in diesem horizontalen Hirnschnittpräparat bietet neue Möglichkeiten zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen Genen und Erlebtem, das die grosse Variabilität von Temporallappenepilepsie beeinflusst.

Circuits en Pétri

Lors de ces derniers dix ans, de nombreux gènes associés avec différents syndromes épileptiques ont été identifiés. Bien que ces nouvelles connaissances permettent de mieux comprendre certaines prédispositions à développer une épilepsie, elles n'expliquent pas la grande variabilité des symptômes et de la sévérité de cette maladie. Pour comprendre les liens complexes entre l'expression des gènes et la pathophysiologie de l'épilepsie, il est important de pouvoir analyser dans des conditions bien définies *in vitro* comment les altérations neuronales dans les circuits épileptiques contribuent au développement et à la maintenance des crises. Un tel modèle devrait également permettre de tester les effets de mutations introduites dans des animaux transgéniques.

Nous avons développé dernièrement une préparation de tranche du lobe temporal qui contient l'hippocampe, le cortex entorhinal et l'amygdale. Ces trois régions sont interconnectées et jouent un rôle primordial dans l'épilepsie du lobe temporal. Suite à un traitement pharmacologique spécifique, nous avons observé

dans cette préparation le développement d'une activité neuronale qui se propage entre l'hippocampe, le cortex entorhinal et l'amygdale et qui ressemble fortement à l'activité interictale chez des patients épileptiques. De plus, nous avons découvert que 30 minutes d'exposition à cet agent pharmacologique suffisent pour induire des changements dans les circuits neuronaux pour que cette activité interictale se maintienne indéfiniment après l'exposition pharmacologique. L'induction d'une activité épileptique permanente entre hippocampe, le cortex entorhinal et l'amygdale nous permet d'étudier les interactions entre gènes et environnement qui influencent le développement et la persistance de crises épileptiques dans le lobe temporal.

Epileptologie 2004; 21: 13 – 20

Introduction

Recent studies have identified a number of genetic causes for epilepsy, many of which are leading to changes in cell excitability^[1-3]. Such changes can predispose neuronal circuits to transient epileptic activity that can gradually lead to full developed epilepsy^[4]. For example, it is well known that early childhood epileptic attacks, if not properly treated, may lead to a long-lasting epileptogenic pathological condition. The exact mechanisms underlying such transition, however, are not well known.

Certain areas in the brain, particularly those underlying memory formation, are known to easily undergo permanent changes in electrical activity after sustained stimulation. Temporal lobe epilepsy is a form of partial complex epilepsy involving seizures that originate in parts of the temporal lobe and propagate within or beyond its boundaries^[5]. The hippocampus, the entorhinal cortex, and the amygdala are structures in the temporal lobe of the brain that are extensively and directly interconnected^[6]. Based on studies of H.M., a patient in the 1950's who suffered from severe epilepsy in the hippocampus on both sides of the brain, we now know that these regions of the medial temporal lobe are essential for memory formation and for the regulation of emotions, such as fear and anxiety^[7].

Electrophysiological transmission in hippocampus and amygdala

Electrophysiologists have demonstrated in both hippocampus and amygdala certain changes in the propagation of electrical activity that could represent a direct cellular basis for learning and memory (see accompanying article by Muller). These changes were first discovered in 1973 by two Scandinavian researchers^[8] in parts of the hippocampus. They have subsequently been found in many other pathways in the

brain, in particular in the temporal lobe. In animal preparations of the hippocampus they can be easily measured with the help of one stimulation electrode placed in the dentate gyrus region of the hippocampus and one recording electrode in the neighboring CA3 region (i.e. the part of the hippocampus to which the dentate gyrus projects). While low intensity stimulation of the dentate gyrus leads to reproducible signals in the CA3 region, if several high intensity stimulations are applied for a short moment to the dentate gyrus in between, the same low intensity stimuli now lead to much larger signals. The potentiation of this signal can last for many hours and has been called "long-term potentiation" or LTP. In vivo studies have recently demonstrated that LTP takes place in the amygdala when rats are trained in a fear-conditioning experiment^[9,10]. These findings have provided the first causative relation between long-term potentiation and emotional memory.

An outstanding question in the field of emotional memory concerns the issue whether fear conditioned learning takes place exclusively in the amygdala^[11] or if the hippocampus is also involved^[12]. Indeed, the hippocampus, the entorhinal cortex and the amygdala may have important effects on each other's functioning. Thus, electrophysiological studies in animal models have shown that long-term potentiation in the hippocampus affects long-term potentiation in the amygdala and vice versa^[13,14]. Alternatively, during behavioral progression of epilepsy in the amygdala, epileptic bursts are known to spread throughout the temporal lobe and their spread is known to develop progressively^[15]. Malfunction in these systems has been suggested to underlie depression and anxiety illnesses. For example, patients with temporal lobe epilepsy have often been reported to experience fear or terror right before the occurrence of a seizure, while they can be afflicted with several emotional and psychological disturbances in between seizures^[11]. During temporal lobe epilepsy, spreading of activity between hippocampus and amygdala might easily take place and it would be of importance to study the exact mechanisms that underlie such spreading.

An animal slice model for temporal lobe epileptic activity

1. Interictal-like bursting in a slice preparation of the hippocampus

An interesting model to study the cellular mechanisms underlying the development and spread of epileptic-like activity in the hippocampus has been developed in the early 1980s. In this model, parts of rodent (rat or mouse) brain that contain the hippocampus are cut into thin slices of up to 400 μm (see figure 1A and B) and are placed onto a grid in a special chamber, called an inter-

face chamber, in a setup for electrophysiological recordings. Below this grid an artificial cerebrospinal fluid is passed that is bubbled to saturation with a mixture of 95% oxygen and 5% carbon dioxide and provides all the nutrients necessary to maintain the neurons alive. Above the grid a humidified air flow of 95% oxygen/5% carbon dioxide is passed over the slice. In this interface chamber, slices of the hippocampal formation can be maintained alive up to 24 hours after cutting. This permits an easy access for precise, visually controlled measurements of electrical activity in the hippocampus with various electrophysiological techniques. It is also possible to modulate neuronal activity by introducing drugs into the bath by dissolving them in the artificial cerebrospinal fluid.

Interestingly, in these slices, a particular type of epileptic activity can be readily provoked under certain pharmacological conditions. This happens, for example, following administration of bicuculline, a blocker of GABA_A receptors. GABA_A receptors mediate the inhibitory transmission in the brain and regulate the activity of most neurons in the brain. Administration of bicuculline markedly increases the activity of excitatory neurons resulting in the appearance of spontaneous, regular bursts

appearing every 5-10 seconds and lasting for 100-500 ms. These bursts resemble the activity that can often be recorded in between seizures in the brains of epileptic patients (the “ictal” events) and is therefore called interictal-like bursting. Anatomical [16,17] and electrophysiological [18] studies have suggested that the interictal-like bursts are the result of simultaneous massive firing of a large number of excitatory cells, once they become disinhibited after the blockade of GABA_A receptors. These bursts can be triggered by a spontaneously occurring, single excitatory event in cells in the hippocampus that are locally interconnected through recurrent excitatory circuits (for review see [19]). The recurrent circuitry causes the excitatory activity from one single cell to excite in turn many neighboring cells, that each excites again another series of neighbors (see figure 1 C and D). This provokes a chain reaction that leads, in the end, to the simultaneous firing of nearly all cells in a locally connected area of the slice: the “interictal-like burst”.

Interictal-like bursts can propagate from one area of the slice to the next where they again provoke interictal-like bursts if sufficient recurrent excitatory circuitry is present. Typically, this has been studied in slices of the

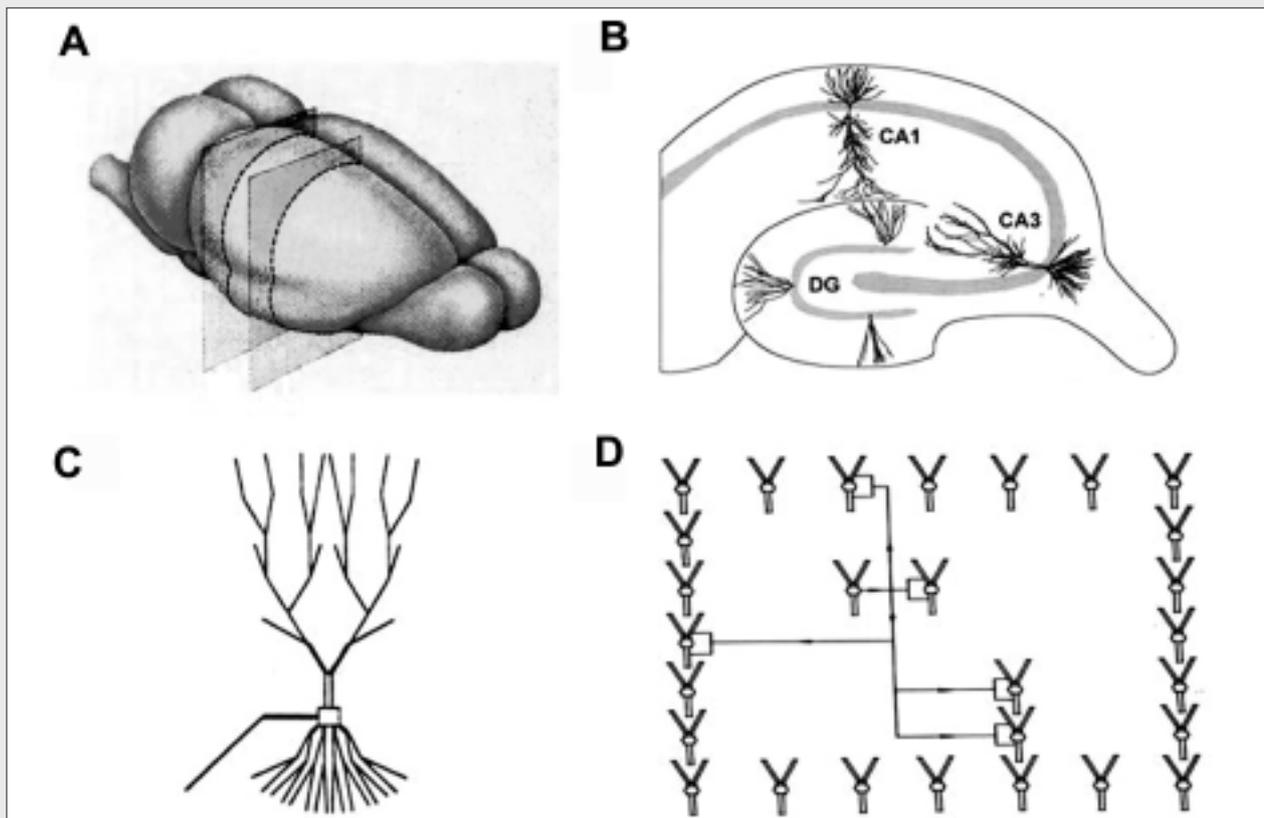


Figure 1: The coronal slice preparation as model for the development and spread of interictal-like activity in the hippocampus. A) Rodent brain showing the plane of sectioning to obtain a coronal (vertical) slice at the level of the hippocampus. B) Classical coronal slice preparation of the hippocampus indicating the major cell types found in the dentate gyrus layer (DG), the pyramidal cells layer in the CA3 region (CA3) and the pyramidal cells layer in the CA1 region (CA1). Note that the DG projects to the CA3 cells and the CA3 cells project to the CA1. C) Model of pyramidal cell showing cell body with one axon (left branch) and various dendrites (upper and lower processes). D) Model for recurrently connected pyramidal cells. The cell in the middle sends axonal branches onto dendritic processes of 5 neighboring pyramidal cells.

hippocampus that have been obtained by cutting the brain in the vertical or “coronal” plane (see figure 1A + B). Since the amygdala is located anterior to the hippocampus, studies addressing neurotransmission between these two structures are not possible in such “coronal” slices. The use of this slice preparation has therefore been restricted to the study of spreading within the hippocampus and the adjacent entorhinal cortex, but has not directly contributed to our knowledge about interactions between hippocampus and amygdala.

2. A new slice model for burst spreading in the temporal lobe

In view of the location of the amygdala immediately anterior to the hippocampal formation, it should in principle be possible to include both structures in a preparation obtained by cutting horizontal slices from this part of the brain. Indeed, previous studies have described connections between the hippocampus and the entorhinal cortex in horizontally oriented brain slices [20-24] as well as between amygdala and entorhinal cortex [25]. However, no studies have directly assessed a functional connectivity between the hippocampus, entorhinal cortex, and amygdala. It therefore seemed important to investigate whether a horizontal slice could be developed in which the connections between the hippocampus, the entorhinal cortex and the amygdala are preserved and to study the development and spread of epileptic bursting activity between these three structures.

Following this argument, we have recently developed a modified, horizontal slice preparation of the rodent limbic system (figure 2A) that includes at the same time the hippocampus, entorhinal cortex, and amygdala, and preserves the connections between these three structures [26]. We found that within 10-15 minutes after application of bicuculline, light electrical stimulation with an electrode could provoke bursts that resembled in many aspects the interictal-like bursts found in coronal slices (figure 2B). These bursts could be provoked in either the hippocampus, the entorhinal cortex, or the amygdala and they would spread in between these different regions. Thus, bursting that initiated in the entorhinal cortex would propagate both to the amygdala and to the hippocampus, while bursts initiated in the hippocampus would follow two pathways to the amygdala: One pathway led via the subiculum and entorhinal cortex to the perirhinal cortex while the other consisted of a shortcut directly passing from CA1 to perirhinal cortex (see figure 2A); both would subsequently lead to the amygdala.

Following longer exposure to bicuculline, we also observed the development of a bursting activity that spontaneously initiated in the CA3 region of the hippocampus. This activity would spread through the slice following the same two pathways as described above.

Interestingly, when we separated the hippocampus, entorhinal cortex, and amygdala into three separate regions by cutting the slice, we found that each individual region was, in principle, also capable of generating its own spontaneous bursting activity. In the entorhinal cortex and amygdala, individual bursts had a lower frequency than in the hippocampus (see figure 2B). In the intact horizontal slice preparation, however, the hippocampus generates interictal-like discharges at the fastest rate and automatically functions as initiator and coordinator of the bursting activity in the entorhinal cortex and amygdala. Taken together, this slice preparation can provide a model for the generation and spread of interictal-like bursts between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala. It approaches better the *in vivo* situation, where these three regions are heavily interconnected, than the coronal slice preparation described above.

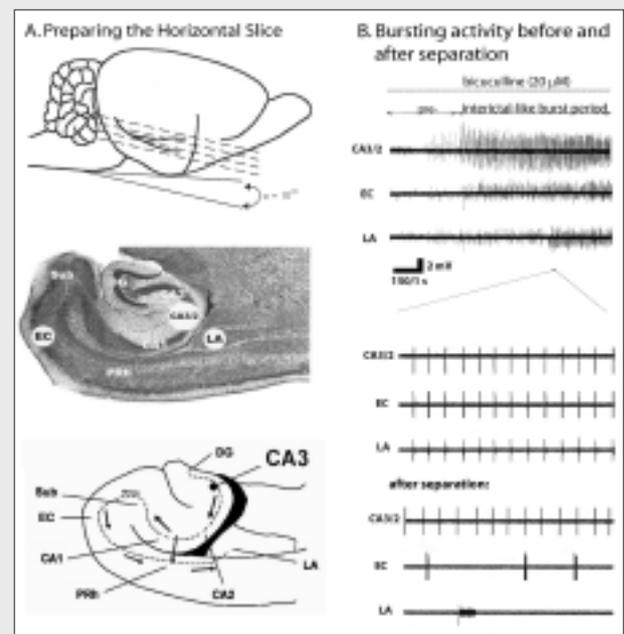


Figure 2: Preparation and spread of interictal like activity in the rodent horizontal slice preparation. A) Preparation of horizontal slices from the rodent brain. Dashed lines in the upper figure indicate the positions along which the horizontal slices of 400 μm thickness were obtained. Middle figure shows the horizontal slice stained with cresyl violet. White circles indicate the usual recording sites in the hippocampus (CA3/2), the entorhinal cortex (EC) and the lateral amygdala (LA). In addition are indicated the position of: dentate gyrus (DG); subiculum (Sub), perirhinal cortex (PRh) and the CA1 region (CA1). Lower figure shows the pathways of the propagation of the spontaneous bursts originating from the CA3 region. **B)** Example of extracellular recording illustrating differences in time of appearance of bursts between the three different regions (beginning of trace coincides with start of 20 μM bicuculline application), below enlargements illustrate the highly regular and synchronized occurrence of each burst in the three different regions in the intact preparation as well as the complete asynchrony between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala after separation of the three regions.

Persistent bursting in the horizontal slice preparation

The spontaneous bursting described above takes place in the presence of bicuculline, i.e. when GABA_A receptors are blocked and no GABAergic neurotransmission can take place. We were interested, however, to study interictal-like activity under physiological circumstances, i.e. in the presence of GABAergic inhibition. In order to return to physiological conditions, we re-established GABAergic inhibition in slices that had displayed interictal-like bursting activity in the presence of bicuculline over periods of 30-60 minutes by washing out the bicuculline. Washout of bicuculline appeared to be very effective: Within 5 min after the washout had started, bursting frequency sharply increased, then decreased again to previous levels while burst duration rapidly and permanently decreased to a length of maximally 100-200 ms (from 400 ms initially, **figure 3A**). Interestingly, these short duration bursts persisted for as long as we could measure (up to 24 hrs). While this persistence could be due to the presence of residual bicuculline, there were various reasons to believe that this is not the case: First of all, as mentioned, washout of bicuculline caused an immediate increase in frequency and decrease in burst duration, clearly showing the effects (and effectiveness) of the washout (**figure 3A and 3B**). Second, we found that shorter applications of bicuculline (15 min) still were able to provoke a complete bursting activity (indicating full bicuculline penetration) but did not lead to persistent bursting. Finally, to confirm the return of GABAergic inhibition, we measured the amplitudes of GABAergic currents that were evoked by electrical stimulation before, during and after bicuculline application. As expected, the perfusion with bicuculline caused a complete block of these GABAergically mediated currents, but after bicuculline washout, we found that they completely recovered. These findings confirm a full washout of bicuculline and suggest that persistent bursting is due to a change in function or connectivity in the slice ^[27].

Origin of the persistent bursting

As we already knew (see above) the spontaneous activity in the presence of bicuculline initiates in the CA3 hippocampal region, but other regions in this slice preparation are also capable of generating burst activity. To assess whether persistent bursting is unique to the hippocampal region or also develops in e.g. the entorhinal cortex, we separated the CA3 from the entorhinal cortex following 1 hr of bursting in the presence of bicuculline. At this point two cuts were made with the tip of a fine syringe needle to isolate the CA3 region of the hippocampus from the rest of the slice (**figure 3B**). While this separation did not affect the burst appearance in the CA3 region, bursts started to

appear at a lower frequency in the entorhinal cortex, as previously described. Following the wash out of bicuculline, we observed the same effect in the CA3 region as found in the intact slice preparation i.e. a transient increase in bursting followed by persistent bursts. In the entorhinal cortex, however, the washout of bicuculline resulted in a gradual decrease in the frequency of the bursts until they completely disappeared after about 3 hrs (**figure 3B**). These findings suggest that in the intact slice preparation, the persistent bursting originates and develops through changes in the circuitry in the CA3 region from where it permanently drives the bursting in the entorhinal cortex.

Mechanisms underlying persistent bursting

1. Cell layers in the CA3 region of the hippocampus

With this new model of persistent interictal-like bursting activity, we decided to examine the nature of the mechanisms underlying the development of the persistent bursting activity. As mentioned above and shown in **figure 1**, this activity becomes possible in circuits that consist of excitatory cells with recurrent mutual connections. In the hippocampal CA3 region, these excitatory cells are located within a thin layer called the pyramidal cell layer. Previous studies have shown that the connections between cells in the pyramidal cell layer can undergo long-term potentiation i.e. increases in connective strength after intensive stimulation. Thus, one possible explanation for the persistence of bursting after the washout of bicuculline and return of GABAergic inhibition could be that the preceding bursting activity has increased the strength between the excitatory connections through which it has propagated. On the other hand, under normal physiological circumstances, that is, in the absence of bicuculline, the cells in the pyramidal layer are strongly inhibited by GABAergic input. This input originates from inhibitory cells that are generally located outside of the pyramidal cell layer and send their projections to the pyramidal layer. They receive, in turn, an excitatory input from the cells in the pyramidal layer. While we have found that the GABAergic input itself was not affected after one hour of bicuculline application and bursting, it remains very well possible that changes of recurrent excitatory input on these GABAergic cell bodies may have undergone some changes (i.e. decreased).

2. Whole-cell patch clamping to establish changes on the cellular level

In order to assess which changes take place on a cellular level, we used an electrophysiological technique

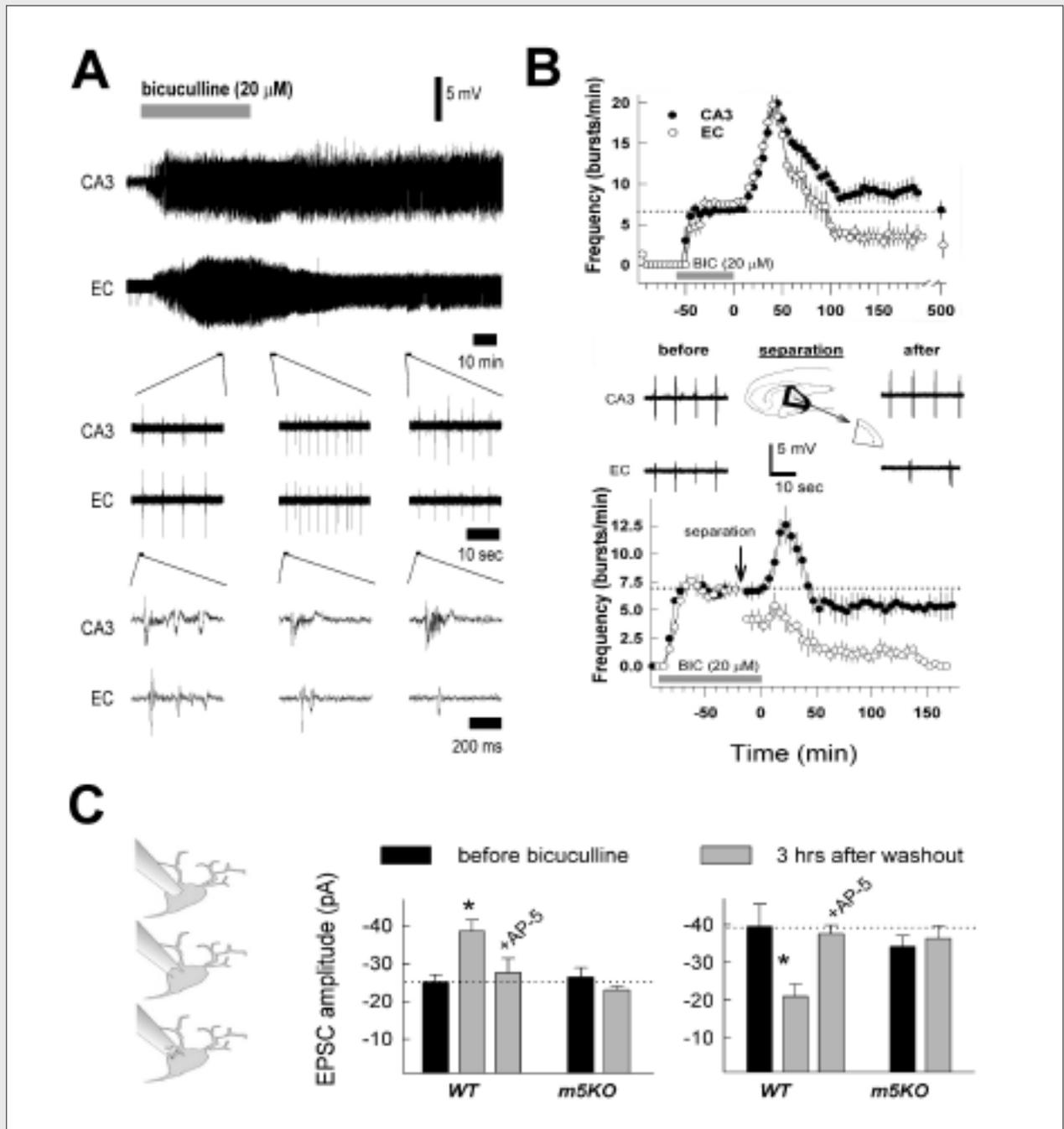


Figure 3: A) Effects of bicuculline application and washout on spontaneous bursting activity in the hippocampus and entorhinal cortex (EC). Top traces represent examples of extracellular recordings of bursting activity in the hippocampal CA3 region and EC before, during, and after bicuculline application. Insets represent enlarged parts of the top two traces to show the regularity of the bursting activity (middle traces) as well as the individual bursts with afterdischarges (bottom traces). B) Upper graph: Average burst frequencies before, during, and after 60 min of bicuculline application in the CA3 region (filled circles) and entorhinal cortex (open circles). Lower graph: Average frequencies of bursting activity in the hippocampus and entorhinal cortex before and after their separation (as indicated at the top) followed by bicuculline washout ($n = 15$ slices). Example traces show CA3 and EC bursting activity before and after separation. Notice the transient increase in frequency after bicuculline washout and the lower frequency in the EC after its separation from the CA3 area and the loss of synchrony with CA3 bursts. In all graphs, bicuculline application (BIC; 20 μ M) is indicated by gray bars, and dotted lines indicate average frequencies obtained during 60 min bicuculline incubation. C) Whole-cell patch-clamp recordings of pyramidal cells and interneurons. Left panel shows the three subsequent steps to obtain whole-cell patch-clamp configuration. Mean amplitudes of the minimal evoked EPSCs recorded from pyramidal cells (left graph) and interneurons (right graph) before (black columns) and 3 hrs after bicuculline (20 μ M) washout (gray columns). All data were obtained from wild-type mice, except for the columns that indicated m5KO, which were from mGluR5-KO mice. +AP-5 indicates AP-5 (100 μ M) incubation 30 min before and throughout the 1 hr bicuculline incubation ($n = 5$ –20 cells per bar). The stimulated pathways are indicated below the columns ($*p < 0.05$; ANOVA).

that can determine changes in connections on a single cell level. This technique, called whole-cell patch-clamp, uses glass capillaries that are pulled through a specialized heating instrument into pipettes that taper at their end into a sharp tip with an opening of only 1 μm . This tip becomes suitable for recording of the small currents that pass through single cells. A single pipette is mounted on a micromanipulator and is lowered under visual control (using videomicroscopy) onto one of the cells in the hippocampal region (e.g., on a cell in the pyramidal layer). Once the tip is touching the cell membrane (see **figure 3C**), a slight suction is applied at the free end of the pipette such that the membrane slightly enters into the small opening at the end of the pipette and forms a tight seal with the inside walls of the pipette. By applying stronger suction, the cell membrane that has entered the tip of the pipette can be fractured leaving the inside of the cell in immediate contact with the inside of the pipette. Typically, the pipette is filled with a solution that has the same concentration of ions as the cell to be recorded. In this way, an electrical continuum is created between the inside of the cell and the inside of the pipette through which currents can flow without much resistance. Two metal electrodes are connected, one to the inside of the pipette, the other in the interface chamber of the slice and fed into an amplifier, so the currents passing through the cell membrane can be precisely measured. For comparison: the currents passing through the cell membrane are about a billion times smaller than those typically passing through a 100 Watt light bulb.

3. Changes in both excitation and inhibition lead to persistent bursting

Using this technique, we have been able to establish that in the horizontal slice preparation two types of changes take place after washout of one hour of bicuculline application^[27]. First of all, we found that the currents caused by connections in between excitatory cells in the pyramidal layer undergo increases up to 50% of their initial values (**figure 3C**). As one can imagine, this leads to an overall increase in excitation between these cells, and facilitates the effect of one cell to cause a bursting of its neighboring cells. At the same time, we found that the projections sent by the excitatory cells in the pyramidal layer to the inhibitory interneurons i.e. the neurons outside of the pyramidal layer, undergo a decrease in strength. Thus, the excitatory currents caused by these connections in the inhibitory neurons undergo decreases down to 50% of their initial strength (**figure 3C**). As a result, these cells will be less activated and will in turn send less often inhibitory feedback on the excitatory cells in the pyramidal layer. Taken together, a smaller inhibition and larger excitation of excitatory cells in the pyramidal layer after washout of bicuculline will lead to an overall decreased inhibition in the slice.

A model to test gene influence on epileptic bursting and spread

With the persistent interictal-like bursting in this slice preparation, we now have a model to study pharmacological and genetic factors that influence the development as well as the persistence of epileptic activity in the temporal lobe. Indeed we have already tried several manipulations to elucidate part of the factors necessary for the development of persistence bursting. We have tested the involvement of NMDA receptors, which are known to be necessary for the induction of long-term potentiation. They are typically excited by high intensity stimulation during which time they allow the entry of calcium into the cell. Calcium entry is considered to trigger a series of events leading finally to strengthening of connections between cells.

Incubation with the NMDA receptor blocker AP-5 did not interfere with the normal appearance of interictal-like bursts in the presence of bicuculline but prevented the development of persistent bursting. During whole-cell patch-clamp recordings, no changes in excitatory input on cells in the pyramidal layer nor on interneurons outside of this layer were found (**figure 3C**). This indicates that the activation of NMDA receptors is necessary both for long-term potentiation and for persistent bursting. We also applied AP-5 after bicuculline i.e. starting from the washout of bicuculline. We reasoned that in this way we should be able to distinguish whether activation of these processes is necessary for the induction or for the expression of persistent bursting activity. In this case, however, we found a normal development of persistent bursting clearly showing that the activation of NMDA receptors is necessary only for the induction of persistent bursting, not for its expression.

We have also tested if the induction of persistent bursting can depend on the genetic background of the mice. To this purpose, we used a strain of mice that were lacking the metabotropic type-5 glutamate receptor. Activation of this receptor has been shown to be necessary for the induction of long-term potentiation in particular parts of the hippocampus^[28]. We found that mice lacking this receptor developed normal interictal-like bursting activity upon perfusion with bicuculline, but this bursting activity disappeared as soon as bicuculline was washed out. Thus, these mice were not able to produce persistent interictal-like bursts. Interestingly, they did not exhibit the changes in excitatory input on pyramidal cells and interneurons (**figure 3C**). While it is not possible in this case to distinguish between the function of the metabotropic type-5 glutamate receptor for the induction versus the maintenance of persistent bursting activity, this result nevertheless indicates that this receptor plays an important role in this kind of epileptiform activity.

Conclusion

In conclusion, the persistent bursting occurring in the horizontal slice preparation may be used for several purposes. First of all, it is a model to study the spreading of epilepsy-related activity between different regions in the temporal lobe, among which the hippocampus, amygdala and entorhinal cortex^[25]. Second, it allows to analyze the cellular mechanisms underlying the induction and expression of permanent interictal-like activity in these regions and the effects of genetic background and pharmacological manipulations on its development^[27,29,30]. Finally, our preparation can also be used to investigate the effects of permanent interictal-like bursting activity on the development of new sites capable of generating such permanent activity in other regions of the temporal lobe. In these ways our model will advance the understanding of basic cellular mechanisms underlying the development of temporal lobe epilepsy.

References

1. Kim D, Song I, Keum S et al. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 2001; 31: 35-45
2. Skradski SL, Clark AM, Jiang H et al. A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 2001; 31: 537-544
3. Schuler V, Luscher C, Blanchet C et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 2001; 31: 47-58
4. Wheal HV, Bernard C, Chad JE, Cannon RC. Pro-epileptic changes in synaptic function can be accompanied by pro-epileptic changes in neuronal excitability. *Trends Neurosci* 1998; 21: 167-174
5. Bartolomei F, Wendling F, Bellanger JJ et al. Neutral networks involving the medial temporal structures in temporal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol* 2001; 112: 1746-1760
6. Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 1990; 70: 453-511
7. Kandel ER. *Biology and the future of psychoanalysis: a new intellectual framework for psychiatry revisited*. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 505-524
8. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-356
9. McKernan MG, Shinnickgallagher P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 1997; 390: 607-611
10. Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 1997; 390: 604-607
11. LeDoux JE. *The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life*. New York, NY: Touchstone, 1998
12. Cahill L, Weinberger NM, Roozendaal B, McGaugh JL. Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron* 1999; 23: 227-228
13. Ikegaya Y, Saito H, Abe K. Requirement of basolateral amygdala neuron activity for the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Brain Res* 1995; 671: 351-354
14. Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 1995; 15: 7548-7564
15. Handforth A, Ackermann RF. Mapping of limbic seizure progressions utilizing the electrogenic status epilepticus model and the 14C-2-deoxyglucose method. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 1-23
16. Gomez-Di Cesare CM, Smith KL, Rice FL, Swann JW. Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 1997; 384: 165-180
17. Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 295: 580-623
18. Miles R, Wong RK. Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol (Lond)* 1986; 373: 397-418
19. Traub RD, Jefferys JG. Simulations of epileptiform activity in the hippocampal CA3 region in vitro. *Hippocampus* 1994; 4: 281-285
20. Walther H, Lambert JD, Jones RS et al. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett* 1986; 69: 156-161
21. Jones RS, Lambert JD. Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro: site of initiation and the role of amino acid receptors. *Neurosci* 1990b; 34: 657-670
22. Jones RS, Lambert JD. The role of excitatory amino acid receptors in the propagation of epileptiform discharges from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in vitro. *Exp Brain Res* 1990a; 80: 310-322
23. Barbarosie M, Avoli M. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J Neurosci* 1997; 17: 9308-9314
24. Gloveli T, Schmitz D, Empson RM, Heinemann U. Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J Neurophysiol* 1997; 78: 3444-3449
25. Ferry B, Magistretti PJ, Pralong E. Noradrenaline modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basolateral amygdala in vitro. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1356-1364
26. Stoop R, Pralong E. Functional connections and epileptic spread between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala in a modified horizontal slice preparation of the rat brain. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3651-3663
27. Stoop R, Conquet F, Zuber B, Voronin LL, Pralong E. Activation of metabotropic glutamate 5 and NMDA receptors underlies the induction of persistent bursting and associated long-lasting changes in CA3 recurrent connections. *J Neurosci*. 2003, 23: 5634-5644
28. Lu YM, Jia Z, Janus C et al. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 1997; 17: 5196-5205
29. Stoop R, Epiney S, Meier E, Pralong E. Modulation of epileptiform discharges in the rat limbic system in vitro by noradrenergic agents. *Neurosci Lett* 2000; 287: 5-8
30. Stoop R, Conquet F, Pralong E. Determination of group I metabotropic glutamate receptor subtypes involved in the frequency of epileptiform activity in vitro using mGluR1 and mGluR5 mutant mice. *Neuropharmacology* 2003; 44: 157-162

Address for correspondence:

Ron Stoop, Ph. D.

Centre de Neurosciences Psychiatriques

Hôpital de Cery, Route de Cery | 1008 Prilly, Lausanne

Tel. 0041 21 643 69 54 | Fax 0041 21 643 69 50

rstoop@ibcm.unil.ch

Jean-Marc Fritschy, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich

Summary

Temporal lobe epilepsy (TLE) with hippocampal sclerosis is a predominant form of acquired epilepsy, characterized by profound neuronal loss and gliosis in the hippocampal formation and by recurrent complex partial seizures. Retrospective studies suggest that the disease is related to an initial precipitating event, such as febrile seizures in early childhood. In rodents, TLE can be modeled by inducing a status epilepticus, either by prolonged electrical stimulation or by administration of drugs, such as pilocarpine or kainic acid, which produce a strong activation of the hippocampal formation. These treatments produce extensive bilateral lesions and lead to recurrent, generalized seizures following a latent period of several weeks. In this review, a new animal model is described, in which kainic acid is injected unilaterally into the hippocampus of adult mice to cause a small initial lesion. Thereafter, the lesion leads to a gradual, unilateral degeneration of the hippocampus CA1 area and to a marked dispersion of dentate gyrus granule cells, two features of the human pathology. Following a latent period of about 2 weeks, the mice develop focal, recurrent seizures interspaced with interictal spikes-and-waves lasting for the rest of the life of the animal. The clear temporal separation between the acute lesion, the latent phase, and the chronic seizures allows investigating morphological and functional changes underlying epileptogenesis and generation of recurrent focal seizures. We show that while kainic acid injection initially affects specific populations of GABAergic interneurons, there is a pronounced up-regulation of GABAergic transmission in the dentate gyrus during the chronic phase. The plasticity of the surviving GABAergic neurons might represent a compensatory adaptation to recurrent seizures.

Ein neues Tiermodell der Temporallappenepilepsie

Temporallappenepilepsie (TLE) mit Hippokampus-sklerose ist eine häufige Form der erworbenen Epilepsien. Sie ist durch einen ausgeprägten Neuronenzellverlust und eine Gliose im Hippokampus gekennzeichnet, darüber hinaus auch durch das Auftreten von chronischen partiell-komplexen Anfällen. Retrospektive Studien lassen vermuten, dass die TLE auf ein Ereignis im Kleinkindalter, wie einen komplizierten Fieberanfall, zurückzuführen sein könnte. Bei Nagetieren kann die TLE durch das Auslösen eines Status epilepticus modelliert werden, entweder mittels eines starken elektri-

schen Reizes oder einer systemischen Behandlung mit Substanzen wie Pilocarpin oder Kainat. Diese Behandlungen führen zu grossen Läsionen im Hippokampusbereich und lösen, nach einer Latenzzeit, spontan-generalisierte Anfälle aus. Im Tiermodell der TLE, das hier beschrieben wird, wird eine winzige Menge von Kainat unilateral in den Hippokampus von erwachsenen Mäusen eingespritzt, um eine kleine lokale Läsion zu erzeugen. Im Laufe der Zeit führt diese Läsion zu einer ausgeprägten unilateralen Degeneration des CA1-Bereiches des Hippokampus und zu einer Dispersion der Körnerzellen im Gyrus dentatus, zwei Merkmalen der Hippokampus-sklerose. Nach einer Latenzzeit von zwei Wochen entwickeln die behandelten Mäuse spontane fokale Anfälle und interiktale Aktivitäten, die während ihres ganzen Lebens zu beobachten sind. Die deutliche zeitliche Trennung der initialen Läsion, der Latenzzeit und der chronischen Phase erlaubt die Untersuchung der Mechanismen der Epileptogenese und der Aufrechterhaltung von wiederkehrenden Anfällen. Wir zeigen, dass die chronische Phase durch eine ausgeprägte Erhöhung der GABAergen Neurotransmission im Gyrus dentatus gekennzeichnet ist, obwohl Kainat spezifische Typen von GABAergen Neuronen zerstört. Die Plastizität der überlebenden GABAergen Zellen könnte als kompensatorischer Mechanismus gegen die chronischen Anfälle angesehen werden.

Un nouveau modèle animal de l'épilepsie du lobe temporal

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) avec sclérose hippocampale est une forme fréquente d'épilepsie acquise. Elle se caractérise par une perte importante de neurones et une forte gliose dans l'hippocampe, ainsi que par des crises partielles complexes. Des études rétrospectives suggèrent que l'ELT soit liée à un événement déclenchant lors de la petite enfance, tel que la survenue d'une crise fébrile. Chez les rongeurs, il est possible de modéliser l'ELT en induisant un status epilepticus par des stimulations électriques répétées ou par l'injection systémique de substances excitotoxiques telles que la pilocarpine ou l'acide kainique. Ces traitements provoquent de fortes lésions dans l'hippocampe et déclenchent, après un temps de latence, des crises épileptiques généralisées spontanées. Dans le modèle d'ELT décrit ici, tout commence par une petite lésion initiale produite par une injection unilatérale d'une quantité minimale d'acide kainique directement dans l'hippocampe de la souris adulte. Cette lésion augmente graduellement en raison d'une dégénérescence progressive de la

région CA1 de l'hippocampe et d'une dispersion des cellules en grain du gyrus dentelé, deux phénomènes typiques de l'ELT. Après une latence de deux semaines environ, des crises focales se produisent spontanément, en alternance avec des activités intercritiques, qui peuvent être observées tout au long de la vie des souris traitées. La claire séparation temporelle entre la lésion initiale et la phase chronique permet d'étudier à la fois les mécanismes de l'épileptogenèse et de la répétition des crises spontanées. En particulier, il est démontré que la phase chronique est marquée par une forte augmentation de la neurotransmission GABAergique dans le gyrus dentelé, bien que l'injection d'acide kaïnique détruise sélectivement certains types de neurones GABAergiques. La plasticité des cellules épargnées par la lésion initiale pourrait donc représenter un mécanisme compensateur activé par la survenue des crises focales récurrentes.

Epileptologie 2004; 21: 21 – 28

*Grant support: Swiss National Science Foundation

Acquired epilepsies are caused by multiple factors, including traumatic brain injury, brain tumors, cerebrovascular disease, developmental malformations, central nervous system infections, perinatal insults, febrile seizures, and status epilepticus. Several of these conditions can be mimicked experimentally, offering the possibility to study causal mechanisms of epileptogenesis and both short and long-term adverse consequences of seizures [1]. Temporal lobe epilepsy (TLE) is of particular interest because it can be modeled relatively easily in laboratory animals, and because the final stages of the disease can be studied after surgical resection of the epileptic focus, thereby offering the invaluable possibility to validate the experimental models [2].

Which aspects of temporal lobe epilepsy can be studied in animal models?

Although the heading “temporal lobe epilepsy” covers all seizure types originating from the temporal lobe, one of the most frequent forms of TLE and which constitutes a large number of medically refractory epilepsies, is TLE with “hippocampal sclerosis”. This term refers to a typical lesion of the hippocampal formation and was related to epilepsy more than 150 years ago [3]. It is characterized by extensive loss of neurons and gliosis, most severe in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus and in the hilus of the dentate gyrus [4]. The neurodegeneration also affects, to a variable degree, granule cells of the dentate gyrus and CA2 pyramidal cells. The profound neuronal loss results in a marked volume reduction of the hippocampal formation, detectable by magnetic resonance imaging. While the cause of hippocampal sclerosis is not known, retrospective stu-

dies of TLE patients who underwent a surgical resection for intractable seizures have shown a correlation between febrile seizures in early childhood and the development of TLE with hippocampal sclerosis [5]. Although this correlation is disputed, it is very likely that an initial precipitating event predisposes certain patients to the development of TLE with hippocampal sclerosis.

In rodents, insults to the hippocampus induced by a status epilepticus also lead to a condition with spontaneous, unprovoked limbic seizures that mimic clinical findings. Histologically, these insults resemble hippocampal sclerosis, pointing to a selective vulnerability of certain types of hippocampal neurons, notably in the hilus of the dentate gyrus. Although the etiology underlying TLE with hippocampal sclerosis and experimentally-induced hippocampal lesions is very different, it is generally believed that common mechanisms might underlie the generation of spontaneous seizures in man and rodents [5]. Therefore, animal models constitute a valuable tool to study the pathophysiology of TLE, in spite of the inherent differences between the human and the rodent brain. In particular, experimental studies allow determining the type of lesion that might contribute to epileptogenesis, observing and manipulating the disease process before the onset of spontaneous seizures, assessing the effects of seizures on neuronal survival, and examining the chronically epileptic brain with a battery of anatomical, biochemical, pharmacological, and electrophysiological techniques [1].

TLE is a chronic disorder, which manifests itself by the sporadic apparition of seizures and other symptoms, such as the auras. It implies a permanent change in brain structure and/or function, which remains unnoticed between these episodes but is necessary for triggering seizures. Several animal models, in particular the “kindling” model of epilepsy, have been designed to investigate the nature and location of these changes. More recently, a model of febrile seizures was developed in young rats to study the long-term effects of a single episode of seizures occurring in juvenile brain [6,7].

There is no single animal model that reproduces faithfully all features of TLE with hippocampal sclerosis, and therefore each model has to be selected for addressing a specific set of questions. The mouse model described in this review is characterized by a pattern of neuronal loss comparable to hippocampal sclerosis and by the occurrence of spontaneous focal seizures that resemble the complex partial seizures seen in many patients with TLE. It presents with a unilateral hippocampal lesion, offering the advantage to investigate whether compensatory changes in the contralateral hippocampus represent endogenous anticonvulsant mechanisms preventing the spread of seizures to the intact side of the brain.

Finally, animal models have a good predictive value for the efficacy of antiepileptic drugs and for studying the mechanisms of drug resistance affecting a large

proportion of patients with partial complex seizures^[8]. Again, the mouse model described here appears to be very valuable in this respect, since it was shown to be resistant to classical anti-epileptic drugs^[9].

Classical animal models

It has been observed long ago that electrical stimulation of the brain can cause a seizure. Several regions of the temporal lobe, including the entorhinal cortex, amygdala, and hippocampal formation, are particularly sensitive to electrical stimulations, and low intensity currents are sufficient to induce epileptic seizures in these regions. The kindling model of TLE is derived from this observation (see^[2] for review). Kindling is induced by repeated applications of low intensity stimuli, which initially cause only a local excitation, without any behavioral effect. Gradually, however, each subsequent stimulation recruits a large neuronal population, resulting in electrographic seizures and ultimately in a generalized convulsion. When rats or mice are stimulated once daily, it takes about three weeks to achieve a generalized tonic-clonic seizure episode (grade 5 seizure on a scale from 0 to 5). Once established, the kindled state is permanent. Renewed application of the low intensity electrical stimulus, even after a delay of several weeks or months, will suffice to provoke a grade 5 seizure. The kindling procedure therefore demonstrates that repeated electrical stimulations of sensitive areas in the temporal lobe induce irreversible changes in the brain that greatly lower the threshold for seizures. The nature of these changes is unknown but could be related to the plasticity phenomena discussed in the accompanying articles by Stoop and McKinney. Kindling causes only moderate neuronal damage and does not lead to spontaneous seizures. It is therefore not a "state of epilepsy". Recently, two lines of rats have been bred, exhibiting "slow" and "fast" development of the kindled state^[10]. This study demonstrates a clear genetic basis for differences in susceptibility to kindling, supporting the notion of a genetic predisposition for development of TLE in man following an early precipitating event.

To produce a "state of epilepsy", characterized by the occurrence of spontaneous seizures, it is necessary to induce structural damage in the temporal lobe, in particular in the hippocampal formation. This can be achieved either by prolonged electrical stimulation, resulting in a status epilepticus, or following injection of specific drugs that produce a strong stimulation of the vulnerable regions^[2]. For example, a systemic injection of the muscarinic acetylcholine receptor agonist pilocarpine to adult rats induces a severe status epilepticus, lasting for several hours unless terminated with diazepam. A latent, seizure-free period of several weeks occurs after the status epilepticus, eventually leading to the onset of recurrent seizures, which are then observed for the entire life of the animal. Unlike in most patients with TLE, these sei-

zures are generalized, reflecting the widespread bilateral lesions caused by pilocarpine treatment in numerous brain areas, notably the entorhinal cortex, dentate gyrus, hippocampus, and several thalamic nuclei.

Instead of pilocarpine, similar effects can be produced by a potent excitatory neurotoxin, kainic acid (KA)^[11]. This substance, which activates glutamate receptors, causes widespread neuronal loss in the hippocampus due to overexcitation and excessive influx of calcium, a phenomenon called "excitotoxicity". Like pilocarpine, systemic or intracerebroventricular administration of KA causes a severe status epilepticus followed after several weeks by spontaneous recurrent seizures. KA treatment causes severe neuronal loss in the hippocampal formation, especially in the hilus of the dentate gyrus and in the CA3 area. There is less extra-hippocampal neuronal damage than after pilocarpine treatment, supporting the view that lesions of the hippocampus are important for epileptogenesis.

These models have been extensively studied because they mimic, to some extent, TLE with hippocampal sclerosis. The main differences, however, are that the drugs cause bilateral lesions and induce generalized seizures. A major finding was that chronic epilepsy is accompanied by the formation of aberrant neuronal circuits, notably due to sprouting of granule cells axons so-called mossy fibers because of their unique morphology into the molecular layer of the dentate gyrus, a feature never seen in normal brain^[12]. Mossy fiber sprouting is a prominent feature of TLE with hippocampal sclerosis and has been proposed to provide a substrate for enhanced excitability in the dentate gyrus. Recent studies have shown, however, that this form of structural plasticity is not required for the onset of spontaneous recurrent seizures in animal models of TLE^[13]. Its significance in human TLE remains debated.

The mouse kainate-model of temporal lobe epilepsy

This model was developed following the chance observation that injection of a very small dose of KA directly into the hippocampus of adult mice causes striking morphological changes over the course of several weeks (**figure 1**) without producing generalized seizures^[14]. The authors of the initial report observed a profound degeneration of the CA1 region of the hippocampus and a striking enlargement of the dentate gyrus, due to the hypertrophy and dispersion of granule cells. It was shown in a subsequent study that these mice develop spontaneous focal seizures in the lesioned hippocampal formation^[15]. Finally, a detailed histological and functional characterization of KA-treated mice demonstrated that this model replicates several major features of TLE with hippocampal sclerosis^[16], and it is now being extensively used to study experimentally pathophysiological mechanisms of TLE *in vivo*.

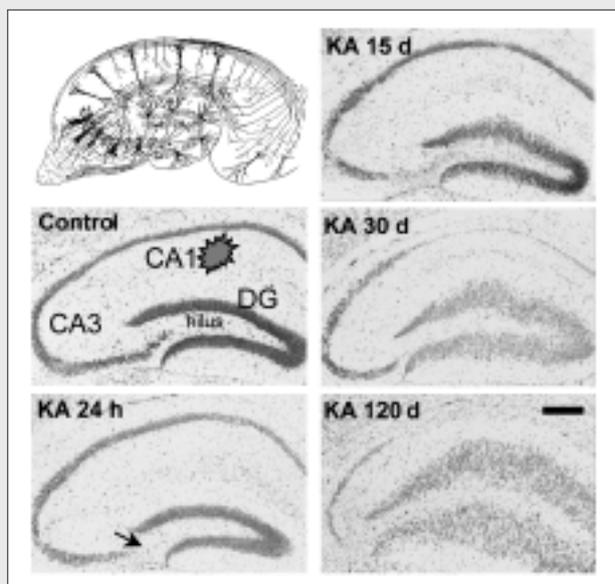


Figure 1: Gradual degeneration of the hippocampus and hypertrophy of the dentate gyrus following a unilateral injection of kainic acid (KA) in adult mouse. A diagram (adapted from [17]) depicting the main types of neurons and the circuitry of the hippocampus is given for orientation. Photomicrographs of Nissl-stained sections are shown to illustrate the cytoarchitecture of the mouse hippocampal formation in control (untreated mouse) and at the given time-points following KA injection (indicated by the orange symbol). Note the loss of neurons in the hilus and CA3 region (arrow) as soon as 1 day after the lesion, and the gradual disappearance of the CA1 area over the next few months. Starting at 2 weeks post-KA, the dispersion of granule in the dentate gyrus (DG) becomes evident. After 4 months, the enlarged dentate gyrus occupies most of the volume of the original hippocampal formation. Scale bar, 200 μm .

The main features of the model

One of the most interesting features of this model is the slow, but gradual progression of neurodegeneration in the KA-injected hippocampal formation, leading to a profound atrophy of the hippocampus [16, 18] (**figure 1**). The time course of neurodegeneration, along with the changes in EEG patterns, allows distinguishing three phases in the disease process [9] (**figure 2**): The initial phase, characterized electrophysiologically by a non-convulsive status epilepticus (**figure 2B**), corresponds to the acute excitatory and neurotoxic effects of KA. When examined histologically after 24 h, the treatment causes a local lesion in CA1 around the injection site and an extensive loss of neurons in the hilus and in the distal (hilar) part of CA3 (**figure 1**). The second phase lasts about 2 weeks and corresponds to the latent phase of the pilocarpine model. EEG recordings of the injected hippocampus revealed a disappearance of the normal activity pattern, in particular, the occurrence of theta

rhythms during exploration and active behavior (**figure 2A**). Instead, it is replaced by a low amplitude activity interrupted at irregular intervals by isolated spikes and waves, but no seizures (**figure 2C**) [9]. During this phase, there is a slow progression of the lesion in CA1, evidenced by increasing neuronal loss in the pyramidal cell layer (**figure 1**). Finally, the chronic phase, which starts by the occurrence of the first recurrent seizure and which leads after about four months to a complete degeneration of the CA1 region and to the hypertrophy of the dentate gyrus noted in the initial report (**figure 1**). During the chronic phase, mice experience frequent recurrent seizures interspaced by isolated spikes and waves of large amplitude, typical for interictal activity [9] (**figures 2D, E**). Most strikingly, seizures are unilateral, restricted to the lesioned hippocampal formation, whereas interictal spikes and waves can be recorded also contralaterally. Only occasionally do seizures spread to the cerebral cortex and to the contralateral hippocampus, resulting in secondary generalization [9]. In mice recorded up to one year after KA injection, the length and frequency of recurrent seizures did not change over time, indicating that the chronic state is stable [15].

The three distinct stages of the model allow several conclusions. First, while the initial lesion in CA1 and the loss of neurons in the hilus and CA3 result from the neurotoxic action of KA, the delayed degeneration of the entire CA1 region most likely has another cause. It is not known why these cells die, or whether recurrent seizures contribute to neurodegeneration. For instance, inflammatory mechanisms triggered by the KA-induced lesion might also contribute to the delayed loss of neurons in CA1. The mouse KA model therefore offers an excellent opportunity to study the mechanisms of neuronal and to develop therapeutic strategies based on neuroprotection. Secondly, the acute damage induced by KA is not sufficient for triggering the onset of recurrent seizures. Additional mechanisms, which develop during the latent phase, are necessary. Thirdly, recurrent seizures start before the degeneration of the CA1 area is much advanced. Hippocampal sclerosis might therefore be a consequence rather than a cause of recurrent seizures in TLE.

The hypertrophy and dispersion of granule cells in the dentate gyrus is another striking feature of this model (**figure 1**). This process starts towards the end of the latent phase and evolves gradually over a period of about two months [14]. At the end, granule cells are dispersed and markedly enlarged in volume. Their dendritic tree is also expanded and becomes covered by numerous spines [19]. As a result, the volume of the dentate gyrus is significantly increased. The onset of recurrent seizures matches the beginning of the dispersion, but it is not clear how the two phenomena are related. Granule cell dispersion is also a feature of human TLE with hippocampal sclerosis [20], but it is not observed in all patients and it is much less pronounced than in the KA-mouse model. The hypertrophy of granule cells is

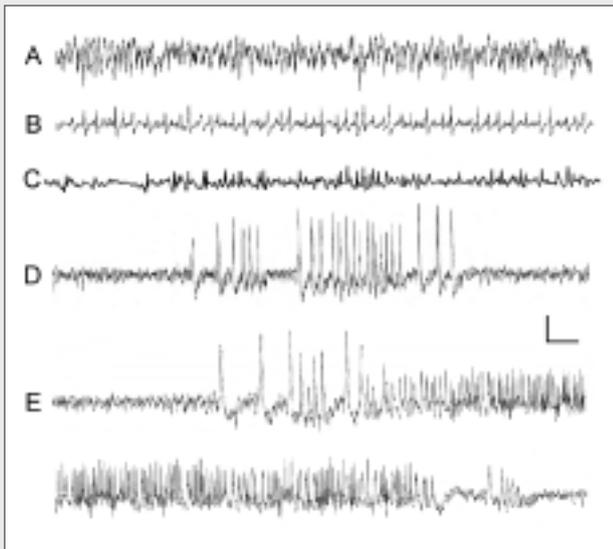


Figure 2: Traces from intrahippocampal EEG recordings taken at various stages after KA treatment with a bipolar electrode implanted in the hippocampus (see [9] for details). **A)** Typical theta-like activity in a control mouse during exploratory behavior; **B)** Status epilepticus recorded upon recovery from anesthesia shortly after the KA injection; **C)** Irregular spiking activity during the latent phase. Note the overall decrease in amplitude and the absence of rhythmic activity compared to control; **D)** Large amplitude, low frequency spikes and waves characteristic of interictal activity during the chronic phase. These spikes and waves were seen either isolated or grouped in short trains as depicted; **E)** Example of a recurrent seizure during the chronic phase. Typically, seizures started with a few large amplitude spikes and waves, followed by regular spikes with higher frequency and gradually decreasing amplitude. Such seizures were seen at variable frequencies (up to several per hour), mainly during the resting phase of the mice. Horizontal scale: 1 second (A-C) ; 1.5 second (D-E); vertical scale : 1 mV (A-C) ; 1.5 mV (D-E).

accompanied by numerous neurochemical changes in these neurons (see next section). They are therefore likely to become functionally altered during the chronic phase of the model.

Finally, during the entire disease process, the contralateral hippocampal formation, which is not lesioned by the KA injection, remains structurally largely intact [16]. In spite of the numerous synaptic connections between the two sides of the brain, the repeated occurrence of seizures in the KA-treated side does not seem to induce major alterations on the other side. It will therefore be of major interest to study the endogenous adaptations preventing the spread of seizures to the contralateral hippocampus.

Mechanisms of epileptogenesis

Similar to the classical rat models of TLE discussed above, vulnerable populations of neurons, notably in

the hilus of the dentate gyrus, are irreversibly destroyed during the KA-induced status epilepticus. As noted above, this lesion does not result in spontaneous seizures, suggesting that additional adaptation mechanisms are required. Since seizures generally originate from an imbalance between excitatory and inhibitory inhibition, a detailed morphological analysis of KA-treated mice was undertaken to determine whether a change in inhibitory neurons, the so-called GABAergic interneurons, underlies the onset of recurrent seizures. In the hippocampal formation, interneurons are highly specialized cells, which use the inhibitory neurotransmitter GABA to control the activity of dentate gyrus granule cells and CA1-CA3 pyramidal cells. These cells can be visualized in brain sections with several markers, which label each a distinct subpopulation of interneurons. To determine whether some interneurons are destroyed by KA treatment, brain sections from control and KA-treated mice were examined at different time-points after the injection with markers of interneurons. These investigations revealed an irreversible disappearance of several of these markers within 1 day after KA treatment, even in hippocampal regions where the pyramidal cells did not appear to be lesioned by the neurotoxin (figures 3A-B) [16]. This finding suggested that certain interneurons are highly vulnerable to the acute toxic action of KA, resulting in a reduction of GABAergic inhibition at the onset of the latent phase. Pronounced changes were observed also in dentate gyrus granule cells, notably a strong overexpression of a neuropeptide, named NPY (figure 3C), which has been suggested to have an anticonvulsant action in the brain [21]. It is not known whether NPY is involved in seizure suppression during the latent phase, but this possibility is currently being investigated.

Compensatory adaptations during the chronic phase

TLE with hippocampal sclerosis offers the advantage, as noted in the introduction, that final stages of the disease can be studied in tissue resected from patients suffering from intractable seizures. Numerous studies have reported changes in the expression or distribution of neurotransmitters, their receptors, ions channels, and other components of interneurons signaling in TLE with hippocampal sclerosis. The significance of these changes for the pathophysiology of TLE has remained uncertain, because it is not known whether they are established during the latent phase of the disease, or whether they occur as a consequence of seizures. In the mouse KA model, the clear separation between the two phases allows to distinguish causes and consequences.

We have focused our attention primarily onto the GABAergic system to investigate the long-term consequences of the loss of GABAergic neurons occurring during the acute phase and to determine whether

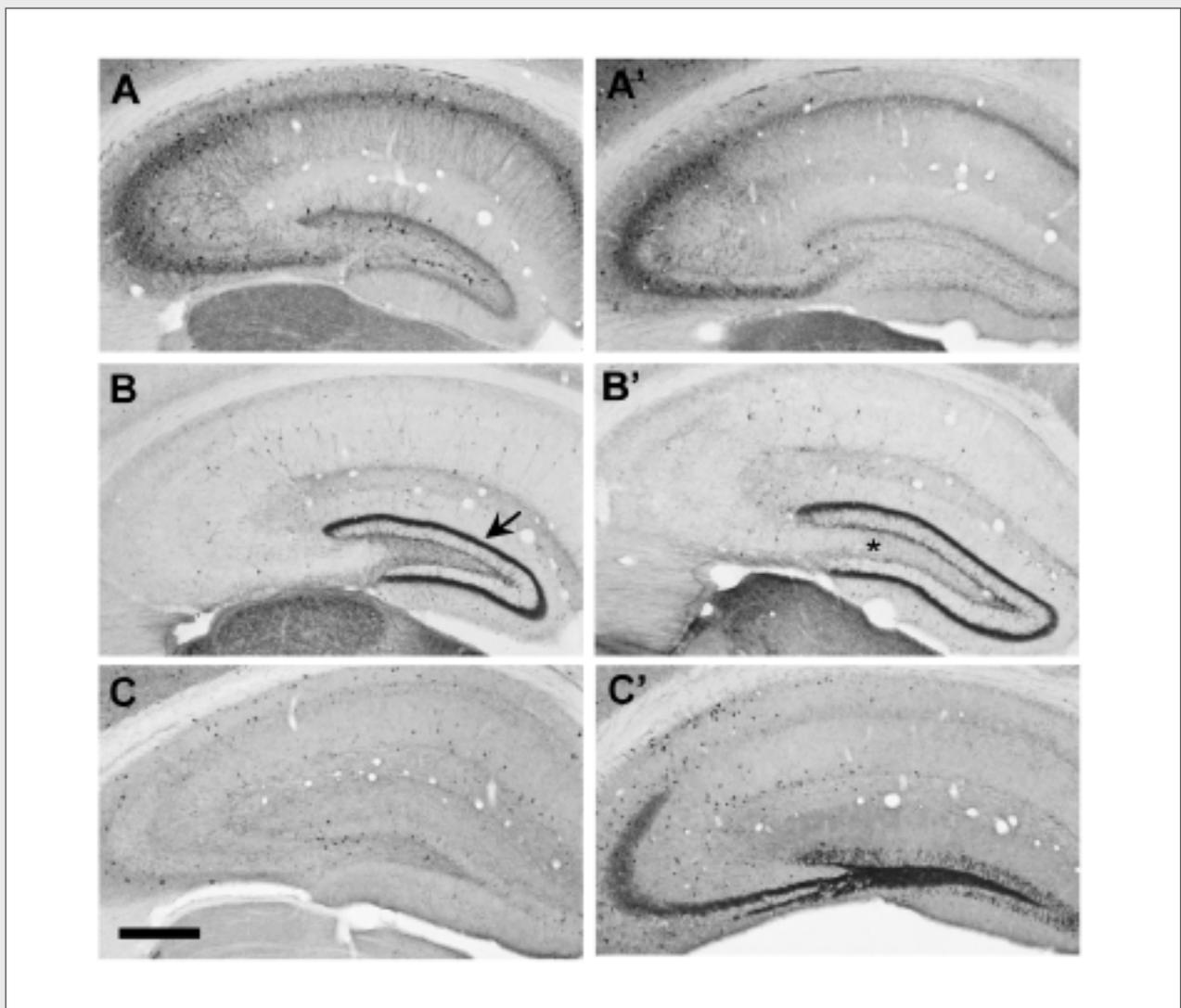


Figure 3: Neurochemical changes during the latent phase after unilateral intrahippocampal KA injection. **A-A'**: Immunohistochemical staining for the calcium-binding protein parvalbumin, which marks a subpopulation of interneurons in the hippocampus and dentate gyrus (**A**). This marker labels their cell body, dendrites, and axons that form a dense plexus in the granule cell layer of the dentate gyrus and in the CA3-CA1 pyramidal cell layer. Note that most parvalbumin-positive cells have disappeared in the dentate gyrus and in CA1 at 24 h after KA injection (**A'**). **B-B'**: Unchanged staining for calretinin, another calcium-binding protein that marks a distinct population of interneurons, as well as a very dense layer of axons in the molecular layer of the dentate gyrus (arrow). Few changes are visible in KA-treated hippocampus (**B'**), except for the reduced staining of the hilus (*), reflecting the acute loss of cells in this area. **C-C'**: Up-regulation of NPY, a neuropeptide, in granule cells and in their axon innervating the CA3 pyramidal cells (mossy fibers), as seen at 24 hours after KA injection. Note that NPY also is present in isolated interneurons, which appear more strongly stained than in control. Scale bar, 100 μm .

changes in GABA_A receptors, which have been observed in human [22], also occur in the KA-model of TLE. GABA_A receptors are formed by the assembly of five proteins, so-called subunits, which form an ion channel permeable for chloride ions in the membrane of neurons. They play an essential role in the control of neuronal excitability and a reduction in GABA_A receptor function can induce seizures, as discussed in the accompanying articles. However, GABAergic transmission also contributes to synchronize the activity of neurons. Enhancing GABA_A receptor function above a certain level causes hypersynchronicity and seizure-like discharges. Therefore, either too little or too much GABAergic trans-

mission can lead to seizures.

The analysis of GABA_A receptors in the hippocampal formation of KA-treated mice using immunohistochemistry revealed a marked increase in the dentate gyrus (**figure 4A**), selectively during the chronic phase [16,18]. Therefore, the hypertrophy of granule cells is accompanied by a higher amount of GABA_A receptors in these neurons. The increase was particularly marked in the cell body layer (**figure 4A**), where numerous GABAergic synapses are normally formed. This result was unexpected, in view of the partial loss of interneurons that characterizes this model, but it suggested that the remaining GABAergic cells form novel axons and synapses

during the chronic phase, possibly to compensate against the increased activity during the seizures. This possibility was examined using a marker of GABAergic axons, the enzyme “glutamic acid decarboxylase”, which is responsible for GABA synthesis and is localized selectively in GABAergic neurons. This study indicated that the density of GABAergic axons, which is dramatically reduced after KA-injection, gradually increases during the chronic phase (figure 4B), especially in the

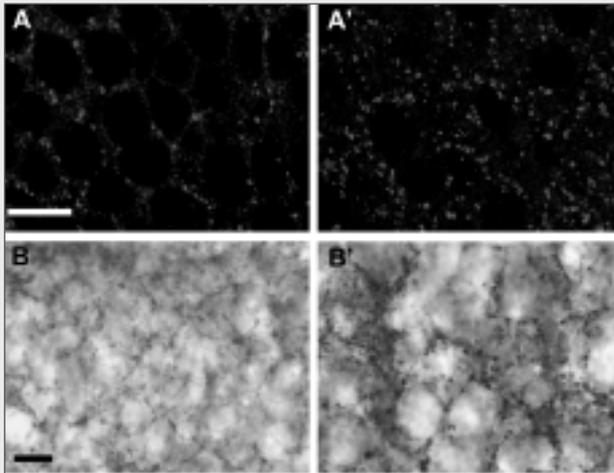


Figure 4: Up-regulation of GABA_A receptors (A-A') and GABAergic axons (B-B') in the granule cell layer during the chronic phase after KA treatment. GABA_A receptors were labeled by immunofluorescence using an antibody against the $\alpha 2$ subunit and visualized by confocal laser scanning microscopy (see [18] for details). They appear as brightly labeled dots, representing individual synapses around the cell body of granule cells. Note that the density of these dots is markedly increased four weeks after KA treatment. GABAergic axons were stained by immunoperoxidase staining with antibodies against glutamic acid decarboxylase and visualized by light-microscopy. They appear as dark brown dots on the surface of unlabeled granule cells. The size and density of these dots, which represent synaptic contacts matching the receptors depicted in A-A', are increased in KA-treated dentate gyrus granule cell layer. Scale bars 10 μ m.

granule cell layer of the dentate gyrus. This effect was seen after the onset of recurrent seizures and is therefore a consequence rather than a cause of epilepsy. It is not known, however, whether this abnormally high number of GABAergic axons and synapses represents a protective mechanism against seizures, or whether it facilitates additional seizures due to hypersynchronization.

The observation that the GABAergic system is increased during the chronic phase of TLE, both in human tissue and in sections from KA-treated mice strongly reinforces the validity of this model for studying TLE with hippocampal sclerosis [23]. It was unexpected, because it makes it difficult to explain why hippocampal neuron becomes more excitable when a transmitter system, which normally serves as a “brake” in the brain, is increased. The response to this paradox will re-

quire further analysis. Given the numerous parallels between the model and TLE with hippocampal sclerosis, we can expect the answer to this question to help us understand the pathophysiology of the disease.

The possibility of modeling TLE with hippocampal sclerosis in a mouse offers novel avenues for genetic analyses, because of the availability of numerous lines of mice carrying specific mutations. The KA-model of TLE will therefore represent an important tool for future research aiming at understanding the role of specific genes in epilepsy. Finally, as outlined in the following article, this model is well suited for testing novel therapeutic strategies.

References

1. White HS. Animal models of epileptogenesis. *Neurosci* 2002; 5955: 57-514
2. Coulter DA, McIntyre DC, Löscher W. Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Pathol* 2002; 12: 240-256
3. Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL. Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev* 1998; 20: 563-573
4. Babb TL, Najm M. Hippocampal sclerosis: pathology, electrophysiology, and mechanisms of epileptogenesis. In: Wyllie E (ed): *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*. Third Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 105-114
5. Dalby NO, Mody I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol* 2001; 14: 187-192
6. Brewster AL, Bender RA, Chen Y et al. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 2002; 22: 4591-4599
7. Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nature Medicine* 1999; 5: 888-894
8. Dudek FE, Staley K, Sutula TP. The search for animal models of epileptogenesis and pharmacoresistance: are there biologic barriers to simple validation strategies? *Epilepsia* 2002; 43: 1275-1277
9. Riban V, Bouillere V, Pham-Lè BT et al. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci* 2002; 112: 101-111
10. McIntyre DC, Kelly ME, Dufresne C. FAST and SLOW amygdala kindling rat strains: Comparison of amygdala, hippocampal piriform and perirhinal cortex kindling. *Epilepsy Res* 1999; 35: 197-209
11. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci* 1985; 14: 375-403
12. Sutula T, Xiao-Xian H, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1988; 239: 1147-1150
13. Maru E, Kanada M, Ashida H. Functional and morphological changes in the hippocampal neuronal circuits associated with epileptic seizures. *Epilepsia* 2002; 43: 44-49
14. Suzuki F, Junier MP, Guilhem D et al. Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci* 1995; 64: 665-674
15. Bouillere V, Ridoux V, Depaulis A et al. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice:

- EEG, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neurosci* 1999; 89: 717-729
16. Bouillere V, Loup F, Kiener T et al. Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA_A-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2000; 10: 305-324
 17. Swanson N, Swanson LW. *New ideas on the structure of the nervous system in man and vertebrates. Translation of the original book of Santiago Ramón y Cajal.* Cambridge, Massachusetts: The MIT Press, 1990
 18. Knuesel I, Zuellig RA, Schaub MC, Fritschy JM. Alterations in dystrophin and utrophin expression parallel the reorganization of GABAergic synapses in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1113-1124
 19. Makiura Y, Suzuki F, Chevalier E, Onteniente B. Excitatory granule cells of the dentate gyrus exhibit a double inhibitory neurochemical content after intrahippocampal administration of kainate in adult mice. *Exp Neurol* 1999; 159: 73-83
 20. Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1990; 535: 195-204
 21. Bouillere V, Schwaller B, Schurmans S et al. Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin. *Neurosci* 2000; 97: 47-58
 22. Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y et al. Selective alterations in GABA_A receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2000; 20: 5401-5419
 23. Fritschy JM, Kiener T, Bouillere V, Loup F. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 1999; 34: 435-445

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy

Universität Zürich

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Winterthurerstrasse 190

CH 8057 Zürich

Tel. 0041 1 635 59 26

Fax 0041 1 635 68 74

fritschy@pharma.unizh.ch

Detlev Boison, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich, Departement für Chemie und Angewandte Biowissenschaften, ETH Zürich

Zusammenfassung

Adenosin ist ein körpereigener inhibitorischer Botenstoff, der im Gehirn neuroprotektive und antiepileptische Wirkungen entfaltet. Adenosin wird natürlicherweise während eines akuten Sauerstoffmangels bei einer Ischämie oder während eines epileptischen Anfalls ausgeschüttet, mit der körpereigenen Funktion, in solchen Stress-Situationen Nervenzellen zu schützen und epileptische Anfälle wieder zu beenden. Adenosin wurde daher auch als körpereigene antiepileptische Substanz bezeichnet. Aufgrund von starken Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf-System kann Adenosin nicht systemisch für die Epilepsitherapie verabreicht werden. Eine lokale und nebenwirkungsfreie Anwendung von Adenosin erscheint jedoch möglich durch Implantation von Adenosin-freisetzenden Zellen in die Nähe eines epileptischen Fokus. In diesem Beitrag wird gezeigt, wie Zellen gentechnisch verändert werden, so dass sie therapeutische Mengen Adenosin freisetzen und wie solche gentechnisch veränderten Zellen zur Therapie der pharmakoresistenten Epilepsie eingesetzt werden können. Experimentell konnte mit dieser Strategie bereits eine effektive Anfallskontrolle im Tiermodell demonstriert werden.

Adenosine Cell Therapy for Epilepsy

Adenosine is an endogenous inhibitory neuromodulator with neuroprotective and antiepileptic activity. Adenosine is released naturally during acute oxygen stress in ischemia and during epileptic seizures, presumably with the aim to safeguard neurons in stress-situations and to provide termination of epileptic seizures. Adenosine has therefore been termed the brain's endogenous anticonvulsant. Due to strong cardiovascular side effects adenosine cannot be used for the systemic therapy of epilepsy. However, a local and side-effect free therapeutic application of adenosine appears to be feasible by implantation of adenosin-releasing cells into the vicinity of an epileptic focus. In this report it will be demonstrated how cells can be genetically engineered to release therapeutic amounts of adenosine and how these cells could be used for the therapy of pharmacoresistant epilepsy. Experimentally, this strategy has already been used to suppress seizure activity in animal models of focal epilepsy.

Epileptologie 2004; 21: 29 – 36

Einleitung

Eines der grössten Probleme der Epilepsieforschung besteht heute in der Entwicklung verbesserter antikonvulsiver Therapien. Effektive Therapien mit geringen Nebenwirkungen sind leider begrenzt. Dies betrifft vor allem „schwierige“, häufig pharmakoresistente Fälle mit komplex partialen (fokalen) Anfällen. Zudem ist die Pharmakotherapie der Epilepsie meistens palliativ, da sie darauf abzielt, im Wesentlichen die Symptome der Epilepsie, nämlich Anfälle, zu unterdrücken^[1]. Ein Ziel der modernen Epilepsieforschung ist somit die Entwicklung kausaler Therapien. Seit einigen Jahren werden daher verschiedene Strategien der *in vivo*- und der *in vitro*-Gentherapie für ihren Nutzen in der Epilepsitherapie evaluiert.

Ein molekularer Ansatz, welcher nicht nur auf die Epilepsitherapie beschränkt ist, besteht in der Verwendung von Zellen, die in der Kulturschale gentechnisch so modifiziert werden können, dass sie eine therapeutische Substanz (z.B. ein Antikonvulsivum) freisetzen. Diese modifizierten Zellen lassen sich dann in einem zweiten Schritt gezielt in die Region transplantieren, in welcher die therapeutische Wirkung zum Tragen kommen soll. Für die Entwicklung solcher *ex vivo*-Gentherapien gelten dieselben Kriterien, wie für die Entwicklung herkömmlicher Pharmaka: maximale Effizienz, Spezifität und Persistenz bei minimaler Toxizität. Es gibt heute eine Vielzahl von möglichen Zelltypen, die für eine Zelltherapie in Frage kommen. Patienteneigene autologe Zellen lassen sich nach genetischer Veränderung problemlos ohne Immunsuppression reinjizieren. Diese Strategie wird heute bereits erfolgreich in klinischen Studien bei Bluterkrankungen angewendet^[2]. Logischerweise ist nicht jeder Zelltyp leicht zugänglich, so dass auch heterologe Zellen von einem anderen Organismus derselben Art Verwendung finden können. So werden beispielsweise dopaminerge Neuronen, die aus menschlichen Föten gewonnen werden, als Hirn-Implantate bei der Parkinson'schen Krankheit verwendet^[3]. Xenogene Zellen, das sind Zellen aus einer anderen Spezies, aber auch Tumorzellen, lassen sich in verkapselter Form (s.u.) transplantieren, ohne dass sich die Notwendigkeit einer Immunsuppression ergibt^[4]. Neuerdings wird auch die therapeutische Anwendung von embryonalen und adulten Stammzellen intensiv diskutiert^[5,6]. Wie lassen sich nun Zellimplantate für die Therapie der Epilepsie nutzen?

Zellimplantate bieten die Möglichkeit, eine antikonvulsive Substanz, die systemisch aufgrund von Nebenwirkungen nicht verabreicht werden kann, lokal in oder

in der Nähe von einem epileptischen Fokus zur Anwendung zu bringen. Adenosin ist solch eine Substanz. Adenosin hat als inhibitorischer Neuromodulator im Zentralnervensystem potente antiepileptische und neuroprotektive Eigenschaften^[7]. Als Neuromodulator kontrolliert Adenosin die Effizienz synaptischer Transmission, ohne jedoch selber direkt als Transmitter zu wirken und ohne vektoriell Informationen zwischen Nervenzellen zu übertragen. In Gewebekultur-Experimenten steigen nach einer elektrischen Stimulation extrazelluläre Adenosin-Spiegel sehr schnell an. Die Zunahme extrazellulären Adenosins beginnt jeweils 10 Sekunden nach einer Stimulation und erreicht ein Maximum nach 160 bis 180 Minuten. Diese erhöhten Adenosin-Spiegel sprechen dafür, dass Adenosin ebenfalls für die postiktäre Refraktärzeit mitverantwortlich ist^[8]. In Untersuchungen an Patienten konnte bestätigt werden, dass während eines epileptischen Anfalls grosse Mengen Adenosin ausgeschüttet werden, möglicherweise mit der körpereigenen Funktion, einen epileptischen Anfall wieder zu beenden^[8]. Erhöhte Adenosin-Konzentrationen wurden ebenfalls in einer Hirn-Zyste eines Patienten gefunden, der keine epileptischen Anfälle hatte, obwohl die Zyste hochgradig erhöhte Spiegel an Glutamat und Aspartat – anfallsfördernden Substanzen – aufwies^[9]. Möglicherweise vermittelten die erhöhten Adenosin-Werte hier eine Anfallssuppression.

Zahlreiche Beobachtungen implizieren, dass endogenes Adenosin einen tonischen antikonvulsiven Effekt ausübt. Tatsächlich haben Adenosin-Rezeptor-Antagonisten eine prokonvulsive Wirkung, ohne jedoch im gesunden Organismus Anfälle auszulösen. Die prokonvulsiven Eigenschaften der Adenosin-Rezeptor-Antagonisten führen zu einer zeitlichen Verlängerung von epileptischen Anfällen, zu einer Verkürzung der postiktären Refraktärzeit und können ein Muster von wiederkehrenden Anfällen in einen Status epilepticus überführen. Aus diesen und oben aufgeführten Gründen wurde Adenosin auch als körpereigenes Antikonvulsivum bezeichnet^[10].

Neben den antikonvulsiven Eigenschaften von Adenosin sind auch dessen neuroprotektive Eigenschaften von erheblicher Bedeutung in der Therapie der Epilepsie. So konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Stress-Situationen Adenosin zu einer Reduktion des Stress-induzierten neuronalen Zelltods führte^[11]. Dies ist von Bedeutung in Anbetracht des extensiven neuronalen Zelltods, welcher als Konsequenz von wiederholter Anfallsaktivität auftritt^[12]. Aufgrund der hier beschriebenen Kombination von antikonvulsiven und neuroprotektiven Eigenschaften ist somit das Adenosin-vermittelte neuromodulatorische System von besonderem Interesse für die Epilepsitherapie.

1. Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren

Warum wurde Adenosin bisher noch nicht zur Therapie der Epilepsie eingesetzt? Adenosin entfaltet seine protektive Wirkung durch Bindung an Adenosin-Rezeptoren^[13], vornehmlich durch Aktivierung von inhibitorischen Adenosin A₁-Rezeptoren, den häufigsten der vier (A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃) metabotropen Adenosin-Rezeptoren im Zentralnervensystem^[14]. Diese Rezeptoren sind im Organismus weit verbreitet, unter anderem auch im Herz-Kreislauf-System. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt dort zur Erniedrigung von Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur, sowie zu Sedation und Einschränkungen der motorischen Funktionen, also starke Nebenwirkungen, die bei systemischer Gabe von Adenosin oder Adenosin-Rezeptor-Agonisten zu erwarten wären. Darüber hinaus hat Adenosin im Kreislaufsystem nur eine sehr kurze Halbwertszeit, so dass sehr hohe Dosen verabreicht werden müssten, um eine Wirkung im Gehirn zu erzielen und Adenosin-Rezeptor-Agonisten passieren die Blut-Hirn-Schranke nur unzureichend. Daher erscheint es therapeutisch sinnvoller, extrazelluläre Adenosin-Spiegel lokal zu erhöhen durch eine Manipulation des Adenosin-Metabolismus und/oder Transports.

Interessanterweise betrifft der inhibitorische Effekt von Adenosin im Zentralnervensystem vorwiegend die exzitatorische Neurotransmission. So konnte gezeigt werden, dass in einigen Hirnregionen, wie dem Hippokampus, die Aktivierung von A₁-Rezeptoren selektiv die exzitatorische aber nicht die inhibitorische Neurotransmission hemmt^[15]. Diese Hemmung der synaptischen Transmission beruht im Wesentlichen auf einem präsynaptischen Effekt, nämlich auf der Fähigkeit von A₁-Rezeptoren, die induzierte Freisetzung von Glutamat zu hemmen. Bei dieser Kontrolle der Glutamat-Freisetzung ist entweder eine G-Protein-abhängige Hemmung des Calcium-Einstroms über spannungsabhängige Calciumkanäle oder eine verminderte Empfindlichkeit des für die Neurotransmitter-Freisetzung verantwortlichen Calcium-Sensors verantwortlich.

Die Effekte von Adenosin sind jedoch nicht auf die präsynaptische Kontrolle der Glutamat-Freisetzung beschränkt. In der Tat wurden A₁-Rezeptoren sowohl postsynaptisch als auch ausserhalb von Synapsen gefunden. Postsynaptisch führt eine Aktivierung von A₁-Rezeptoren zu einer Hemmung von NMDA-Rezeptoren, sowie von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen. Die A₁-Rezeptor-vermittelte Kontrolle von NMDA-Rezeptoren ist möglicherweise eine Erklärung für die neuroprotektiven Eigenschaften von Adenosin. Ausserhalb der Synapsen setzt Adenosin die neuronale Aktivität herab durch Aktivierung von Kalium-Kanälen, wodurch eine neuronale Hyperpolarisation erzeugt wird. Dies spielt eine wichtige Rolle in pathologischen Situationen der Übererregung.

Durch Verwendung stabiler und selektiver Adenosin-Rezeptor-Agonisten, lässt sich prüfen, welche

Adenosin-Rezeptoren die antiepileptische Wirkung von Adenosin im Gehirn vermitteln. Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass die Verwendung von A₁-Rezeptor-Agonisten antikonvulsive Eigenschaften in verschiedenen Modellen der Epilepsie zeigten. Neben der Aktivierung von A₁-Rezeptoren scheint auch die Aktivierung von Adenosin A_{2a}-Rezeptoren an der Anfallssuppression beteiligt zu sein [16,17]. Allerdings ist die systemische Verabreichung von Adenosin-Rezeptor-Agonisten mit erheblichen kardiovaskulären und sedativen Nebenwirkungen verbunden, woraus sich die Notwendigkeit einer lokalen Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren zur Anfallskontrolle ergibt.

2. Anfallsunterdrückung in pharmakoresistenter Epilepsie

Es wird davon ausgegangen, dass bis zu einem Drittel aller Epilepsie-Patienten pharmakoresistent sind. Ein Charakteristikum der Pharmakoresistenz besteht in der Beobachtung, dass viele Patienten, die gegen ein antiepileptisches Medikament (AED für „antiepileptic drug“) resistent sind, auch gegenüber weiteren AEDs resistent sind. Neuere Untersuchungen zeigen, dass häufig eine Überexpression von sogenannten „multi-drug-Transportern“ in den Membranen der Blut-Hirnschranke für die Entstehung der Pharmakoresistenz verantwortlich ist [18].

Eignet sich nun Adenosin für die Therapie der pharmakoresistenten Epilepsie? Zur Beantwortung dieser Frage steht für die Forschung ein Mausmodell für pharmakoresistente Epilepsie zur Verfügung. Nach einer Injektion einer winzigen Menge Kainat in einen Hippo-

kampus der Maus entsteht dort eine primäre Läsion, die nach einer Latenzzeit zu einer fokalen Epileptogenese mit chronischem Verlauf führt. Dieses Tiermodell widerspiegelt ziemlich präzise die humane Form der pharmakoresistenten mesialen Temporallappenepilepsie. Es konnte gezeigt werden, dass weder Carbamazepin, noch Valproat oder Phenytoin in der Lage waren, die chronische Anfallsaktivität in diesen Tieren zu unterdrücken [19]. Die EEG-Ableitungen in **Abbildung 1** zeigen, dass Injektion von Carbamazepin das Anfallsmuster der Tiere nicht verändert. Sowohl nach Carbamazepin als auch nach Vehikel-Injektionen (Kontrolle) zeigen sich im EEG wiederkehrende epileptische Entladungen. Im Gegensatz dazu führt die Applikation eines selektiven Adenosin A₁-Rezeptor-Agonisten (CCPA, = 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosin) zu einer vollständigen Unterdrückung der Anfallsaktivität [20]. In einem Kontroll-experiment konnte die anfallsunterdrückende Wirkung von CCPA aufrechterhalten werden, wenn CCPA mit einem nicht hirngängigen unselektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten (8-Sulfophenyltheophyllin zur selektiven Blockade der peripheren Adenosin-Rezeptoren) kombiniert wurde. Diese Experimente zeigen, dass über zentrale Aktivierung des Adenosin-Systems pharmakoresistente Anfälle unterdrückt werden können. Zur Vermeidung peripherer Nebenwirkungen erscheint daher auch der lokale Einsatz von Adenosin in der Nähe eines epileptischen Fokus mit Hilfe von implantierten Adenosin freisetzenden Zellen geeignet zur Unterdrückung pharmakoresistenter Anfälle.

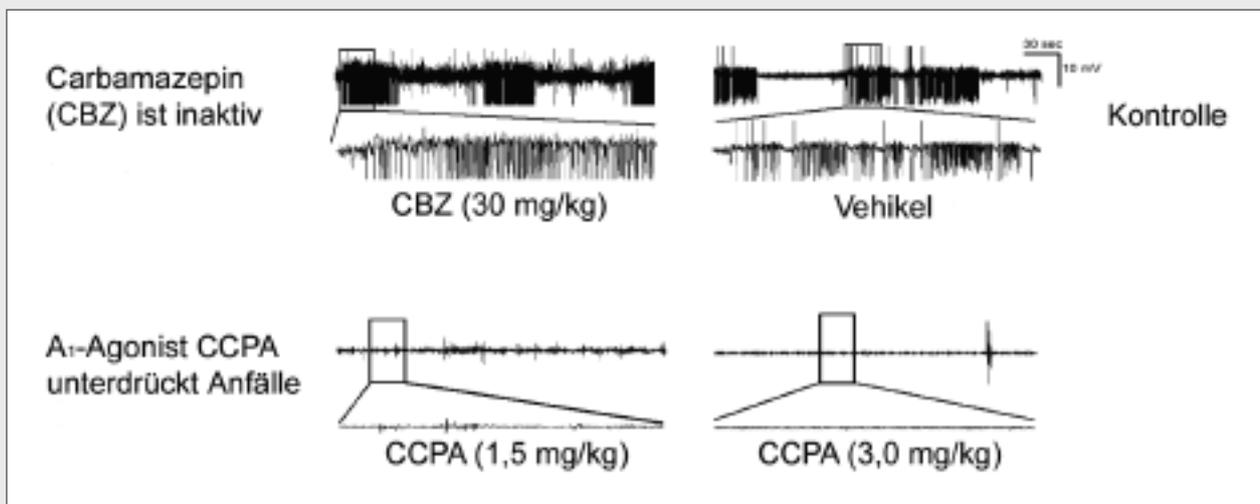


Abbildung 1: Anfallsunterdrückung von Carbamazepin-resistenten Anfällen durch Aktivierung von Adenosin-A₁-Rezeptoren. Pharmakoresistente Anfälle im Kainat-Modell für chronische Temporallappenepilepsie in der Maus lassen sich nicht durch Carbamazepin beeinflussen (oben). Das Entladungsmuster nach Carbamazepin-Injektion (oben links) unterscheidet sich nicht wesentlich von der Kontrolle (Vehikel-Injektion, oben rechts). Im Gegensatz dazu führt Aktivierung von Adenosin-A₁-Rezeptoren durch CCPA zu einer vollständigen und dosisabhängigen Anfallssuppression (unten).

3. Rolle der Adenosin-Kinase in der Epilepsie

Die extrazellulären Adenosin-Spiegel hängen direkt vom Aktivitätszustand neuronaler Kreisläufe ab. Bei niedrigfrequenter Stimulation von Nervenfasern (< 0.1 Hz) wurde eine tonische A1-Rezeptor-vermittelte Hemmung der synaptischen Transmission beobachtet [21], und extrazelluläre Adenosin-Spiegel liessen sich erhöhen durch wiederholte hochfrequente Stimulation (100 Hz) [22]. Wie jedoch werden Adenosin-Spiegel im Gehirn auf molekularer Ebene reguliert? Es gibt prinzipiell zwei Wege, über die Adenosin gebildet werden kann: Zum einen ist Adenosin ein obligates „Abfallpro-

Transporter freigesetzt wird) [14].

Adenosin kann über zwei verschiedene Reaktionen wieder entfernt werden. Das Enzym Adenosin-Deaminase bereitet Adenosin durch Desaminierung für den terminalen Abbau und die Exkretion vor. Im Gegensatz dazu kann Adenosin durch Phosphorylierung über Adenosin-Kinase dem Energie-Pool wieder zugeführt, also rezykliert werden. Zwei Argumente sprechen dafür, dass die Adenosin-Konzentrationen im Gehirn ausschliesslich durch die Aktivität der Adenosin-Kinase reguliert werden: 1. Im Gegensatz zur Adenosin-Kinase wird Adenosin-Deaminase nur in wenigen Hirnregionen und in geringen Mengen exprimiert [24]. 2. Ein spezi-

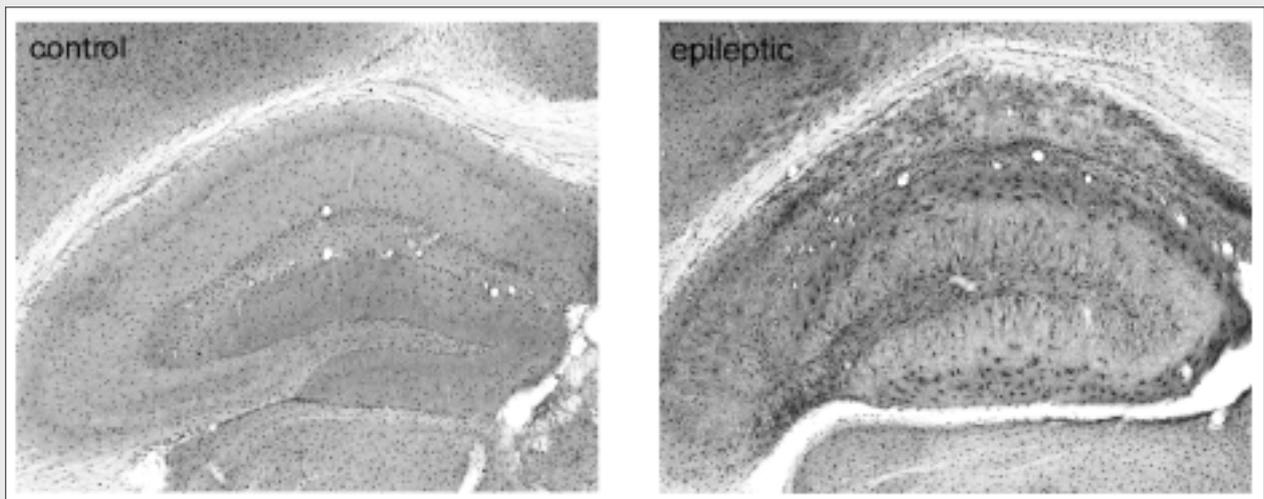


Abbildung 2: Überexpression der Adenosin-Kinase im epileptischen Hippokampus. Koronale Schnitte durch einen Kontrollhippocampus (links) und durch einen epileptischen Hippocampus vier Wochen nach der Injektion von Kainat wurden mit einem Antikörper gegen das Enzym Adenosin-Kinase angefärbt. Der Hippocampus rechts zeigt neben strukturellen (gliotischen) Veränderungen eine markante Zunahme der Adenosin-Kinase Immunoreaktivität.

dukt“ von Transmethylierungs-Reaktionen, die vor allem in der Leber ablaufen [23], zum anderen ist Adenosin eng mit dem Energiestoffwechsel der Zelle verbunden und kann über eine Dephosphorylierungskaskade von Adenosin-1,3-bisphosphat (ATP) über Adenosin-di- und -monophosphat gebildet werden. Das ist auch der Grund dafür, dass bei hohem Energieverbrauch, z.B. während eines epileptischen Anfalls, grosse Mengen Adenosin freigesetzt werden. Diese Freisetzung unter Stress-Situationen erfolgt über bidirektionale nicht-konzentrierende Nucleosid-Transporter. Darüber hinaus kann extrazelluläres Adenosin auch aus synaptisch freigesetztem ATP (ATP als Neurotransmitter) durch eine Reihe von Ectonucleotidasen gebildet werden. Die Existenz dieser beiden Wege für die Bildung extrazellulären Adenosins aus ATP legt den Schluss nahe, dass Adenosin möglicherweise zwei parallele Funktionen erfüllt, zum einen als Neuromodulator in Nicht-Stress-Situationen (in welchen extrazelluläres Adenosin weitestgehend durch Ecto-Enzyme aus synaptisch freigesetztem ATP gebildet wird), zum anderen als homöostatischer Modulator in Stress-Situationen (wenn intrazelluläres Adenosin direkt über die oben beschriebenen

fischer Inhibitor der Adenosin-Kinase (5-Iodotubercidin) führt zur Erhöhung von extrazellulären Adenosin-Spiegeln und unterdrückt die synaptische Aktivität im Hippocampus [25]. Eine Inhibition der Adenosin-Deaminase hingegen hat keinen vergleichbaren Effekt.

Die zentrale Rolle der Adenosin-Kinase in der Regulation endogener Adenosin-Spiegel legt daher die Frage nahe, welche Rolle dieses Enzym bei der Epileptogenese spielt. Im Mausmodell der pharmakoresistenten Epilepsie (s.o.) konnte gezeigt werden, dass im epileptischen Hippocampus zeitgleich mit fortschreitender Astrogliose eine Überexpression der in hippocampalen Astrozyten exprimierten Adenosin-Kinase stattfindet (**Abbildung 2**). Diese Überexpression geht einher mit einer signifikant erhöhten enzymatischen Aktivität des Enzyms [26]. Die logische Konsequenz einer erhöhten Adenosin-Kinase-Aktivität im epileptischen Hippocampus ist eine Erniedrigung der protektiven Adenosin-Spiegel. Daher kann die Überexpression von Adenosin-Kinase im gliotischen Hippocampus zur Epileptogenese und zur Aufrechterhaltung der chronischen Anfallsaktivität beitragen. Interessanterweise wurde auch im Kindling-Modell der Epilepsie in der Ratte ein Defizit im

inhibitorischen Adenosinsystem beobachtet: neben einer Abnahme der A₁-Rezeptor-Dichte im Hippokampus wurden auch reduzierte Adenosin-Spiegel beobachtet [27].

Aus diesen Befunden ergibt sich eine wichtige therapeutische Konsequenz: Rekonstitution der protektiven Adenosin-Spiegel im epileptischen Hippokampus sollte zur Anfallssuppression ausreichen und die Voraussetzung für die Entwicklung einer kausalen Epilepsie-Therapie schaffen. Somit ist das Adenosin-vermittelte neuromodulatorische System ein bedeutendes pharmakologisches „Target“.

4. Anfallsunterdrückung durch lokale Zell-Implantate

Aufgrund der vorherigen Ausführungen sollte es möglich sein, epileptische Anfälle durch lokale Adenosin-Freisetzung in der Nähe eines epileptischen Herdes zu unterdrücken. Wie lassen sich Zellen dazu bringen, Adenosin freizusetzen? Der Schlüssel für dieses Problem liegt ebenfalls in der Aktivität des Enzyms Adenosin-Kinase:

Mit dem Ziel, die Adenosin-Kinase auszuschalten, wurden daher in unserem Labor Fibroblasten des Hamsters (BHK-Zellen) einer chemischen Mutagenese unterzogen. Diese Mutagenese führt zur willkürlichen Einführung von Mutationen im Genom dieser Zellen. Nun ist es notwendig, diejenigen Zellen zu finden und gezielt zu vermehren, die einen Defekt in der Adenosin-Kinase tragen. Dafür wurde eine Selektion mit dem Chemotherapeutikum Vidarabin (AraA) eingesetzt. AraA wird durch Adenosin-Kinase in einen toxischen Metaboliten überführt. Als Konsequenz sterben in Gegenwart von AraA alle Zellen ab, die Adenosin-Kinase exprimieren; diejenigen Zellen jedoch, die einen Defekt im Adenosin-Kinase-Gen tragen, überleben. Mit dieser Mutagenese/Selektions-Strategie ist es gelungen, eine BHK-Zelllinie (BHK-AK2) zu etablieren, die keine Adenosin-Kinase mehr exprimiert. Wie erwartet setzen diese Zellen in der Kultur grosse Mengen Adenosin frei (ca. 20 ng Adenosin pro 10⁵ Zellen pro Stunde) [28].

Wie lassen sich Fibroblasten vom Hamster sicher in das Gehirn einer Ratte oder Maus transplantieren, ohne dass es zu immunologischen Abwehrreaktionen kommt? Patrick Aebischer am Neurosciences-Institut an der EPFL (Ecole Polytechnique Fédérale) in Lausanne hat eine Technik entwickelt, mit welcher Zellen in eine semipermeable Polymer-Hohlfaser eingekapselt werden können [29]. Die Porengrösse der Kapselmembran ist so gewählt, dass Zellen und Komponenten des Immunsystems nicht hindurchpassen, hingegen kleine Moleküle, wie Nährstoffe oder therapeutisch wirksame Substanzen (z.B. Adenosin) ungehindert passieren können. Durch diese Immunisolierung ist es möglich, Zellen über Artgrenzen hinweg ohne die Notwendigkeit einer Immunsuppression zu transplantieren. Solche

Zellkapseln wurden bereits in klinischen Studien zur Therapie von chronischem Schmerz und der Amyotrophen Lateralsklerose eingesetzt [30,31].

Zur Evaluation der Anfalls-supprimierenden Eigenschaften von Adenosin-freisetzenden Fibroblasten wurden jeweils 200'000 BHK-AK2-Zellen in verkapselter Form in die Hirnventrikel von „gekündelten“ epileptischen Ratten implantiert. Kontroll-Tiere erhielten Kapseln mit unveränderten BHK-Zellen oder Kapseln, die nur Matrix-Material, aber keine Zellen enthielten. Das Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie in der Ratte ist ein ideales Modell, um die Effizienz neuer Therapieansätze zu erproben. Durch wiederholte Applikation subkonvulsiver elektrischer Reize über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen durch bilateral in die Hippocampi implantierte Elektroden wird der stimulierte Hippokampus quasi sensibilisiert, so dass in einem fertig „gekündelten“ Tier ein ehemals subkonvulsiver Reiz ausreicht, um einen epileptischen Anfall hervorzurufen. Diesem Phänomen liegen permanente Veränderungen im stimulierten Hippokampus zugrunde, die denjenigen einer humanen fokalen Temporallappenepilepsie ähnlich sind. Die implantierten Elektroden ermöglichen zudem, direkt intrahippokampal EEGs abzuleiten.

Zum Test Adenosin-freisetzender Zellkapseln wurden ausschliesslich gekündelte Ratten verwendet, die reproduzierbar nach jedem Test-Stimulus mit einem Grad 5-Anfall (höchster konvulsiver Anfallsgrad in diesem Tiermodell) reagierten. Vier Tage nach Implantation von Zellkapseln in die lateralen Hirnventrikel wurden erstmals Teststimulationen durchgeführt. Bemerkenswerterweise führte die Implantation von Adenosin-freisetzenden BHK-AK2-Kapseln zu einer starken Unterdrückung der elektrographischen Aktivität als auch zu einer drastischen Reduktion der konvulsiven Anfallsaktivität (**Abbildung 3**). Im Gegensatz dazu blieb das Anfallsverhalten in Tieren mit Kontroll-Implantaten unverändert. Die Anfallssuppression mit Adenosin freisetzenden BHK-AK2-Zellen hielt über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen an (**Abbildung 3**) [28]. Während der ersten zwei Wochen wurde in den Adenosin-behandelten Tieren keinerlei konvulsive Aktivität beobachtet. Dieses Experiment belegt, dass die lokale Freisetzung von Adenosin durch implantierte Zellen ausreicht, um epileptische Anfälle nahezu vollständig zu unterdrücken. Der begrenzende Faktor für eine Langzeit-Therapie lag bei diesem Experiment in der Überlebensdauer der verkapselten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die allmähliche Rückkehr der Anfallsaktivität nach 3 bis 4 Wochen mit einem Absterben der verkapselten Zellen korrelierte [28].

Um zu zeigen, dass die Anfallsunterdrückung durch implantierte BHK-AK2-Zellen tatsächlich auf freigesetztem Adenosin beruht, wurden protektierte Tiere mit dem A1-Rezeptor-selektiven Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX) behandelt. Bereits 20 Minuten nach Applikation von DPCPX kehrte die An-

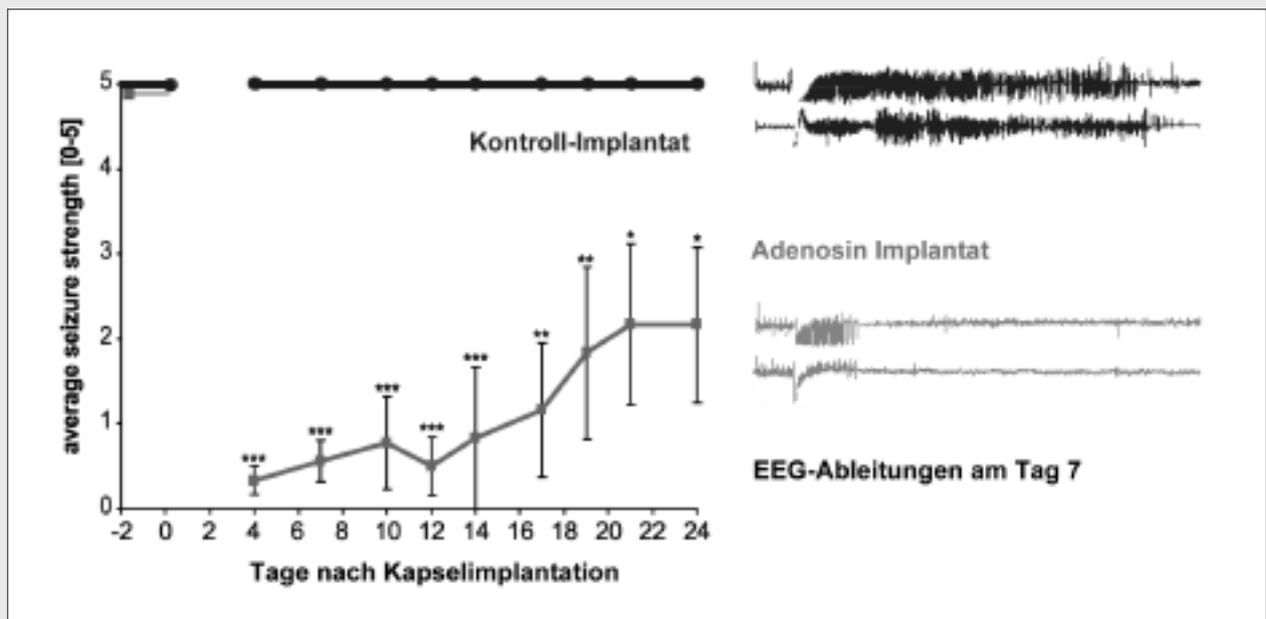


Abbildung 3: Anfallssuppression im Kindling-Modell der Epilepsie durch Adenosin-freisetzende Zellkapseln. Adenosin-freisetzende BHK-AK2-Zell-Kapseln (grün) und Kontrollkapseln ohne Zellen (blau) wurden am Tag Null in die lateralen Hirnventrikel von vollständig gekindelten (d.h. epileptischen) Ratten implantiert. Die Anfallsaktivität wurde an den angegebenen Tagen jeweils nach der Applikation von einem Test-Stimulus ermittelt. Vor der Implantation (Tag -2) wurde durch jeden Test-Stimulus reproduzierbar ein konvulsiver Grad 5-Anfall (maximale Anfallsstärke) ausgelöst. Nach der Implantation von Kontrollkapseln (n = 12) blieb das Anfallsmuster unverändert bestehen (Grad 5-Anfälle, blau). Die Grad 5-Anfälle waren jeweils begleitet von einer starken epileptischen Entladung, die im EEG deutlich wurde (rechts oben). Während desselben Zeitraums war die Anfallsaktivität in gekindelten Ratten, die ein Adenosin-freisetzendes Zell-Implantat erhalten hatten (n = 9), drastisch reduziert (< Grad 1 während 14 Tagen, grün). Diese markante Anfalls-Suppression wurde ebenfalls im EEG deutlich durch eine Unterdrückung epileptischer Entladungen (unten rechts).

fallssuszeptibilität transient zurück. Dieses Kontroll-Experiment belegt, dass tatsächlich von den Zellen freigesetztes Adenosin für die Anfallsunterdrückung verantwortlich ist.

Neben den tiefen anfallsunterdrückenden Eigenschaften Adenosin-freisetzender Zellkapseln wurden keinerlei offensichtliche Nebenwirkungen, wie Sedation oder Einschränkung der Lokomotion beobachtet. Dies ist ein wichtiger Vorteil der lokalen Adenosin-Applikation gegenüber systemisch applizierten Adenosin A₁-Rezeptor-Agonisten oder Adenosin-Kinase-Antagonisten, welche ausgeprägte kardiovaskuläre und sedative Nebenwirkungen hervorrufen.

Die Entwicklung einer lokalen Adenosin-vermittelten Zelltherapie zur Behandlung pharmakoresistenter Epilepsien erscheint daher vielversprechend. Voraussetzung ist jedoch, ein Zellsystem zu finden, welches langfristig nach erfolgter Implantation überlebt und Adenosin in konstanten Mengen freisetzt. Zwei Möglichkeiten, die zur Zeit intensiv evaluiert werden, bestehen in der Verwendung von verkapselten Adenosin-freisetzenden Muskelzellen, sowie in der Verwendung von Stammzellen mit einem genetischen „knockout“ der Adenosin-Kinase.

5. Stammzellen – ein neuer Weg zur lokalen Adenosin-Freisetzung?

Stammzellen bieten den einzigartigen Vorteil, dass sie einerseits als proliferierende Zellen genetisch verändert und in beliebiger Menge produziert werden können und andererseits in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen (z.B. Nerven- und Glia-Zellen) differenziert werden können. Die Stammzell-Forschung hat daher in den letzten Jahren einen enormen Aufschwung erhalten [5,32,33]. Zwei Typen von Stammzellen sind von therapeutischem Interesse: Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und adulte Stammzellen (AS-Zellen).

ES-Zellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Präimplantations-Embryonen gewonnen werden. ES-Zellen können in grossen Mengen kultiviert werden und behalten dabei ihr Potential, in somatische Zelltypen von allen drei Keimblättern zu differenzieren. Sie haben den Vorteil, relativ einfach genetisch mit Methoden der homologen Rekombination verändert werden zu können. Die *in vitro*-Differenzierung von ES-Zellen eröffnet neue Möglichkeiten für die Generierung von Donor-Zellen für Transplantations-Therapien. So wurden ES-Zellen der Maus bereits erfolgreich differenziert in verschiedene klinisch relevante Zelltypen wie beispielsweise Insulin-freisetzende Zellen [34], Dopamin-freisetzende Neuronen [6] und Glia-Zellen [35].

Es konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass ES-abgeleitete Neuronen und Glia-Zellen sich funktional ins Gehirn integrieren und dort jahrelang überleben können. Somit sind diese Zelltypen prinzipiell geeignet, um therapeutisch aktive Substanzen langfristig im Gehirn zur Applikation zu bringen. Experimentell ist es in unserem Labor bereits gelungen, ES-Zellen der Maus zu generieren, die einen Defekt im Gen der Adenosin-Kinase tragen. Diese Zellen lassen sich nach einem Protokoll von Oliver Brüstle (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) in reine Populationen Adenosin-freisetzender Glia-Zellen differenzieren. Diese Zellen werden zur Zeit als direkte Zell-Implantate in Maus- und Ratten-Modellen der Epilepsie evaluiert. Für eine auf individuelle Patienten massgeschneiderte Therapie mit ES-Zellen stellen sich allerdings ethische Probleme, die noch gelöst werden müssen: Um eine Xenotransplantation mit Risiken der Pathogen-Übertragung zu umgehen, wäre es notwendig, humane ES-Zellen zu verwenden, die nach einer *in vitro*-Fertilisation aus menschlichen 4 bis 5 Tage alten Embryonen isoliert werden können^[36,37]. Um hier eine Immunkompatibilität zu gewährleisten, würde ein Schritt des therapeutischen Klonens notwendig werden^[33]. Die Verwendung adulter Stammzellen würde diese Problematik jedoch umgehen.

AS-Zellen wurden aus verschiedenen Quellen, wie z.B. Knochenmark, Hirn, Fettgewebe oder Haut isoliert^[5]. Diese Zellen haben primär die Aufgabe der Regeneration. Es konnte jedoch experimentell gezeigt werden, dass zumindest ein Anteil dieser Zellen in der Lage ist, auch differenzierte Zellen aus einer anderen embryonalen Linie hervorzubringen. Dieses Phänomen nennt man Transdifferenzierung von Stammzellen. Beispielsweise waren neuronale Stammzellen in der Lage, Blut- oder Skelettmuskel-Zellen zu bilden^[38,39]. Dieses Phänomen der Transdifferenzierung hat therapeutische Bedeutung, besonders für das Nervensystem, da Implantate von neuronalen Stammzellen zu funktionaler Verbesserung im geschädigten Nervensystem führen können^[35,40]. Obwohl das therapeutische Potenzial von neuronalen Stammzellen vielversprechend ist, gibt es nach wie vor eine Reihe wichtiger Probleme^[41]. Ethische Probleme tauchen auf, da gegenwärtig menschliches fötales Gewebe als einzige Quelle für humane neuronale Stammzellen klinisch genutzt wird (fötale dopaminerge Neuronen zur Parkinsontherapie). Darüber hinaus erfordert selbst die Verwendung von humanem fötalem Gewebe eine heterologe Transplantation und die Notwendigkeit einer Immunsuppression. Um diese Probleme zu umgehen, wurde kürzlich eine neuer Typ adulter Stammzellen aus der Haut von Säugern isoliert. Unter geeigneten Kulturbedingungen lassen sich aus diesen Stammzellen Neurosphären generieren, die in (transplantierbare) Neuronen ausdifferenziert werden können^[42]. Damit besteht die einzigartige Möglichkeit, aus einem leicht zugänglichen Gewebe patientenidentische neuronale Stammzellen zu generieren. Nach ei-

ner Elimination der Adenosin-Kinase wäre es dann prinzipiell möglich, solche Zellen dazu zu bringen, Adenosin freizusetzen und für die Epilepsie-Therapie einzusetzen. Tierexperimentell wird diese Möglichkeit bereits evaluiert, indem Adenosin-freisetzende Nervenzellen aus der Haut von Adenosin-Kinase-knockout-Mäusen generiert werden.

Schlussfolgerung

Die hier beschriebenen Ergebnisse zur Anfallsunterdrückung mit Adenosin freisetzenden Zell-Implantaten stellen ein „proof-of-principle“ für einen neuen therapeutischen Weg der Epilepsie-Therapie dar. Insbesondere sind folgende Resultate von Bedeutung:

1. Eine Überexpression von Adenosin-Kinase im epileptischen Hippokampus erlaubt den rationalen Einsatz von Adenosin zur Anfallskontrolle.
2. Ein genetischer Defekt der Adenosin-Kinase erlaubt die Freisetzung therapeutischer Mengen von Adenosin.
3. Pharmakoresistente Anfälle lassen sich durch Aktivierung von Adenosin- A₁-Rezeptoren unterdrücken.
4. Die lokale Adenosin-Freisetzung durch Zellen in der Nähe von einem epileptischen Fokus reicht aus, um konvulsive Anfallsaktivität nahezu vollständig zu unterdrücken.
5. Die lokale Freisetzung von Adenosin führt zu keinen auffälligen Nebenwirkungen.

Durch die Fähigkeit, pharmakoresistente epileptische Anfälle bei lokaler Applikation nebenwirkungsfrei zu unterdrücken, erscheint die Verwendung von Adenosin – von implantierten Zellen in der Nähe eines epileptischen Fokus freigesetzt – als vielversprechender neuer Weg in der Epilepsie-Therapie. Die Rekonstitution von normalen protektiven Adenosin-Spiegeln in einem Hippokampus mit überexprimierter Adenosin-Kinase wäre ein kausaler Therapieansatz, welcher über eine rein palliative Therapie hinausgehen würde. Allerdings muss noch ein Weg gefunden werden, Adenosin über implantierte Zellen langfristig zur Applikation zu bringen. Die Verwendung von verkapselten Myoblasten und von Adenosin-freisetzenden Stammzellen stellen vielversprechende Alternativen dar.

Referenzen

1. Schmidt D, Krämer G. The new anticonvulsant drugs. Implications for avoidance of adverse effects. *Drug Saf* 1994; 11: 422-431
2. Hershfield MS. Adenosine deaminase deficiency: Clinical expression,

- molecular basis, and therapy. *Semin Hematol* 1998; 35: 291-298
3. Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O. Cell therapy in parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 365-369
 4. Lysaght MJ, Aebischer P. Encapsulated cells as therapy. *Sci Am* 1999; 280: 76-82
 5. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-582
 6. Bjorklund LM, Sanchez-Pernate R, Chung S et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2344-2349
 7. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 31-55
 8. During MJ, Spencer DD. Adenosine: A potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol* 1992; 32: 618-624
 9. Wieser HG, Rudolph U, Blau N et al. Amino acid composition of brain cysts: Levels of excitatory amino acids in cyst fluid fail to predict seizures. *Epilepsy Res* 2003; 55: 191-199
 10. Dragunow M. Adenosine: The brain's natural anticonvulsant? *Trends Pharmacol Sci* 1986; 7: 128
 11. Fredholm BB. Adenosine and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 1997; 40: 259-280
 12. Tasch E, Cendes F, Li LM et al. Neuroimaging evidence of progressive neuronal loss and dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1999; 45: 568-576
 13. Fredholm BB, AP II, Jacobson KA et al. International union of pharmacology. Xv. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 527-552
 14. Malva JO, Silva AP, Cunha RA. Presynaptic modulation controlling neuronal excitability and epileptogenesis: Role of kainate, adenosine and neuropeptide y receptors. *Neurochem Res* 2003; 28: 1501-1515
 15. Yoon KW, Rothman SM. Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 1991; 11: 1375-1380
 16. De Sarro G, De Sarro A, Di Paola ED, Bertorelli R. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible dba/2 mice. *Eur J Pharmacol* 1999; 371: 137-145
 17. Huber A, Güttinger M, Möhler H, Boison D. Seizure suppression by adenosine a2a receptor activation in a rat model of audiogenic brainstem epilepsy. *Neurosci Lett* 2002; 329: 289-292
 18. Löscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 7-14
 19. Riban V, Bouillere V, Pham-Le BT et al. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2002; 112: 101-111
 20. Gouder N, Fritschy JM, Boison D. Seizure suppression by adenosine a1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 877-885
 21. Dunwiddie TV. Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 1980; 21: 541-548
 22. Mitchell JB, Lupica CR, Dunwiddie TV. Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1993; 13: 3439-3447
 23. Boison D, Scheurer L, Zumsteg V et al. Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6985-6990
 24. Geiger JD, Nagy JJ. Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. *J Neurosci* 1986; 6: 2707-2714
 25. Pak MA, Haas HL, Decking UKM, Schrader J. Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. *Neuropharmacol* 1994; 33: 1049-1053
 26. Gouder N, Scheurer L, Fritschy J-M, Boison D. Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci* 2004; 24: 692-701
 27. Rebola N, Coelho JE, Costenla AR et al. Decrease of adenosine a1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 820-828
 28. Huber A, Padrun V, Déglon N et al. Grafts of adenosine releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7611-7616
 29. Aebischer P, Tresco PA, Winn SR et al. Long-term cross-species brain transplantation of a polymer-encapsulated dopamine-secreting cell line. *Exp Neurol* 1991; 111: 269-275
 30. Buchser E, Goddard M, Heyd B et al. Immunisolated xenogenic chromaffin cell therapy for chronic pain. Initial clinical experience. *Anesthesiology* 1996; 85: 1005-1012
 31. Aebischer P, Schluep M, Déglon N et al. Intrathecal delivery of cntf using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Medicine* 1996; 2: 696-699
 32. Bjorklund A. Cell replacement strategies for neurodegenerative disorders. *Novartis Found Symp* 2000; 231: 7-15
 33. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 275-286
 34. Soria B, Roche E, Berna G et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162
 35. Brustle O, Jones KN, Learish RD et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-756
 36. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1129-1133
 37. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-1140
 38. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA et al. Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283: 534-537
 39. Galli R, Borello U, Gritti A et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 986-991
 40. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999; 5: 1410-1412
 41. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000; 3: 537-544
 42. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJL et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-784

Korrespondenzadresse:

Dr. Detlev Boison
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Zürich
Winterthurerstr. 190
CH 8057 Zürich
Tel. 0041 1 635 59 31
Fax 0041 1 635 68 74
boison@pharma.unizh.ch

Susanne G. Müller, Abteilung für Epileptologie und Enzephalographie, Universitätsspital Zürich

Zusammenfassung

Magnet-Resonanz-Spektroskopie (MRS) ist eine relativ neue Technik, welche die non-invasive Messung verschiedener wichtiger Hirnmetabolite erlaubt. Der epileptische Fokus weist sowohl ictal als auch interiktal typische MR-spektroskopische neurochemische Veränderungen auf, die zur Fokuslokalisation verwendet werden können. Ictal ist N-Acetylaspartat (NAA) durch einen initialen Anstieg und in der Spätphase einen Abfall gekennzeichnet. Zusätzlich ist ein Anstieg von Laktat mit entsprechendem Abfall des pH und Zeichen eines kompensierten, erhöhten Energiebedarfes, d.h. ein stabiles Creatin/Phosphocreatin (Cr), bei gleichzeitigem Abfall von Phosphocreatin (PCr) und Anstieg des anorganischen Phosphats (Pi), jedoch noch normalem Adenosintriphosphat (ATP) typisch für den Fokus. Interiktal ist der Fokus ebenfalls in der Regel durch eine NAA-Reduktion und eine Erhöhung von Pi charakterisiert. Mittels spezieller MRS-Sequenzen sind seit ein paar Jahren nun auch non-invasive Messungen der wichtigsten exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitoren und Neuromodulatoren möglich, die es vielleicht eines Tages erlauben, für jeden Patienten die antiepileptische Therapie bereits vor Beginn im Hinblick auf optimale Wirksamkeit abzustimmen.

MR Spectroscopy: a Non-Invasive Method for Investigating Neurochemical Alterations in the Epileptic Brain

MR-spectroscopy is a relatively new technique that allows for the non-invasive measurement of different brain metabolites. In the ictal state as well as in the interictal state, the epileptogenic focus is characterized by several typical neurochemical abnormalities that can be used for focus identification. In the ictal state N-acetylaspartate (NAA) is increased in the early phase but decreases in the late phase. These changes are accompanied by an increase of lactate (Lac), a decrease of pH and phosphocreatine (PCr), and an increase of inorganic phosphate (Pi) while adenosintriphosphate (ATP) is stable. In the interictal state, the epileptic focus is characterized by a reduced NAA and an increased Pi. Special MR-spectroscopy sequences now also allow of the measurement of some of the most important excitatory and inhibitory neurotransmitters and neuromodulators. Further developments of these techniques will allow someday determining individually and beforehand the most effective antiepileptic

drug or drug combination for treatment of any particular patient.

Epileptologie 2004; 21: 37 – 43

Einleitung

Dank der Entwicklung grösserer und stärkerer Magnete und Computer in den letzten zwanzig Jahren war es möglich, die Technik der Magnet-Resonanz-Spektroskopie (MRS), die ursprünglich zur molekularen Strukturbestimmung in der physikalischen Chemie entwickelt worden war, zunehmend auch für die non-invasive Messung einer immer länger werdenden Liste biologisch wichtiger Stoffwechselprodukte im lebenden Organismus anzuwenden. Heutzutage sind die meisten klinischen Magnet-Resonanz-Imaging (MRI)-Systeme bereits vom Hersteller mit den wichtigsten MRS-Messsequenzen und einfachen Analyseprogrammen ausgestattet, so dass einfachere spektroskopische Messungen ohne grösseren Aufwand im klinischen Betrieb möglich sind. Komplexere Messungen, z.B. die Messung von gamma-Aminobuttersäure (GABA), benötigen jedoch aufwändigere Sequenzen und Analysemethoden und sind deshalb immer noch MRS-Spezialisten vorbehalten. Grundsätzlich können MRS-Untersuchungen an den verschiedensten Organen, z.B. Herz, Muskel, Leber etc., durchgeführt werden. Das Hirn ist jedoch besonders für diese Art Untersuchung geeignet, da die Messungen kaum durch Bewegungsartefakte gestört werden und die Position des Kopfes relativ zum ruhenden Körper die Anwendung von speziellen Spulen besonders einfach macht. Infolgedessen wurde diese Technik in den letzten Jahren zur Untersuchung einer ganzen Anzahl von neurologischen Erkrankungen verwendet, unter anderem Morbus Alzheimer, amyotrophe Lateralsklerose, Hirninfarkt, Multiple Sklerose, Hirntumoren und natürlich auch Epilepsie.

Für die MR-Spektroskopie im lebenden Gewebe sind v.a. die Kerne, die in organischen Verbindungen häufig vorkommen, interessant, d.h. Wasserstoff (^1H), Phosphor 31 (^{31}P), Kohlenstoff 13 (^{13}C), Stickstoff (^{15}N) und Fluor (^{19}F). Da ^{13}C -, ^{15}N - und ^{19}F - Messungen aber immer noch nur einigen wenigen spezialisierten Zentren vorbehalten sind, wird sich dieser Beitrag auf ^1H - und ^{31}P -Spektroskopie beschränken.

Grundlagen

Magnet-Resonanz macht sich die Tatsache zunutze, dass gewisse Atome aufgrund der Zusammensetzung ihres Kernes ein magnetisches Moment μ haben. Wird eine Probe, die solche Kerne enthält, in ein äusseres Magnetfeld (B_0) gebracht, so richten sich die zuvor völlig zufällig angeordneten „Kernmagnete“ entweder parallel oder antiparallel zu diesem Magnetfeld aus und beginnen, um die Achse von B_0 mit einer bestimmten Frequenz, der so genannten Larmorfrequenz, zu rotieren. Da die Kerne, die sich parallel zum äusseren Magnetfeld ausrichten, in einer geringen Überzahl sind, kommt es zu einer sehr schwachen Gesamtmagnetisierung (M_0) der Probe. Die Stärke von M_0 ist direkt proportional zur Grösse des äusseren Magnetfeldes. M_0 kann nun mittels eines zweiten, zeitlich limitierten und in der für den betreffenden Kern typischen Frequenz oszillierenden Magnetfeld (B_1) ausgelenkt, resp. „angeregt“, werden. Nach Abschalten von B_1 wird M_0 wieder nur von B_0 beeinflusst und richtet sich daher langsam wieder parallel zu diesem aus. Dabei induziert M_0 in einer die Probe umgebenden Spule eine elektromotorische Kraft, die dann in das MR-Signal umgewandelt werden kann. MR-Spektroskopie macht sich nun die Tatsache zunutze, dass die Larmorfrequenz nicht nur von der Stärke des äusseren Magnetfeldes und der Art des Kernes, sondern auch von der chemischen Umgebung des Kernes abhängt. Dies bedeutet, dass z.B. die Larmorfrequenz eines ^1H in einem Wassermolekül nicht ganz dieselbe ist wie die eines ^1H in einem Glucosemolekül (sog. „chemical shift“). Das MR-Signal enthält daher das ganze Frequenzspektrum aller in der Probe vorhandenen ^1H -haltigen Metabolite. Mittels Fourier-Transformation kann dann dieses komplexe Signal in die einzelnen Frequenzkomponenten, d.h. Metabolitensignale, zerlegt werden, wobei die Fläche unter dem entsprechenden Peak proportional der Konzentration des Metaboliten in der Probe ist.

Leider sind die Anwendungsmöglichkeiten der MRS-Technik aber durch gewisse methodische Grenzen eingeschränkt. Eine davon ist die relativ geringe räumliche Auflösung, die z.B. für ^1H -MRS in Tierstudien bei Feldstärken von 7.0 - 9.4T ca. 1-4 mm³ und im menschlichen Gehirn bei Feldstärken von 1.5 – 4.0T ca. 7-40 mm³ beträgt. Da das MRS-Signal überdies direkt proportional zu der relativ schwachen M_0 ist, hat die MRS ausserdem auch eine relative geringe Sensitivität. Konkret bedeutet dies, dass in der Regel nur Metabolite, die in der Probe in einer Konzentration von mindestens 1 mM enthalten sind, detektiert werden können. Es ist daher zum Beispiel nicht möglich, Dopamin, Serotonin oder Acetylcholin im Gehirn zu messen, da deren Konzentration normalerweise unter dieser Detektionsgrenze liegt. Schlussendlich ist auch anzumerken, dass die gemessenen Konzentrationen den jeweiligen Gesamtkonzentrationen in der Probe entsprechen, d.h. es ist zum Beispiel in der Regel nicht möglich, zwischen extrazel-

lulärem und intrazellulärem oder gar vesikulärem und zytoplasmatischem Glutamat zu unterscheiden.

^1H -Spektroskopie des Gehirns

^1H zeichnet sich durch ein hohes natürliches Vorkommen und eine hohe MR-Sensitivität (d.h. hohe gyromagnetische Ratio γ) aus. Damit wäre es eigentlich ideal für MRS, leider hat ^1H aber auch zwei entscheidende Nachteile: 1. Das ^1H -Spektrum hat eine relativ kleine „chemical-shift“ Dispersion, was dazu führt, dass sich die Resonanzen vieler Metabolite überlappen und z.T. nur mit speziellen Anregungssequenzen, so genannten Editing-Sequenzen „sichtbar“ gemacht werden können. 2. Die ^1H -reichsten Verbindungen *in vivo* sind H₂O und Fette. Diese intensiven Fett- und H₂O-Resonanzen müssen daher mittels spezieller Suppressionstechniken unterdrückt werden, da sonst die Signale anderer, interessanterer Moleküle durch sie verdeckt werden.

In Hochfeld-MRS-Messungen von Hirnextrakten können im ^1H -Spektrum die Resonanzen von bis zu 18 verschiedenen, biologisch wichtigen Molekülen unterschieden werden, z.B. Alanin, Aspartat, Laktat (Lac), N-Acetylaspartat (NAA), N-Acetylaspartatylglutamat (NAAG), GABA, Glu, Glutamin (Gln), Glutathion (GSH), total Creatin (Cr), d.h. Creatin und Phosphocreatin, cholinhaltige Verbindungen (Cho), d.h. Phosphorylcholin und Glycerophosphorylcholin, Taurin (Tau), Myoinositol (MI), Scylloinositol, Glucose und Glycin. *In vivo* ist die Anzahl wegen der geringeren Auflösung kleiner. Mit den heutzutage für klinische Geräte üblichen Feldstärken von 1.5 – 4T ist es aber immerhin möglich, die Resonanzen von NAA, Cr, Cho, Glnx, (d.h. gemeinsame Resonanzen von Glu und Gln), MI und Laktat zuverlässig zu identifizieren und zu quantifizieren (**Abbildung 1**). Mittels spezieller Editing-Sequenzen können zusätzlich Glutathion, Taurin, GABA und Glu gemessen werden [1,2].

Der prominenteste Peak im normalen ^1H -Spektrum des Gehirns gehört zu NAA. NAA, dessen genaue Funktion im menschlichen Gehirn immer noch unklar ist, gilt als neuronaler Marker, da es im ausgereiften Gehirn nahezu ausschliesslich und in hoher Konzentration in den Mitochondrien von Neuronen in einem Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen und eng mit dem Glucosemetabolismus gekoppelten Prozess synthetisiert wird [3-6]. Bis auf einen geringen Teil, der in den Neuronen zur Synthese von NAAG dient, wird das neuronale NAA in einem kontrollierten Prozess in den extrazellulären Raum abgegeben und von dort mittels eines effizienten Transportprozesses in Oligodendrozyten aufgenommen, wo es dann mittels Amidohydrolase II wieder zu Acetat und Aspartat abgebaut wird [7]. Aufgrund dieser Eigenheiten des NAA-Metabolismus wird mittlerweile angenommen, dass der dabei entstehende ausgeprägte neuronale/extrazelluläre NAA-Gradient dazu dient, mittels einer speziellen molekularen Wasserpumpe das

während der aeroben Glycolyse in grosser Menge anfallende metabolische H_2O aus den Neuronen in den Extrazellulärraum zu transportieren^[7]. Cr, dessen Peak nach NAA der prominenteste ist, besteht aus den Resonanzen von Creatin und Phosphocreatin. Da diese beiden sich chemisch sehr ähnlich sind, haben sie nahezu identische Larmorfrequenzen und verschmelzen im in vivo-Spektrum zu einem einzigen Peak. Creatin/Phosphocreatin spielen eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel, da durch die Umwandlung von Phosphocreatin und ADP (Adenosindiphosphat) in Creatin und ATP mittels Creatin-Kinase-Reaktion die ATP-Konzentration auch in Situationen mit erhöhtem Energiebedarf stabil gehalten werden kann. Die Gesamtkonzentration dieser beiden Stoffe und damit die Intensität des Cr-Peaks im Spektrum ist daher auch unter pathologischen Bedingungen häufig konstant, weshalb Cr auch gerne als interne Referenz zur Quantifizierung der anderen Peaks gebraucht wird. Die Resonanzen der cholinhaltigen Verbindungen, die v.a. von Phosphorylcholin und Glycerol-

phosphorylcholin, zwei wichtigen Komponenten des Phospholipidstoffwechsels, stammen, bilden den dritten grossen Peak im 1H -Spektrum. Eine weitere Resonanz, Lac, ist nur in Situationen mit erhöhtem Energiebedarf, z.B. im visuellen Cortex bei intensiver visueller Stimulation oder bei Störungen des Energiestoffwechsels, z.B. in einem Infarktreal, in einer messbaren Konzentration vorhanden. Bei kürzeren Echozeiten können zusätzlich die Resonanzen von Glu, Gln und MI beobachtet werden. Glu und Gln haben beide je vier, wegen des so genannten „spin-spin-couplings“ sehr komplexe Resonanzen, die ausserdem aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der beiden Moleküle sehr nahe beieinander liegen und daher bei den für klinische Untersuchungen gebräuchlichen Feldstärken nicht sicher voneinander unterschieden werden können. Sie werden daher oft als eine einzige Resonanz, den so genannten „Glnx“-Peak, gemessen. MI, von dessen vier Resonanzen die bei 3.54 ppm am besten quantifizierbar ist, ist ein „second messenger“ und Osmolyt und gilt, da es in Gliazellen in be-

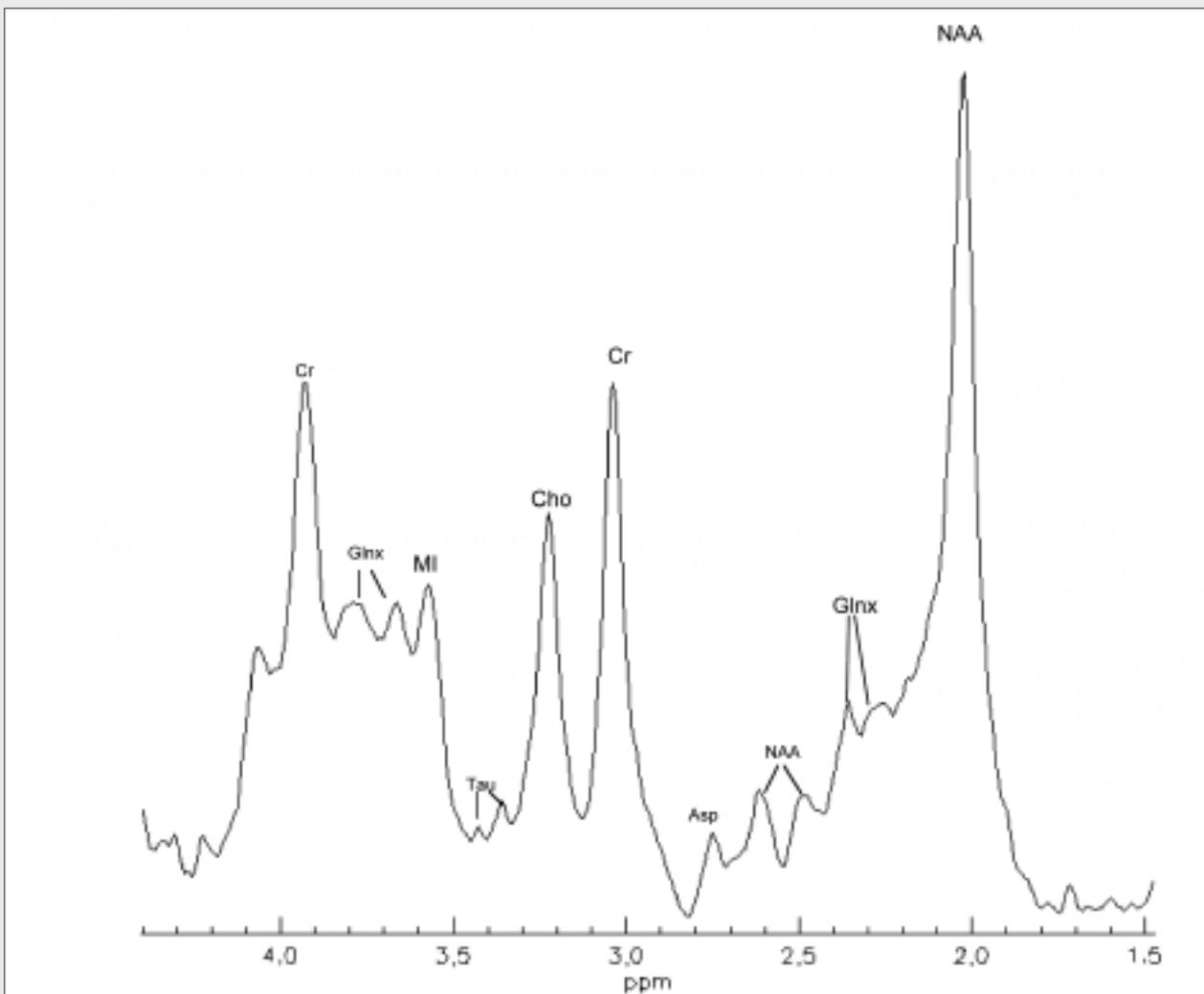


Abbildung 1: 1H Spektrum eines normalen Gehirns („single voxel mit PRESS-Lokalisation, nominale Voxelgrösse 8 ccm, Messung parieto-occipital) bei kurzer Echozeit (TE/TR = 30/ 2000 ms) bei 3T. Klar erkennbar sind die Hauptresonanzen von N-Acetylaspartat (NAA), Creatin/Phosphocreatin (Cr), cholinhaltigen Verbindungen (Cho), Myoinositol (MI), Glutamat und Glutamin (Glnx) (grosse Beschriftung) und zusätzliche Resonanzen von Taurin (Tau), Aspartat (Asp), NAA und Glnx (kleine Beschriftung).

sonders hohen Konzentrationen vorhanden ist, als gliärer Marker.

³¹P-Spektroskopie des Gehirns

³¹P hat zwar eine bedeutend kleinere gyromagnetische Ratio als ¹H, aber wie dieses ein sehr hohes natürliches Vorkommen (100%) und ausserdem eine relativ grosse „chemical shift“-Dispersion, was eine relativ gute Unterscheidung der verschiedenen Resonanzen erlaubt. In einem typischen, auf einem klinischen Gerät gemessenen *in vivo* ³¹P-Spektrum lassen sich in der Regel die Peaks der Phosphomonoestergruppe (PME), die sich v.a. aus den Resonanzen von alpha-Glycerol-Phosphat, Phosphorycholin, Phosphoethanolamin und Inositol-1-Phosphat, d.h. Substraten für die Phospholipidsynthese, zusammensetzen, von anorganischem Phosphat (Pi), der Phosphodiestergruppe (PDE), bestehend aus den Resonanzen von Glycerophosphorylcholin und

Glycerophosphoethanolamin, d.h. den Abbauprodukten des Phospholipidstoffwechsels, von Phosphocreatin, und schliesslich von gamma-, alpha- und beta-Adenosintri-phosphat (ATP) (1) unterscheiden (**Abbildung 2**).

MR-Spektroskopie und Epilepsie

Auf dem Gebiet der Epileptologie hat die MRS zwei grosse Anwendungsbereiche: 1. Identifikation des epileptischen Fokus und sekundär in die Anfallsausbreitung einbezogener Hirnregionen im Rahmen prächirurgischer Abklärungen. 2. Identifikation eines „Responderprofiles“ für den gezielten Einsatz antiepileptischer Medikamente. Zahlreiche Untersuchungen belegen mittlerweile den Nutzen von MR-spektroskopischen Messungen zur Fokusidentifikation. Der zweite Anwendungsbereich steckt zwar zur Zeit immer noch in den Kinderschuhen, dennoch ist abzusehen, dass die zunehmende Verbreitung von klinischen Magneten mit höhe-

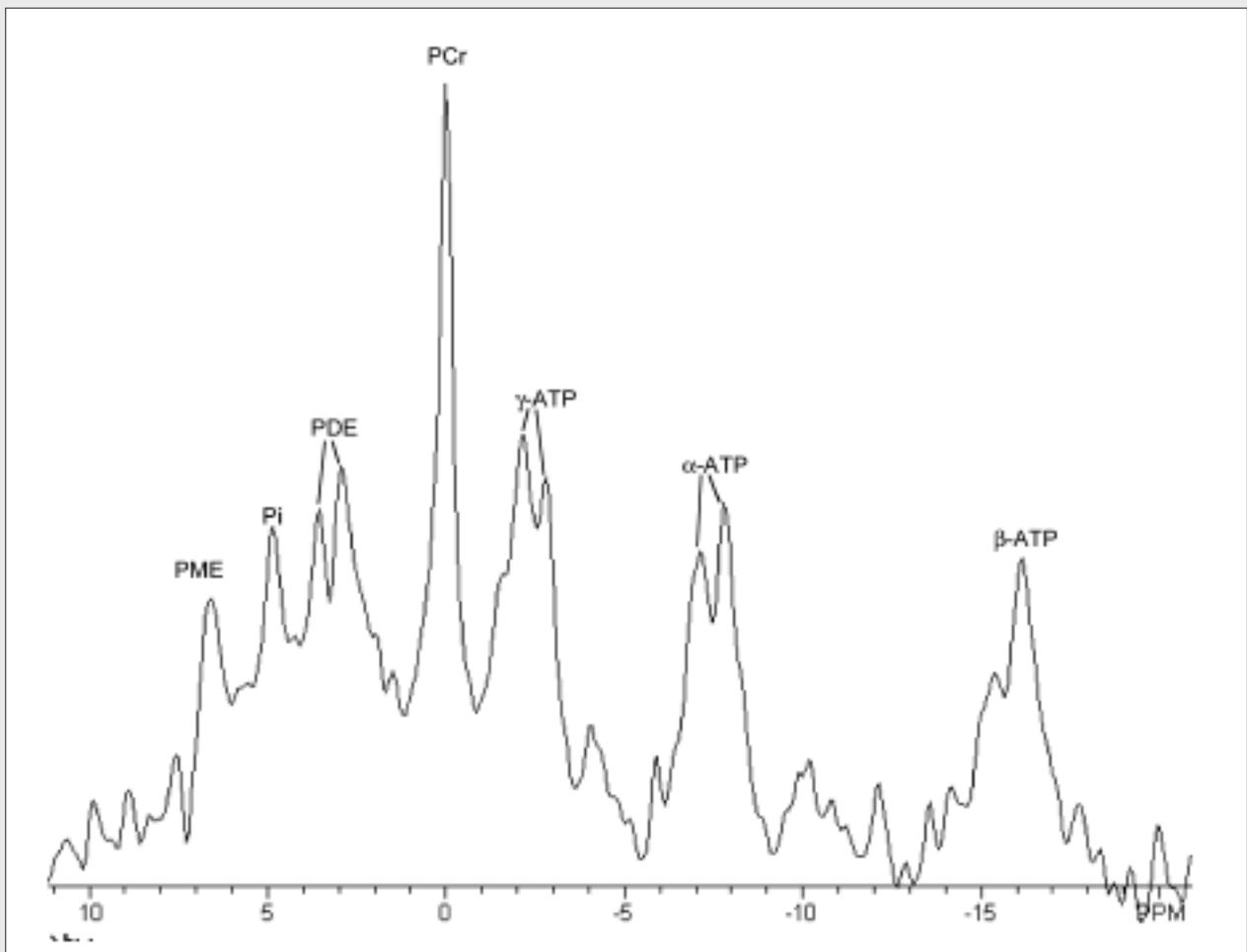


Abbildung 2. ³¹P-Spektrum des Gehirns (3D ³¹P MRSI mit ¹H-Decoupling, TR/TE = 400/3,2 msec, ³¹P MRSI mit FOV 270 ccm, 8 averages, nominale Voxelgrösse: 11,4 ccm, rechts temporal) bei 1,5 T. Erkennbar sind die Peaks von Phosphomonoester (PME), anorganischem Phosphat (Pi), Phosphodiester (PDE), Phosphocreatin (PCr) und Adenosintri-phosphat (ATP) (3 Peaks für die gamma-, alpha- und beta-Phosphatgruppe). Im Vergleich zum ¹H-Spektrum (**Abbildung 1**) ist die „chemical shift“-Dispersion viel grösser, d.h. ca. 25 ppm im Vergleich zu ca. 10 ppm bei ¹H.

rer Feldstärke, d.h. 3-4 T, in den nächsten Jahren auch in diesem Bereich zu weiteren Fortschritten führen wird.

MR-spektroskopische Abnormalitäten im epileptischen Fokus

Die spektroskopisch erfassbaren biochemischen Veränderungen im Fokus sind komplex und werden im Wesentlichen durch drei Faktoren bestimmt: 1. die Histologie, d.h. das Verhältnis Gliazellen zu Neuronen, und dem Differenzierungsgrad dieser Zellen. 2. der Funktionalität von Neuronen und Gliazellen, d.h. ob die verschiedenen Stoffwechselprozesse in den Zellen normal ablaufen können, und 3. ihrem Funktionszustand, d.h. im Falle des epileptischen Fokus, ob die Untersuchung iktal oder interiktal stattfindet.

Da Untersuchungen im Anfall in der Regel schwierig und für den Patienten belastend sind, wurden die meisten iktalen MRS-Untersuchungen an betäubten und beatmeten Tieren durchgeführt, bei denen künstlich, z.B. mittels Kainat-Injektion, ein prolongierter Anfall oder gar ein Status epilepticus provoziert worden war. In der Frühphase, d.h. innert der ersten sechzig Minuten eines derartigen Anfalls, kommt es bei Ratten im ^1H -Spektrum zu einem Anstieg von NAA/Cr und Lac/Cr ^[8,9]. Dies wird als Zeichen eines erhöhten, jedoch noch kompensierten Energieumsatzes interpretiert, was auch durch ^{31}P -spektroskopische Untersuchungen unterstützt wird, die in dieser Phase einen Abfall des pH und PCr bei gleichzeitigem Anstieg von Pi, aber unveränderter ATP-Konzentration zeigen ^[10,11]. In der Spätphase (>24 h) kommt es dann zu einem Abfall von NAA und Cr ^[12] mit persistierendem Lac-Anstieg ^[9], was als Anzeichen einer definitiven neuronalen Schädigung und Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels mit gestörtem Abtransport von Lac interpretiert wird. Diese Befunde, die im Tiermodell ziemlich konstant sind, unterscheiden sich etwas von denen, die in den wenigen Studien bei Patienten mit prolongierten Anfällen oder nicht konvulsiven Staten gefunden wurden. Dies dürfte jedoch v.a. darauf zurückzuführen sein, dass einerseits die Untersuchungen bei Patienten in der Regel zu einem späteren Zeitpunkt als in den Tierstudien (d.h. oft erst nach mehreren Tagen) durchgeführt wurden und andererseits das Gewebe der Patienten bereits durch eine über längere Zeit bestehende Epilepsie vorgeschädigt war, oder die Anfälle gar von einer strukturellen Läsion, z.B. einer kortikalen Malformation, ausgingen. Eine Erniedrigung von NAA im Fokus, die z.T. nach Beendigung der Anfälle eine gewisse Erholungstendenz zeigte, war zusammen mit einem iktalen Anstieg von Lac die konstanteste Veränderung. Ausserdem wurden z.T. auch ein iktales Ansteigen von Glnx und Cho beobachtet ^[13-16].

Die NAA-Reduktion ist auch im interiktalen Zustand das typischste Kennzeichen des epileptischen Fokus. Diese wurde lange ausschliesslich mit dem für epileptischen Fokus typischen Neuronenverlust erklärt. In der

letzten Zeit häufen sich jedoch Hinweise, dass sie zu einem nicht unbeträchtlichen Teil auch auf eine neuronale/gliale Dysfunktion zurückzuführen ist, die wahrscheinlich die Folge einer durch den epileptogenen Prozess bedingten mitochondrialen Funktionsstörung ist ^[17-19]. Dies wird auch durch die interiktalen Befunde der ^{31}P -Spektroskopie im Fokus bestätigt, wo Pi typischerweise erhöht und PCr/Pi und ATP/Pi entsprechend erniedrigt sind (20,21), während Veränderungen der anderen ^{31}P -haltigen Metabolite, z.B. PME und pH, nur inkonstant beschrieben werden. Was die Veränderungen der Konzentrationen anderer Metabolite im Fokus angeht, so sind die Befunde ebenfalls inkonstant. So wurden zum Teil erhöhte Konzentrationen von Cho, PME, Glnx und des pH gefunden ^[21-24], die aber in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnten ^[20,25,26]. Auch für MI wurden sowohl eine Erhöhung ^[27] als auch eine Erniedrigung ^[28] im Fokus beschrieben. Während diese Inkonsistenzen zum Teil sicher durch unterschiedliche Mess- und Postprocessingmethoden bedingt sind, reflektieren sie zum anderen aber auch Unterschiede in den untersuchten Patientenkollektiven, z.B. neokortikale Epilepsien vs. Temporallappenepilepsien, unterschiedliche Ausmasse von Neuronenverlust resp. reaktiver Gliose im Fokus, unterschiedliche intrinsische epileptogene Aktivität oder unterschiedliche antiepileptische Behandlungen. Dies bedeutet, dass, während sich einerseits die MRS immer mehr als zuverlässige non-invasive Methode zur Fokuslokalisation in der Klinik bewährt, andererseits aber auch weitere Forschungsarbeit notwendig ist, um die gesamte in einem Spektrum enthaltene metabolische Information besser zu verstehen und somit auch zu nutzen. Wie dies etwa aussehen könnte, beschreibt der nächste Abschnitt.

MR-Spektroskopie als Hilfsmittel für den gezielten Medikamenteneinsatz

Die medikamentöse Therapie der Epilepsien basiert auch heute noch immer auf dem Prinzip „trial and error“, d.h. die Therapie wird dadurch optimiert, dass die verschiedenen heute erhältlichen Antiepileptika der Reihe nach allein oder in Kombination durchprobiert werden, bis die Substanz oder Substanzkombination gefunden ist, mit der die Anfälle am besten kontrolliert sind. Wünschenswert wäre allerdings eine massgeschneiderte Therapie, d.h. dass von Beginn an nur die Substanzen eingesetzt werden könnten, die in der individuellen Situation eines Patienten die grösste Aussicht auf Erfolg haben. Dies setzt allerdings voraus, dass einerseits sowohl die kurz- als auch die langfristigen Wirkungen der Antiepileptika auf die verschiedenen Neurotransmitter-/Ionenkanalsysteme bekannt sind, andererseits aber auch ein genaues neurochemisches Profil des individuellen Patienten erstellt werden kann. Erste Ansätze für Letzteres wurden mit der Entwicklung von Editing-Sequenzen zur Messung von GABA möglich. Diese erlaub-

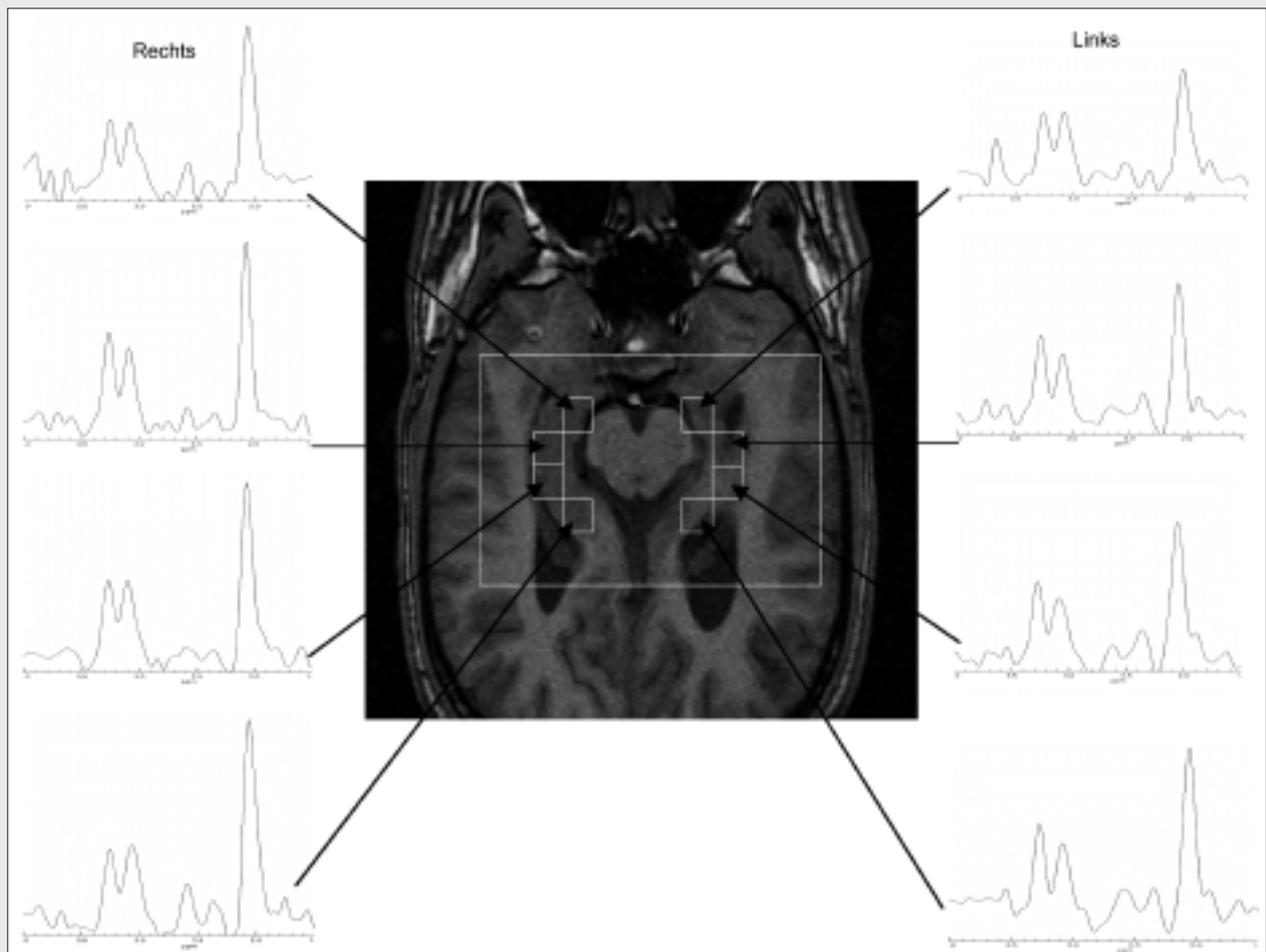


Abbildung 3: ^1H -Spektren (1H MRSI, TE/TR 144/1500 ms, FOV 210 ccm, nominale Voxelgröße 1ccm) aus dem Hippokampus eines Patienten mit einem links hippocampalen Anfallsherd (interiktale Messung). Jedes Quadrat entspricht einem Voxel, die entsprechenden Spektren sind mit einem Pfeil bezeichnet. Im Seitenvergleich fällt auf, dass der NAA-Peak in den ersten 3 Spektren auf der linken Seite deutlich kleiner ist als die entsprechenden Spektren auf der nicht epileptogenen rechten Seite, während sich die Peaks von Cr und Cho nicht unterscheiden.

ten es, die Veränderungen der GABA-Konzentration durch ein GABA-erges Medikament, wie z.B. Vigabatrin zu verfolgen und Charakteristika für ein gutes Ansprechen auf eine Therapie zu definieren. Im Falle von Vigabatrin waren eine deutliche Erniedrigung der GABA-Konzentration in der Hemisphäre mit dem epileptischen Fokus und ein deutlicher Anstieg in beiden Hemisphären auf übernormale Werte unter der Therapie in der Regel typisch für eine deutliche Reduktion der Anfälle durch Vigabatrin, während normale GABA-Konzentrationen vor Therapiebeginn, die auch unter Therapie kaum anstiegen, typisch für ein Versagen von Vigabatrin waren ^[29]. Inwieweit sich diese Respondercharakteristika auch auf die anderen Antiepileptika übertragen lassen, die zu einem spektroskopisch messbaren GABA-Anstieg führen, bleibt abzuklären ^[30-31].

Referenzen

1. De Graaf RA. *In vivo NMR Spectroscopy. Principles and Techniques*. Chichester: John Wiley, 1998
2. Pettegrew JW, Klunk WE, Panchalingam K et al. *Molecular insights into neurodevelopmental and neurodegenerative diseases*. *Brain Res Bull* 2000; 53: 455-469
3. Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. *Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro*. *J Neurochem* 1992; 59: 55-61
4. Bates TE, Strangward M, Keelan J et al. *Inhibition of N-acetylaspartate production: implications for 1H MRS studies in vivo*. *Neuroreport* 1996; 7: 1397-1400
5. Bhakoo KK, Pearce D. *In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo*. *J Neurochem* 2000; 74:254-262
6. Moreno A, Ross BD, Bluml S. *Direct determination of N-acetyl-L-aspartate synthesis rate in the human brain by 13CMRS and [1-13C] glucose infusion*. *J Neurochem* 2001; 77: 347-350
7. Baslow MH. *N-Acetylaspartate in the vertebrate brain: Metabolism and function*. *Neurochem Res* 2003; 28: 941-953

8. Najm IM, Wang Y, Hong SC et al. Temporal changes in proton MRS metabolites after kainic acid-induced seizures in rat brain. *Epilepsia* 1997; 38: 87-94
9. Najm IM, Wang Y, Shedi D et al. MRS metabolic markers of seizures and seizure-induced neuronal damage. *Epilepsia* 1998; 39: 244-250
10. Holtzman D, Meyers R, Khait I, Jensen F. Brain creatine kinase reaction rates and reactant concentrations during seizures in developing rats. *Epilepsy Res* 1997; 27: 7-11
11. Young RS, Petroff OA, Chen B et al. Brain energy state and lactate metabolism during status epilepticus in the neonatal dog: in vivo ^{31}P and ^1H nuclear magnetic resonance study. *Pediatr Res* 1991; 29: 191-195
12. Tokumitsu T, Manusco A, Weinstein PR et al. Metabolic and pathological effects of temporal lobe epilepsy in rat brain detected by proton spectroscopy and imaging. *Brain Res* 1997; 744: 57-67
13. Fazekas F, Kapeller P, Schmidt R et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy findings after focal status epilepticus. *Epilepsia* 1995; 36: 946-949
14. Lazeyras F, Blanke O, Zimine I et al. MRI, ^1H -MRS, and functional MRI during and after prolonged nonconvulsive seizure activity. *Neurology* 2000; 55: 1677-1682
15. Mueller SG, Kollias SS, Trabesinger AH et al. Proton magnetic resonance spectroscopy characteristics of a focal cortical dysgenesis during status epilepticus and in the interictal state. *Seizure* 2001; 10: 518-524
16. Castillo M, Smith JK, Kwock L. Proton spectroscopy in patients with acute temporal lobe seizures. *Am J Neuroradiol* 2001; 22: 152-157
17. Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S et al. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000; 48: 766-773
18. Kuzniecky R, Palmer C, Hugg J et al. Magnetic resonance spectroscopic imaging in temporal lobe epilepsy: neuronal dysfunction or cell loss. *Arch Neurol* 2001; 58: 2048-2053
19. Hetherington HP, Pan JW, Spencer DD. ^1H and ^{31}P spectroscopy and bioenergetics in the lateralization of seizures in temporal lobe epilepsy. *J Magn Reson Imag* 2002; 16: 477-483
20. Chu WJ, Hetherington HP, Kuzniecky RI et al. Lateralization of human temporal lobe epilepsy by ^{31}P NMR spectroscopic imaging at 4.1T. *Neurology* 1998; 51: 472-479
21. Van der Grond J, Gerson JR, Laxer KD et al. Regional distribution of interictal ^{31}P metabolic changes in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1998; 39: 527-536
22. Connelly A, Jackson GD, Duncan JS et al. Magnetic resonance spectroscopy in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1994; 44: 1411-1417
23. Savic I, Thomas AM, Ke Y et al. In vivo measurements of glutamine+glutamate (Glx) and N-acetyl aspartate (NAA) levels in human partial epilepsy. *Acta Neurol Scand* 2000; 102: 179-188
24. Woermann FG, McLean MA, Bartlett PA et al. Short echo time single-voxel ^1H magnetic resonance spectroscopy in magnetic resonance imaging-negative temporal lobe epilepsy: different biochemical profile compared with hippocampal sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 45: 369-376
25. Vermathen P, Laxer KD, Matson GB, Weiner MW. Hippocampal structures: anteroposterior N-acetylaspartate differences in patients with epilepsy and control subjects as shown with proton MR spectroscopic imaging. *Radiology* 2000; 214: 403-410
26. Simister RJ, Woermann FG, McLean MA et al. A short-echo-time proton magnetic resonance spectroscopic imaging study of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 1021-1031
27. Wellard RM, Briellmann RS, Prichard JW et al. Myoinositol abnormalities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 815-821
28. Mueller SG, Laxer KD, Suhy J et al. Spectroscopic metabolic abnormalities in mTLE with and without MRI evidence for mesial temporal sclerosis using hippocampal short-TE MRSI. *Epilepsia* 2003; 44: 977-980
29. Mueller SG, Weber OM, Duc CO et al. Effects of vigabatrin on brain GABA+/Cr signals in patients with epilepsy monitored by ^1H NMR-spectroscopy: Responder characteristics. *Epilepsia* 2001; 42: 29-40
30. Petroff OA, Hyder F, Rothman DL, Mattson RH. Topiramate rapidly raises brain GABA in epilepsy patients. *Epilepsia* 2001; 42: 543-548
31. Kuzniecky R, Ho S, Pan J et al. Modulation of cerebral GABA by topiramate, lamotrigine, and gabapentin in healthy adults. *Neurology* 2002; 58: 368-372

Korrespondenzadresse:
Dr. med. Susanne G. Müller
 Abteilung für Epileptologie
 und Enzephalographie
 Neurologische Klinik
 Universitätsspital Zürich
 Frauenklinikstrasse 26
 CH 8091 Zürich
 smuenos@hotmail.com

Die Schweizerische Liga gegen Epilepsie (SLgE) nimmt Abschied von ihrem Ehrenmitglied, Herrn Prof. Dr. Pierre Gloor (1923-2003). Mit Erlaubnis seines Freundes, Prof. Fred Andermann, drucken wir den (leicht veränderten und gekürzten) Nachruf ab, den dieser verfasste. Die SLgE trauert mit den Freunden und Angehörigen. Sie wird Prof. Gloor ein ehrendes Andenken bewahren. Der Unterzeichnende trauert um einen väterlichen Freund und Mentor des Epilepsiechirurgischen Programms des Universitätsspitals Zürich.

Prof. Heinz Gregor Wieser

Tribute

After having been felled by a severe stroke in 1994, Dr. Pierre Gloor passed away peacefully at the Montreal Neurological Institute/Hospital on Friday, October 24, 2003.

Professor Gloor was born in Basel, Switzerland, and started his career in neuroscience with Professor Boranger in Colmar. He joined McGill's Montreal Neurological Institute in 1952 as a fellow in electroencephalography and neurophysiology, where he studied with Wilder Penfield and Herbert Jasper, receiving his Ph.D. from McGill in 1957. During his training with Penfield and Jasper in the early 1950's, he developed a life long passion for clinical neurophysiology, EEG and, in particular, epilepsy. Prof. Gloor had a deep admiration for the work of Hans Berger, the discoverer of electroencephalography. He translated Berger's papers with great care to render the complexities of Berger's sentences, with the proverbial verb at the end of a long paragraph. He was as much concerned by the legacy and personality of the man as by his work on the electroencephalogram.

Pierre Gloor began lecturing at McGill in 1954 as an Assistant Professor, became Full Professor in 1968 in the department of Neurology and Neurosurgery, and a McGill Emeritus Professor in 1998.

Pierre Gloor worked closely with the clinical and research teams at the Montreal Neurological Institute in the treatment of epilepsy. His work in understanding and treating this disorder earned him a worldwide reputation. Prof. Gloor was a teacher-clinician-scientist-scholar able to mesh these activities to an incredible degree. He was a consummate researcher, a wonderful teacher and he had extraordinary clinical judgment and powers of observation. Prof. Pierre Gloor was a prodigious worker and, upon his retirement from administration, it took three people to shoulder his workload. He was one of the great epileptologists of our time.

Laden with honors and admired by his many disciples, he received the Epilepsy Research Award of the American Epilepsy Society, the Michael Prize from West

Germany (1980), the Robert Bing Prize of the Swiss Academy of Medical Sciences (1962), the William Lennox Award of the American Epilepsy Society (1981), the Jasper Award, American Electroencephalographic Society (1988), the Penfield Award of the Canadian League Against Epilepsy (1990), and the Epilepsy Research Award, American Epilepsy Society Milken Family Foundation (1994). He was the President of the Canadian and the American Electroencephalographic Societies, The Eastern Association of Electroencephalographers, and of the American Epilepsy Society. Lectureships in his honor were founded by the American EEG Society, the Eastern Association of Electroencephalographers, and by the University of Chicago.

Pierre Gloor published approximately 250 scientific articles covering wide areas of brain research. He had inexhaustible scholarly curiosity and planned a comprehensive synthesis of all that is known about the temporal lobe and the limbic system, a subject, which continually fascinated him. He did this in his usual thorough manner, involving many trips to the original Yakovlev anatomical archives in Washington. This resulted in his magnum opus, "The Temporal Lobe and The Limbic System", published by Oxford University Press, a culmination of his life's interest in the anatomy and physiology of the temporal lobe and its disorders. The final critique of this subject was unfortunately not given to him to complete, but the volume appeared under the stewardship of William Feindel and many of Pierre's friends. It will stand as a tribute to him for many years.

Prof. Pierre Gloor was a key figure in the training of graduate students in neuroscience and of young physicians in neurology. He had a prominent role in training a generation of now internationally renowned experts. He took an active part in organizing a CEGEP program, resulting in Quebec having superbly trained EEG technologists. He also acted as consultant to many Montreal hospitals.

Pierre Gloor was an accomplished pianist and harpsichordist with a special love of J.S. Bach. He and his wife Luba Genush were marvelous hosts and as a true Swiss, he adored cheese. An avid cross-country skier, he often outdistanced his much younger colleagues. He was sensitive and generous to his employees, to friends and in particular to his Swiss colleagues seeking advice, and always helped with any of their problems. His devotion to his wife and children, Irene (Schatzy) and Danny, and his grandchildren, Amanda and Patrick Gloor, and Justin and Emilie Shoubridge, was admirable.

Prof. Pierre Gloor was indeed a star in the crown of McGill and of international Neurophysiology and Epileptology. He will always be remembered as a great pioneer and a wonderful friend.

Fred Andermann, Montreal

Vorschau Epileptologie 2 | 2004

Editorial

Epilepsie und Kognition

PD Dr. rer. nat. Hennric Jokeit / Zürich

Neuropsychologie in der beruflichen Rehabilitation

Anna Dalfarra, lic. phil. I, Psychologin, und Dr. med. Klaus Meyer / Tschugg

Neuropsychologie im Vorschulalter

Maria Haag, Psychotherapeutin SPV, und Therese Siegenthaler, dipl. Heilpädagogin / Zürich

Manifestations neuropsychologiques du syndrome de Rasmussen

PD Dr. med. Margitta Seeck / Genève

Limbische Ereignis-korrelierte Potenziale und hippocampale Gedächtnisprozesse

PD Dr. Dr. med. Thomas Grunwald / Zürich

Funktionelle Bildgebung in der klinischen Neuropsychologie

Martina Schacher, lic. phil. I, Psychologin / Zürich

Epilepsies bénignes partielles

Prof. Dr. med. Thierry Deonna / Lausanne

Benennstörungen nach epilepsiechirurgischen Eingriffen im sprachdominanten Temporallappen

Dr. Michael Schwarz, Dr. Elisabeth Pauli und Prof. Hermann Stefan / Erlangen D



Ausschreibung - Forschungsförderung

Förderung der wissenschaftlichen Forschung im Bereich der Epilepsie (vorwiegend Starthilfen) durch die Schweizerische Liga gegen Epilepsie (SLgE)

Die SLgE unterstützt wissenschaftliche Projekte im Bereich der Epileptologie im Gesamtbetrag von maximal CHF 20'000.-- pro Jahr. Insbesondere soll die Erforschung von Ursachen und Behandlungen der Epilepsie gefördert werden.

Stipendien für Aus- oder Weiterbildung oder Auslandsaufenthalte werden nicht ausgerichtet. Hingegen können Reise- und Aufenthaltskosten (ohne Salär) für Kurzaufenthalte (maximal einige Wochen) finanziert werden, sofern sie dem Erlernen von Methoden dienen, welche im Rahmen eines unterstützten Projektes in der Schweiz eingesetzt werden.

Termin für die Einreichung von Gesuchen:

1. Oktober 2004

Formulare und Wegleitung für Gesuchsteller können angefordert werden bei: **Geschäftsstelle SLgE, Schweizerische Liga gegen Epilepsie, Seestr. 84 / Postfach 1084, 8034 Zürich, Telefon 043 488 67 77 / Telefax 043 488 67 78 / info@epi.ch**

Liga-Fachveranstaltung

Dienstag, 4. Mai 2004 | 18 bis 19.30 Uhr | Ostschweizer Kinderspital, St. Gallen | Referenten: PD Dr. med. Barbara Tettenborn, Dr. med. Markus Weissert und Dr. med. Oswald Hasselmann

600. Liga-Mitglied

Ende 2003 durften wir Dr. Karl H. Strackenbrock als 600. Mitglied begrüßen. Wir heissen ihn herzlich willkommen. Geboren auf einem Bauernhof in der Lüneburger Heide, aufgewachsen in Hamburg, Westfalen und im Rheinland, studierte er allgemeine Naturwissenschaften mit Hauptrichtung Biochemie und Analytik in Köln, Tübingen, Wien, Bonn und Karlsruhe. Dr. Karl H. Strackenbrock war Leiter Entwicklung Lebensmittelverfahrenstechnik und Verpackung für einen weltweit tätigen US-Lebensmittelkonzern und arbeitete in nationalen und internationalen Gremien mit. Er lebt seit vierzig Jahren in der Schweiz und ist seit 1998 pensioniert. Seine Interessen gelten neben der Familie der Ethnologie, der Architektur und den Gärten.

SLgE-Mitgliederversammlung

**Donnerstag, 13. Mai 2004 | 17.45 Uhr
Luzern Kultur- und Kongresszentrum**



Dr. Claude Kahn (rechts) mit dem Preisträger

Am 4. Dezember 2003 überreichte Dr. Claude Kahn den Forschungspreis der Hugo Kahn Jubiläumsstiftung für Epilepsieforschung an PD Dr. med. Adrian M. Siegel für seine Habilitationsschrift über die prächirurgische Untersuchung und chirurgische Therapie von pharmakotherapierefraktären Epilepsien. Im Folgenden eine gekürzte Fassung der Laudatio, gehalten vom Liga-Präsidenten.

„Sehr geehrter, lieber Herr Dr. Kahn, sehr geehrte Mitglieder des Stiftungsrates des Forschungspreises der Hugo Kahn Jubiläumsstiftung für Epilepsieforschung, lieber Adrian, meine sehr geehrten Damen und Herren!

Als Vorsitzender des Preisrichterkollegiums ist es mir auch im Namen der weiteren Mitglieder, Herrn Prof. Paul-André Despland aus Lausanne und Herrn Prof. Theodor Landis aus Genf, eine grosse Freude, Ihnen heute Herrn Privatdozent Dr. Adrian Siegel vorstellen zu dürfen, der – nach der erstmaligen Preisvergabe an Frau PD Dr. Margitta Seeck im Jahr 2000 – mit dem diesjährigen Preis der Hugo Kahn Jubiläumsstiftung ausgezeichnet wird.

Im Juli 2003 erhielt Herr Siegel die Venia Legendi für das Fach Neurologie an der Universität Zürich. Zurzeit ist er Oberarzt an der Abteilung für Epileptologie und Elektroenzephalographie sowie für allgemein-neurologische Stationen an der Neurologischen Universitätsklinik, darüber hinaus ist er seit 1999 Konsiliarus für Epileptologie an der Neurologischen Universitätsklinik Basel und seit November diesen Jahres Konsiliarus für Neurologie am Kantonsspital Zug.

Thema seiner mit dem diesjährigen Preis der Hugo Kahn-Stiftung ausgezeichneten Habilitationsschrift war die prächirurgische Untersuchung und chirurgische Therapie von pharmakotherapierefraktären Epilepsie.

Bei den meisten Epilepsiepatienten kann mit antiepileptischen Medikamenten eine Anfallsfreiheit oder zumindest eine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreicht werden. Etwa 25 % der fokalen Epilepsien gelten jedoch als medikamentös therapierefraktär.

Für diese Patienten stellt die Epilepsiechirurgie eine wichtige Therapieoption dar. Dank den heute zur Verfü-

gung stehenden modernen bildgebenden Untersuchungsmethoden und vor allem dank der häufigen Herdlokalisation durch nichtinvasives und invasives EEG-Monitoring können immer mehr Patienten einer Operation zugeführt werden. Die Resultate solcher operativen Therapien sind vor allem bei der mesialen Temporallappenepilepsie, der häufigsten Form fokaler Epilepsien von Erwachsenen, sehr gut. Demgegenüber sind die therapierefraktären extratemporalen Epilepsien, bei denen der Anfallsursprung ausserhalb des Temporallappens liegt, weiterhin eine grosse therapeutische Herausforderung für den Epileptologen und Neurochirurgen. In den letzten Jahren konnten aber auch bei der extratemporalen Epilepsiechirurgie ausreichend gute Resultate erreicht werden, um operative Eingriffe zu rechtfertigen.

In seiner preisgekrönten Arbeit hat Herr Siegel zunächst anhand von 10 eigenen einschlägigen Publikationen die klinischen Aspekte der zwei häufigsten extratemporalen Epilepsieformen dargestellt, im zweiten Teil dann die verschiedenen Strategien in der prächirurgischen Diagnostik bei temporalen und extratemporalen Epilepsien, im dritten Teil ihre chirurgische Therapie und im vierten Teil mögliche Prädiktoren für ein gutes chirurgisches Operationsergebnis vorgestellt.

Das Preisrichterkollegium war einstimmig der Ansicht, aus den insgesamt eingegangenen 8 Bewerbungen die Arbeit von Herrn Siegel für die Preisvergabe vorzuschlagen.

Lieber Adrian, Herzlichen Glückwunsch!

Dr. med. Günter Krämer

Ausschreibung - Promotionspreis

Die Schweizerische Liga gegen Epilepsie (SLgE) vergibt ab sofort jährlich einen Preis in Höhe von CHF 2'500

für die beste Dissertation auf dem Gebiet der Epileptologie. Bewerbungen sind aus allen Fachbereichen und Berufsgruppen möglich und erwünscht, sowohl aus Grundlagen- als auch klinischen Fächern. Eine Altersbeschränkung erfolgt nicht.

Das Preisrichterkollegium setzt sich aus drei Vorstandsmitgliedern der SLgE zusammen, das bei Bedarf zusätzlich externe Gutachter hinzuziehen kann. Es trifft seine Entscheidung in geheimer Wahl.

Die Preisverleihung erfolgt jeweils im darauf folgenden Jahr anlässlich der Jahrestagung oder Mitgliederversammlung der SLgE, erstmals 2004.

Bewerbungen sind jeweils **bis zum 31.12.** an die Geschäftsstelle der SLgE (Seefeldstr. 84, Postfach 1084, 8034 Zürich) einzureichen und müssen beinhalten:

- drei Exemplare der abgeschlossenen und beim Dekanat eingereichten Dissertation,
- drei Exemplare einer Stellungnahme des Doktorvaters (dabei kann es sich auch um das entsprechende Gutachten für die Dissertation handeln).

22.-24.4.2004 | Basel

Schweiz. Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie (SGKN) mit SVEPTA

Information: Prof. Dr. med. P. Fuhr,
Neurologische Universitäts-Klinik, 4031 Basel,
Tel. 0041 / 61 / 2654167, Fax 0041 / 61 / 2655638,
e-mail: peter.fuhr@unibas.ch, pfuhr@uhbs.ch

24.4.-1.5.2004 | San Francisco, USA

56th American Academy of Neurology (AAN) Annual Meeting

Information: AAN Member Services, 1080 Montreal Avenue, St. Paul, MN 55116-2325, USA, Tel. 001 / 651 / 6951940, Fax 001 / 651 / 6952791, e-mail: memberservice@aan.com, www.aan.com oder http://am.aan.com

4.5.2004 | St. Gallen

Ostschweizer Kinderspital 18.00 – 19.30

Fachveranstaltung der Schweiz. Liga gegen Epilepsie

Information: Geschäftsstelle SLgE, Seefeldstrasse 84, 8034 Zürich, Tel. 0041 / 43 / 488 67 77,
e-mail: info@epi.ch

5.-9.5.2004 | Triest, Italien

7th Congress of the European Society for Clinical Neuropharmacology (ESCNP)

Information: Aristeia, Via Tolmino 5, 00198 Rom, Italien,
Tel. 0039 / 06 / 845431, Fax 0039 / 06 / 84543700,
e-mail: escnp2004@aristeia.com,
www.aristeia.com/escnp2004

9.-13.5.2004 | Villasimius, Sardinien, Italien

7th Eilat Conference on new Antiepileptic Drugs (Eilat VII)

Information: Eilat VII,
PO Box 29041, Tel Aviv 61290, Israel,
Tel. 00972 / 3 / 5175150, Fax 00972 / 3 / 5175155,
e-mail: eilatvii@targetconf.com, www.eilatvii.com

13.-15.5.2004 | Luzern

Frühjahrstagung der Schweizerischen Neurologischen Gesellschaft (SNG) gemeinsam mit der Schweizerischen Liga gegen Epilepsie (SLgE)

Information: Dr. H.R. Stöckli (Präsident SNG),
Kasernenstr. 22a, 4410 Liestal,
Tel. 0041 / 61 / 9219170, Fax 0041 / 61 / 9219136;
e-mail: hrstoekli@datacomm.ch

20.-23.5.2004 | Freiburg, Deutschland

44. Jahrestagung der Deutschen Sektion der Internationalen Liga gegen Epilepsie

Information: CTW-Congress Organisation,
Thomas Wiese GmbH, Gosslerstr. 30, 12161 Berlin,
Tel. 030 / 859962-14, Fax 030 / 85079826;

e-mail: liga@ctw-congress.de,
www.ctw-congress.de/liga04

30.5.-3.6.2004 | Wien, Österreich

6th European Congress on Epileptology

Information: ILAE/IBE Congress Secretariat,
16 Mountdown Road, Walkinstown, Dublin 12, Ireland,
Tel. 00353 / 1 / 409 / 77796, Fax 00353 / 1 / 429 / 1290,
e-mail: info@epilepsycongress.org,
www.epilepsyvienna2004.org,
www.epilepsycongress.org

23.-26.6.2004 | Wien, Österreich

16th Congress of the European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery (ESSFN)

Information: GTmed, Society for Telemedicine,
Schottenfeldgasse 45, 1070 Wien, Österreich,
e-mail: info@come2vienna.org, www.come2vienna.org

24.-26.6.2004 | Charmex

10. Arbeitstagung des Deutsch-Österreichischen-Schweizer Arbeitskreises (Dach-AK) Epilepsie

Information: Prof. Dr. P.-A. Despland, Centre Hospitalier Universitaire (CHUV), Service de Neurologie,
Tel. 0041 / 21 / 3141215, Fax 0041 / 21 / 3141285
e-mail: Paul-Andre.Despland@chuv.hospvd.ch

26.-30.6.2004 | Barcelona, Spanien

14th Meeting of the European Neurological Society (ENS)

Information: ENS 2004, c/o AKM Congress Service,
Clarastr. 57, P.O. Box, CH-4005 Basel,
Tel.: 0041 / 61 / 6867711, Fax 0041 / 61 / 686 7788,
e-mail: info@akm.ch, www.ensinfo.com

2.-5.7.2004 | Mexico City, Mexico

3rd Latin American Epilepsy Congress

Information: ILAE/IBE Congress Secretariat,
16 Mountdown Road, Walkinstown, Dublin 12, Ireland,
Tel. 00353 / 1 / 409 / 77796,
Fax 00353 / 1 / 429 / 1290,
e-mail: info@epilepsycongress.org,
www.epilepsiamexico2004.org,
www.epilepsycongress.org

11.-21.7.2004 | San Servolo, Venidig, Italien

International Course: Epilepsy in children: neurobiological, clinical and therapeutic approach

Information: Prof. G. Avanzini, M.D., Istituto Nazionale Neurologico, Via Celoria 11, 20133 Milano, Italien,
Tel. 0029 / 02 / 2394253, Metella Paterlini,
Fax 0039 / 02 / 700445211,
e-mail: sanservolocourse@virgilio.it,
www.ilae-epilepsy.org, www.epilepsy-academy.org

28.-31.8.2004 | Bangkok, Thailand
5th Asian & Oceanian Epilepsy Congress
Information: ILAE/IBE Congress Secretariat,
16 Mountdown Road, Walkinstown, Dublin 12, Ireland,
Tel. 00353 / 1 / 409 / 77796,
Fax 00353 / 1 / 429 / 1290,
e-mail: info@epilepsycongress.org,
www.epilepsycongress.org

4.-7.9.2004 | Paris, Frankreich
8th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS)
Information: Kenes International, 17 Rue du Cendrier,
PO Box 1726, 1211 Geneva 1, Switzerland,
Tel. 0041 / 22 / 9080488, Fax 0041 / 22 / 7322850,
e-mail: efns2004@kenes.com,
www.kenes.com/efns2004

8.-11.9.2004 | Gargnano, Italien
16. Praxisseminar über Epilepsie
Information: Stiftung Michael, Münzkamp 5 22339
Hamburg, Tel. 040 / 5388540, Fax 040 / 5381559,
e-mail: stiftungmichael@t-online.de,
www.stiftungmichael.de

15.-19.9.2004 | Jena, Deutschland
49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für klinische Neurophysiologie und funktionelle Bildgebung
Information: Conventus Kongressmanagement
& Marketing GmbH, Markt 8, 07743 Jena,
Tel. 03641 / 35330, Fax 3641 / 353321,
e-mail: post@conventus.de,
www.conventus.de/DGKN2004

9.-13.10.2004 | Stockholm, Schweden
17th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress
Information: Congrex Holland BV, P.O. Box 302, 1000
AH Amsterdam, The Netherlands,
Tel. 0031 / 20 / 5040207, Fax 0031 / 20 / 5040225,
e-mail: secretariat@ecnp.nl, www.congrex.com

3.-6.11.2004 | Savannah, Georgia, USA
American Association of Electrodiagnostic Medicine (AAEM)
Information: AAEM, 421 First Avenue S.W.,
Suite 300 East Rochester, MN 55902, USA,
Tel. 001 / 507 / 2880100, Fax 001 / 507 / 2881225,
e-mail: aaem@aaem.net, www.aaem.net

4.-6.11.2004 | Genf
Herbsttagung der Schweizerischen Neurologischen Gesellschaft (SNG)
Information: Dr. H.R. Stöckli (Präsident SNG),
Kasernenstr. 22a, 4410 Liestal,
Tel. 0041 / 61 / 9219170, Fax 0041 / 61 / 9219136;
e-mail: hrstoekli@datacomm.ch

3.-8.12.2004 | New Orleans, USA
58th Annual Meeting of the American Epilepsy Society (AES)
Information: Karan Murray, American Epilepsy Society,
638 Prospect Avenue, Hartford, CT 06195-4240, USA,
Tel. 001 / 860 / 5867505, Fax 001 / 860 / 5867550,
e-mail: info@aesnet.org, www.aesnet.org

Impressum

Herausgeber | Administration | Schlussredaktion
Schweizerische Liga gegen Epilepsie
Margret Becker, lic. phil. I
Seefeldstrasse 84, Postfach 1084,
8034 Zürich
Tel. 0041 43 488 67 79
Fax 0041 43 488 67 78
becker@epi.ch

Konzeption | Gestaltung | Reinzeichnung
Birgit Depping, Mediendesign
Pulverstrasse 20b, D-31675 Bückeburg
bd@screenblue.de, www.screenblue.de

Belichtung | Druck
J.C.C. Bruns Betriebs GmbH
D-32423 Minden, www.jccbruns.de

Auflage
2.000 Exemplare

Versand
Eingliederungs- und Dauerwerkstätte
des Schweiz. Epilepsie-Zentrums
Bleulerstrasse 72, 8008 Zürich