

Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regionale und zeitliche Korrelation von epilepsietypischer  
Aktivität und Genexpression – eine *in vitro* Studie in  
Rattenhirnschnitten

Spatiotemporal correlation of epileptiform activity and gene  
expression – an *in vitro* study in rodent brain slices

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Schlabitz

Datum der Promotion: 03.03.2023



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Epileptische Anfälle und Epilepsie .....	5
1.2 Antiepileptische Pharmakotherapie .....	5
1.3 Experimentelle Epileptologie.....	5
1.3.1 Das akute Hirnschnitt-Modell .....	6
1.3.2 Molekularbiologische Ansätze in der Epileptologie .....	7
1.4 Translationale Epilepsieforschung .....	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Methodik.....	10
2.1 Experimente <i>in vitro</i> .....	10
2.1.1 Versuchstiere .....	10
2.1.2 Hirnschnittpräparation .....	10
2.1.3 Versuchsaufbau .....	12
2.1.4 Elektrophysiologische Messungen .....	13
2.1.5 Optische Messungen.....	14
2.2 Molekularbiologisches Prozedere .....	16
2.2.1 RNA-Extraktion .....	16
2.2.2 Degradierung genomischer DNA .....	17
2.2.3 Reverse Transkription .....	18
2.2.4 Design und Effizienz von Primern .....	19
2.2.5 NormFinder Analyse.....	22

---

2.2.6	Quantitative PCR.....	22
2.3	Zelltod-Assay .....	24
2.4	Datenauswertung und statistische Auswertung .....	25
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Elektrophysiologische Parameter der epilepsietypischen Aktivität <i>in vitro</i> .....	27
3.2	Optische Parameter in akuten Rattenhirnschnitten.....	28
3.2.1	Induzierte epilepsietypische Aktivität durch 4-AP .....	28
3.2.2	Einfluss der Schnittebene der dorsoventralen Achse .....	30
3.2.3	Ausbreitende Depolarisationen .....	30
3.3	Zelltod-Assay .....	31
3.4	Auswahl des Referenzgens für die quantitative Genexpression .....	32
3.5	Genexpressionsanalyse in akuten Rattenhirnschnitten .....	33
3.5.1	<i>c-Fos</i> Expression.....	33
3.5.2	<i>Icer</i> Expression.....	34
3.5.3	<i>mTor</i> Expression .....	35
3.6	Korrelation der Genexpression mit Inkubationsdauer und Aktivität.....	36
4	Diskussion .....	38
4.1	Kurzzusammenfassung der Ergebnisse .....	38
4.2	Interpretation der Ergebnisse.....	38
4.3	Reproduktion in humanen Hirschnitten.....	40
4.4	Stärken und Schwächen der Studie.....	40
4.5	Implikation für zukünftige Forschung .....	42
	Literaturverzeichnis .....	43
	Eidesstattliche Versicherung .....	51
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....	52
	Auszug aus der Journal Summary List.....	53
	Eingebundene Publikation.....	57

---

Schlabitz, S., Monni, L., Ragot, A., Dipper-Wawra, M., Onken J. Holtkamp, M. und Fidzinski, P. (2021) Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression *in vitro*. *Front Mol Neurosci*. 14:643763

Lebenslauf.....	74
Publikationsliste.....	75
Danksagung.....	76

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Zusammensetzung von aCSF und NMDG-aCSF.....	12
<b>Tabelle 2</b>	Zusammensetzung des Mastermix zum DNase-Verdau.....	17
<b>Tabelle 3</b>	Zusammensetzung von Ansatz A für die reverse Transkription.....	18
<b>Tabelle 4</b>	Zusammensetzung von Ansatz B für die reverse Transkription.....	19
<b>Tabelle 5</b>	Übersicht der Charakteristika aller eingesetzten Primer.....	21
<b>Tabelle 6</b>	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR.....	23

---

Die Tabellen 1, 2, 3, 4 und 6 sind eigene Darstellungen.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung des Rattenhirns und lichtmikroskopische Aufnahme eines Hirnschnitts.....	11
<b>Abbildung 2</b>	Versuchsaufbau und Studiendesign.....	13
<b>Abbildung 3</b>	Übersicht der molekularbiologischen Arbeitsschritte.....	16
<b>Abbildung 4</b>	Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	20
<b>Abbildung 5</b>	Schematische Darstellung der quantitativen PCR.....	24
<b>Abbildung 6</b>	Elektrophysiologische Messungen der AE.....	27
<b>Abbildung 7</b>	Persistierende ictale Aktivität im ventralen EC.....	28
<b>Abbildung 8</b>	Optische Messungen der AE.....	29
<b>Abbildung 9</b>	Einteilung der Schnittebenen entlang der dorsoventralen Achse und deren Einfluss auf Ursprung und Propagation der AE.....	30
<b>Abbildung 10</b>	Optische Messungen der SD.....	30
<b>Abbildung 11</b>	Zelltod-Assay.....	32
<b>Abbildung 12</b>	Stabilitätswert M der Referenzgene.....	33
<b>Abbildung 13</b>	<i>c-Fos</i> Genexpression.....	34
<b>Abbildung 14</b>	<i>Icer</i> Genexpression.....	35
<b>Abbildung 15</b>	<i>mTor</i> Genexpression.....	35
<b>Abbildung 16</b>	Zeitliche und regionale Korrelation der epilepsietypischen Aktivität mit der Genexpression von <i>c-Fos</i> und <i>Icer</i> .....	36

---

Die Abbildungen 1B, 3, 4, 5 und 9A sind eigene Darstellungen.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1-AP</b>	Transkriptionsfaktor (engl. activated protein 1)
<b>4-AP</b>	4-Aminopyridin
<b>aCSF</b>	artifizieller Liquor (engl. artificial cerebrospinal fluid)
<b>AE</b>	anfallsartiges Ereignis
<b>ANOVA</b>	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
<b>CA</b>	Cornu ammonis
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. cyclic adenosine monophosphate)
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary deoxyribonucleic acid)
<b>c-Fos</b>	FOS-Proto-Onkogen
<b>Cq</b>	Quantifikationszyklus (engl. quantification cycle)
<b>CRE</b>	DNA-Regulationseinheit (engl. cAMP response element)
<b>CREM</b>	Transkriptionsfaktor (engl. cAMP response element-binding modulator)
<b>CREP</b>	Transkriptionsfaktor (engl. cAMP response element-binding protein)
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DG</b>	Gyrus dentatus
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
<b>EC</b>	entorhinaler Kortex
<b>EEG</b>	Elektroenzephalogramm
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure (engl. gamma-aminobutyric acid)
<b>H</b>	Hippocampus

---

<b>Icer</b>	Transkriptionsfaktor (engl. inducible cAMP early repressor)
<b>IOS</b>	intrinsisches optisches Signal
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
<b>mTor</b>	Rapamycin-bindendes Protein (engl. mechanistic, früher auch mammalian target of rapamycin)
<b>NMDG</b>	N-Methyl-D-Glucamin
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PTZ</b>	Pentylentetrazol
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
<b>RT</b>	reverse Transkription
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>S</b>	Subiculum
<b>TC</b>	temporaler Kortex
<b>Ywhaz</b>	Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase-Aktivierungsprotein
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Einer Epilepsie liegt eine komplexe und oft polygene Pathophysiologie zugrunde, die durch eine Dysregulation biologischer Netzwerke und Zellfunktionen verursacht wird. Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von epilepsietypischer Aktivität können das Verständnis beteiligter zellulärer Signalkaskaden verbessern. Bisher wurden dafür überwiegend Tiermodelle eingesetzt, die die humanen Bedingungen nur eingeschränkt rekapitulieren können. Durch Verwendung eines *in vitro* Anfallsmodells eröffnen sich Perspektiven, anfallsassoziierte Veränderungen der Genexpression auch in humanem Gewebe *ex vivo* zu studieren. Als Voraussetzung für einen translationalen Forschungsansatz haben wir die grundsätzliche Eignung eines etablierten *in vitro* Modells zur Untersuchung der Modulation von Genexpression infolge epilepsietypischer Aktivität evaluiert. Dafür haben wir das 4-Aminopyridin-Modell (4-AP-Modell) verwendet. In Rattenhirnschnitten wurde das Ausbreitungsmuster anfallsartiger Ereignisse (AE) mit den mRNA-Spiegeln der untersuchten Gene *c-Fos* (FOS-Proto-Onkogen), *Icer* (engl. inducible cAMP early repressor) und *mTor* (engl. mechanistic target of rapamycin) korreliert.

**Methoden:** Von naiven Ratten (Wistar Han) wurden kombinierte entorhinal-hippocampale Hirnschnitte (400 µm) angefertigt und AE *in vitro* durch 4-AP induziert. Die AE wurden durch Messung extrazellulärer Feldpotentiale und intrinsischer optischer Signale erfasst. Die Interventionsdauer variierte zwischen 1 und 4 Stunden. Anschließend erfolgte eine relative Quantifizierung der mRNA-Spiegel durch Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) unter Verwendung von *Ywhaz* als Referenzgen.

**Ergebnisse:** In den akuten Rattenhirnschnitten konnten durch 4-AP regelmäßig auftretende AE in anhaltend stabiler Frequenz induziert werden. Die meisten AE hatten ihren Ursprung im temporalen Kortex, breiteten sich zum entorhinalen Kortex aus und zeigten nur selten eine Einbeziehung der Hippocampusformation. Infolge der Präparation und Lagerung der Hirnschnitte wurde bereits in den Kontrollschnitten eine Zunahme der *c-Fos* und *Icer* mRNA beobachtet. Die epilepsietypische Aktivität *in vitro* resultierte in einer zusätzlichen zeitabhängigen Induktion der Genexpression von *c-Fos* und *Icer*. In Übereinstimmung mit dem regionalen Ausbreitungsmuster der AE war der mRNA Anstieg

beider Gene im temporalen Kortex am stärksten. Für *mTor* ließ sich keine Änderung der Genexpression infolge epilepsietypischer Aktivität nachweisen.

**Schlussfolgerung:** Bei positivem Nachweis einer regionalen und zeitlichen Korrelation zwischen elektrophysiologisch-optischen und molekularbiologischen Parametern epilepsietypischer Aktivität schlussfolgern wir, dass das akute Hirnschnittmodell mit 4-AP induzierten AE für Genexpressionsstudien geeignet ist. Daher können Transkriptomanalysen in humanen Hirnschnitten perspektivisch Einblicke in die molekularen Grundlagen der Pathophysiologie von Epilepsien geben.

## Abstract

**Background:** Epilepsy is considered as a complex and often polygenic disorder caused by dysregulation of biological networks and cellular functions. Analysis of gene expression changes due to epileptiform activity may enhance the understanding of involved molecular signaling cascades. Until now, animal models have been predominantly used for this purpose, but they can only recapitulate the humane conditions to a limited extent. *In vitro* seizure models provide perspectives to determine seizure-associated changes in gene expression also in human tissue *ex vivo*. As requirement for a translational approach, we evaluated the suitability of an established *in vitro* model to examine modulation of gene expression caused by epileptiform activity. For this, we used the 4-aminopyridine model (4-AP model). In rat brain slices, the propagation pattern of epileptiform activity was correlated with gene expression of the candidate genes *c-Fos* (FOS-Proto-Oncogene), *Icer* (inducible cAMP early repressor) and *mTor* (mechanistic target of rapamycin).

**Methods:** In combined entorhinal-hippocampal brain slices (400  $\mu\text{m}$ ) prepared from naive Wistar Han rats, epileptiform events *in vitro* were induced by 4-AP and monitored using recordings of extracellular field potentials and intrinsic optical signals. The duration of the intervention ranged from 1 to 4 hours. The mRNA levels were relatively quantified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using *Ywhaz* as reference gene.

**Results:** In acute rat brain slices, 4-AP was effective in inducing recurrent epileptiform activity at a persistently stable frequency. The majority of epileptiform events had their origin in the temporal cortex, propagated to the entorhinal cortex and rarely showed any hippocampal involvement. As a result of the preparation and storage of slices, an increase of *c-Fos* and *Icer* mRNA was already apparent in control slices. The epileptiform activity *in vitro* resulted in an additional time-dependent induction of *c-Fos* and *Icer* gene expression. Correlating with the regional propagation, the induction of both genes was strongest in the temporal cortex. The *mTor* gene expression did not show any changes following epileptiform activity.

**Conclusion:** Demonstrating a positive spatiotemporal correlation between electrophysiological-optical and molecular parameters of epileptiform activity, we

---

conclude that the acute brain slice model with 4-AP induced epileptiform events is suitable for gene expression studies. Perspectively, transcriptome analyses in human brain tissue may enhance our knowledge of the molecular mechanisms of the pathophysiology of epilepsies.

# 1 Einleitung

## 1.1 Epileptische Anfälle und Epilepsie

Ein epileptischer Anfall wird von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE, engl. international league against epilepsy) als ein transientes Auftreten von klinisch-objektivierbaren Zeichen und/oder subjektiven Symptomen definiert, die auf eine pathologische exzitatorische und synchronisierte neuronale Aktivität im Gehirn zurückzuführen ist. Eine Epilepsie ist eine Funktionsstörung des zentralen Nervensystems, die durch eine anhaltend erhöhte Prädisposition zur Generierung epileptischer Anfälle und den damit einhergehenden neurobiologischen, kognitiven, psychosozialen und sozialen Konsequenzen gekennzeichnet ist (Fisher et al. 2014). Epilepsien gehören zu den häufigsten chronisch-neurologischen Erkrankungen, für das Jahr 2009 wurde in einer epidemiologischen Untersuchung eine Periodenprävalenz in der deutschen Bevölkerung von 9,1/1000 ermittelt (Hamer et al. 2012).

## 1.2 Antiepileptische Pharmakotherapie

Die Hauptsäule in der Behandlung der Epilepsie ist die Pharmakotherapie. Bei mehr als 1/3 aller Patient\*innen mit Epilepsie besteht eine Pharmakoresistenz, d.h. es kann unter einer medikamentösen Behandlung mit zwei Antiepileptika in ausreichend hoher Dosis kombiniert oder in Folge keine Anfallsfreiheit für mindestens 12 Monate erreicht werden (Kwan et al. 2010). Trotz der Verfügbarkeit von mittlerweile mehr als 15 zugelassenen antiepileptischen Medikamenten der dritten Generation hat sich die Rate an anfallsfreien Patient\*innen nicht wesentlich verbessert (Chen et al. 2018). Die heutzutage eingesetzten Antiepileptika zielen auf eine Anfallssuppression durch Reduktion der neuronalen Exzitabilität ab. Es ist bislang nicht gelungen, krankheitsmodifizierende Medikamente zu entwickeln, die der Epileptogenese nach einer strukturellen Schädigung des Hirnparenchyms, zum Beispiel infolge eines Hirninfarktes oder nach einem Schädel-Hirn-Trauma, entgegenwirken können (Pitkänen et al. 2011; Pitkänen et al. 2016).

## 1.3 Experimentelle Epileptologie

Um das pathophysiologische Verständnis von epileptischen Anfällen und Epilepsien zu verbessern und neue therapeutische Optionen zu etablieren, ist es notwendig, die daran

beteiligten komplexen zellulären und molekularen Signalwege aufzudecken. In den letzten Dekaden wurden insbesondere Tiermodelle entwickelt und nachfolgend genutzt, um fundamentale krankheitsspezifische Mechanismen zu erforschen (Löscher 2017). In der experimentellen Epileptologie existieren zahlreiche *in vivo* sowie *in vitro* Modelle, zu letztgenannten zählen unter anderem akute Hirnschnitte, akute Hirnschnittkulturen und neuronale Kulturen (Avoli und Jefferys 2016).

### 1.3.1 Das akute Hirnschnitt-Modell

Eine wichtige Bedingung zur Induktion und Messung epilepsietypischer Aktivität *in vitro* sind die in Hirnschnitten über einen längeren Zeitraum vital erhaltenen Neuronen, die ausreichende funktionell intakte physiologische Verbindungen als neuronales Netzwerk beibehalten. Insbesondere in hippocampalen Hirnschnitten können sogenannte anfallsartige Ereignisse (AE) durch unterschiedliche elektrische und chemische Stimuli induziert werden (Stasheff et al. 1985; Walther et al. 1986). Eine Möglichkeit bietet die Behandlung von naiven Rattenhirnschnitten mit 4-Aminopyridin (4-AP) (Buckle und Haas 1982). 4-AP ist ein nicht-selektiver Inhibitor von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, der durch eine Depolarisation von Neuronen die Anfallsschwelle herabsetzt (Mathie et al. 1998). Zusätzlich werden durch 4-AP der präsynaptische Calcium-Einstrom und die synaptische Transmission erhöht, was ebenfalls zur Induktion der AE beiträgt (Perreault und Avoli 1991). *In vitro* führt 4-AP zu langanhaltenden Entladungen, die unter Berücksichtigung des klinischen Korrelats eines Grand mal-Anfalls mit initial tonischer und anschließend klonischer Phase sowie des dazugehörigen EEG-Musters korrespondierend zu epileptischen Anfällen *in vivo* angesehen werden (Avoli et al. 2002). Elektrophysiologisch zeigt diese iktale Aktivität insbesondere in kortikalen Strukturen eine monomorphe Konfiguration mit einer initialen Potentialnegativierung, gefolgt von hochfrequenten Oszillationen mit niedriger Amplitude und hiernach niedrigfrequenten Entladungen mit höherer Amplitude. Die AE treten regelmäßig auf und weisen eine Dauer von einigen Sekunden bis zu wenigen Minuten auf (Bruckner und Heinemann 2000).

Zusätzlich zu elektrophysiologischen Messungen kann epilepsietypische Aktivität mithilfe eines optischen Verfahrens erfasst werden, dabei werden sogenannte intrinsische optische Signale (IOS) aufgezeichnet. Als IOS wird die aktivitätsabhängige Änderung optischer Eigenschaften in neuronalem Gewebe bezeichnet. Epilepsietypische Aktivität geht in akuten Hirnschnitten mit einer Zunahme der Lichttransmission einher, die durch

eine Schwellung von Neuronen und Astrozyten bedingt zu sein scheint, allerdings sind die zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen nicht gänzlich geklärt (Pál et al. 2013). Mit einer Kamera können die intrinsischen optischen Signale des gesamten Hirnschnitts aufgezeichnet und somit Anfallscharakteristika wie Ursprung, Ausbreitung und Größe der betroffenen Fläche evaluiert werden (Borbely et al. 2014).

### 1.3.2 Molekularbiologische Ansätze in der Epileptologie

Durch technologische Fortschritte in der molekularbiologischen Forschung werden Untersuchungen auch zu krankheitsspezifischen genetischen Veränderungen bei Epilepsien möglich. Neben monogenetischen Krankheiten bietet das Feld auch Potential, Veränderungen in der Genom-Editierung und Epigenetik aufzudecken (Kobow und Blümcke 2018). Durch Analysen des gesamten Transkriptoms mit hoher regionaler Auflösung (engl. spatial transcriptomics) bis zur Erstellung von Einzelzellprofilen können außerdem anfallsbedingte Modulationen der Genexpression beurteilt werden (Becker et al. 2002; Guelfi et al. 2019). Im Tiermodell konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche Gene identifiziert werden, die für epilepsietypische Aktivität *in vivo* relevant sind.

Dazu zählt c-Fos (FOS-Proto-Onkogen), ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der der Familie der sogenannten frühen Gene (engl. immediate early genes) angehört (Curran und Morgan 1995). Als etablierter Marker für neuronale Aktivität kommt es durch eine Vielzahl pathophysiologischer Stimuli, wie epilepsietypische Aktivität, zu einer schnellen und transienten Induktion der c-Fos Expression (Willoughby et al. 1995; Barros et al. 2015). Als Heterodimer mit Mitgliedern der Jun-Familie wird der Transkriptionsfaktor 1-AP gebildet, der eine Reihe von zellulären Reaktionen wie Differenzierung, Plastizität und Degeneration vermittelt (Chiu et al. 1988; Pennypacker et al. 1994).

Die Genexpression des cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktors Icer (engl. inducible cAMP early repressor) wird ebenfalls infolge epilepsietypischer Aktivität *in vivo* induziert (Fitzgerald et al. 1996; Lund et al. 2008). Es ist bekannt, dass Icer nachfolgend die Transkription von Zielgenen durch Bindung an die DNA-Regulationseinheit CRE (engl. cAMP response element) supprimiert (Mioduszevska et al. 2003). Von besonderem Interesse ist dabei die Repression der Transkription der  $\alpha$ 1-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors im Gyrus dentatus der hippocampalen Formation (Lund et al. 2008). Veränderungen der Zusammensetzung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors lassen eine Begünstigung spontaner Anfälle (Epileptogenese) vermuten. Allerdings konnten andere Studien einen

antiepileptogenen Effekt von Icer aufdecken: Mäuse mit Icer Überexpression zeigten einen deutlich verzögerten Anfallsbeginn und mildere Anfallsformen (Kojima et al. 2008). Des Weiteren litten Icer Knockout-Mäuse nach einem durch Pilocarpin induzierten Status epilepticus häufiger unter epileptischen Anfällen als ihre Kontroll-Wurfgeschwister (Porter et al. 2008). Aufgrund der Komplexität der Genregulation mit Zell- und Hirnregionspezifität kann aktuell die resultierende Auswirkung von Icer auf die Epileptogenese nicht abschließend benannt werden.

Zunehmende Bedeutung in der Epileptologie findet auch mTOR (engl. mechanistic, früher auch mammalian target of rapamycin), ein in allen Säugtieren vorkommendes Enzym, dessen Signalweg neuronales Wachstum und Proliferation moduliert (Crino et al. 2006). Bei Patienten mit Tuberöser Sklerose, die meist unter schwerer und pharmakoresistenter Epilepsie leiden, ist der mTOR Signalweg aufgrund von Mutationen in den *TSC1*- und *TSC2*-Genen (engl. tuberous sclerosis complex) hyperaktiviert (Overwater et al. 2019). Eine Behandlung mit mTOR Inhibitoren wie Everolimus kann die Anfallshäufigkeit bei bis zu 40% der Betroffenen reduzieren (French et al. 2016). Neben genetischen Erkrankungen wurde eine Beteiligung des mTor Signalweges auch bei erworbenen Epilepsien in mehreren *in vivo* Tiermodellen nachgewiesen (Huang et al. 2010; Zhang und Wong 2012).

#### **1.4 Translationale Epilepsieforschung**

In den vergangenen 40 Jahren konnten zahlreiche neue Antiepileptika durch die Erprobung in Tiermodellen etabliert werden, wodurch die therapeutischen Möglichkeiten in der Epilepsiebehandlung zweifellos erweitert wurden (Löscher 2017). Tiermodelle haben einen hohen Stellenwert erlangt, da die induzierten Anfälle ein ähnliches Ansprechen auf Antiepileptika zeigen wie epileptische Anfälle des Menschen. Für viele andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie Migräne oder bipolare Störungen existieren keine Tiermodelle mit einem ähnlich hohen prädiktiven Wert (Löscher 2013). Während die neuen Antiepileptika vor allem ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen, zeigen viele dieser Substanzen in Monotherapie aber keine überlegende Wirksamkeit im Vergleich zu konventionellen Substanzen wie Carbamazepin oder Valproinsäure (Marson et al. 2007). Eine Ursache dafür ist das Beibehalten der gleichen Tiermodelle (vor allem das Maximal-Elektroschock- und Pentylentetrazol-Modell), die stets Substanzen identifizieren, die einen ähnlichen

Wirkmechanismus haben wie die etablierten Antiepileptika (Holtkamp und Meierkord 2007). Darüber hinaus wurden auch die meisten molekularen Erkenntnisse in tierexperimentellen Versuchen gewonnen, die die humanen Bedingungen nur eingeschränkt rekapitulieren können. In den letzten Jahren hat die Lücke zwischen Tiermodellen und klinischer Anwendung zunehmend Aufmerksamkeit erhalten. Folglich wird in Strategien investiert, die die Reproduzierbarkeit in der Grundlagenforschung erhöhen und auf eine Verbesserung der Translation in der Epileptologie abzielen (Löscher 2017). Eine Möglichkeit zur Untersuchung speziesspezifischer pathophysiologischer Mechanismen besteht in der Verwendung von humanem Gewebe *ex vivo*. Dafür bietet sich vitales Hirngewebe nach neurochirurgischen Eingriffen besonders an.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Die bisherigen Untersuchungen zur Modulation von Genexpression infolge epilepsietypischer Aktivität basieren überwiegend auf *in vivo* Tierversuchen. Ein solcher Ansatz ist naturgemäß im menschlichen Gehirn nicht möglich. Es ist bisher nicht bekannt, ob *in vitro* Modelle die beobachteten Veränderungen der Genexpression reproduzieren können. Als Voraussetzung für einen translationalen Forschungsansatz haben wir die grundsätzliche Eignung eines etablierten *in vitro* Anfallsmodells zur Untersuchung von Genexpressionsänderungen infolge epilepsietypischer Aktivität evaluiert.

## 2 Methodik

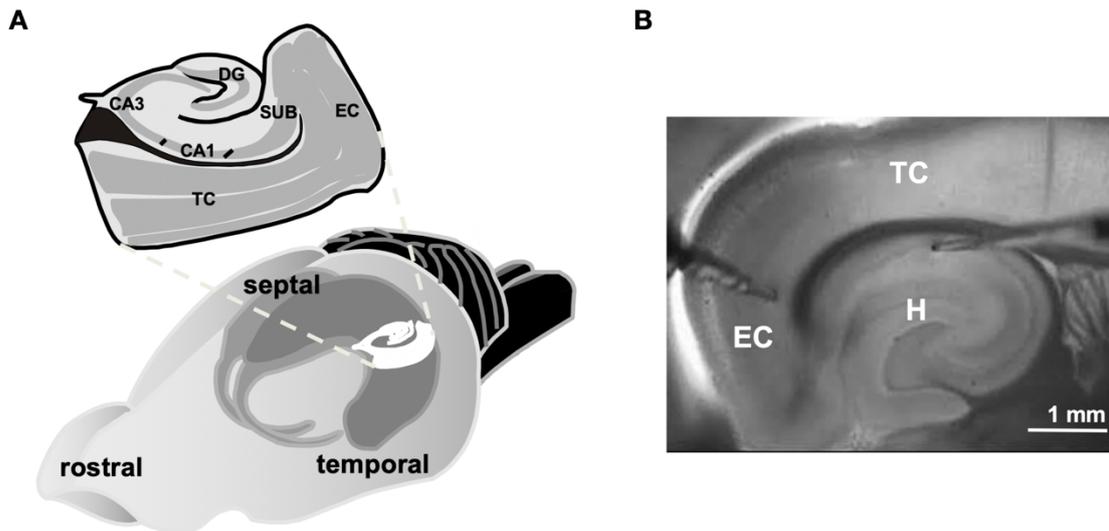
### 2.1 Experimente *in vitro*

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für unsere Experimente wurden adulte männliche Wistar Han Ratten (Janvier, Rennes, Frankreich) mit einem Gewicht von 220-240 g verwendet (n = 23 Tiere). Die Aufzucht und Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen der zentralen Tierzuchthaltung des Bereichs Experimentelle Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Die Tierversuche wurden unter Einhaltung des in Deutschland geltenden Tierschutzgesetzes (TierSchG, 5. Abschnitt, §7-§9 Tierversuche) sowie der Europäischen Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt und vom institutionellen Tierschutzbeauftragten und dem Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin (T0336/12) genehmigt.

#### 2.1.2 Hirnschnittpräparation

Die Ratten erhielten eine tiefe Isofluran-Narkose (Abbott Arzneimittel GmbH, Hannover, Deutschland) per inhalationem (4% Isofluran in 100% Sauerstoff). Nach Kontrolle der Sedierungstiefe erfolgte bei ausbleibender Reaktion auf Schmerzreize eine Dekapitation mittels einer Guillotine für Nagetiere (Kent Scientific, Torrington, USA). Nachfolgend wurden die Gehirne durch vorsichtige Entfernung des Kraniums mit einer Knochenzange freipräpariert und nach Eröffnung der Dura mater aus der Schädelgrube herausgelöst. Diese Präparationszeit bis zur vollständigen Separation des Gehirns betrug maximal 4 Minuten. Die Gehirne wurden nach Entnahme in einer kalten (ca. 4°C) Liquor-ähnlichen Lösung (engl. artificial cerebrospinal fluid (aCSF)) mit Zusatz von N-Methyl-D-Glucamin (NMDG) platziert. Der äquimolare Ersatz von Natrium durch NMDG führt zu einer verminderten Diffusion von Ionen über neuronale Membranen und damit zu einer reduzierten Zellschwellung (Hille 1971). Die Zusammensetzung des NMDG-aCSF ist in **Tabelle 1** angegeben. Die Lösung wurde in einem Becherglas zusätzlich mit einem Gasmischung, Carbogen bestehend aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid, angereichert. Mit einem Präzisionsschneidegerät (Vibroslicer VT1200S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 400 µm dicke horizontale Hirnschnitte angefertigt, die die Hippocampusformation (H), den entorhinalen Kortex (EC) und angrenzende Teile des temporalen Kortex (TC) umfassten (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1** (A) Schematische Darstellung des Gehirns der Ratte mit Lagebeziehung der angefertigten horizontalen Hirnschnitte. Quelle: modifizierte Abbildung 1 nach Witter et al. 2000. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Hirnschnitts während der nachfolgenden elektrophysiologischen Messung. Die Schnitte umfassten folgende Strukturen: Hippocampusformation (H) bestehend aus Subiculum (S), Cornu ammonis (CA1, CA3) und Gyrus dentatus (DG) sowie entorhinaler Kortex (EC) und temporaler Kortex (TC). Eigene Darstellung.

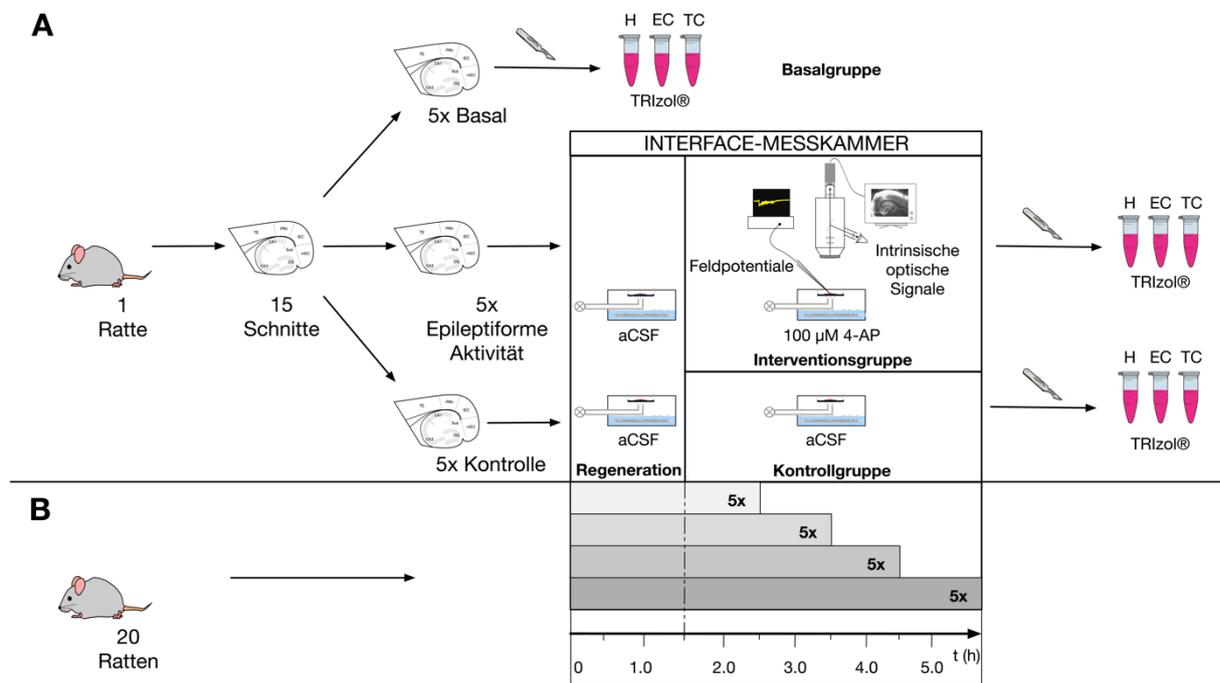
Von jedem Rattenhirn wurden insgesamt 15 Schnitte von beiden Hemisphären angefertigt und alternierend drei Gruppen mit je fünf Schnitten zugeordnet: (1) Basalgruppe zur Bestimmung der initialen, von den Experimenten unbeeinflussten Genexpression; (2) Kontrollgruppe zur Untersuchung der unmittelbaren Auswirkungen der Präparation und Lagerung der Hirnschnitte auf die Genexpression und (3) Interventionsgruppe zur Beurteilung der Genexpression in Abhängigkeit induzierter epilepsietypischer Aktivität *in vitro*. Die Schnitte der Kontroll- und Interventionsgruppe wurden einzeln in einer Messkammer unter sogenannten Interface-Bedingungen gelagert, dort befanden sie sich zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase. Das wurde einerseits durch eine kontinuierliche Perfusion (1,5-2,0 ml/min) der Hirnschnitte mit vorgewärmtem (35°C) und mit Carbogen-angereichertem aCSF (pH 7,4) erreicht (flüssige Phase). Die Zusammensetzung des aCSF ist in **Tabelle 1** aufgeführt. Während der Lagerung in der Interface-Messkammer wurde zusätzlich erwärmtes (35°C) und angefeuchtetes Carbogen über die Oberfläche der Hirnschnitte geleitet (gasförmige Phase).

**Tabelle 1** Zusammensetzung von aCSF und NMDG-aCSF

Substanz		aCSF-Konzentration (mM)	NMDG-Konzentration (mM)
Natriumchlorid	NaCl	129,00	0,00
Kaliumchlorid	KCl	3,00	2,50
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	1,20
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	21,00	30,00
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	1,80	10,00
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1,60	0,50
Glukose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10,00	25,00
N-Methyl-D-Glucamin	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	0,00	93,00
Natrium-L-Ascorbat	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	0,00	5,00
Natriumpyruvat	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	0,00	3,00
Thioharnstoff	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	0,00	2,00
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	0,00	20,00

### 2.1.3 Versuchsaufbau

Nach der Präparation und Platzierung der Schnitte in der Messkammer folgte eine 1,5-stündige Regenerationsphase zur Anpassung der Schnitte an die *in vitro* Umgebung. In den fünf Schnitten der Interventionsgruppe wurden anschließend AE pharmakologisch durch Zugabe von 100 µM 4-Aminopyridin (4-AP, Sigma, München, Deutschland) zur Perfusionslösung aCSF induziert. Die Behandlungsdauer mit 4-AP betrug 1, 2, 3 oder 4 Stunden, währenddessen wurde die epilepsietypische Aktivität elektrophysiologisch und optisch gemessen. Die fünf Schnitte der Kontrollgruppe verblieben für einen identischen Zeitraum in aCSF. Nach Entnahme aus der Messkammer erfolgte in allen Schnitten eine Mikrodisektion von H, EC und des anteilmäßigen TC um die Genexpression in diesen Regionen getrennt voneinander zu untersuchen. Zur Gewinnung ausreichender mRNA-Mengen (engl. messenger ribonucleic acid) wurde das Gewebe der gleichen Region und Gruppe innerhalb eines Experiments gepoolt. Eine Zell-Lyse des gepoolten Gewebes wurde durch Zugabe von je 1 ml TRIzol® (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) induziert. Wir führten dieses Experiment mit insgesamt 20 Ratten durch, dabei wurden fünf Tiere jeder 4-AP Behandlungsdauer (1, 2, 3 oder 4 Stunden) zugeordnet. Der experimentelle Ablauf ist in **Abbildung 2** skizziert.



**Abbildung 2 (A)** Darstellung des experimentellen Ablaufs von der Hirnschnittpräparation bis zur Zell-Lyse für die nachfolgende Genexpressionsanalyse, die separat für die Regionen Hippocampus (H), entorhinaler Kortex (EC) und temporalen Kortex (TC) erfolgte. **(B)** Gesamtes Studiendesign: Durchführung oben skizzierter Experimente mit insgesamt 20 Ratten, Zuordnung von je fünf Tieren zu jeder 4-AP Behandlungsdauer (1, 2, 3 oder 4 Stunden). Quelle: modifizierte Abbildung 1 nach Schlabitz et al. 2021.

### 2.1.4 Elektrophysiologische Messungen

Die durch 4-AP induzierte epilepsietypische Aktivität *in vitro* wurde elektrophysiologisch durch Messung von extrazellulären Feldpotentialen in 20 ausgewählten Hirnschnitten der Interventionsgruppe (ein Schnitt pro Ratte) aufgezeichnet. Um den Einfluss der Schnittposition auf die epilepsietypische Aktivität zu kontrollieren, wurden die Hirnschnitte drei verschiedenen horizontalen Schnittebenen zugeordnet. Der dorsoventralen Achse des Stereotaxie-Atlas des Rattenhirns entsprechend wurden diese definiert als: ventral (-7,6 bis -6,4 mm ventral vom Bregma), medial (-6,4 bis -5,2 mm) und dorsal (-5,2 bis -4,0 mm) (Paxinos und Watson 1998).

In den Hirnschnitten erfolgten simultane Messungen im Kortex und der Hippocampusformation: Eine Elektrode wurde in die tiefen Schichten (IV/V) des lateralen EC platziert, die zweite Elektrode wurde im Stratum pyramidale der hippocampalen CA1-Region positioniert (**Abbildung 1B**). Die dafür eingesetzten Glaselektroden wurden aus einlumigem Borosilikatglas (GB150F – 8P, Science products GmbH, Hofheim, Deutschland) angefertigt und das Kapillarlumen mit einer 150 mM Natriumchlorid-Lösung befüllt. Ein chlorierter Silberdraht diente als elektrischer Leiter (Elektrodenwiderstand 1-

2 M $\Omega$ ). Die Glaselektrode registrierte Änderungen des extrazellulären Feldpotentials, diese Potentialschwankungen sind durch elektrische Aktivität von Neuronen bedingt und vergleichbar mit denen eines Elektroenzephalogramms (EEG). Das elektrische Signal wurde von einem speziell angefertigten Differenzverstärker (10x) erfasst und verstärkt. Anschließend wurde das analoge Signal mit einem A/D-Wandler (Micro 1401 mk II, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) digitalisiert und unter Verwendung der Software Spike2 und Signal (Versionen 7.00 bzw. 3.07, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) kontinuierlich auf dem Computer aufgezeichnet. Mit selbstprogrammierten Algorithmen erfolgte eine Analyse der elektrophysiologischen Messungen mit der Software Matlab (R2014b, MathWorks, Natick, MA, USA). In Schnitten der Interventionsgruppe waren während der Exposition mit 4-AP regelmäßig auftretende AE nachweisbar. Diese AE wurden unter Berücksichtigung der folgenden Kriterien identifiziert: (1) Abfall des Feldpotentials > 0,3 mV; (2) hochfrequente Potentialschwankungen nach initialem Potentialabfall und (3) Dauer der AE > 10 s.

#### 2.1.5 Optische Messungen

In allen elektrophysiologisch gemessenen Hirnschnitten wurden zusätzlich intrinsische optische Signale (IOS) erfasst, die auf einer aktivitätsabhängigen Änderung optischer Eigenschaften in neuronalen Geweben basieren. Die Schnitte wurden dafür auf eine transparente Membran (0.4  $\mu$ m Millicell culture plate inserts, Millipore, Bedford MA, USA) in der Interface-Messkammer platziert. Um die für die IOS-Messung erforderliche homogene Durchleuchtung der Schnitte zu erreichen, wurde eine Halogenlampe (KL 1500, Schott, Wiesbaden, Deutschland) eingesetzt und das Licht über einen gebogenen und direkt unter dem Schnitt in der Messkammer eingelassenen Glasstab ( $\varnothing$  8 mm) geleitet. Die IOS-Signale wurden mit einem aufrechten binokularen Mikroskop (MS 5, Leica, Bensheim, Deutschland) unter Verwendung des Objektivs zur 4-fachen Vergrößerung, einem monokularen Fototubus (Leica, Bensheim, Deutschland) und einer CCD-Kamera (engl. charged coupled device, 8 bit, Sanyo, Osaka, Japan) aufgenommen. Eine Video-Digitalisierungskarte (pciGrabber-4plus, Phytex, Mainz, Deutschland) wurde zur Umwandlung der analogen Videosignale mit 10 MHz in 320 x 240 Pixel-Bilder eingesetzt. Sobald in der elektrophysiologischen Messung ein AE auftrat, wurde die Aufzeichnung der Bildsequenzen manuell gestartet. Es ist bekannt, dass die Transmission kurz nach dem Einsetzen der ictalen Aktivität zunimmt (Weissinger et al. 2000). Ein zirkulärer Datenpuffer gewährleistete eine zusätzliche Speicherung von 100

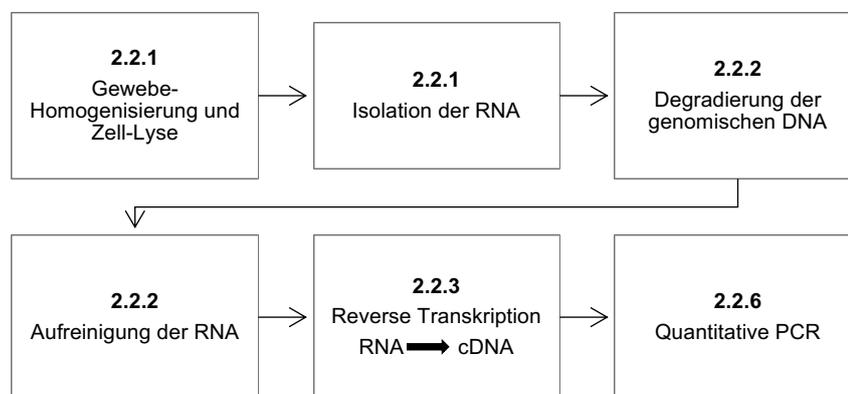
dem manuellen Aufnahmezeitpunkt vorausgehenden Bildern. Bei einer Bildfrequenz von 10 Bildern pro Sekunde begann die Speicherung der Bildsequenzen damit bereits 10 Sekunden vor dem manuellen Start. Somit konnte die Ursprungsregion der AE durch die ausreichend früh aufgezeichneten optischen Signale topographisch sicher detektiert werden. Da auch die Ausbreitung der AE erfasst werden sollte, umfasste die gesamte Aufzeichnung bis zu 180 Sekunden, abhängig von der Dauer des elektrophysiologisch gemessenen iktalen Ereignisses. Zur Bearbeitung der Bilder wurden selbstprogrammierte Algorithmen (Makros) für ImageJ 1.51m9 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) und Matlab-Software genutzt. Die Transmission wurde für jedes Pixel in einer von 256 differenten Graustufen kodiert. Die Transmissionsänderung ( $\Delta T$ ) eines Pixels wurde als Differenz der Transmission zu einer Referenz-Transmission angegeben. Als Referenz-Transmission nutzten wir den Mittelwert der Transmission der ersten 20 Bilder in jeder Serie, die vor Beginn der iktalen Aktivität aufgezeichnet wurden. Nachfolgend wurde der Quotient aus Transmissionsänderung und der Referenztransmission ( $\Delta T/T$ ) ermittelt. Während iktaler Ereignisse erreichte  $\Delta T/T$  Prozentwerte zwischen 1,0% und 7,5%, während das optische Hintergrundrauschen unter 1,0% lag. Die Amplitude während der AE wurde als  $\max(\Delta T/T)$  angegeben.

Die Behandlung mit 4-AP senkt durch die neuronale Erregbarkeitssteigerung nicht nur die Schwelle für AE, sondern auch für sich ausbreitende Depolarisationen (engl. spreading depolarizations (SD)), die wir durch die Messung optischer Signale ebenfalls erfassen konnten. SD resultieren in einer reduzierten elektrischen Aktivität, die auf einer Depolarisationsblockade basiert und einen Verlust der Ionenhomöostase widerspiegelt (Dreier 2011). Im Gegensatz zur iktalen Aktivität gehen SD mit einer reduzierten Transmission einher (Müller und Somjen 1999). In unseren Messungen wiesen Regionen mit SD eine Transmissionsabnahme ( $\Delta T/T$ ) zwischen -1,0% und -9,2% auf.

Die Änderungen der Lichttransmission im zeitlichen Verlauf geben Aufschluss über die Ursprungsregion und Propagation sowohl der epilepsietypischen Aktivität als auch der SD im gesamten Hirnschnitt. Die Auswertung der optischen Signale erfolgte separat für die drei anatomischen Regionen H, EC und TC unter Verwendung von Rastern aus quadratischen Feldern (engl. region of interest (ROI)) mit einer Kantenlänge von 20 Pixeln. Für die ROI wurde jeweils der Mittelwert der Transmissionsänderung ( $\Delta T/T$ ) aller enthaltenen Pixel berechnet. Optische Signale wurden als signifikant mit einem AE assoziiert angesehen, wenn die Zunahme der Transmission einen Schwellenwert von

$\Delta T/T > 1,0\%$  erreichte und mit einer SD, wenn die Abnahme der Transmission einen Grenzwert von  $\Delta T/T < -1,0\%$  unterschritt. Die zuerst aufgetretene Änderung der Transmission von mindestens einem Prozentpunkt ( $+1,0\%$  für AE;  $-1,0\%$  für SD) in einem ROI definiert wir als Ursprungsregion der AE bzw. SD im Hirnschnitt. Ergänzend wurde auch die Expansion der AE bzw. SD innerhalb der anatomischen Regionen untersucht und als relativer Anteil von Pixeln mit einer Transmissionsänderung von mindestens einem Prozentpunkt ( $+1,0\%$  für AE;  $-1,0\%$  für SD) in  $> 9$  aufeinanderfolgenden Bildern zur Gesamtheit aller Pixel dieser Hirnregion ausgedrückt.

## 2.2 Molekularbiologisches Prozedere



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der ausgeführten molekularbiologischen Arbeitsschritte zur Untersuchung der Genexpression. Eigene Darstellung.

Die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Arbeitsschritte mit dem Ziel einer validen Genexpressionsanalyse orientieren sich an den sogenannten MIQE-Richtlinien (MIQE = **M**inimum **I**nformation for Publication of **Q**uantitative **R**eal-Time **P**CR **E**xperiments) (Bustin et al. 2009). In **Abbildung 3** ist ein Überblick über das molekularbiologische Prozedere gegeben.

### 2.2.1 RNA-Extraktion

Von den Hirnschnitten wurden zu einem gruppenspezifischen Zeitpunkt der H, EC und der anteilmäßige TC separiert um die Genexpression in jedem dieser Hirnareale separat zu quantifizieren. Um ausreichende Mengen an mRNA zu erhalten, wurde Gewebe der gleichen Region und Gruppe innerhalb eines Experiments gepoolt. Für eine effiziente Homogenisierung des Gewebes wurde eine Kugelmühle (TissueLyser LT, Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) eingesetzt, die durch schnelles vertikales Schütteln einer kleinen

Edelstahlkugel in einer Oszillationsfrequenz von 50 Hz für 10 Minuten zum mechanischen Zellaufschluss beiträgt. Die Zell-Lyse wurde durch Zugabe von je 1 ml TRIzol® induziert. Trizol ist eine phenolhaltige Reagenz mit Guanidiniumthiocyanat, die gleichzeitig die RNA-Integrität erhält und die RNase-Aktivität inhibiert. Basierend auf der Methode der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, wurde der Probe Chloroform (200 µl) zugegeben um die RNA zu isolieren (Chomczynski und Sacchi 1987). Eine Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (15 Minuten bei 12.000g und 4°C), anschließend wurde die RNA durch Inkubation in Isopropanol (500 µl) präzipitiert. Das ausgefällte Pellet wurde anschließend mit 75% Ethanol (1 ml, vorgekühlt bei -20°C) gewaschen und in RNase-freiem Wasser resuspendiert (25 µl).

### 2.2.2 Degradierung genomischer DNA

Nach der RNA-Isolation folgte eine Behandlung mit DNase I, um eine Verunreinigung mit genomischer DNA (engl. deoxyribonucleic acid) zu beseitigen und deren spätere Amplifikation zu verhindern. Dafür wurde ein Mastermix (Gesamtvolumen 35 µl) mit den in **Tabelle 2** aufgeführten Reagenzien angesetzt (alle Reagenzien von Promega, Fitchburg, WI, USA).

**Tabelle 2** Zusammensetzung des Mastermix zum DNase-Verdau

Substanz	Menge in µl	Arbeitskonzentration
RQ1 RNase-freie DNase	3,0	1 U/µg RNA
RQ1 RNase-freie DNase 10x Reaktionspuffer: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris-Puffer (400 mM Tris-HCl, pH 8,0),</li> <li>• Magnesiumsulfat (100 mM MgSO<sub>4</sub>)</li> <li>• Calciumchlorid (10 mM CaCl<sub>2</sub>)</li> </ul>	3,5	
Rekombinanter RNasin® Ribonuklease Inhibitor	3,5	4 U/µl
Resuspendierte RNA in RNase-freiem Wasser	25,0	

Dieser Ansatz zum DNase-Verdau wurde für 30 Minuten bei 37°C im Thermocycler (Veriti 96 Well Thermal Cycler, AB Applied Biosystems, Waltham, USA) inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute RNA-Aufreinigung, dafür wurde das Volumen des DNase-Verdau (35 µl) mit nukleasefreiem Wasser (165 µl) auf 200 µl aufgefüllt und eine identische Menge Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (200 µl, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 12.000g und 4°C) wurde die RNA-enhaltene wässrige Phase mit 200 µl Chloroform behandelt, um der Lösung das restliche Phenol zu entziehen. Die RNA wurde durch Zugabe von Ethanol (550 µl,

96%) und Ammoniumacetat (6  $\mu\text{l}$ , 10 M) über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ausgefällt und nachfolgend in nukleasefreiem Wasser (16  $\mu\text{l}$ ) aufgelöst. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) ermittelt und variierte von 143,5 ng/ $\mu\text{l}$  bis 738,5 ng/ $\mu\text{l}$  pro Probe. Die Reinheit der RNA wurde mit dem Verhältnis der Dichtemessung bei 260 nm/230 nm sowie 260 nm/280 nm überprüft, wobei Werte über 1,8 akzeptiert wurden.

### 2.2.3 Reverse Transkription

Die einsträngige RNA wurde durch die enzymatische Funktion der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben und lieferte so eine Vorlage (engl. template) für die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction (PCR)) im Rahmen der Genexpressionsanalyse. Die Synthese der komplementären DNA (engl. complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)) erfolgte unter Einsatz der Moloney-Maus-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase (M-MLV RT, Promega, Fitchburg, WI, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit einigen Modifikationen. Es wurde zunächst der Ansatz A (Gesamtvolumen 18  $\mu\text{l}$ ) mit den in **Tabelle 3** aufgeführten Reagenzien angesetzt (alle Reagenzien von Roche, Basel, Schweiz). Es wurden je 2  $\mu\text{g}$  RNA pro Probe eingesetzt, unter Berücksichtigung der vorherigen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde das probenspezifische Volumen mit nukleasefreiem Wasser auf 15  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

**Tabelle 3** Zusammensetzung von Ansatz A für die reverse Transkription

Substanz	Menge in $\mu\text{l}$	Arbeitskonzentration
Total RNA in RNase-freiem Wasser	15,0	2,0 $\mu\text{g}$ = 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
zufällige Hexonukleotide (Oligonukleotidsequenzen aus 6 Basen, 100 $\mu\text{M}$ )	1,5	8,33 $\mu\text{M}$
Deoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, je 10 mM):	1,5	je 0,83 mM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2'-Deoxyadenosin 5'-triphosphat (dATP)</li> <li>• 2'-Deoxycytidin 5'-triphosphat (dCTP)</li> <li>• 2'-Deoxyguanosin 5'-triphosphat (dGTP)</li> <li>• 2'-Deoxythymidin 5'-triphosphat (dTTP)</li> </ul>		

Der Ansatz A wurde im Thermocycler 5 Minuten bei einer Temperatur von  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Währenddessen wurde der Ansatz B (Gesamtvolumen 8  $\mu\text{l}$ ) mit den in **Tabelle 4** aufgelisteten Reagenzien vorbereitet (alle Reagenzien von Promega, Fitchburg, WI, USA).

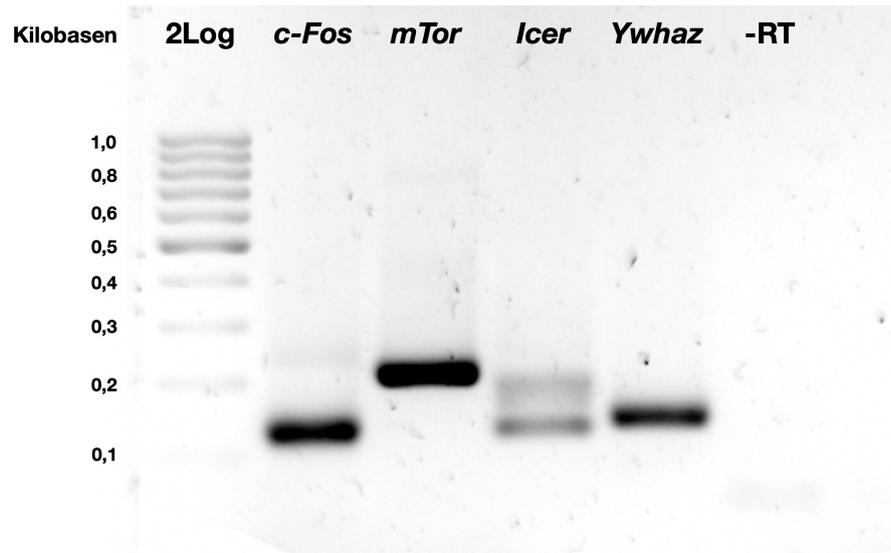
**Tabelle 4** Zusammensetzung von Ansatz B für die reverse Transkription

Substanz	Menge in $\mu\text{l}$	Arbeitskonzentration
MMLV-RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )	2,0	50 U/ $\mu\text{l}$
Puffer	5,0	
RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	2,5 U/ $\mu\text{l}$
DTT (0,1 M)	0,5	6,25 mM

Zu jeder Probe im Ansatz A wurde der Ansatz B hinzugegeben und das Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 26  $\mu\text{l}$ ) nacheinander wie folgt im Thermocycler inkubiert: (1) 5 Minuten bei 21°C; (2) 60 Minuten bei 37°C und (3) 15 Minuten bei 70°C. Um sicherzustellen, dass die genomische DNA-Kontamination im DNase-Ansatz vollständig degradiert wurde, wurde in jedem Experiment eine -RT-Kontrolle, also ein cDNA-Syntheseansatz ohne Reverse Transkriptase, mitgeführt. Die cDNA-Proben wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.4 Design und Effizienz von Primern

Primer sind kurze, einzelsträngige, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die im Rahmen der PCR als Startermoleküle für die DNA-Polymerase bei der Synthese des Komplementärstranges dienen. Für die PCR werden je zwei Primer, ein Vorwärtsprimer (engl. forward primer) und ein Rückwärtsprimer (engl. reverse primer) benötigt (**Abbildung 5**). Die Nukleotidsequenz muss spezifisch für die Sequenz der Ziel-DNA sein und an eine Position binden, die keine Sekundärstruktur ausbildet. Die von uns für die quantitative PCR eingesetzten Primer wurden unter Berücksichtigung der cDNA-Sequenzen der sogenannten RefSeq-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), letzter Zugriff 12.10.2021) manuell entworfen. Eine Ausnahme bildeten die *c-Fos*-Primer, deren Sequenzen aus publizierten Daten übernommen wurden (Barros et al. 2015). Die Spezifität aller Primer wurde mit dem Primer-BLAST-Programm ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi), letzter Zugriff: 12.10.2021) überprüft, bevor wir eine Primer-Synthese bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gaben. Für jedes Primer-Paar wurde die Länge der amplifizierten DNA-Sequenz mittels Gelelektrophorese (1% Agarosegel) geprüft, zusätzlich wurde das PCR-Produkt durch eine Sanger-Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) verifiziert. Die eingesetzten Primer für *Icer* amplifizierten zwei von drei möglichen Transkriptvarianten von *Crem* (Variante 2 und 5, siehe **Tabelle 5** und **Abbildung 4**).



**Abbildung 4** Überprüfung der Länge aller Primer-spezifischen PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des DNA-Längenstandards 2Log, dessen Skalierung in Kilobasen am linken Abbildungsrand angegeben ist. Die Amplifikationslänge der untersuchten Gene in Basenpaaren (BP) ist in **Tabelle 5** aufgelistet. Die *Icer*-Primer amplifizierten zwei von drei möglichen Transkriptvarianten von *Crem*. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle der vollständigen Degradierung genomischer DNA (-RT). Eigene Darstellung.

Vor dem Einsatz zur Genexpressionsanalyse erfolgt außerdem eine Beurteilung der Primer-spezifischen PCR-Effizienz als Maß für die PCR-Sensitivität. Die theoretisch angenommene Verdopplung der Kopienzahl mit jedem PCR-Zyklus entspricht einer Effizienz von 100%. Durch den Einfluss verschiedener Faktoren wie unspezifische PCR-Inhibitoren oder zusätzliche PCR-Komponenten (Polymerase, Puffer) ist die Effizienz im praktischen Alltag meist geringer. Die PCR-Effizienz wurde anhand der Steigung einer Standardkurve ermittelt. Dafür erfolgte eine PCR mit einer Verdünnungsreihe der cDNA bestehend aus 9 Verdünnungsstufen. Dabei wurde der sogenannte Quantifikationszyklus (engl. quantification cycle (Cq)) gemessen, der den Zyklus der PCR beschreibt, bei dem ein Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. In einem Koordinatensystem wurden die ermittelten Cq-Werte sowie der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Konzentrationen ( $x = \text{Log}_{10} \text{cDNA}$ ) aufgetragen. Mithilfe einer Regressionsanalyse wurde der Anstieg des linearen Abschnitts dieser Standardkurve berechnet. Aus dem Anstieg wurde nach der folgenden Formel die PCR-Effizienz E ermittelt:

$$E = [10^{(-1/m)}] - 1 \text{ mit } E = \text{PCR-Effizienz, } m = \text{Anstieg der Standardkurve.}$$

Die PCR-Effizienz unserer Primer lag im Bereich von 0,88 und 1,0. In **Tabelle 5** ist eine Zusammenfassung aller Primer-spezifischen Charakteristika aufgeführt.

**Tabelle 5** Übersicht der Charakteristika aller eingesetzten Primer

Gen	Transkript-varianten	RefSeq	5'-3'-Sequenz	Amplifikationslänge (BP)	PCR-Effizienz (%)	R <sup>2</sup>	Hybridisierungstemperatur (°C)	Messtemperatur (°C)
<i>c-Fos</i>		NM_022197	F – ACGGAGAAATCCGAAGGGGAAAGGAA R - TCTGCAACGCAGACTTCTCGTCTT	125	88	0,9988	62	80
<i>Icer</i>	2 5 6	NM_017334 NM_001271102 NM_001271245	F – CTTTATTTGGACTGTGGTACGGC  R - AGTAGGAGCTCGGATCTGGTAA	161 125 207	100	0,991	61	79
<i>mTor</i>		NM_019906	F – CGGAGAGAGGCCATCCGAGT R - ACGCGGGGTAGAACTCGTC	209	100	0,9966	64	82
<i>Ywhaz</i>		NM_013011	F – TTGAGCAGAAGACGGGAAGGT R - GAAGCATTGGGGATCAAGAA	135	90	0,9995	58	79
<i>Actb</i>		NM_031144	F – ACCCACACTGTGCCATCTA R - GCCACAGGATTCATACCCA	341	88	0,9959	68	80
<i>Tbp</i>		NM_001004198	F – CCTTCACCAATGACTCCTATG R - TGGATTGTTCTTCACTCTTGGC	273	100	0,9908	62	80
<i>Hprt1</i>		NM_012583	F – TTGTTGGATATGCCCTTGACT R - CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG	105	92	0,9944	60	75
<i>Reep5</i>		NM_001108888	F – CTGATAGGTTTCGGATACCCA R - GACTCGTGTCTTCAGGAAGATGG	269	91	0,9979	68	80

Die Tabelle enthält die jeweiligen Gen-Namen, im Fall von Icer ebenso die Transkriptvarianten. Für alle Primer ist die Referenz-Sequenz (RefSeq) entsprechend der NCBI-Datenbank sowie die Sequenz des Vorwärtsprimers (F) und des Rückwärtsprimers (R), die jeweilige Amplifikationslänge des PCR-Produktes in Basenpaaren (BP), die ermittelte PCR-Effizienz mit dem Regressionskoeffizient R<sup>2</sup> der Standardkurve sowie die Hybridisierung- und Messtemperatur aufgelistet, Quelle: Modifizierte Tabelle 1 nach Schlabit et al. 2021.

### 2.2.5 NormFinder Analyse

Für die relative Quantifizierung der Genexpression ist ein Referenzgen notwendig, das Unterschiede der Ausgangsmaterialmenge, der Effizienz der reversen Transkription und der eingesetzten cDNA-Menge ausgleicht. Dieses Normalisierungsgen sollte eine stabile Expression in verschiedenen Zelltypen und Geweberegionen aufweisen, die nicht durch die experimentellen Bedingungen beeinflusst wird. Die NormFinder Analyse ist ein etablierter statistischer Algorithmus, um aus einer Gruppe möglicher Kandidatengene dasjenige mit der höchsten Expressionsstabilität über alle Proben zu ermitteln und damit das am besten geeignete Referenzgen für die quantitative PCR zu identifizieren (Andersen et al. 2004). Basierend auf Literaturangaben wurden fünf Kandidatengene ausgewählt: Beta-Aktin (*Actb*), Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase-Aktivierungsprotein (*Ywhaz*), Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), Rezeptor-Expressionsverbesserungsprotein 5 (*Reep5*) und TATA-Box-Bindungsprotein (*Tbp*) (Sadangi et al. 2017). Die NormFinder Analyse wurde separat für die drei anatomischen Regionen (H, EC und TC) durchgeführt. Es wurden dabei alle experimentellen Bedingungen berücksichtigt und die C<sub>q</sub>-Werte in jeweils zwei unabhängigen Proben der folgenden neun Gruppen bestimmt: basal; Kontrolle 1 h, 2 h, 3 h, 4 h; 4-AP 1 h, 2 h, 3 h, 4h. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der freiverfügbaren NormFinder MS Excel-Anwendung, die vom Molekularen Diagnostik-Labor der Autoren (Abteilung für Molekulare Medizin, Aarhus Universitätskrankenhaus Skejby, Dänemark) zur Verfügung gestellt wird. Hiermit wurde sowohl die Intra- als auch die Intergruppenvariation, ausgedrückt als Standardabweichung, berechnet. Kandidatengene mit einer Standardabweichung > 0,25 wurden ausgeschlossen. Für die verbleibenden Kandidatengene wurde der spezifische Stabilitätswert M ermittelt, wobei niedrige Werte mit einer höheren Expressionsstabilität einhergehen.

### 2.2.6 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (engl. real time quantitative PCR (qPCR)) ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren. Mit dieser auf dem Grundsatz der Polymerase-Kettenreaktion basierenden Methode ist eine zusätzliche Quantifizierung der DNA durch die Messung eines Fluoreszenzsignals möglich. Wir verwendeten dafür den interkalierenden Cyanin-Farbstoff SYBR® Green I (C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>S<sup>+</sup>), der sich unspezifisch in die doppelsträngige DNA einlagert, bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt wird und

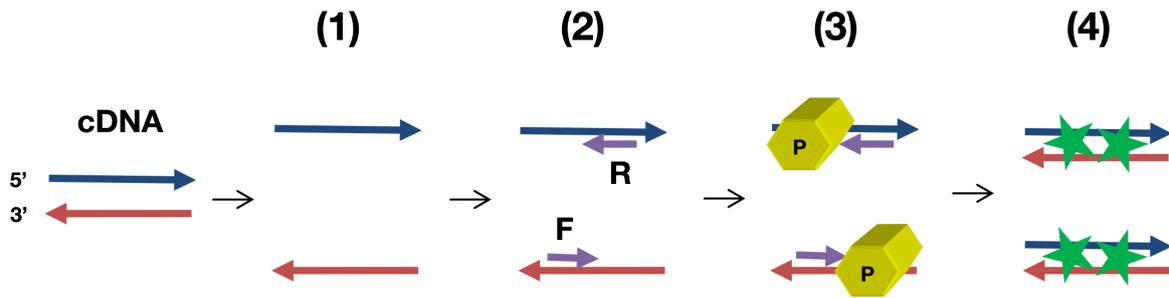
eine maximale Fluoreszenzemission von 520 nm aufweist (Dragan et al. 2012). Der Reaktionsansatz für die qPCR (Gesamtvolumen 20 µl) wurde den Herstellerangaben (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz) entsprechend angesetzt und enthielt die in **Tabelle 6** aufgeführten Reagenzien.

**Tabelle 6** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qPCR

Substanz	Menge in µl	Arbeitskonzentration
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x) <ul style="list-style-type: none"> <li>• FastStart Taq DNA-Polymerase</li> <li>• SYBR Green I Farbstoff</li> </ul>	10,0	1x
Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je 10 µM)	1,0	je 0,5 µM
Nuklease-freies Wasser	8,0	
cDNA	1,0	

Jeder PCR-Lauf enthielt eine -RT-Kontrolle zur Überprüfung des vorherigen DNase-Verdaus sowie eine Negativkontrolle ohne cDNA, um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen. Außerdem wurde jede Probe zweimal repliziert um Pipettierfehler zu detektieren. Die qPCR wurde mit dem LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz) durchgeführt. Jeder Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 95°C inkubiert, bevor die 45 Amplifikationszyklen mit der nachfolgend genannten Sequenz erfolgten (schematische Darstellung in **Abbildung 5**):

- (1) Denaturierung, also Auftrennung der DNA-Doppelstränge bei 95°C für 5 Sekunden
- (2) Primer-Hybridisierung (engl. annealing) bei einer Primer-spezifischen Temperatur für 10 Sekunden (siehe Hybridisierungstemperatur, **Tabelle 5**)
- (3) Elongation, also Verlängerung der 3'-Enden der angelagerten Primer durch die DNA-Polymerase bei einer für die Taq Polymerase optimalen Arbeitstemperatur von 72°C für 15 Sekunden
- (4) Quantifizierung, also Messung des proportional zur Menge der PCR-Produkte zunehmenden Fluoreszenzsignals des interkalierenden SYBR® Green I wiederum bei einer Primer-spezifischen Temperatur für 1 Sekunde (siehe Messtemperatur, **Tabelle 5**). Es wird dabei der C<sub>q</sub>-Wert ermittelt, der dem Quantifikationszyklus entspricht, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung der quantitativen PCR. (1) Denaturierung, (2) Primer-Hybridisierung mit Vorwärtsprimer (F) und Rückwärtsprimer (R), (3) Elongation durch DNA-Polymerase (P), (4) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals des interkalierenden SYBR® Green I. Eigene Darstellung.

Am Ende jedes PCR-Laufs wurde eine Schmelzkurve erstellt und analysiert, diese ist produktspezifisch und liefert einen unmittelbaren Hinweis auf die Richtigkeit der PCR. Dafür wurden die folgenden Temperaturschritte durchlaufen: (1) Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden; (2) Primer-Hybridisierung bei 70°C für 30 Sekunden und (3) sukzessive Temperaturerhöhung von 0,11°C/s bis zum Erreichen einer Endtemperatur von 95°C. Die relative Quantifizierung der Genexpression einer Probe basierte auf dem Verhältnis der Cq-Werte des Zielgens und des stabil exprimierten Referenzgens. Wir wendeten zur Berechnung die effizienzadjustierte „Delta-Delta-Ct-Methode“ an (Pfaffl 2001). Damit berechneten wir die relative Änderung der Genexpression (engl. fold change) in Proben der Kontroll- und Interventionsgruppe im Vergleich zur basalen Genexpression mithilfe der Formel:

$$\text{Quotient} \left( \frac{GOI}{RG} \right) = \frac{E^{\Delta Cq_{GOI}(\text{Mittelwert } Cq(\text{basal})-x)}}{E^{\Delta Cq_{RG}(\text{Mittelwert } Cq(\text{basal})-y)}}$$

mit GOI = Zielgen (engl. gene of interest), RG = Referenzgen, E = PCR-Effizienz, Cq = Quantifikationszyklus, x = probenspezifischer Cq-Wert des Zielgens, y = probenspezifischer Cq-Wert des Referenzgens.

Nachfolgend wurden die so ermittelten Expressionswerte von Proben der Kontroll- und Interventionsgruppe miteinander ins Verhältnis gesetzt, um die effektive Auswirkung der 4-AP induzierten epilepsietypischen Aktivität auf die Genexpression zu bestimmen.

### 2.3 Zelltod-Assay

Um die Viabilität der Hirnschnitte unter den Kontroll- und Interventionsbedingungen in Abhängigkeit der Dauer der Experimente zu beurteilen, führten wir ein Zelltod-Assay

durch. Wir verwendeten dafür den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI), der die perforierten Membranen von toten Zellen, nicht jedoch intakte Membran von vitalen Zellen durchdringen kann und somit ein anerkannter Indikator für Zelltod ist (Buskila et al. 2014). Für diese zusätzliche Untersuchung wurden insgesamt 41 Hirnschnitte von drei Ratten präpariert und alternierend den folgenden Gruppen zugeordnet: basal; Kontrolle 1 h und 4 h; 4-AP 1 h und 4 h. Nach der oben genannten gruppenspezifischen Behandlung wurden alle Schnitte mit PI (1 µg/ml) in Carbogenangereichertem aCSF für 1 Stunde inkubiert. Bei den Schnitten der Interventionsgruppe wurde der Färbelösung zusätzlich 4-AP (100 µM) beigefügt. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Paraformaldehyd (4%) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (0,2 M) für 30 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung aller Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 2 µg/ml) für 10 Minuten. Mit einem inversen konfokalen Mikroskop (LSM 700, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden Bilder mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurde für jeden Hirnschnitt (400 µm) ein Bildstapel entlang der Z-Ebene mit Akquisition einzelner Bilder im Intervall von 2,47 µm, ausgehend von der Schnittoberfläche bis zu einer Tiefe von 40-50 µm, angefertigt. Das DAPI-Signal wurde durch Laseranregung mit einer Wellenlänge von 405 nm und Fluoreszenzmessung bei einer Wellenlänge von 470 nm erfasst. Für die Aufzeichnung der PI-Signale erfolgte eine Laseranregung mit 555 nm und eine Fluoreszenzmessung bei 617 nm. Die Bilder wurden mit ImageJ 1.51m9 verarbeitet und analysiert. In insgesamt 8 Hirnregionen der Hippocampusformation (Stratum granulosum des Gyrus dentatus, Stratum pyramidale von CA3, CA1 sowie Subiculum) und des Kortex (Schicht I-III und Schicht IV-VI von EC bzw. TC) wurden DAPI- und PI-positive Zellen in einem Sichtfeld von 500 x 300 µm gezählt. Die Viabilität der Hirnschnitte wurde als Verhältnis zwischen PI-positiven und DAPI-positiven (tote/gesamte) Zellen für jede untersuchte Region bewertet.

## **2.4 Datenauswertung und statistische Auswertung**

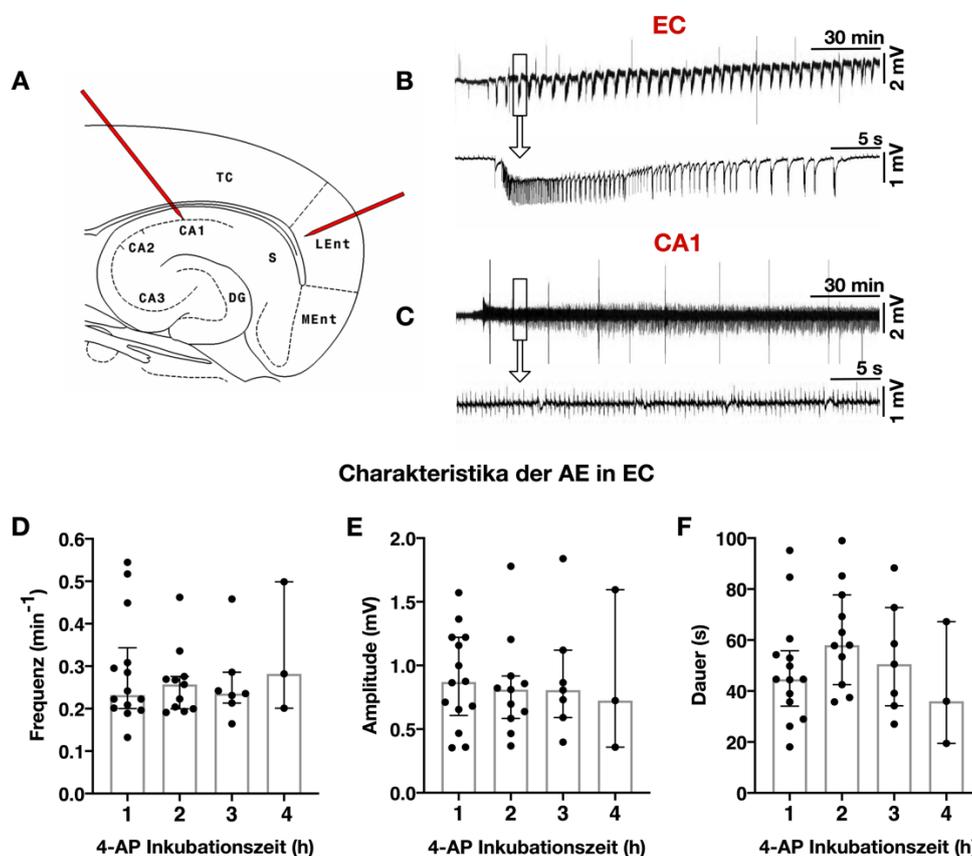
Alle Rohdaten wurden mit ImageJ 1.51m9, Matlab und MS Excel analysiert. Die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism7 (Graphpad Software, La Jolla, USA). Unter Anwendung des D'Agostino-Pearson-Tests wurden alle Daten zunächst auf Normalverteilung überprüft. Wenn die Gruppengröße für eine Testung der Normalverteilung zu klein war, wurde der

nicht-parametrische Test nach Kruskal-Wallis verwendet. Die statistische Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mittels einfaktorieller ANOVA (normalverteilte Daten) oder dem Kruskal-Wallis-Test (nicht normalverteilte Daten oder kleine Gruppengröße) mit nachfolgender Post-hoc Mehrfachanalyse mittels Tukey- oder Dunnett-Test beurteilt. Unterschiede zwischen den Gruppen mit einem Niveau von  $p < 0,05$  wurden als signifikant, mit einem Niveau von  $p < 0,001$  als hochsignifikant eingeschätzt. Die mit parametrischen Tests analysierten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, während die mit nicht-parametrischen Tests ausgewerteten Daten als Median  $\pm$  Interquartilsbereich ausgedrückt werden. Als Grafiksoftware wurde OmniGraffle 7 (The Omni Group, Seattle, WA, USA) zur Erstellung aller Abbildungen für die Publikation und den Manteltext verwendet.

### 3 Ergebnisse

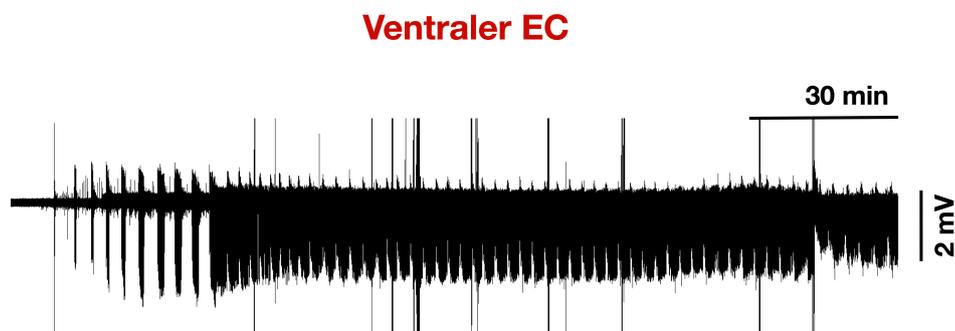
#### 3.1 Elektrophysiologische Parameter der epilepsietypischen Aktivität *in vitro*

Für die Experimente *in vitro* wurden 20 Tiere präpariert. Epilepsietypische Aktivität wurde in insgesamt 100 Rattenhirnschnitten (fünf Schnitte pro Ratte) durch 4-AP induziert. Die extrazelluläre Messung von Feldpotentialen erfolgte in 20 ausgewählten Schnitten (ein Schnitt pro Ratte) an zwei Lokalisationen (EC und CA1) und resultierte in einer Aufzeichnung von insgesamt 572 AE (**Abbildung 6A**). Nach dem Einwaschen von 4-AP setzte die ictale Aktivität nach durchschnittlich 18,0 Minuten ( $\pm 7,5$  Minuten) ein.



**Abbildung 6** (A) Schematische Darstellung eines Hirnschnitts mit Lokalisation der Messelektroden in Schicht IV/V des lateralen EC sowie der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA1-Region. Die Schnitte umfassten folgende Strukturen: Hippocampusformation bestehend aus Subiculum (S), Cornu ammonis (CA1-CA3) und Gyrus dentatus (DG) sowie medialer entorhinaler Kortex (MEnt), lateraler entorhinaler Kortex (LEnt) und temporalen Kortex (TC). (B) Repräsentative elektrophysiologische Aufnahme über 4 Stunden im EC mit regelmäßig auftretenden, monomorph konfigurierten anfallsartigen Ereignissen (AE). (C) Simultane Aufzeichnung von interiktalen Spikes in der hippocampalen CA1-Region während dieses Experiments. (D-F) Elektrophysiologische Eigenschaften der AE im EC für jede 4-AP Behandlungsdauer (1, 2, 3 oder 4 Stunden). Streudiagramme stellen Einzelmessungen, die überlagerten Kästen den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar. Quelle: Modifizierte Abbildung 2 nach Schlabitz et al. 2021.

Im lateralen EC traten in regelmäßiger und stabiler Frequenz monomorph konfigurierte AE über den gesamten Messzeitraum von maximal 4 Stunden auf. Die AE weisen als typische Charakteristika eine initiale Potentialnegativierung auf, gefolgt von hochfrequenten Entladungen mit niedriger Amplitude als elektrophysiologisches Korrelat der tonischen Phase und hiernach niedrigfrequenten Oszillationen mit höherer Amplitude als Ausdruck der klonischen Phase (**Abbildung 6B**). Im Gegensatz dazu imponierten in simultanen Messungen der hippocampalen CA1-Region interiktale Spikes, während AE nur in 11 der 20 gemessenen Schnitte aufgezeichnet wurden (**Abbildung 6C**). Alle untersuchten elektrophysiologischen Parameter zeigten sich im gesamten Messzeitraum stabil (für EC vgl. **Abbildung 6D-F**). Die AE wiesen eine Frequenz von  $0,24 \pm 0,09$  / min im EC und  $0,22 \pm 0,05$  / min in CA1; eine Amplitude  $0,81 \pm 0,52$  mV in EC und  $0,62 \pm 0,29$  mV in CA1 sowie eine Dauer von  $50,54 \pm 28,39$  s in EC und  $51,88 \pm 40,31$  s in CA1 auf (Angabe aller Parameter als Median  $\pm$  Interquartilsabstand). In fünf ventralen Hirnschnitten manifestierte sich eine persistente epilepsietypische Aktivität, sodass keine separaten AE abgegrenzt werden konnten und diese Schnitte von der weiteren elektrophysiologischen Analyse ausgeschlossen wurden (**Abbildung 7**).

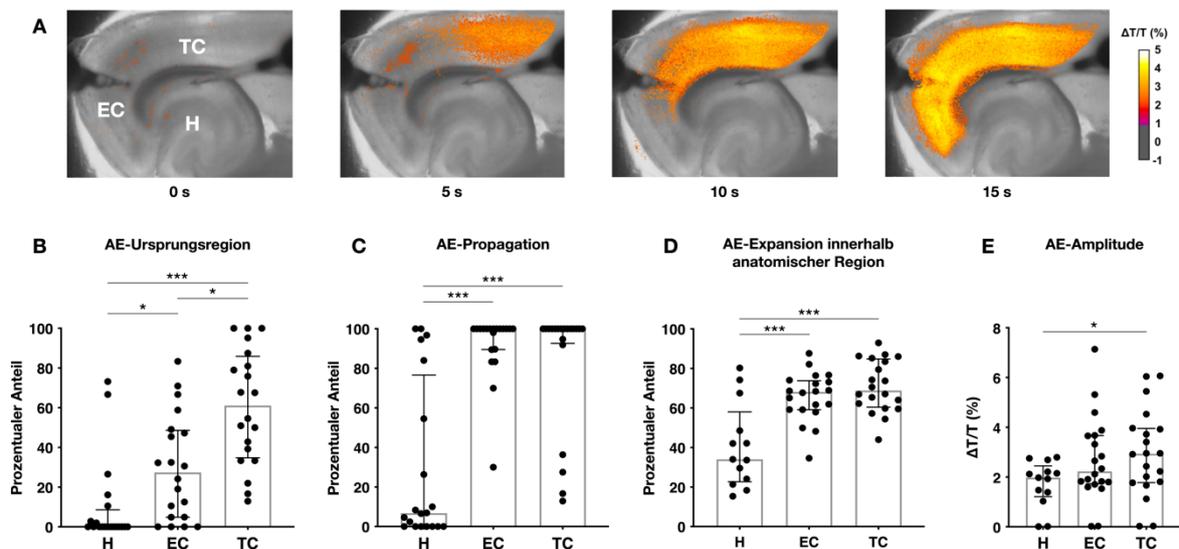


**Abbildung 7** Durch 4-AP induzierte persistierende ictale Aktivität im entorhinalen Kortex (EC) wurde ausschließlich in ventralen Rattenhirnschnitten (-7,6 bis -6,8 mm vom Bregma) detektiert. Quelle: Modifizierte Abbildung S1 nach Schlabitz et al. 2021.

## 3.2 Optische Parameter in akuten Rattenhirnschnitten

### 3.2.1 Induzierte epilepsietypische Aktivität durch 4-AP

Zeitgleich mit der elektrophysiologischen Messung der Feldpotentiale wurden intrinsische optische Signale im gesamten Hirnschnitt aufgezeichnet. Jedes elektrophysiologisch detektierte AE konnte somit auf Ursprungsregion und Propagation untersucht werden (**Abbildung 8A**).

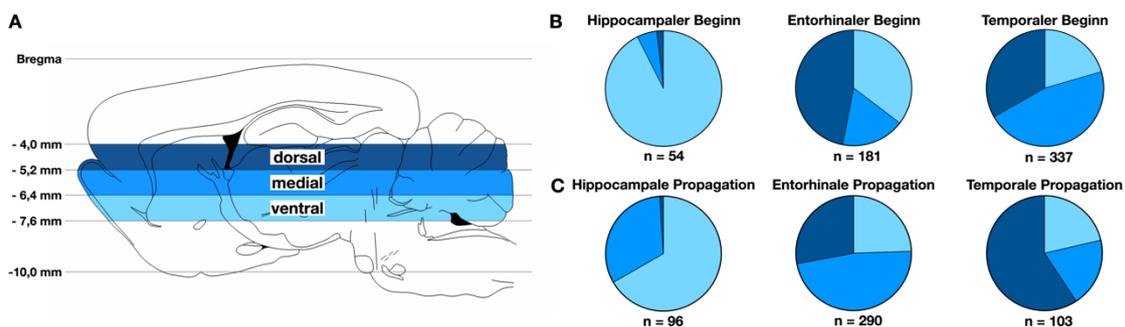


**Abbildung 8** (A) Ausbreitung eines repräsentativen anfallsartigen Ereignisses (AE) mit farbcodierter Amplitude ( $\Delta T/T$ ). (B-E) Optische Eigenschaften der AE für die untersuchten anatomischen Regionen Hippocampus (H), entorhinaler Kortex (EC) und temporaler Kortex (TC). Streudiagramme stellen Einzelmessungen, die überlagerten Kästen den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung 3 nach Schlabitz et al. 2021.

Hinsichtlich der Ursprungsregion wurde die Mehrheit der AE in temporalen Strukturen (61,1% in TC) generiert, während ein Beginn im EC bei 27,4% und im H 0,0% (Medianwerte) aller AE nachgewiesen wurde (**Abbildung 8B**). Zusätzlich fanden sich in 13 Schnitten insgesamt 57 AE (10,0%) mit einem multiregionalen Ursprung in voneinander entfernten anatomischen Regionen. Nur 49 AE (8,6%) in neun Schnitten blieben auf die anatomische Ursprungsregion begrenzt, während der Großteil der AE (> 90%) mindestens in eine benachbarte Region propagierte. Dabei breiteten sich die AE überwiegend innerhalb neokortikaler Strukturen aus und zeigten nur selten eine Beteiligung der Hippocampusformation (6,7%) (**Abbildung 8C**). Die größte Ausdehnung innerhalb einer anatomischen Region zeigte die epilepsietypische Aktivität im TC (68,8%), gefolgt vom EC (68,1%) (**Abbildung 8D**). Korrelierend mit der untergeordneten Rolle hippocampaler Strukturen in der Generierung und Ausbreitung ichtaler Aktivität war die Expansion der AE innerhalb der Hippocampusformation gering (34,0%) und betraf wie vorbeschrieben zumeist das Subiculum (Heuzeroth et al. 2019). Die Amplitude der AE-assoziierten Zunahme der Lichttransmission war im TC am größten ( $\Delta T/T = 2,94\%$ ), gefolgt vom EC ( $\Delta T/T = 2,23\%$ ) und im H am niedrigsten ( $\Delta T/T = 1,98\%$ ) (**Abbildung 8E**). In Zusammenschau der Ergebnisse sticht die Bedeutung des TC als häufigste Ursprungsregion der AE mit zudem größter intraregionaler Ausdehnung und maximaler Amplitude heraus.

### 3.2.2 Einfluss der Schnittebene der dorsoventralen Achse

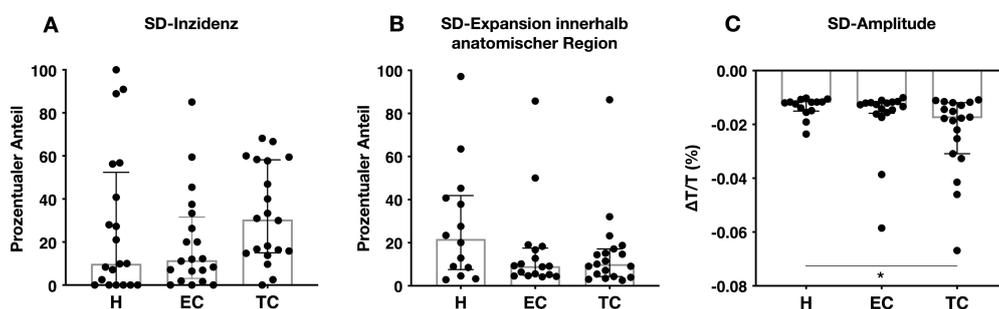
Die Hirnschnitte wurden der dorsoventralen Achse des Rattenhirns entsprechend drei horizontalen Ebenen (ventral, medial, dorsal) zugeordnet (**Abbildung 9A**). Es konnte eine Abhängigkeit der Ursprungsregion und Propagation der epilepsietypischen Aktivität von der Schnittposition des untersuchten Hirnschnitts nachgewiesen werden (**Abbildung 9B-C**). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass ein hippocampaler Beginn der AE fast ausschließlich in ventralen Schnitten auftrat. Ebenso wurde eine Ausbreitung der AE in die hippocampale Formation überwiegend in ventralen Hirnschnitten beobachtet.



**Abbildung 9 (A)** Graphik eines sagittalen Rattenhirnschnitts zur Verdeutlichung der Einteilung der Schnittebenen entlang der dorsoventralen Achse ausgehend vom Bregma. Eigene Darstellung. **(B)** Ursprungsregion und **(C)** Propagation der epilepsietypischen Aktivität in Abhängigkeit der Ebene des untersuchten Hirnschnitts. Quelle: Modifizierte Abbildung 3 nach Schlabit et al. 2021.

### 3.2.3 Ausbreitende Depolarisationen

Die IOS-Messung bot uns auch die Möglichkeit, sich ausbreitende Depolarisationen (SD) zu detektieren.

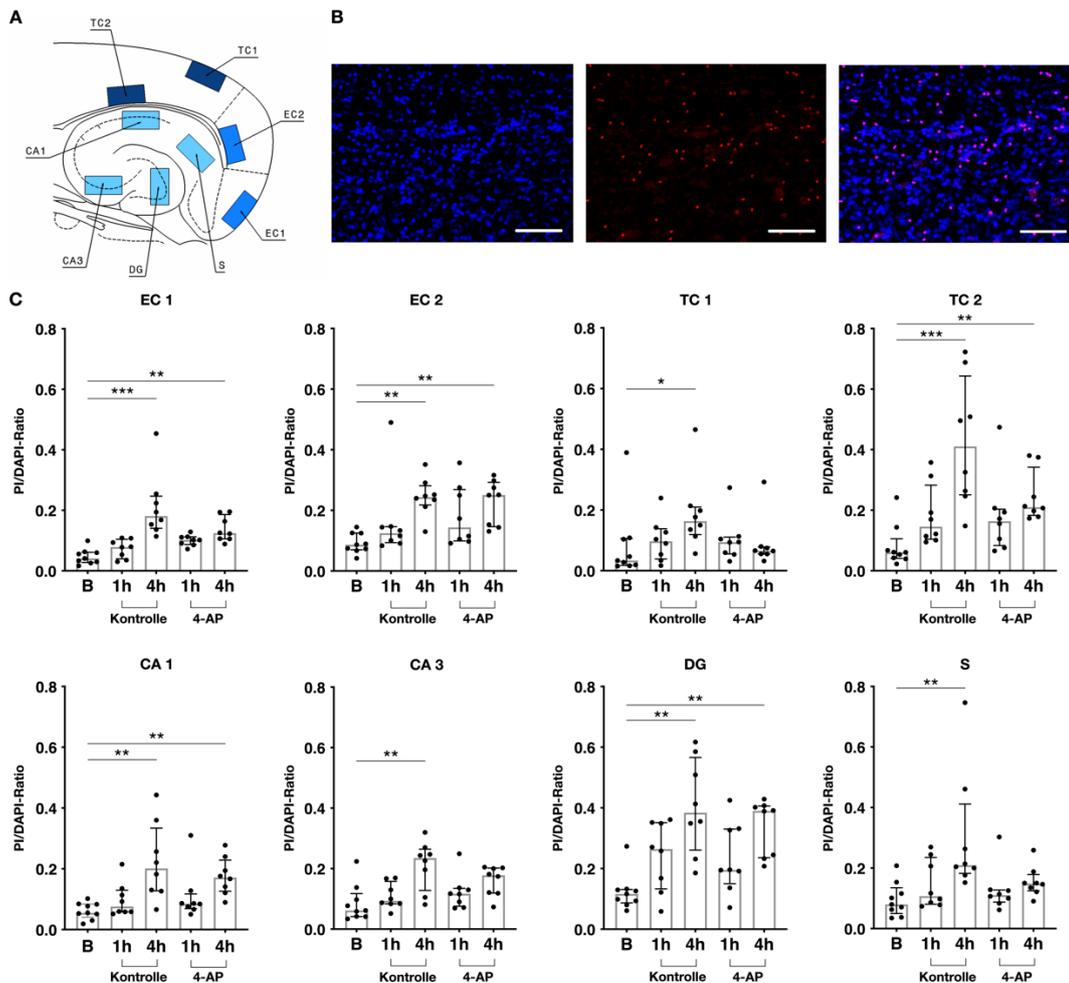


**Abbildung 10 (A-C)** Optische Eigenschaften der sich ausbreitenden Depolarisationen (SD) für die untersuchten anatomischen Regionen Hippocampus (H), entorhinaler Kortex (EC) und temporalen Kortex (TC). Streudiagramme stellen Einzelmessungen, die überlagerten Kästen den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung 3 nach Schlabit et al. 2021.

Insgesamt waren 16,5% der AE mit einer simultan auftretenden Depolarisation assoziiert. Dabei konnte kein statistisch signifikanter interregionaler Unterschied in der Inzidenz der SD nachgewiesen werden (**Abbildung 10A**). Die relative Expansion der SD innerhalb einer anatomischen Region war geringer im Vergleich zur Ausdehnung der epilepsietypischen Aktivität und zeigte ebenfalls keinen interregionalen Unterschied mit statistischer Signifikanz (**Abbildung 10B**). Alle SD wiesen eine Abnahme der Lichttransmission auf, deren Amplitude im TC ( $\Delta T/T = -1,77\%$ ) am ausgeprägtesten war, gefolgt vom EC ( $\Delta T/T = -1,27\%$ ) und H ( $\Delta T/T = -1,19\%$ ) (**Abbildung 10C**).

### 3.3 Zelltod-Assay

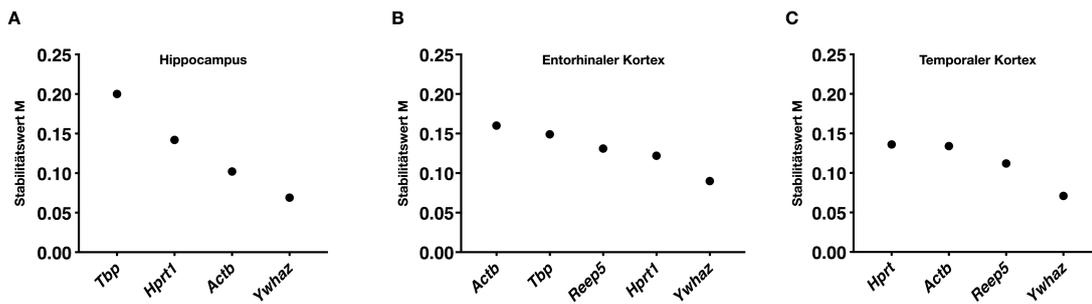
Um die Auswirkungen des Zelltodes auf unsere Ergebnisse abzuschätzen, führten wir eine kombinierte PI- und DAPI-Färbung in 41 akuten Hirnschnitten durch. Eine Zellzählung erfolgte dabei separat in acht verschiedenen anatomischen Regionen (**Abbildung 11A-B**). Die Viabilität der Hirnschnitte wurde als Verhältnis zwischen PI-positiven und DAPI-positiven (tote/gesamte) Zellen bewertet. In allen untersuchten Hirnregionen nahm der Zelltod sowohl in der Kontroll- als auch in der Interventionsgruppe mit 4-AP induzierter epilepsietypischer Aktivität zeitabhängig zu (**Abbildung 11C**). In basalen Schnitten, die nach der Präparation umgehend gefärbt wurden, schwankte der relative Anteil toter Zellen interregional zwischen 3,4% ( $\pm 8,8\%$ ) in oberflächlichen TC-Schichten und 11,6% ( $\pm 4,5\%$ ) im Gyrus dentatus. Infolge der Lagerung in der Interface-Kammer war in den Kontrollschnitten eine im Vergleich zu den Basalwerten statistisch signifikante Zunahme des Zelltodes in allen Hirnregionen nach 4 Stunden nachweisbar. Im Hippocampus variierte die Rate des Zelltodes nach vierstündiger Lagerung unter Kontrollbedingungen zwischen 14,8% ( $\pm 5,4\%$ ) im Subiculum und 39,0% ( $\pm 17,1\%$ ) im Gyrus dentatus. Auch in den neokortikalen Regionen nahm der Zelltod zeitabhängig zu, dieser war in den tiefen Schichten stärker ausgeprägt (Schicht I-III: 15,9% in EC, 9,7% in TC; Schicht IV-VI: 24,9% in EC, 25,5% in TC). In den Schnitten der Interventionsgruppe mit Exposition zu 4-AP war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrollschnitten mit zeitgleicher Lagerung in der Messkammer nachweisbar, die Induktion hochfrequent auftretender AE verstärkte die zum Zelltod führenden Prozesse nicht. Interessanterweise zeichnete sich sogar eine reduzierte Zelltodrate in den mit 4-AP behandelten Schnitten des vierstündigen Interventionszeitraums im Vergleich der Kontrollschnitte ab, ohne dabei allerdings ein signifikantes Ausmaß zu erreichen.



**Abbildung 11** (A) Schematische Darstellung eines Hirnschnitts mit den acht Sichtfeldern (500 x 300 µm) zur Zellzählung: 2 Schichten vom entorhinalen (EC1, EC2) und temporalen Kortex (TC1, TC2), Subiculum (S), CA1, CA3 und Gyrus dentatus (DG). (B) Repräsentative Mikroskopie-Aufnahme (20x Vergrößerung), links: DAPI-Färbung, mittig: PI-Färbung, rechts: beide Färbungen überlagert. Balkenskala 100 µm. (C) Viabilität der Schnitte als Verhältnis von PI (toten Zellen) zu DAPI (alle Zellen) in allen untersuchten anatomischen Regionen. Streudiagramme stellen Zellzählungen einzelner Hirnschnitte, die überlagerten Kästen den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung 4 nach Schlabitz et al. 2021.

### 3.4 Auswahl des Referenzgens für die quantitative Genexpression

Die etablierte NormFinder Analyse wurde angewendet, um ein Referenzgen für die quantitative Genexpression zu identifizieren. Für die ausgewählten Kandidatengene *Actb*, *Ywhaz*, *Hprt1*, *Reep5* und *Tbp* wurde die Intra- und Intergruppenvariation, ausgedrückt als Standardabweichung, berechnet. Gene mit einer Standardabweichung  $> 0,25$  wurden ausgeschlossen (*Reep5* im H, *Tbp* im TC). Unter allen verbleibenden Kandidaten erwies sich *Ywhaz* als das am stabilsten exprimierte Gen in allen Regionen (Stabilitätswert M: H 0,069; EC 0,09; TC 0,071) und wurde in den folgenden Experimenten als Referenzgen für die qPCR verwendet (**Abbildung 12**).



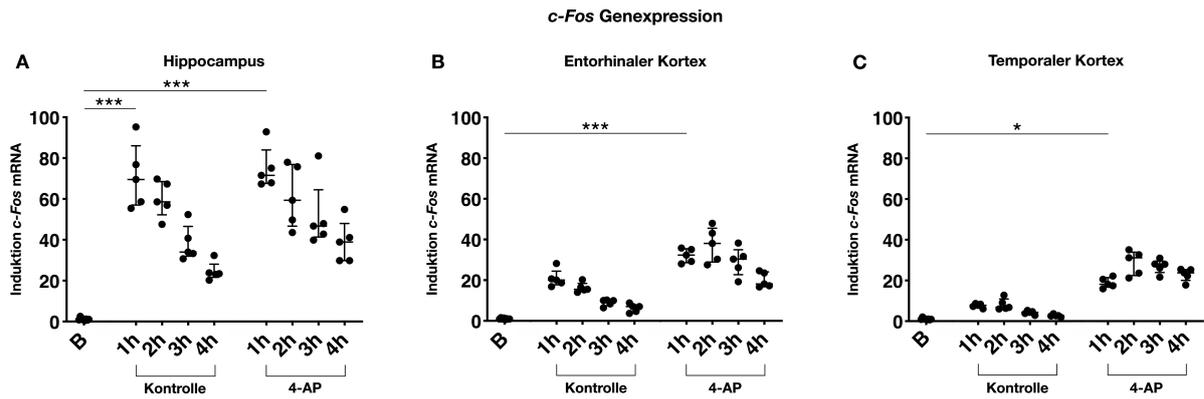
**Abbildung 12** Stabilitätswert M der mithilfe der NormFinder Analyse untersuchten Referenzgene für die Regionen (A) Hippocampus, (B) entorhinaler Kortex und (C) temporaler Kortex. Ein niedriger Stabilitätswert zeigt eine stabile Genexpression an. Quelle: Modifizierte Abbildung S2 nach Schlabitz et al. 2021.

### 3.5 Genexpressionsanalyse in akuten Rattenhirnschnitten

In Rattenhirnschnitten wurde die aktivitätsabhängige Genexpression für die Gene *c-Fos*, *Icer* und *mTor* in Bezug zur *Ywhaz* Expression bestimmt. Anschließend wurde die relative Induktion der Genexpression in Proben der Kontroll- und Interventionsgruppe im Vergleich zur basalen Genexpression berechnet.

#### 3.5.1 *c-Fos* Expression

Die Untersuchung der basalen Hirnschnitte, in denen unmittelbar nach der Präparation eine Zell-Lyse und Inhibition der RNase induziert wurde, gibt Aufschluss über die unbeeinflusste Genexpression im naiven Rattenhirn. Für *c-Fos* variierte die relative Expression bezogen auf das Referenzgen *Ywhaz* in basalen Schnitten interregional und erreichte im TC die höchsten Werte, gefolgt vom EC und den niedrigsten Werten im H (*c-Fos/Ywhaz*(Median): H = 0,0033, EC = 0,0080, TC = 0,0134). Im Vergleich zu den Basalwerten erhöhte sich die *c-Fos* Genexpression in den Kontrollschnitten nach Lagerung in der Interface-Kammer und Inkubation in aCSF deutlich (**Abbildung 13**). Diese Induktion der *c-Fos* mRNA war in allen Regionen der Kontrollschnitte nach einer Stunde am stärksten ausgeprägt. Die hippocampale *c-Fos* Induktion übertraf dabei mit 69,5-fachem Anstieg der mRNA-Level eindeutig die vom EC (20,1-facher Anstieg) und TC (7,8-facher Anstieg). Bei längerer Lagerung der Kontrollschnitte kam es in allen Regionen zu einer Abnahme der *c-Fos* Expression, die mRNA-Level korrelierten dabei negativ mit der Inkubationszeit. In den Schnitten der Interventionsgruppe zeichnete sich eine ähnliche Dynamik ab. Es war eine starke Zunahme der *c-Fos* Genexpression infolge der 4-AP Exposition von einer Stunde nachweisbar, bei längerer Behandlungsdauer kam es zu einer erneuten Abnahme der *c-Fos* mRNA.

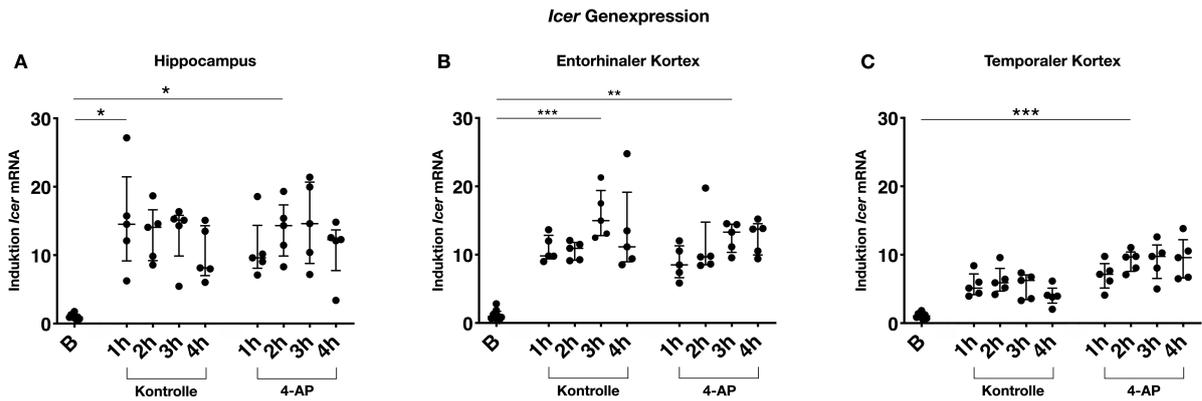


**Abbildung 13** Relative Induktion der *c-Fos* Genexpression in Bezug zur basalen Genexpression in Rattenhirnschnitten für die Regionen **(A)** Hippocampus, **(B)** entorhinaler Kortex und **(C)** temporaler Kortex. *Ywhaz* wurde als Referenzgen für die quantitative PCR genutzt. Streudiagramme stellen Mittelwerte der gepoolten Proben einzelner Ratten ( $n = 20$ ), die überlagerten Linien den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung 5 nach Schlabit et al. 2021.

Um die effektive Auswirkung der 4-AP-induzierten epilepsietypischen Aktivität auf die Genexpression zu bewerten, wurden die Expressionswerte von Proben der Kontroll- und Interventionsgruppe paarweise für jede Ratte miteinander ins Verhältnis gesetzt und die 4-AP/Kontrolle-Ratio berechnet. So konnte verdeutlicht werden, dass *c-Fos* in der Interventionsgruppe stärker induziert wurde. Dabei korrelierte das Ausmaß der *c-Fos* Genexpression mit der Dauer der induzierten epilepsietypischen Aktivität (**Abbildung 16A**). Dieser zeitabhängige Anstieg der *c-Fos* mRNA variierte interregional. Im Hippocampus erhöhte die 4-AP Behandlung die *c-Fos* Level nur geringfügig mit einer (nicht signifikanten) Steigung von 0,19, während im EC und TC signifikante Steigungen von 0,64 ( $p < 0,05$ ) und 2,18 ( $p < 0,01$ ) beobachtet wurden.

### 3.5.2. *Icer* Expression

Die *Icer* Genexpression wies eine mit *c-Fos* vergleichbare Dynamik in geringerer Ausprägung auf (**Abbildung 14**). Schon in den basalen Schnitten war die Expression von *Icer* deutlich geringer als die von *c-Fos* (*Icer/Ywhaz*(Median): H = 0,0002, EC = 0,0003, TC = 0,0003). Als Folge der Hirnschnittpräparation und deren Lagerung in aCSF stiegen die *Icer* mRNA-Level in den Kontrollschnitten an (**Abbildung 14**). In allen Regionen wurde das Maximum der Genexpression nach 3 Stunden beobachtet. In den Schnitten der Interventionsgruppe zeigte die *Icer* Expression ebenfalls einen regionenspezifischen und zeitabhängigen Anstieg.

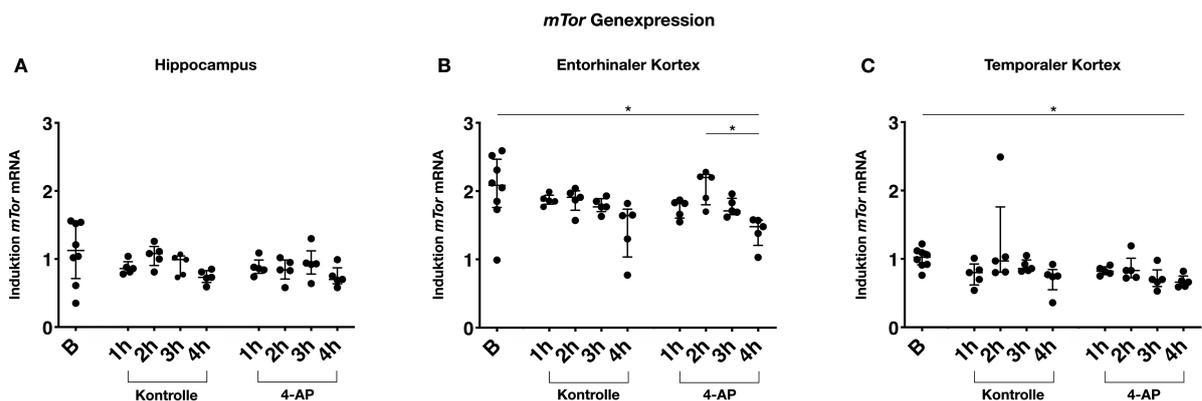


**Abbildung 14** Relative Induktion der *Icer* Genexpression in Bezug zur basalen Genexpression in Rattenhirnschnitten für die Regionen **(A)** Hippocampus, **(B)** entorhinaler Kortex und **(C)** temporaler Kortex. *Ywhaz* wurde als Referenzgen für die quantitative PCR genutzt. Streudiagramme stellen Mittelwerte der gepoolten Proben einzelner Ratten ( $n = 20$ ), die überlagerten Linien den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung S4 nach Schlabitz et al. 2021.

Die 4-AP/Kontroll-Ratio deckte auch für *Icer* eine positive zeitliche Korrelation mit zunehmender Induktion der Genexpression bei anhaltender epilepsietypischer Aktivität bis zu 4 Stunden auf (**Abbildung 16B**). Im H und EC war dieser Effekt nur marginal, im TC erreichte die 4-AP Exposition einen signifikanten *Icer* Anstieg von 0,41 ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.3 *mTor* Expression

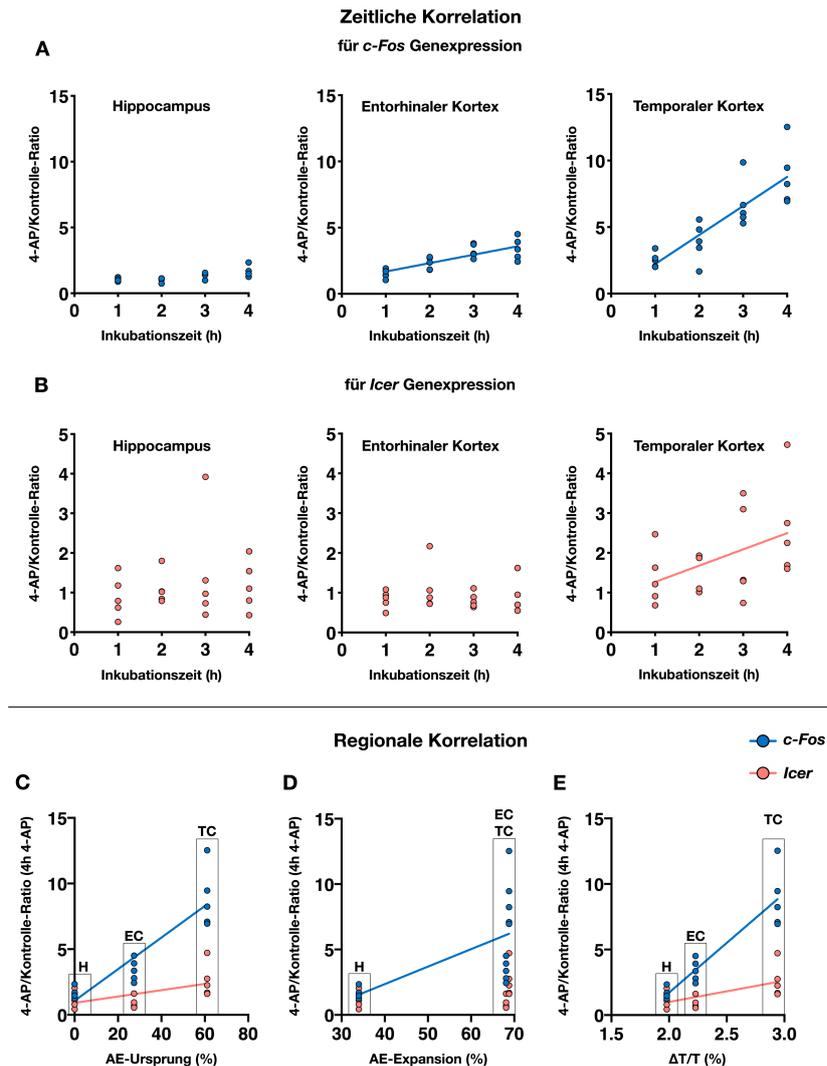
Die *mTor* Genexpression war in basalen Hirnschnitten im Vergleich zu *c-Fos* und *Icer* stärker ausgeprägt (*mTor/Ywhaz*(Median): H = 0,0137, EC = 0,0151, TC = 0,0145).



**Abbildung 15** Relative Induktion der *mTor* Genexpression in Bezug zur basalen Genexpression in Rattenhirnschnitten für die Regionen **(A)** Hippocampus, **(B)** entorhinaler Kortex und **(C)** temporaler Kortex. *Ywhaz* wurde als Referenzgen für die quantitative PCR genutzt. Streudiagramme stellen Mittelwerte der gepoolten Proben einzelner Ratten ( $n = 20$ ), die überlagerten Linien den Median  $\pm$  Interquartilsbereich dar (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Quelle: Modifizierte Abbildung S4 nach Schlabitz et al. 2021.

In den Schnitten der Kontroll- und Interventionsgruppe ließ sich eine leichte zeitabhängige Abnahme der *mTor* mRNA-Level nachweisen, die in 4-AP exponierten Schnitten nach 4 Stunden ein signifikantes Ausmaß erreichte (**Abbildung 15**). Die 4-AP/Kontroll-Ratio verdeutlichte, dass epilepsietypische Aktivität *in vitro* keinen Einfluss auf die *mTor* Genexpression innerhalb von 4 Stunden hatte.

### 3.6 Korrelation der Genexpression mit Inkubationsdauer und Aktivität



**Abbildung 16** Positive Korrelation zwischen der Dauer der epilepsietypischen Aktivität und der induzierten Genexpression von **(A)** *c-Fos* sowie **(B)** *Icer* für die Regionen Hippocampus, entorhinaler Kortex und temporaler Kortex. Ebenfalls positive Korrelation zwischen der regionalen Ausprägung der ictalen Aktivität im Hirnschnitt für die Parameter **(C)** Ursprungshäufigkeit der anfallsartigen Ereignisse (AE), **(D)** intraregionale AE-Expansion sowie **(E)** AE-Amplitude und der Genexpression nach der Interventionszeit von 4 Stunden. Streudiagramme stellen die für jede Ratte individuell berechnete 4-AP/Kontroll-Ratio dar, Regressionslinien verdeutlichen einen signifikanten mRNA-Anstieg in Abhängigkeit der aufgeführten Parameter. Quelle: Modifizierte Abbildung 6 nach Schlabitz et al. 2021.

Die Genexpression der von uns untersuchten Gene war von der Dauer der Lagerung der Hirnschnitte in der Messkammer abhängig. Wir konnten darüber hinaus einen Einfluss der 4-AP Behandlung auf die Expression von *c-Fos* und *Icer* nachweisen: Die epilepsietypische Aktivität hatte eine ebenfalls zeitabhängige Induktion beider Gene zur Folge (**Abbildung 16A-B**). Neben dieser zeitlichen Assoziation fanden wir auch eine Korrelation der regionalen Ausprägung der ictalen Aktivität im Hirnschnitt und der Genexpression (**Abbildung 16C-E**). Der regionale *c-Fos* mRNA Anstieg korrelierte positiv mit der Häufigkeit des Ursprungs der AE in dieser anatomischen Region. Dementsprechend wurde die stärkste *c-Fos* Induktion im TC gemessen, wo die Mehrheit der AE generiert wurde. Diese positive Korrelation war auch für die mittels IOS gemessenen Parameter der AE-Expansion innerhalb einer anatomischen Region sowie der AE-Amplitude nachweisbar. Für *Icer* wurde eine ähnliche Assoziation der Genexpression und der regionalen Parameter in allerdings geringerer Ausprägung aufgezeigt. Für *mTor* wurde eine derartige Korrelation nicht beobachtet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kurzzusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie haben wir den Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität in akuten Rattenhirnschnitten und der Genexpression dreier Kandidatengene evaluiert. Für *c-Fos* und *Icer* konnten wir eine positive regionale und zeitliche Korrelation epilepsietypischer Aktivität *in vitro* und der Genexpression nachweisen, für *mTor* fand sich keine solche Assoziation. Die durch epilepsietypische Aktivität induzierte Modulation der Genexpression konnte zudem von Änderungen infolge der Hirnschnittpräparation und der Inkubationszeit in aCSF unterschieden werden.

### 4.2 Interpretation der Ergebnisse

Die stärkste Korrelation zwischen epilepsietypischer Aktivität *in vitro* und Genexpression fanden wir für *c-Fos*, einem etablierten Marker neuronaler Aktivität (Willoughby et al. 1995; Mihály et al. 2001; Szyndler et al. 2009). Viele pathophysiologische Stimuli, darunter prokonvulsive Substanzen, haben in Tiermodellen *in vivo* eine schnelle und transiente Induktion sowohl der *c-Fos* Gen- als auch Proteinexpression zur Folge (Barros et al. 2015; Yang et al. 2019). Bis heute ist die Datenlage zur *c-Fos* Expression in Hirnschnitten nach iktaler Aktivität *in vitro* sehr begrenzt. In einer Arbeit von Massamiri et al. (1994) konnte eine Induktion der *c-Fos* Genexpression in adulten hippocampalen Rattenschnitten nach einer Behandlung mit der exzitatorisch wirkenden Kainsäure demonstriert werden, während diese Beobachtung nach Exposition der Schnitte mit GABA und dem GABA-Antagonisten Bicucullin nicht eintrat. Diese Arbeit weist allerdings methodische Limitationen auf, da bei Verzicht einer elektrophysiologischen Messung epilepsietypischer Aktivität und einer für Subregionen spezifischen Analyse der Genexpression eine direkte Assoziation nicht möglich ist. Auch im humanen Neokortex konnte unabhängig von der Ätiologie der epileptogenen Läsion ein regionaler Anstieg der *c-FOS* mRNA nachgewiesen werden (Rakhade et al. 2005).

In unserer Studie war epilepsietypische Aktivität *in vitro*, speziell im temporalen Kortex, auch mit einer zeitabhängigen Induktion der Genexpression von *Icer*, einem cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor, assoziiert. Nach unserem Kenntnisstand konnten wir erstmalig eine Modulation der *Icer* Genexpression in einem *in vitro* Anfallsmodell

nachweisen. In 1996 wurde von Fitzgerald et al. (1996) erstmals aufgezeigt, dass elektrokonvulsive Anfälle *in vivo* zu einem Anstieg der *Crem* und *Icer* mRNA im Rattenhirn führen. Eine Stunde nach den epileptischen Anfällen erreichte die *Icer* Induktion ein Maximum und war dabei in der Körnerzellenschicht des Gyrus dentatus des Hippocampus sowie der tiefen Schicht der Großhirnrinde am deutlichsten exprimiert. Als weiteres *in vivo* Modell resultierte auch der durch Pilocarpin induzierte Status epilepticus bei Ratten in einem *Icer* mRNA-Anstieg im Gyrus dentatus nach einer Stunde, das Expressionsmaximum trat dabei nach 6 Stunden ein (Lund et al. 2008). Bemerkenswerterweise war die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREP (engl. cAMP response element-binding protein), der die Expression des *ICER* Gens mutmaßlich positiv beeinflusst, auch in der epileptogenen Zone des humanen Neokortex nach epilepsiechirurgischen Eingriffen erhöht (Rakhade et al. 2005).

Für die Serin/Threonin-Kinase mTor, die als wichtiger Regulator für Proliferation und Differenzierung gilt (Crino et al. 2006), konnten wir keine Aktivierung der Genexpression infolge epilepsietypischer Aktivität *in vitro* nachweisen. Im Gegenteil, wir fanden Hinweise für eine Suppression der *mTor* Genexpression im entorhinalen und temporalen Kortex durch die *in vitro* Lagerung der Hirnschnitte in der Interface-Kammer. Neben genetischen Erkrankungen wie der Tuberösen Sklerose konnte allerdings eine Aktivierung des mTor Signalweges in mehreren *in vivo* Anfallsmodellen demonstriert werden (Zhang und Wong 2012; Wang et al. 2018). In den Untersuchungen wurde stets eine mTor Aktivierung durch Proteinphosphorylierung beobachtet, unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse ergab sich bisher kein Anhalt für eine simultane Induktion der *mTor* Genexpression. In zwei chronischen Epilepsiemodellen mit Einsatz von Pilocarpin und Kainsäure fand sich dabei eine biphasische mTor Aktivierung. Auf eine initiale, wenige Stunden andauernde mTor Aktivierung folgte eine zweite chronische Phase, die die Epileptogenese zu fördern scheint (Zeng et al. 2009; Huang et al. 2010). Auch durch Pentylentetrazol (PTZ) induzierte akute Anfälle *in vivo* resultierten in einer transienten mTor Aktivierung im Hippocampus und Neokortex von Ratten, diese setzte eine Stunde nach Anfallsbeginn ein und dauerte 16 Stunden an (Zhang und Wong 2012). Möglicherweise wurde in diesem Modell keine sekundäre Aktivierung des Signalweges beobachtet, weil die PTZ Exposition und die dadurch induzierten Anfälle nicht zu einer Etablierung einer Epilepsie bei den Ratten mit neuropathologischen Veränderungen führen (Holmes et al. 1984;

Wong et al. 2003). Die anfallsinduzierte mTor Aktivierung allein scheint somit für eine Induktion der Epileptogenese nicht ausreichend zu sein.

### **4.3 Reproduktion in humanen Hirnschnitten**

Wir konnten die Ergebnisse zur Induktion der *c-Fos* Genexpression in humanen Hirnschnittpräparationen, die im Rahmen epilepsiechirurgischer Eingriffe gewonnen wurden, in Teilen reproduzieren. Diese Untersuchung wurde von der Doktorandin Laura Monni, die ebenfalls der AG Klinische und Experimentelle Epileptologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin angehört, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zusammen mit den tierexperimentellen Daten publiziert (Schlabitz et al. 2021). Von fünf Patientinnen (Alter zum Zeitpunkt der Resektion 21-58 Jahre) mit mesialer Temporallappenepilepsie erhielten wir reseziertes Hirngewebe. Vom humanen Gewebe wurden, korrelierend zum Studienprotokoll der Rattenhirne, ebenfalls 400 µm dicke Hirnschnitte angefertigt und alternierend auf drei Gruppen (basal, Kontrolle und Intervention) aufgeteilt. In der Kontrollgruppe wurden die humanen Schnitte für 4 Stunden in aCSF inkubiert. In den Schnitten der Interventionsgruppe wurde epilepsietypische Aktivität über einen identischen Zeitraum durch Zugabe von 4-AP (100 µM) und Kalium (8 mM) induziert. Um die epilepsietypische Aktivität zu detektieren, wurden neben extrazellulären Feldpotentialen ebenso intrinsische optische Signale aufgezeichnet. In einem signifikanten Anteil der untersuchten humanen Hirnschnitte variierte die Ursprungsregion der AE im Verlauf des Experiments. In diesen Schnitten wurde der Bereich, in dem die meisten AE generiert wurden, als Ursprungsregion definiert. Die quantitative PCR wies auch in den humanen Schnitten einen Anstieg der *c-FOS* Genexpression infolge der vierstündigen Lagerung in aCSF nach. Wie bei den Rattenschnitten führte die epilepsietypische Aktivität zu einer zusätzlichen *c-FOS* Induktion. Der relative *c-FOS* Anstieg war unter den Interventionsbedingungen (26,1-fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe (15,7-fach) signifikant höher (p-Wert 0,0031). Im Gegensatz zu den tierexperimentellen Ergebnissen konnten wir keinen Unterschied in der *c-FOS* Expression zwischen der AE-Ursprungsregion und dem übrigen Hirnschnitt feststellen.

### **4.4 Stärken und Schwächen der Studie**

Eine Limitation unserer Studie ist die geringe Anzahl an Proben in den untersuchten Gruppen, was dem tierexperimentellen Ansatz und dem Bestreben nach einer geringen

Anzahl an Versuchstieren geschuldet war. Neben tierethischen Aspekten bietet das *in vitro* Anfallsmodell allerdings den Vorteil, mehrere experimentelle Bedingungen in einem Tier gleichzeitig studieren und intraindividuelle Ergebnisse erhalten zu können. Durch den lamellaren Netzwerkaufbau ist eine Untersuchung des neuronalen Netzwerks im entorhinal-hippocampalen Hirnschnittpräparat möglich (Andersen et al. 1971). Dennoch ist davon auszugehen, dass ein Teil der bestehenden Faserverbindungen durch den Schneideprozess unterbrochen wird und die *in vivo* Bedingungen sicher unvollständig abgebildet werden (Boulton et al. 1992). Vereinbar damit konnten wir demonstrieren, dass die Schnitthöhe in Bezug auf die dorsoventrale Achse die optisch gemessenen Anfallsparameter beeinflusst. Um diesen Effekt zu kontrollieren, erfolgte die Verteilung der Schnitte auf die drei Gruppen streng alternierend. Aufgrund unseres Versuchsaufbaus mit Kopplung der elektrophysiologischen und intrinsischen optischen Messung waren zeitgleiche Untersuchungen mehrerer Hirnschnitte der Interventionsgruppe technisch nicht möglich, sodass ein Schnitt pro Ratte gemessen wurde. In diesem akuten *in vitro* Hirnschnittmodell verwendeten wir natives neuronales Gewebe und induzierten epilepsietypische Aktivität durch 4-AP. Die einer Epilepsie zugrunde liegenden Pathologien wurden hierbei allerdings nicht berücksichtigt. Stattdessen wurde epilepsietypische Aktivität durch pharmakologische Modifizierung mit einem einzigen Mechanismus erzeugt. Alternativen stellen das Hoch-Kalium-Modell sowie das Niedrig-Magnesium-Modell dar (Traynelis et al. 1989; Buchheim et al. 2000). Wir bevorzugten das robuste 4-AP Modell aufgrund der stabilen Frequenz der AE über mehrere Stunden. Eine weitere Einschränkung der akuten Hirnschnittmodelle im Vergleich zu *in vivo* Modellen ist der durch den Neuronen-Untergang limitierte experimentelle Zeitraum von deutlich unter 24 Stunden. Die Ergebnisse unseres Zelltod-Assays basierend auf der PI/DAPI-Färbung deuten aber darauf hin, dass das 4-AP-Modell zur Untersuchung der Genexpression *in vitro* geeignet ist. Zwar nahm der Zelltod erwartungsgemäß mit zunehmender Inkubationszeit zu, wir konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Schnitten der Kontroll- und Interventionsgruppe feststellen. Interessanterweise führte eine vierstündige 4-AP Exposition zu einer reduzierten Zelltodrate im Vergleich zu zeitlich angepassten Kontrollschnitten. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen früherer Studien, die Hinweise für eine Beteiligung von 4-AP an der Neuroprotektion aufdeckten, obwohl die genauen Mechanismen unklar sind (Hardingham et al. 2002; Tauskela et al. 2008).

#### 4.5 Implikation für zukünftige Forschung

In Zusammenschau unserer Ergebnisse schlussfolgern wir, dass *in vitro* Modelle für die Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit von epilepsietypischer Aktivität prinzipiell geeignet sind. Die erwähnten Einschränkungen müssen bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Im humanen ZNS-Gewebe ist der *ex vivo* Ansatz zur Analyse der Genexpression sogar alternativlos. Durch die in den letzten Jahren optimierten molekularbiologischen Methoden werden Analysen des gesamten Transkriptoms mit hoher regionaler Auflösung (engl. spatial transcriptomics) bis zur Erstellung von Einzelzellprofilen möglich (Guelfi et al. 2019, Armand et al. 2021). In einem auf diese Studie aufbauenden Projekt planen wir nun, in Hippocampusresektaten von Patient\*innen mit mesialer Temporallappenepilepsie nach epilepsiechirurgischem Eingriff transkriptomweite Untersuchungen durchzuführen. Diese Daten sollen, in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie der Charité, mit den Ergebnissen der histopathologischen Färbungen und schließlich auch mit den klinischen Angaben zur Epilepsie korreliert werden. Die mesiale Temporallappenepilepsie mit Hippocampussklerose repräsentiert das häufigste Epilepsiesyndrom bei Erwachsenen mit pharmakoresistenter fokaler Epilepsie (Wieser 2004). Sie wird als polygene Erkrankung angesehen, deren komplexe Pathophysiologie mit Dysregulation neuronaler Netzwerke und zellulärer Signalkaskaden noch immer unzureichend verstanden ist. Unser Ziel ist es, das pathophysiologische Verständnis der Epilepsie, insbesondere der mesialen Temporallappenepilepsie, zu verbessern. Perspektivisch eröffnen sich dadurch Möglichkeiten, neue Biomarker und therapeutische Optionen sowie auch genetische Risikofaktoren zu identifizieren, welche die Epilepsie und deren Pharmakoresistenz günstig beeinflussen.

## Literaturverzeichnis

1. Andersen, P., Bliss, T. V. und Skrede, K. K. (1971) Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13, 222-38.
2. Andersen, C. L., Jensen, J. L. und Ørntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245–5250.
3. Armand, E. J., Li, J., Xie, F., Luo, C. und Mukamel, E. A. (2021) Single-cell sequencing of brain cell transcriptomes and epigenomes. *Neuron* 109, 11-26.
4. Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G. und Tancredi, V. (2002) Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* 68, 167–207.
5. Avoli, M. und Jefferys, J. G. (2016) Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J Neurosci Methods* 260, 26-32.
6. Barros, V. N., Mundim, M., Galindo, L. T., Bittencourt, S., Porcionatto, M. und Mello, L. E. (2015) The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front Cell Neurosci* 9, 1-8.
7. Becker, A. J., Chen, J., Paus, S., Normann, S., Beck, H., Elger, C. E., Wiestler, O. D. und Blümcke, I. (2002) Transcriptional profiling in human epilepsy: Expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. *NeuroReport* 13, 1327–1333.
8. Borbely, S., Korossy, C., Somogyvari, Z. und Vilagi, I. (2014) In vitro intrinsic optical imaging can be used for source determination in cortical slices. *Eur J Neurosci* 39, 72- 82.
9. Boulton, C. L., von Haebler, D. und Heinemann, U. (1992) Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* 2, 99-106.

10. Bruckner, C. und Heinemann, U. (2000) Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res* 859, 15-20.
11. Buchheim, K., Schuchmann, S., Siegmund, H., Weissinger, F., Heinemann, U. und Meierkord, H. (2000) Comparison of intrinsic optical signals associated with low  $\text{mg}^{2+}$ - and 4-aminopyridine-induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system. *Epilepsia* 41, 635-41.
12. Buckle, P. J. und Haas, H. L. (1982) Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J Physiol* 326, 109-22.
13. Buskila, Y., Breen, P. P., Tapson, J., van Schaik, A., Barton, M. und Morley, J. W. (2014) Extending the viability of acute brain slices. *Sci Rep* 4, 4–10.
14. Bustin, S. A., Benese, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. und Wittwer, C. T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-22.
15. Chen, Z., Brodie, M., Liew, D. und Kwan, P. (2018) Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy with established and new antiepileptic drugs – A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurol* 75, 279-286.
16. Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. und Karin, M. (1988) The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541–552.
17. Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159.
18. Crino, P. B., Nathanson, K. L. und Henske, E. P. (2006) The tuberous sclerosis complex. *New Engl J Med* 355, 1345–1356.
19. Curran, T. und Morgan, J. I. (1995) Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26, 403-12.
20. Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A. und Geddes, C. D. (2012) SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc* 22, 1189-99.

21. Dreier, J. P. (2011) The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17, 439–44.
22. Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M. und Wiebe, S. (2014) ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475-82.
23. Fitzgerald, L. R., Vaidya, V. A., Terwilliger, R. Z. und Duman, R. S. (1996) Electroconvulsive seizure increases the expression of CREM (cyclic AMP response element modulator) and ICER (inducible cyclic AMP early repressor) in rat brain. *J Neurochem* 66, 429–432.
24. French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., Ikeda, H., Polster, T., Nabbout, R., Curatolol, P., de Vries, P. J., Dlugos, D. J., Berkowitz, N., Voi, M., Peyrard, S., Pelov, D. und Franz, D. N. (2016) Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 388, 2153–2163.
25. Guelfi, S., Botia, J. A., Thom, M., Ramasamy, A., Perona, M., Stanyer, L., Martinian, L., Trabzuni, D., Smith, C., Walker, R., Ryten, M., Reimers, M., Weale, M. E., Hardy, J. und Matarin, M. (2019) Transcriptomic and genetic analyses reveal potential causal drivers for intractable partial epilepsy. *Brain* 142, 1616–1630.
26. Hamer, H. M., Dodel, R., Strzelczyk, A., Balzer-Geldsetzer, M., Reese, J. P., Schöffski, O., Graf, W., Schwab, S., Knake, S., Oertel, W. H., Rosenow, F. und Kostev, K. (2012) Prevalence, utilization, and costs of antiepileptic drugs for epilepsy in Germany – a nationwide population-based study in children and adults. *J Neurol* 259, 2376-2384.
27. Hardingham, G. E., Fukunaga, Y. und Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405–414.
28. Heuzeroth, H., Wawra, M., Fidzinski, P., Dag, R. und Holtkamp, M. (2019) The 4-aminopyridine model of acute seizures in vitro elucidates efficacy of new antiepileptic drugs. *Front Neurosci* 13, 677.

29. Hille, B. (1971) The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J Gen Physiol* 58, 599-619.
30. Holmes, G. L., Albala, B. J. und Moshé, S. L. (1984) Effect of a single brief seizure on subsequent seizure susceptibility in the immature rat. *Arch Neurol* 41, 853-5.
31. Holtkamp, M. und Meierkord, H. (2007) Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cell Mol Life Sci* 64, 2023-41.
32. Huang, X., Zhang, H., Yang, J., Wu, J., McMahon, J., Lin, Y., Cao, Z., Gruenthal, M. und Huang, Y. (2010) Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. *Neurobiol Dis* 40, 193–199.
33. Kobow, K. und Blümcke, I. (2018) Epigenetics in epilepsy. *Neurosci Lett* 667, 40–46.
34. Kojima, N., Borlikova, G., Sakamoto, T., Yamada, K., Ikeda, T., Itohara, S., Niki, H. und Endo, S. (2008) Inducible cAMP early repressor acts as a negative regulator for kindling epileptogenesis and long-term fear memory. *J Neurosci* 28, 6459–6472.
35. Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S. und French J. (2010) Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 51, 1069-77.
36. Löscher, W. (2017) Animal models of seizures and epilepsy: Past, present, and future role of the discovery of antiseizure drugs. *Neurochem Res* 42, 1873-1888.
37. Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E. und Schmidt, D. (2013) New avenues for antiepileptic drug discovery and development. *Nat Rev Discov* 12, 757-776.
38. Lund, I. V., Hu, Y., Raol, Y. S. H., Benham, R. S., Faris, R., Russek, S. J. und Brooks-Kayal, A. R. (2008) BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* 1, 1–15.
39. Marson, A. G., Appleton, R., Baker, G. A., Chadwick, D. W., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Jacoby, A., Shackley, P., Smith, D. F., Tudur-Smith, C., Vanoli, A. und Williamson, P. R. (2007) A randomised controlled trial examining the longer-term outcomes of standard versus new antiepileptic drugs. The sanad trial. *Health Technol Assess* 11, 1-134.

40. Massamiri, T., Khrestchatisky, M. und Ben-Ari, Y. (1994) Induction of c-fos mRNA expression in an in vitro hippocampal slice model of adult rats after kainate but not  $\gamma$ -aminobutyric acid or bicuculline treatment. *Neurosci Lett* 166, 73–76.
41. Mathie, A., Wooltorton, J. R. A. und Watkins, C. S. (1998) Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmac* 30, 13–24.
42. Mihály, A., Szakács, R., Bohata, C., Dobó, E. und Krisztin-Péva, B. (2001) Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures. *Epilepsy Res* 44, 97–108.
43. Mioduszevska, B., Jaworski, J. und Kaczmarek, L. (2003) Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system – a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J Neurochem* 87, 1313-1320.
44. Müller, M. und Somjen, G. G. (1999) Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia- induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82, 1818–1831.
45. Pál, I., Nyitrai, G., Kardos, J. und Héja, L. (2013) Neuronal and astroglial correlates underlying spatiotemporal intrinsic optical signal in the rat hippocampal slice. *PLoS One* 8, e57694.
46. Paxinos, G. und Watson, C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego, Academic Press.
47. Pennypacker, K. R., Thai, L., Hong, J. S. und McMillian, M. K. (1994) Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment. *J Neurosci* 14, 3998–4006.
48. Perreault, P. und Avoli, M. (1991) Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 65, 771–785.
49. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.
50. Pitkänen, A. und Lukasiuk, K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 10, 173-86.

51. Pitkänen, A., Roivainen, R. und Lukasiuk, K. (2016) Development of epilepsy after ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 15, 185-197.
52. Porter, B. E., Lund, I. V., Varodayan, F. P., Wallace, R. W. und Blendy, J. A. (2008) The role of transcription factors cyclic-AMP responsive element modulator (CREM) and inducible cyclic-AMP early repressor (ICER) in epileptogenesis. *Neuroscience* 152, 829–836.
53. Overwater, I. E., Rietman, A. B., van Eeghen, A. M. und de Wit, M. C. Y. (2019) Everolimus for the treatment of refractory seizures associated with tuberous sclerosis complex (TSC): Current perspectives. *Ther Clin Risk Manag* 15, 951–955.
54. Rakhade, S. N., Yao, B., Ahmed, S., Asano, E., Beaumont, T. L., Shah, A. K., Draghici, S., Krauss, R., Chugani, H. T., Sood, S. und Loeb, J. A. (2005) A common pattern of persistent gene activation in human neocortical epileptic foci. *Ann Neurol* 58, 736-747.
55. Sadangi, C., Rosenow, F. und Norwood, B. A. (2017) Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J Neurosci Res* 95, 2357–2366.
56. Schlabitz, S., Monni, L., Ragot, A., Dipper-Wawra, M., Onken, J., Holtkamp, M. und Fidzinski, P. (2021) Spatiotemporal correlation of epileptiform activity and gene expression in vitro. *Front Mol Neurosci* 14, 643763.
57. Stasheff, S. F., Bragdon, A. C. und Wilson, W. A. (1985) Induction of epileptiform activity in hippocampal slices by trains of electrical stimuli. *Brain Res* 344, 296-302.
58. Szyndler, J., Maciejak, P., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Taracha, E. und Skórzewska, A. (2009) Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. *Epilepsy Behav* 16, 216–224.
59. Tauskela, J. S., Fang, H., Hewitt, M., Brunette, E., Ahuja, T., Thivierge, J. P., Comas, T. und Mealing, G. A. R. (2008) Elevated synaptic activity preconditions neurons against an in vitro model of ischemia. *J Biol Chem* 283, 34667–34676.

60. Traynelis, S. F., Dingledine, R., McNamara, J. O., Butler, L. und Rigsbee, L. (1989) Effect of kindling on potassium-induced electrographic seizures in vitro. *Neurosci Lett* 105, 326-32.
61. Walther, H., Lambert, J. D., Jones, R. S., Heinemann, U. und Hamon, B. (1986) Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett* 69, 156-61.
62. Wang, F., Chen, F., Wang, G., Wei, S., Fang, F., Kang, D. und Lin, Y. (2018) Rapamycin provides anti-epileptogenic effect in a rat model of post-traumatic epilepsy via deactivation of mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med* 15, 4763–4770.
63. Weissinger, F., Buchheim, K., Siegmund, H., Heinemann, U. und Meierkord, H. (2000) Optical imaging reveals characteristic seizure onsets, spread patterns, and propagation velocities in hippocampal-entorhinal cortex slices of juvenile rats. *Neurobiol Dis* 7, 286- 98.
64. Wieser, H. G., ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45, 695–714.
65. Willoughby, J. O., Mackenzie, L., Medvedev, A. und Hiscock, J. J. (1995) Distribution of Fos-positive neurons in cortical and subcortical structures after picrotoxin-induced convulsions varies with seizure type. *Brain Res* 683, 73–87.
66. Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., van Haeften, T. (2000) Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911, 1-24.
67. Wong, M., Wozniak, D. F. und Yamada, K. A. (2003) An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects. *Exp Neurol* 183, 87-99.
68. Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., Li, F., Yang, X. und Wang, Q. (2019) C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylenetetrazol-induced seizure mice model. *Neurol Res* 41, 749–761.

- 
69. Zeng, L. H., Rensing, N. R. und Wong, M. (2009) The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29, 6964–6972.
  70. Zhang, B. und Wong, M. (2012) Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. *Epilepsia* 53, 506–511.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Schlabitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regionale und zeitliche Korrelation von epilepsietypischer Aktivität und Genexpression - eine *in vitro* Studie in Rattenhirnschnitten“ (engl. „Spatiotemporal correlation of epileptiform activity and gene expression – an *in vitro* study in rodent brain slices“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an der Publikation zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für die im Rahmen der Dissertation entstandene Publikation wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift Sophie Schlabitz

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Sophie Schlabitz hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

**Publikation 1:** Sophie Schlabitz, Laura Monni, Alienor Ragot, Matthias Dipper-Wawra, Julia Onken, Martin Holtkamp, Pawel Fidzinski “Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression *in vitro*” Front. Mol. Neurosci., 2021;14:643763.

**Beitrag im Einzelnen:** Sophie Schlabitz trug nach Literaturrecherche zur Konzeption der Studie mit Ausarbeitung der Fragestellung bei. Sie führte alle Experimente an Rattenhirnschnitten durch, inklusive der elektrophysiologischen und optischen Messungen, der NormFinder Analyse und quantitativen PCR aller untersuchten Gene sowie des Zelltod-Assays. Frau Schlabitz war für die gesamte statistische Datenauswertung verantwortlich, diskutierte und interpretierte die Ergebnisse mit den Koautoren/innen, erstellte sämtliche Abbildungen und arbeitete einen Entwurf des Manuskripts aus. In Zusammenarbeit mit den Koautoren/innen führte sie die Einreichung und die Revision des Manuskripts aus.

---

Unterschrift, Datum und Stempel

PD Dr. med. Pawel Fidzinski

---

Unterschrift Sophie Schlabitz

## Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“NEUROSCIENCES”** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 271 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	42,809	33.654	0.055400
2	NATURE NEUROSCIENCE	62,933	20.071	0.144390
3	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,395	17.333	0.008170
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,705	15.218	0.036050
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,537	14.528	0.009430
6	NEURON	95,056	14.415	0.199640
7	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,011	12.891	0.021220
9	Annual Review of Neuroscience	13,215	12.547	0.012740
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
11	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
13	BRAIN	53,282	11.337	0.067050
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	8,077	9.613	0.013000
15	Molecular Neurodegeneration	4,933	9.599	0.011840
16	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,791	9.371	0.011250
17	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,491	9.059	0.007050
18	ANNALS OF NEUROLOGY	37,304	9.037	0.044120
19	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	28,873	8.330	0.051900
20	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	2,232	7.724	0.008400
21	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960

<b>Rank</b>	<b>Full Journal Title</b>	<b>Total Cites</b>	<b>Journal Impact Factor</b>	<b>Eigenfactor Score</b>
22	Neurobiology of Stress	1,055	7.197	0.003840
23	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
24	npj Parkinsons Disease	662	6.750	0.002500
25	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
26	Brain Stimulation	6,537	6.565	0.015580
27	NEUROSCIENTIST	5,188	6.500	0.007220
28	Acta Neuropathologica Communications	4,070	6.270	0.014730
29	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	14,959	6.267	0.028730
30	Alzheimers Research & Therapy	3,876	6.116	0.011650
31	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
32	GLIA	14,220	5.984	0.017250
33	NEUROIMAGE	102,632	5.902	0.125360
34	Annual Review of Vision Science	601	5.897	0.003700
35	Molecular Autism	2,510	5.869	0.007450
36	Journal of Neuroinflammation	13,709	5.793	0.025870
37	Translational Stroke Research	2,274	5.780	0.004520
38	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,492	5.681	0.024230
39	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	167,114	5.673	0.181170
40	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
41	Translational Neurodegeneration	1,030	5.551	0.002790
42	NEURAL NETWORKS	14,065	5.535	0.018910
43	PAIN	37,753	5.483	0.035730

<b>Rank</b>	<b>Full Journal Title</b>	<b>Total Cites</b>	<b>Journal Impact Factor</b>	<b>Eigenfactor Score</b>
44	Multiple Sclerosis Journal	11,792	5.412	0.019460
45	BIPOLAR DISORDERS	4,838	5.410	0.006610
46	Dialogues in Clinical Neuroscience	3,842	5.397	0.005280
47	Biological Psychiatry-Cognitive Neuroscience and Neuroimaging	1,361	5.335	0.005880
48	NEUROBIOLOGY OF DISEASE	17,200	5.332	0.023770
49	Brain Connectivity	2,431	5.263	0.005180
50	Journal of Parkinsons Disease	2,244	5.178	0.005810
51	CEREBRAL CORTEX	30,815	5.043	0.056030
52	Developmental Cognitive Neuroscience	3,177	4.966	0.010180
53	CEPHALALGIA	11,053	4.868	0.011970
54	NEUROPSYCHOLOGY REVIEW	3,114	4.840	0.004050
55	SLEEP	22,296	4.805	0.024610
56	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	3,898	4.797	0.007600
57	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	19,287	4.732	0.027100
58	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH	13,098	4.699	0.010490
59	EXPERIMENTAL NEUROLOGY	20,154	4.691	0.020070
60	Molecular Brain	2,785	4.686	0.006510
61	Current Neuropharmacology	4,178	4.668	0.006280
62	JOURNAL OF PAIN	10,887	4.621	0.015040
63	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	50,045	4.547	0.037090
64	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	11,015	4.516	0.017330
65	MOLECULAR NEUROBIOLOGY	15,297	4.500	0.031350

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
66	ACS Chemical Neuroscience	6,881	4.486	0.015300
67	Fluids and Barriers of the CNS	1,331	4.470	0.002240
68	NEUROPHARMACOLOGY	21,682	4.431	0.033110
69	HUMAN BRAIN MAPPING	23,094	4.421	0.042760
70	JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE	3,297	4.382	0.004290
71	Current Neurology and Neuroscience Reports	3,429	4.376	0.006810
72	Nature and Science of Sleep	728	4.375	0.001970
73	Frontiers in Aging Neuroscience	9,063	4.362	0.026120
74	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	11,179	4.361	0.013670
75	NEUROBIOLOGY OF AGING	23,002	4.347	0.032570
76	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,749	4.333	0.011150
77	Neuroscience Bulletin	2,338	4.326	0.004870
78	NEUROENDOCRINOLOGY	4,958	4.271	0.004820
79	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	5,437	4.207	0.008280
80	ASN Neuro	984	4.167	0.001580
81	Journal of Neural Engineering	7,240	4.141	0.011940
82	Journal of Neuroimmune Pharmacology	2,809	4.113	0.003520
83	CNS Neuroscience & Therapeutics	3,598	4.074	0.005870
84	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY	34,378	4.066	0.021840
85	Frontiers in Molecular Neuroscience	6,721	4.057	0.020190
86	NUTRITIONAL NEUROSCIENCE	2,110	4.028	0.002640
87	CORTEX	10,979	4.009	0.022870

## Eingebundene Publikation

Schlabitz, S., Monni, L., Ragot, A., Dipper-Wawra, M., Onken, J., Holtkamp, M. und Fidzinski, P. (2021) Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression *in vitro*. *Front Mol Neurosci*. 14:643763.

Impact Factor: 4,057



# Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression *in vitro*

Sophie Schlabitz<sup>1\*</sup>, Laura Monni<sup>1</sup>, Alienor Ragot<sup>1</sup>, Matthias Dipper-Wawra<sup>1</sup>, Julia Onken<sup>2</sup>, Martin Holtkamp<sup>1,3</sup> and Pawel Fidzinski<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Neurology with Experimental Neurology, Clinical and Experimental Epileptology, Berlin, Germany, <sup>2</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Neurosurgery, Berlin, Germany, <sup>3</sup> Epilepsy-Center Berlin-Brandenburg, Institute for Diagnostics of Epilepsy, Berlin, Germany, <sup>4</sup> Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, NeuroCure Cluster of Excellence, Neuroscience Research Center, Berlin, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hermona Soreq,  
Hebrew University of Jerusalem, Israel

### Reviewed by:

Nibha Mishra,  
Takeda Oncology, United States  
Logan James Voss,  
Waikato District Health Board,  
New Zealand

### \*Correspondence:

Sophie Schlabitz  
sophie.schlabitz@charite.de

Received: 18 December 2020

Accepted: 03 March 2021

Published: 30 March 2021

### Citation:

Schlabitz S, Monni L, Ragot A,  
Dipper-Wawra M, Onken J,  
Holtkamp M and Fidzinski P (2021)  
Spatiotemporal Correlation  
of Epileptiform Activity and Gene  
Expression *in vitro*.  
Front. Mol. Neurosci. 14:643763.  
doi: 10.3389/fnmol.2021.643763

Epileptiform activity alters gene expression in the central nervous system, a phenomenon that has been studied extensively in animal models. Here, we asked whether also *in vitro* models of seizures are in principle suitable to investigate changes in gene expression due to epileptiform activity and tested this hypothesis mainly in rodent and additionally in some human brain slices. We focused on three genes relevant for seizures and epilepsy: FOS proto-oncogene (*c-Fos*), inducible cAMP early repressor (*Icer*) and mammalian target of rapamycin (*mTor*). Seizure-like events (SLEs) were induced by 4-aminopyridine (4-AP) in rat entorhinal-hippocampal slices and by 4-AP/8 mM potassium in human temporal lobe slices obtained from surgical treatment of epilepsy. SLEs were monitored simultaneously by extracellular field potentials and intrinsic optical signals (IOS) for 1–4 h, mRNA expression was quantified by real time PCR. In rat slices, both duration of SLE exposure and SLE onset region were associated with increased expression of *c-Fos* and *Icer* while no such association was shown for *mTor* expression. Similar to rat slices, *c-FOS* induction in human tissue was increased in slices with epileptiform activity. Our results indicate that irrespective of limitations imposed by *ex vivo* conditions, *in vitro* models represent a suitable tool to investigate gene expression. Our finding is of relevance for the investigation of human tissue that can only be performed *ex vivo*. Specifically, it presents an important prerequisite for future studies on transcriptome-wide and cell-specific changes in human tissue with the goal to reveal novel candidates involved in the pathophysiology of epilepsy and possibly other CNS pathologies.

**Keywords:** epileptiform activity *in vitro*, 4-aminopyridine, intrinsic optical signals, gene expression, *c-Fos*, *Icer*, *mTor*, cell death

## INTRODUCTION

According to the World Health Organization, diseases of the central nervous system represent a major health risk for the world population (World Health Organization, 2006). To address this risk appropriately and to pursue new therapeutic options, it is critical to understand diverse and often complex molecular mechanisms leading to pathology. For decades, basic research in neurobiology together with disease-specific animal models served as a framework to understand fundamental mechanisms of neurological disorders. This effort led to many useful insights, however, the translational and predictive value of animal models has remained limited (Löscher, 2017). In recent years, this gap between animal models and clinical application has received increasing attention. Consequently, more effort has been put into models that reflect the clinical setting more closely and into novel strategies to increase reproducibility in basic research, aiming for improvement of translation (Bauer et al., 2017).

One of the possibilities to bridge differences between animal models and clinical neurology is to use human tissue-derived *ex vivo* models and to investigate functional disease mechanisms in a species-specific manner. So far, the approaches include the use of resected specimen from brain surgery procedures, investigation of post mortem tissue (Verwer et al., 2002) and the recently evolving field of brain organoids (Di Lullo and Kriegstein, 2017). With the exception of brain organoids, functional investigation of human-derived CNS tissue is constrained by the naturally limited life span of *ex vivo* samples. The recent development of organotypic cultures is a promising advance to overcome this conundrum, however, as of now it still poses challenges associated with low reproducibility and large protocol variety (Jones et al., 2016). According to a recent study on disease burden (GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group, 2017), epilepsy constitutes one of the most common neurological diseases with a prevalence between 0.5 and 1.0% in the developed world (Fiest et al., 2017). Up to one third of individuals afflicted with epilepsy suffer from pharmacoresistance (Chen et al., 2018). Although numerous *in vivo* and *in vitro* animal models established throughout the years increased our knowledge about disease mechanisms, many questions including how to address pharmacoresistance remain unanswered (Becker, 2018). Recent technological advances in the field of transcriptomics and single cell analysis (Becker et al., 2002; Guelfi et al., 2019) made it possible to discover novel disease-specific genetic alterations in epilepsy. Importantly, these findings include not only monogenetic mutations as singular causative factors. Also, seizure-related modulation of gene expression and gene editing as well as epigenetic modulation during epileptogenesis have been reported (Kobow and Blümcke, 2018).

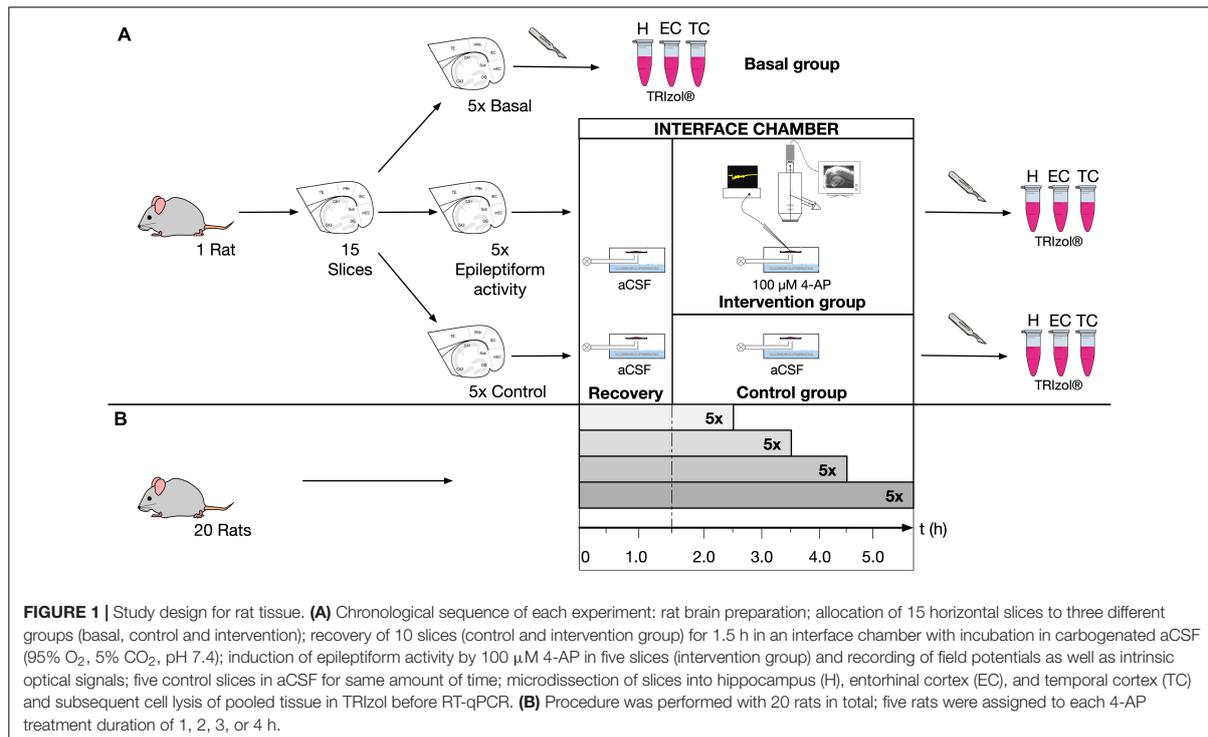
Modulation of gene expression is mostly studied *in vivo*. However, for obvious reasons such approach is not possible in human tissue – in this case only *ex vivo* studies on resected tissue would be possible. To our knowledge, it is not known whether or to what degree *in vitro* models can recapitulate changes in gene expression observed under *in vivo* conditions. Here, in a proof-of-principle study, we aimed to assess the

general, species-independent suitability of *in vitro* models of acute seizures to investigate changes in gene expression due to epileptiform activity. In a first step in that direction, we aimed to test our hypothesis mainly in rat tissue, for which modulation of gene expression due to epileptiform activity has been studied *in vivo* before. In addition, we extended our studies to some human slices. We focused on three genes relevant for seizures and epilepsy: FOS proto-oncogene (*c-Fos*), inducible cAMP early repressor (*Icer*), and mammalian target of rapamycin (*mTor*). Expression of these genes and/or the involved pathways has been described before to be positively modulated by seizure activity and, in case of *Icer* and *mTor*, also to be involved in epileptogenesis (Lund et al., 2008; Porter et al., 2008; Szyndler et al., 2009; Zeng et al., 2009; Huang et al., 2010; Barros et al., 2015).

## MATERIALS AND METHODS

### Rat Slice Preparation

All animal procedures were conducted according to the German Animal Welfare Act as well as the European Directive 2010/63/EU for animal experiments and were approved by the Institutional Animal Welfare Officer and the responsible local authority (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Germany, T0336/12). Institutional security procedures were followed. Experiments were performed using combined hippocampal-entorhinal cortex (EC) slices from rats as previously reported (Heuzeroth et al., 2019) with some modifications. The study design is represented in **Figure 1**. Briefly, adult male Wistar-Han rats (220–240 g) were deeply anesthetized by inhalation of isoflurane (4% in 100% O<sub>2</sub>) and then decapitated. Their brains were rapidly removed and placed into ice-cold N-methyl-D-glucamine (NMDG) containing artificial cerebrospinal fluid (NMDG-aCSF) (Ting et al., 2014). Equimolar replacement of sodium by NMDG leads to decreased permeation of ions via neuronal membranes and subsequent reduced cell swelling (Hille, 1971). Carbogenated NMDG-aCSF (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) contained (in mM): NMDG (93), KCl (2.5), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2), NaHCO<sub>3</sub> (30), MgSO<sub>4</sub> (10), CaCl<sub>2</sub> (0.5), glucose (25), HEPES (20), sodium l-ascorbate (5), thiourea (2), and sodium pyruvate (3). Horizontal slices (400 μm) enclosing the hippocampal formation (H), the entorhinal cortex (EC), and adjacent parts of the temporal cortex (TC) were cut using a vibratome (Vibroslicer VT1200S, Leica, Wetzlar, Germany). From each rat brain, 15 slices were collected and assigned in an alternating manner to three groups, five slices each: (1) basal group to determine initial gene expression; (2) control group to investigate effects of slicing and storage; and (3) intervention group in which epileptiform activity was induced. Slices of the control and intervention group were individually placed in an interface chamber and continuously perfused (1.5–2.0 ml/min) with prewarmed (35°C) and carbogenated aCSF (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH 7.4), containing (in mM): NaCl (129), KCl (3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.25), NaHCO<sub>3</sub> (21), MgSO<sub>4</sub> (1.8), CaCl<sub>2</sub> (1.6), and glucose (10). During storage and experiments, warmed, humidified carbogen was directed over the slice surface. All slices were



allowed to recover 1.5 h after preparation. In the intervention group, seizure-like events (SLEs) were induced by 100 μM 4-aminopyridine (4-AP, Sigma, Munich, Germany), which non-selectively blocks voltage-dependent potassium channels, augments presynaptic calcium influx (Mathie et al., 1998) and enhances synaptic transmission (Perreault and Avoli, 1991). *In vitro* addition of 4-AP to aCSF results in long lasting ictal-like discharges considered as correspondent to focal to bilateral seizures *in vivo* (Avoli et al., 2002). The intervention group was treated with 4-AP for either 1, 2, 3, or 4 h, while the control slices remained in aCSF for the same amount of time. This procedure was performed with 20 rats in total and five rats were assigned to each treatment duration.

## Human Slice Preparation

Brain temporal lobe tissue was obtained from surgical treatment of epilepsy in five female donor patients (age at resection: 21–58 years) diagnosed with mesial temporal lobe epilepsy (mTLE). The experimental protocol was approved by the local Ethics Committee (EA2/111/14) in agreement with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was given by all patients before surgery. Cortex specimens were collected in the operating room, immediately immersed in cold (~4°C) carbogenated NMDG-aCSF (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). The same solution was used for transportation and tissue processing, which took in total up to 2 h. 400 μm-thick slices were then sectioned and assigned as basal, control and intervention as described above. Before start of experiments, slices recovered in standard aCSF for 5 h.

After the stabilization period, on average three slices per patient were further incubated for the duration of 4 h in standard aCSF (control) or with aCSF containing 8 mM potassium and 100 μM 4-AP (pH 7.4) (intervention) to examine the effects of slicing and storage and epileptiform activity on gene expression, respectively. In human brain slices, the application of neither 4-AP alone nor 10 or 12 mM potassium is sufficient to induce epileptiform activity (Gabriel et al., 2004). Therefore, SLEs were evoked by applying a combination of high potassium (8 mM) and 4-AP (100 μM), while adjusting the increased osmolarity of aCSF by lowering the concentration of NaCl from 129 to 124 mM (Kraus et al., 2019).

## Electrophysiological and Optical Recordings

Epileptiform activity was monitored by local field potential recordings in 20 selected slices of the intervention group (one slice per rat and three slices per human sample). To control for the influence of the slice position, rat slices were classified to different locations along the dorsoventral axis defined as ventral (−7.6 to −6.8 mm ventrally from bregma), medial (−6.4 to −5.6 mm), and dorsal (−5.2 to −4.4 mm) (see also Paxinos and Watson, 1998). Extracellular field potentials were measured with glass electrodes (filled with 150 mM NaCl, electrode resistance 1–2 MΩ). In rats, one electrode was placed in layer IV or V of the lateral EC, the second electrode was positioned in the stratum pyramidale of the hippocampal CA1 region. In

human tissue, SLEs were recorded for at least 40 min with one electrode placed on the superficial cortical layers of human slices (layers II/III, 200–700  $\mu\text{m}$  from pial surface) (Köhling and Avoli, 2006). Electrophysiological signals were acquired with a custom-made amplifier (10 $\times$ ) connected to an A/D interface (Micro 1401 mk II, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, United Kingdom). Data were recorded with Spike2 and Signal (versions 7.00 and 3.07, respectively, Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, United Kingdom) and analyzed using custom-written algorithms in MATLAB (R2014b, MathWorks, Natick, MA, United States). SLEs were identified using the following criteria: (1) field potential decrease  $> 0.3$  mV, (2) duration of field potential shift  $> 10$  s and (3) superimposition by ripple-like discharges during negative field potential shift.

Intrinsic optical imaging was employed in each electrophysiologically recorded slice according to previous reports (Weissinger et al., 2017). In brief, slices were positioned on a transparent membrane (0.4  $\mu\text{m}$  Millicell culture plate inserts, Millipore, Bedford MA, United States) and homogeneously illuminated from below by a halogen cold light source (KL 1500, Schott, Wiesbaden, Germany) and a curved glass rod ( $\varnothing$  8 mm). Images were received using an upright binocular microscope (MS 5, Leica, Bensheim, Germany) with a 4 $\times$  objective, a monocular phototube (Leica, Bensheim, Germany) and a CCD camera (8 bit, Sanyo, Osaka, Japan). In-house macros for ImageJ 1.51m9 (Wayne Rasband National Institutes of Health, United States) and MATLAB software were applied for the processing of the images. 8-bit video signals were converted at a 10 MHz ratio into 320  $\times$  240-pixel images employing a frame-grabber board (pciGrabber-4plus, Phytex, Mainz, Germany). Images were only saved when triggered by the experimenter in case ictal activity became apparent in the electrophysiological recording. Using a circular data buffer, the first image was captured 5–10 s before the onset of the SLE, the recording continued for 50–180 s depending on the duration of the electrophysiologically recorded ictal event. The time course of light transmittance was calculated for each SLE as difference in light transmittance ( $\Delta T$ ) between a given image and the control image (mean of the first 20 images in each series recorded before start of ictal activity), and expressed as percentage of the control image transmittance ( $\Delta T/T$ ). During ictal events,  $\Delta T/T$  typically ranged from 1.0 to 7.5% whereas background noise never exceeded 1.0%. The amplitude during SLEs is expressed as  $\max(\Delta T/T)$ . Optical imaging also enabled us to detect spreading depolarizations (SDs) associated with decreased light transmittance (Müller and Somjen, 1999). In regions displaying SD,  $\Delta T/T$  decreased in the range of  $-1.0$  to  $-9.2\%$ . Changes of light transmittance over time provided insight into onset, direction and evolution of both ictal activity and SDs in the entire slice. Using squared regions of interests (ROI) sized 20  $\times$  20 pixels each, the optical signal was quantified separately for the anatomical regions (H, EC, and TC) assigned to later gene expression analysis. Optical signals were considered significantly associated with a SLE when the increase of light transmittance was above a threshold of  $> 1.0\%$  and with a SD when the decrease of light transmittance was  $< -1.0\%$ . The onset of SLE activity was determined by the first region where

transmittance increase above threshold was observed. For calculation of the SLE area, every pixel within a given anatomical region that reached at least 1%  $\Delta T/T$  in  $> 9$  subsequent images during one SLE was considered to be involved in this SLE. The SLE area was calculated for each region separately and expressed as percentage of the total area for a given anatomical region.

## RNA Extraction and Reverse Transcription

All investigated rat slices were microdissected into H, EC and TC in order to separately quantify mRNA levels within these brain areas. In human cortical slices, microdissection was aimed to separate the seizure onset region (named “onset site” group) determined by electrophysiology and optical imaging from the rest of the slice (named “rest” group). Basal slices were snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  immediately after preparation while slices from the intervention and control groups were frozen immediately after the assigned experimental time period (1–4 h in rat and 4 h in human slices). To obtain sufficient amounts of mRNA, tissue from different slices within one experiment but the same anatomical region and group was pooled. Pooled tissue was lysed in 1 ml TRIzol (Invitrogen AG, Carlsbad, United States). Tissue homogenization and cell lysis were facilitated by highspeed shaking (50 Hz) with stainless steel beads for 10 min (TissueLyser LT, Qiagen N.V., Venlo, Netherlands). Based on the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method, chloroform (200  $\mu\text{l}$ ) was added to the sample to isolate RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987). Phase separation was conducted by centrifugation (15 min at 12,000  $\times g$  and  $4^\circ\text{C}$ ) and subsequent precipitation of RNA by incubation with 500  $\mu\text{l}$  isopropanol for 10 min and 3.5  $\mu\text{l}$  Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Fitchburg, WI, United States) resuspended RNA in 25.0  $\mu\text{l}$  nuclease-free water. Additional RNA purification was accomplished by refilling the remaining volume to 200  $\mu\text{l}$  and adding an equal volume of Roti-Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Following short-time centrifugation (5 min), the RNA containing aqueous phase was treated with 200  $\mu\text{l}$  chloroform to remove residual phenol from the solution. RNA was then recovered by overnight precipitation with 550  $\mu\text{l}$  ethanol (96%) and 6  $\mu\text{l}$  ammonium acetate (10 M) at  $-20^\circ\text{C}$  and dissolved in 16  $\mu\text{l}$  nuclease-free water. Concentration of total RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm with NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, United States) and ranged from 143.5 to 738.5 ng/ $\mu\text{l}$  per rat sample and from 71.4 to 2,224.2 ng/ $\mu\text{l}$  per human sample. Purity was checked using the 260/230 nm as well as the 260/280 nm ratios (accepted values  $> 1.8$ ). First strand cDNA synthesis was carried out using moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Promega, Fitchburg, WI, United States) according to the manufacturer's instructions with several modifications. In brief, a mixture of 15.0  $\mu\text{l}$  diluted, purified RNA (2.0  $\mu\text{g}$  for rat sample, 0.5  $\mu\text{g}$  for human sample), 1.5  $\mu\text{l}$  random hexamers (100  $\mu\text{M}$ , Roche, Basel, Switzerland) and 1.5  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM each, Roche, Basel, Switzerland) was incubated at  $65^\circ\text{C}$  for 5 min. The

mixture was then assembled with a prepared reaction volume, consisting of: 2.0  $\mu$ l M-MLV-RT (200 U/ $\mu$ l), 5.0  $\mu$ l M-MLV RT Reaction Buffer (Promega, Fitchburg, WI, United States), 0.5  $\mu$ l Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu$ l) and 0.5  $\mu$ l DTT (100 mM, Promega, Fitchburg, WI, United States). Reverse transcription mixture was successively incubated as follows: 5 min at 21°C, 60 min at 37°C, 15 min at 70°C. To assess genomic DNA contamination in the RNA preparation, a minus RT-control was included in each quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) experiment. cDNA samples were stored at -20°C until further analysis.

### Primer Design and Efficiency

Quantitative PCR (qPCR) primer design was based on mRNA sequences from the RefSeq database<sup>1</sup>. Specificity was verified using the Primer-BLAST program<sup>2</sup>. Primers were synthesized by EUROFINS genomics (Ebersberg, Germany). In addition to electrophoresis in 1% agarose gel, PCR products were also verified by sanger sequencing (EUROFINS). In case of rat *c-Fos*, sequences were adapted from published data (Barros et al., 2015), while in case of the human *c-FOS*, the primer pair was designed *de novo* using Primer-Blast. The *Icer* primers amplified two of three possible transcript variants of CREM (2, 5). The optimal annealing temperature, the amplification efficiency and  $R^2$  of the standard curve were determined for each primer pair (Table 1) and calculated as follow. PCR efficiency of each primer pair was evaluated by performing a dilution series of the target assay and standard curve analysis of the  $C_q$  data points using MS excel. The slope of the standard curve ( $E = [10^{(-1/m)}] - 1$  with  $E$  = amplification efficiency,  $m$  = slope) was used to calculate the amplification efficiency, which ranged from 0.88 to 1.

### NormFinder Analysis

The NormFinder algorithm was used to assess expression stability in a set of candidate genes and to identify the most suitable reference gene for RT-qPCR analysis (Andersen et al., 2004). For rat tissue, five candidate reference genes were selected based on literature: beta-actin (*Actb*), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (*Ywhaz*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*), receptor expression-enhancing protein 5 (*Reep5*), and TATA box binding protein (*Tbp*) (Sadangi et al., 2017). NormFinder analysis was separately performed for the three anatomical ROI (H, EC, and TC). To consider all experimental conditions, gene expression was determined in two independent samples of the following nine groups: basal; control 1, 2, 3, and 4 h; 4-AP 1, 2, 3, and 4 h. For human tissue, three candidate genes were selected: *ACTB*, *TBP* and ribosomal protein L13A (*RPL13A*) (Vandesompele et al., 2002; Rydbirk et al., 2016). NormFinder analysis was performed considering all four experimental conditions and examined in two independent samples of the following groups: basal, control, onset site and rest. NormFinder MS Excel application was used to calculate both the intra- and

intergroup variation expressed as standard deviation. Candidate genes with a standard deviation > 0.25 were excluded from the subsequent determination of gene stability value, the remaining candidate genes were ranked according to their gene stability value with increasing values implying less stability.

### Quantitative PCR

Quantitative PCR was conducted using the LightCycler 480 II (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Switzerland). The reaction assay contained 10  $\mu$ l LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Switzerland), 1  $\mu$ l of forward and reverse primers (0.5  $\mu$ M each), 1  $\mu$ l of template cDNA and was diluted by 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O to a final volume of 20  $\mu$ l. In the case of primer pairs of the human genes, the quantities of forward and reverse primers were lowered to 0.6  $\mu$ l (0.3  $\mu$ M each) for *c-FOS* and 0.4  $\mu$ l (0.2  $\mu$ M each) for *ACTB* and *RPL13A*, in order to improve their amplification efficiency. All assays included a minus RT-control to verify previous DNase digestion as well as a negative control without cDNA (NTC), to reveal any non-specific amplification, and were replicated twice. Each PCR reaction was pre-incubated at 95°C for 10 min followed by 45 amplification cycles with the following sequence: melting at 95°C for 5 s, annealing at a primer specific temperature for 10 s, elongation at 72°C for 15 s and quantification at a primer specific temperature for 1 s. After the amplification, melt curve analysis was run with the following sequence: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 70°C for 30 s, followed by the acquisition increasing the temperature to 95°C at a transition rate of 0.11°C/s in continuous mode. Relative quantification of mRNA levels was done using the efficiency-adjusted “delta-delta Ct method” (Pfaffl, 2001). According to this approach, we calculated fold induction of our selected genes relative to basal gene expression:

$$\text{Ratio} \left( \frac{GOI}{RG} \right) = \frac{E_{GOI}^{\Delta C_q GOI(\text{mean of basal } C_q - x)}}{E_{RG}^{\Delta C_q RG(\text{mean of basal } C_q - y)}}$$

with GOI = gene of interest, RG = reference gene,  $E$  = amplification efficiency,  $C_q$  = quantification cycle,  $x$  = individual  $C_q$  of gene of interest,  $y$  = individual  $C_q$  of reference gene.

To determine the actual effect of 4-AP induced epileptiform activity on gene expression, the ratio of 4-AP to control was calculated.

### Cell Death Assay

To evaluate the spatiotemporal profile of slice viability, we performed fluorescent staining with propidium iodide (PI), an indicator of cell death (Buskila et al., 2014). 41 brain slices were taken from three rats and alternately assigned to the following groups: basal, control 1 h, control 4 h, 4-AP 1 h and 4-AP 4 h. At the end of each experiment, slices were exposed to PI (1  $\mu$ g/ml) in carbogenated aCSF for 1 h. In 4-AP treated slices, 4-AP (100  $\mu$ M) was also added to the staining solution. Following PI staining, slices were fixed by paraformaldehyde (4%) in phosphate buffered saline (0.2 M) for 30 min and subsequently incubated in DAPI (2  $\mu$ g/ml) for 10 min. Images were acquired using an inverted

<sup>1</sup>www.ncbi.nlm.nih.gov

<sup>2</sup>www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi

**TABLE 1 |** Genes and corresponding oligonucleotide primer sequences for qPCR.

Gene	Species	Transcript variants	GenBank reference	5'-3' sequence	Amplicon length (bp)	PCR efficiency (%)	R <sup>2</sup>	Annealing temperature (°C)	Quantification temperature (°C)	C <sub>q</sub> of NTC
<i>c-Fos</i>	rat		NM_022197	F - ACGGAGATCCGAAGGAAAGGAA R - TCTGCAACCGACACTCTCGTCTT	125	88	0.9988	62	80	ND
<i>Icer</i>	rat	2	NM_017334	F - CTTTATTTGGACTGTGGTACGGC	161	100	0.991	61	79	40.00
		5	NM_001271102		125					
		6	NM_001271245		207					
<i>mTor</i>	rat		NM_019906	R - AGTAGGAGCTCGGATCTGGTAA F - CGGAGAGAGGCCATCCGAGT R - ACGCGGGGTAGAACTCGTC	209	100	0.9966	64	82	36.91
<i>Ywhaz</i>	rat		NM_013011	F - TTGAGCAGAAAGCGGAAGGT R - GAAGCATTGGGGATCAAGAA	135	90	0.9995	58	79	36.77
<i>Actb</i>	rat		NM_031144	F - ACCCACACTGTGCCACTCA R - GCCACAGGATCCATACCA	341	88	0.9959	68	80	35.77
<i>Tbp</i>	rat		NM_001004198	F - CCTTCACCAATGACTCCTATG R - TGGATTGTTCTCACTCTGGC	273	100	0.9908	62	80	ND
<i>Hprt1</i>	rat		NM_012583	F - TTGTTGGATATGCCCTTGACT R - CCGCTGCTTTTAGGCTTG	105	92	0.9944	60	75	34.79
<i>Reep5</i>	rat		NM_001108888	F - CTGATAGTTTTGGATACCCA R - GACTGTGCTTCAGGAAGATGG	269	91	0.9979	68	80	38.27
			NM_005252	F - TGGCGTTTGAAGACCATGA R - AGTTGGTCTGCTCCGCTTG	189	90	0.998	60	81	38.41
<i>RPL13A</i>	human		NM_012423	F - COTGGAGGAGAAAGGAAAGAGA R - TTGAGGACCTCTGTGATTTGTCAA	341	94	0.9939	60	77	ND
<i>ACTB</i>	human		NM_001101	F - ACCCACACTGTGCCATCTAC R - GCCACAGGACTCCATGCCCA	125	88	0.9986	66	84	ND
			NM_003339	F - GCCCGAAACGCCGAATATA R - AATCAGTGCCGTTGGTTCTGTG	81	91	0.999	58	77	38.22

Gene name, species of the gene and corresponding primer pair, transcript variants, GenBank reference and sequence of the primers are listed. The table shows also the length of the amplicon for each primer pair. Amplification efficiency and R<sup>2</sup> from the standard curve were calculated as described in materials and methods section. Annealing temperature and quantification temperature specific for each primer pair are also listed. F, forward primer; R, reverse primer; bp, base pair; NTC, no template control; ND, not detectable (>40 Cq).

confocal microscope (LSM 700, Zeiss, Oberkochen, Germany) at 20× magnification. DAPI signals were obtained at 470 nm by laser excitation at 405 nm, while PI signals were measured at 617 nm upon excitation at 555 nm. Z plane image stacks were acquired at intervals of 2.47 μm beginning at the surface up to 40–50 μm depth. Images were visualized using ZEN software and processed using ImageJ 1.51m9. DAPI and PI/DAPI positive cells were counted in the somata containing areas of the hippocampal formation (st. granulosum of dentate gyrus, st. pyramidale of CA3, CA1 and subiculum) and two cortical depths (layer I–III and layer IV–VI of the EC and TC, respectively) in a visual field sized 500 × 300 μm. Slice viability was assessed as the ratio between PI positive and DAPI positive (dead/total) cells for each investigated region.

### Data Analysis and Statistics

Raw image data were analyzed with ImageJ 1.51m9, MATLAB and MS Excel. Statistical analysis and processing of graphs were performed using GraphPad Prism 5 or 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). All data were first tested for normality distribution with D'Agostino and Pearson omnibus normality test. If the evaluation of normality was not possible due to too small sample size, Kruskal–Wallis non-parametric test was used. To assess statistical significance between groups, continuous variables were examined using ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons (normally distributed data) or Kruskal–Wallis test (non-normally distributed data or small sample size) and *post-hoc* Tukey's or Dunnett's multiple comparison of individual groups. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All data analyzed by parametric tests are expressed as mean ± standard deviation while data analyzed by non-parametric tests are shown as median ± interquartile range. OmniGraffle 7 (The Omni Group, Seattle, WA, United States) was used as graphical software to process images.

## RESULTS

### Properties of 4-AP Induced SLEs in Acute Rat Brain Slices

Epileptiform activity due to 4-AP treatment was induced in 100 rat slices (five slices per animal). Local field potentials were recorded in 20 selected slices and yielded 572 SLEs. In the lateral EC, SLE activity started on average 18.0 min (±7.5 min) after 4-AP onset and maintained a stable frequency throughout the entire 4 h incubation period. SLEs displayed the following electrophysiological properties: incidence median  $0.24 \pm 0.09/\text{min}$  in EC and  $0.22 \pm 0.05/\text{min}$  in CA1; amplitude median  $0.81 \pm 0.52$  mV in EC and  $0.62 \pm 0.29$  mV in CA1; duration median  $50.54 \pm 28.39$  s in EC and  $51.88 \pm 40.31$  s in CA1 (Figure 2). SLE activity never occurred in slices incubated in standard aCSF. In five ventral slices with respect to the dorsoventral axis, the 4-AP induced activity differed such that no separate SLE but rather a persistent epileptiform activity was observed in the course of the experiment (Supplementary Figure 1).

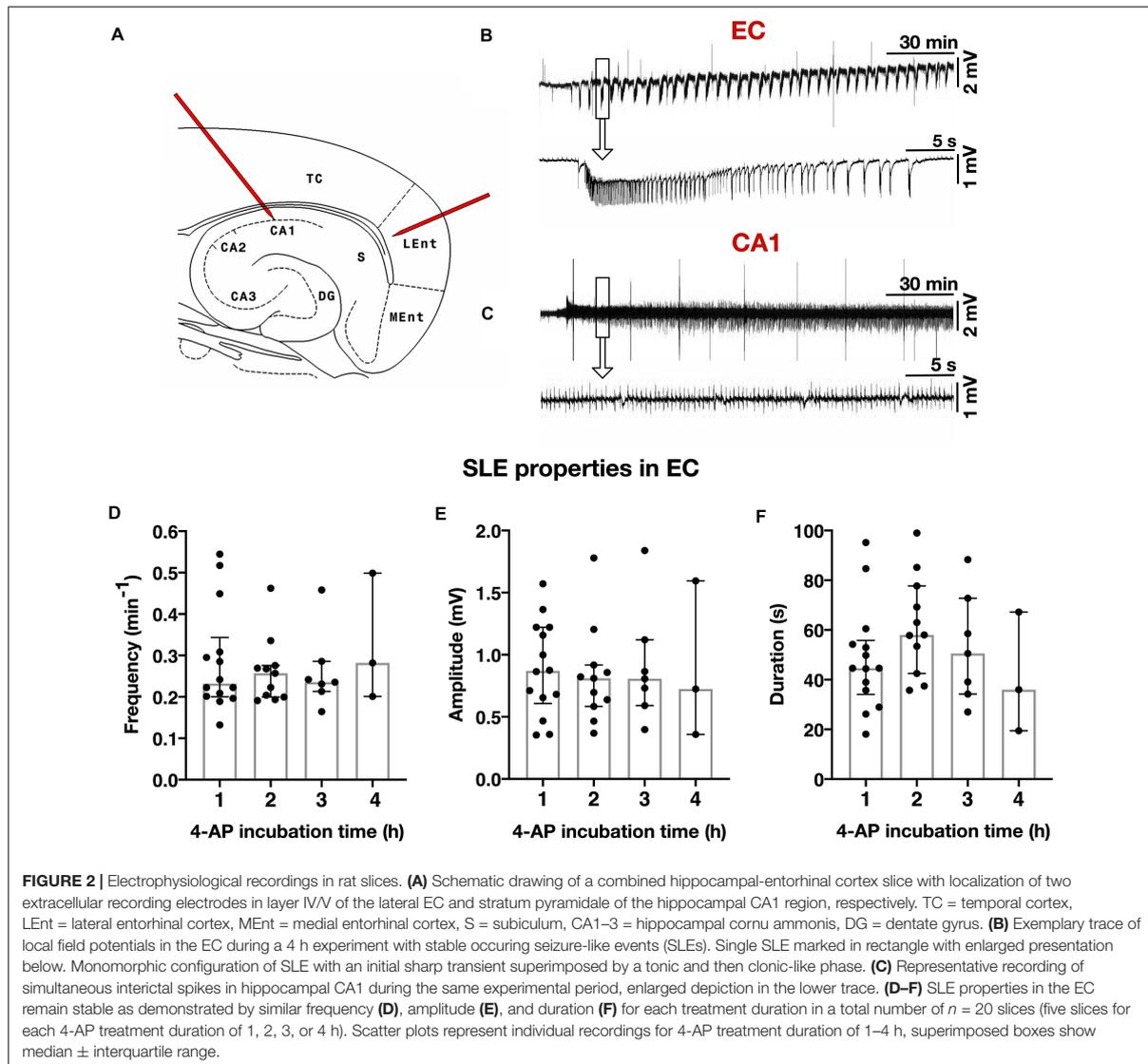
These slices were excluded from further electrophysiological analysis. Simultaneous to electrophysiological recordings, the spatiotemporal evolution of SLEs was monitored by IOS within the entire slice (Figure 3A). Each SLE was assessed for onset and propagation region, respectively. SLE onset in the TC was observed in 61.1% of SLEs followed by 27.4% in the EC and 0.0% in the H (median numbers). In addition to single regions, 57 SLEs (10.0%) in 13 slices had a multiregional onset in anatomical regions distant from each other. The onset region was dependent on the slice origin with respect to the dorsoventral axis such that hippocampal onset almost exclusively occurred in ventral slices while TC and EC onset was more frequent in medial and dorsal slices. Regarding propagation, 49 SLEs (8.6%) in nine slices stayed limited to the onset region while the remaining (>90%) SLEs propagated at least to one neighboring region. The vast majority of SLEs propagated within neocortical regions and invaded hippocampal structures only to a minor degree (6.7%), and, similar to onset, mainly in ventral slices. Propagation to the TC and EC was frequently observed in dorsal and medial slices, respectively. SLE extent assessed by comparing the affected area with the total size of a given region revealed the largest expansion of epileptiform activity in the TC (68.8%) followed by the EC (68.1%). In line with the low rate of onset and propagation, expansion of SLEs within the hippocampus was low (34.0%) and involved in most of the cases the subiculum as previously reported (Heuzeroth et al., 2019). All SLEs were associated with an increase in light transmittance with the maximum in the TC ( $\Delta T/T = 2.94\%$ ) followed by the EC ( $\Delta T/T = 2.23\%$ ) and the H ( $\Delta T/T = 1.98\%$ ). Summary of optical results is given in Figures 3B–G. Overall, the TC stood out such that it presented as the most frequent onset region, displayed the largest intraregional expansion and showed the maximal increase of light transmittance.

### Spreading Depolarizations

Increasing excitability not only decreases the threshold for SLEs but also for spreading depolarizations (SDs) that reflect a propagation of neuronal silencing due to loss of ion homeostasis and a depolarization block (Dreier, 2011). Electrophysiologically, SDs are distinguished from SLEs by their massive amplitude, duration > 1 min and subsequent block of interictal activity. 16.5% of SLEs were associated with simultaneous SDs. No preferred region of SD occurrence could be detected (median numbers, Figure 3H). The relative SD expansion within a given anatomical region was smaller than SLE expansion and showed no significant interregional difference (Figure 3I). In IOS recordings, SDs led to a marked decrease of light transmittance which was pronounced in the TC ( $\Delta T/T = -1.77\%$ ) followed by EC ( $\Delta T/T = -1.27\%$ ) and H ( $\Delta T/T = -1.19\%$ ) (Figure 3J).

### Cell Death Assay

Neuronal activity in acute brain slices can be recorded up to 8 h after slice preparation. Within this time frame, occurrence of cell death with impact on gene expression and neuronal activity is likely (Buskila et al., 2014) and needs to be considered. To

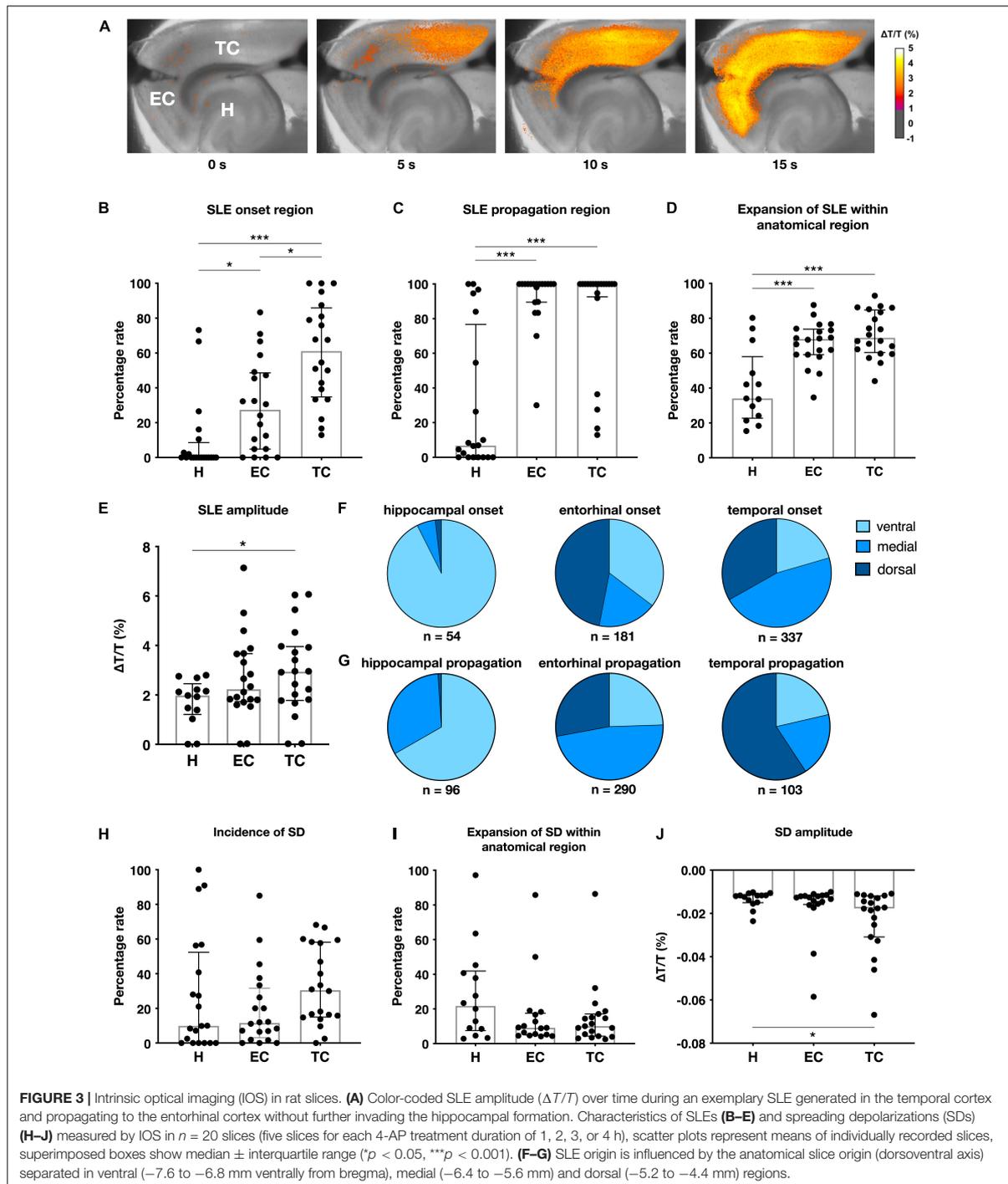


assess the impact of cell death on our results, we performed combined PI and DAPI staining in acute brain slices stored for different time periods. In all investigated brain regions, cell death increased time-dependently under 4-AP treatment as well as control conditions (**Figure 4**): In basal slices not subjected to storage, the rate of cell death ranged between 3.4% ( $\pm 8.8\%$ ) in the superficial TC layers and 11.6% ( $\pm 4.5\%$ ) in the dentate gyrus. Upon incubation for 4 h (5.5 h when including recovery), the extent of cell death markedly increased. In the hippocampus it varied between 14.8% ( $\pm 5.4\%$ ) in subiculum and 39.0% ( $\pm 17.1\%$ ) in dentate gyrus. In neocortical regions, incubation increased the rate of cell death in deep as well as superficial layers (layer I–III: 15.9% in EC; 9.7% in TC, layer IV–VI: 24.9% in EC; 25.5% in TC). No differences were observed when comparing 4-AP

treatment and control, suggesting that 4-AP and the associated epileptiform activity do not increase processes leading to cell death. 4-AP treatment even tended to reduce the cell death rate within the 4 h intervention period when compared to time-matched controls.

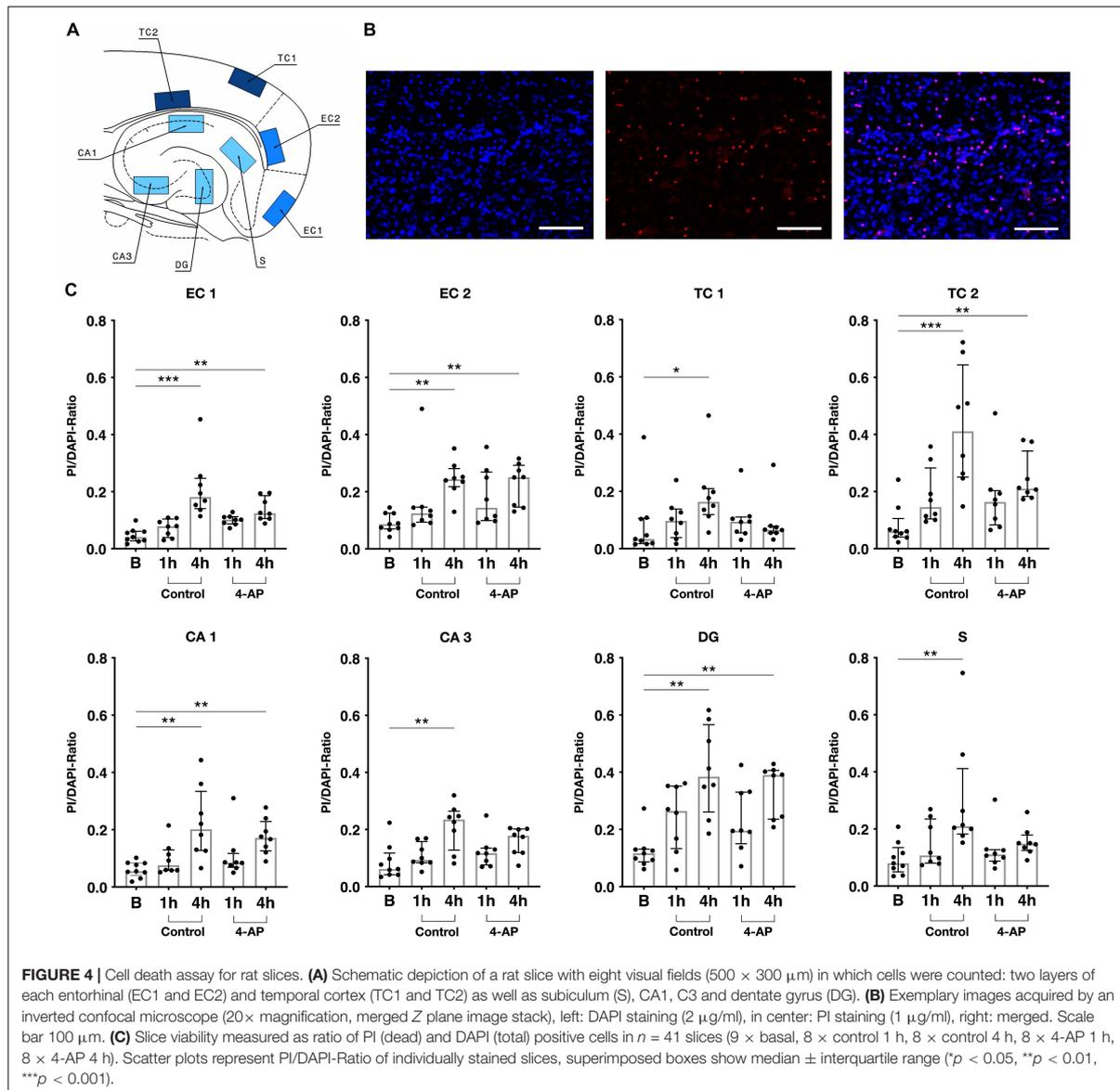
### Reference Gene Identification

To identify a reference gene not dependent on neuronal activity or storage duration, we compared *Actb*, *Ywhaz*, *Hprt1*, *Reep5*, and *Tbp*. *Cq* variability did not differ across investigated regions (H: 19.1–32.8; EC: 19.5–29.8; TC: 19.6–31.5) (**Supplementary Figure 2A**). In all investigated regions, *Actb* was the most abundantly expressed gene and *Tbp* showed the lowest gene expression (**Supplementary Figure 2B**). In order to obtain a



more robust stability ranking, the NormFinder algorithm was applied to calculate the gene stability value  $M$  based on standard deviation expressed intra- and intergroup variation (Andersen

et al., 2004). Reference genes with standard deviation  $> 0.25$  (*Reep5* in H and *Tbp* in TC) were excluded. Among the remaining candidates, *Ywhaz* turned out to be the most stably expressed

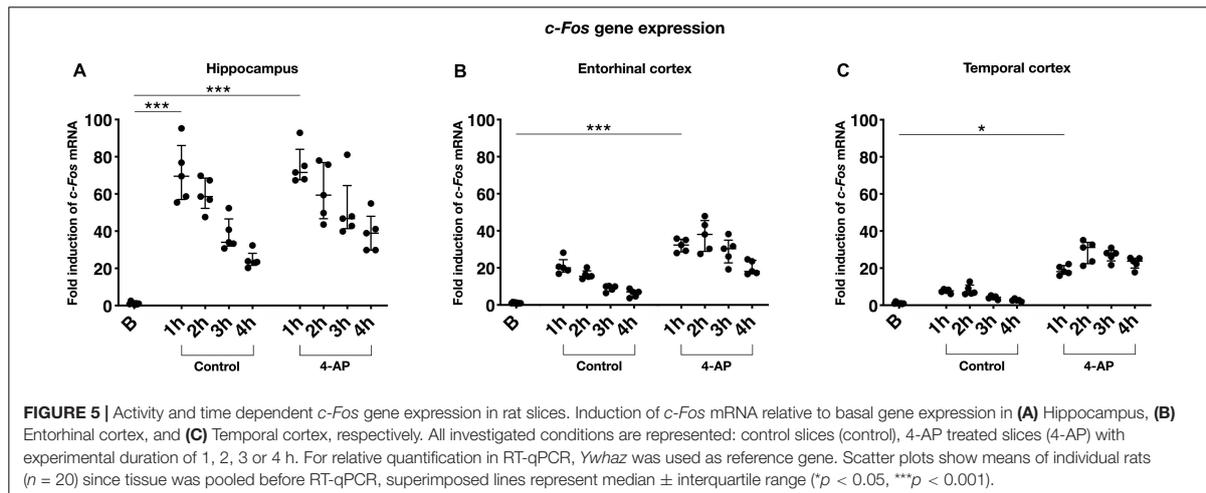


gene across all groups (stability value M: H 0.069; EC 0.09; TC 0.071) (**Supplementary Figure 2C**) and was therefore used as the reference gene for qPCR in the following experiments.

### Gene Expression Analysis

Investigation of activity-dependent gene expression in rat brain slices was performed for the genes *c-Fos*, *Icer*, and *mTor* referenced to *Ywhaz* expression as stated above. In basal slices immediately processed after the slice procedure, relative *c-Fos* expression varied between regions with the lowest expression in the H and the highest expression in the TC (median *c-Fos/Ywhaz*: H = 0.0033, EC = 0.0080, TC = 0.0134). Basal *c-Fos* mRNA

levels were positively correlated with the duration of the brain slice preparation (**Supplementary Figure 3**). In comparison to basal values, incubation in aCSF markedly increased *c-Fos* gene expression. This increase was strongest after 1 h of incubation (corresponding to 2.5 h when including recovery) and most distinctive in the H (median fold induction of 69.5 relative to basal) followed by the EC (median fold increase of 20.1) and the TC (median fold increase of 7.8). Compared to 1 h, incubation for longer intervals (2–4 h or 3.5–5.5 h including recovery) resulted in weaker *c-Fos* expression which was negatively correlated with incubation time (**Figure 5**). In 4-AP treated slices, a similar time course of *c-Fos* expression with the strongest increase



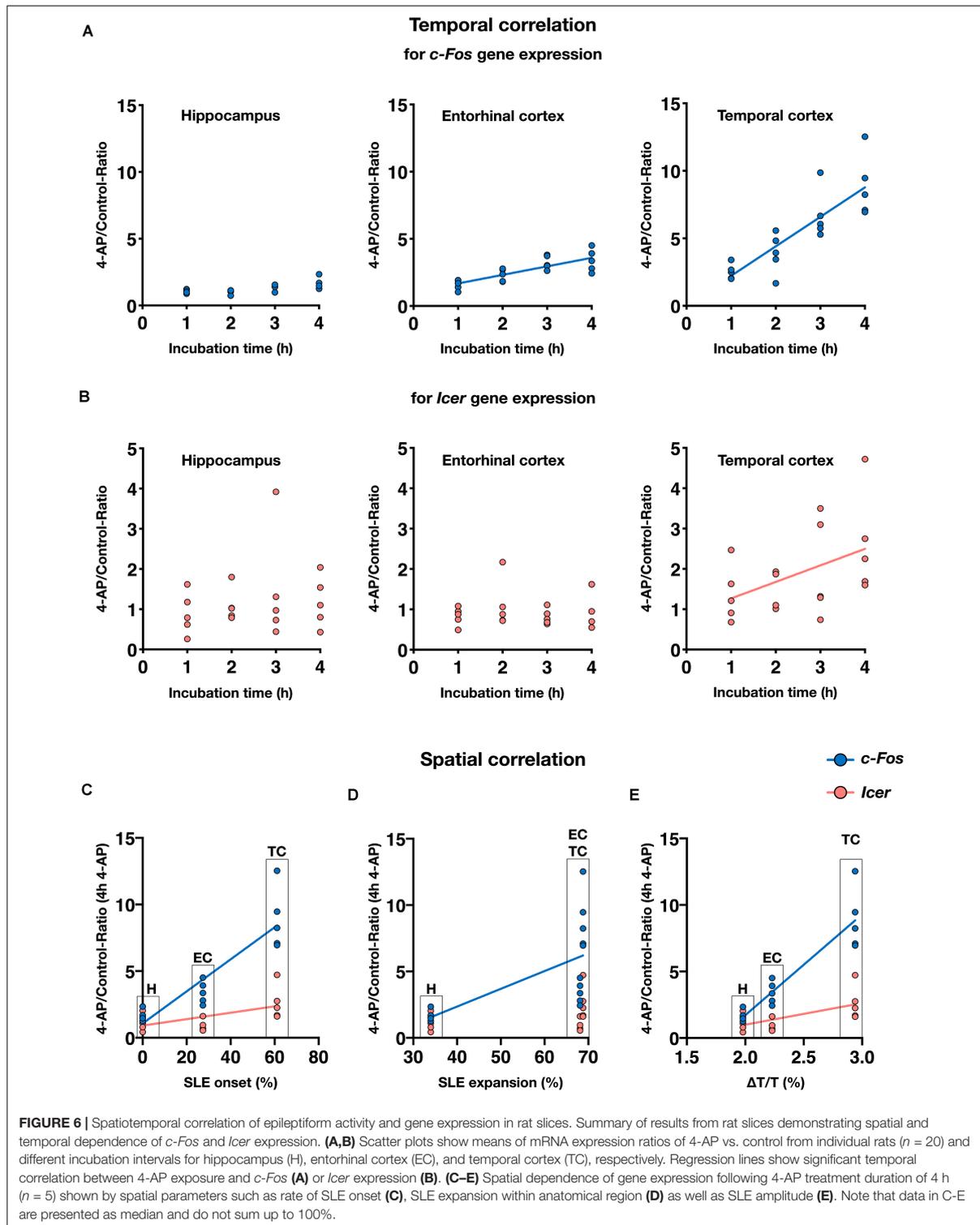
after 1 h of incubation and subsequent decrease was observed. Strikingly, when comparing *c-Fos* expression in 4-AP treated slices to time-matched controls, *c-Fos* expression was consistently higher in the intervention group (Figure 5). Correlation of the duration of intervention and *c-Fos* expression revealed a time-dependent increase of *c-Fos* mRNA that largely differed across examined brain regions (Figure 6A). In the hippocampus, 4-AP treatment increased *c-Fos* mRNA levels only marginally with a (non-significant) slope of 0.19 while significant slopes of 0.64 ( $p < 0.05$ ) and 2.18 ( $p < 0.01$ ) were observed in the EC and TC, respectively. The spatiotemporal pattern of *Icer* expression was similar to *c-Fos* but showed a weaker increase. In all investigated regions of basal slices, *Icer* mRNA levels were low when compared to *c-Fos* mRNA (median *Icer/Ywhaz* H = 0.0002, EC = 0.0003, TC = 0.0003). Reflecting the effect of slice preparation and storage, *Icer* gene expression was also induced in control slices. In contrast to *c-Fos*, the strongest increase of *Icer* mRNA levels was observed in control slices incubated in aCSF for 3 h (median fold induction relative to basal: H 15.1; EC 15.0; TC 6.3) (Supplementary Figures 4A–C). Comparing *Icer* expression between 4-AP and control, slices revealed a region and time-dependent increase of *Icer* mRNA in 4-AP treated slices (Figure 6B): while in the H and the EC, 4-AP treatment had only a marginal effect, it clearly induced an increase in *Icer* expression in the TC with a significant slope of 0.41 ( $p$ -value 0.0271). In basal slices, *mTor* mRNA did not largely differ between the investigated regions (median *mTor/Ywhaz* H = 0.0137, EC = 0.0151, TC = 0.0145). Interestingly, in all investigated regions, a weak, time-dependent decrease of *mTor* expression in both control and 4-AP treated slices was observed. In the EC and TC, the decrease of *mTor* mRNA levels got significant in 4-AP treated slices after 4 h (Supplementary Figures 4D–F). Compared to time-matched control slices, 4-AP induced epileptiform activity did not show any effect on *mTor* gene expression.

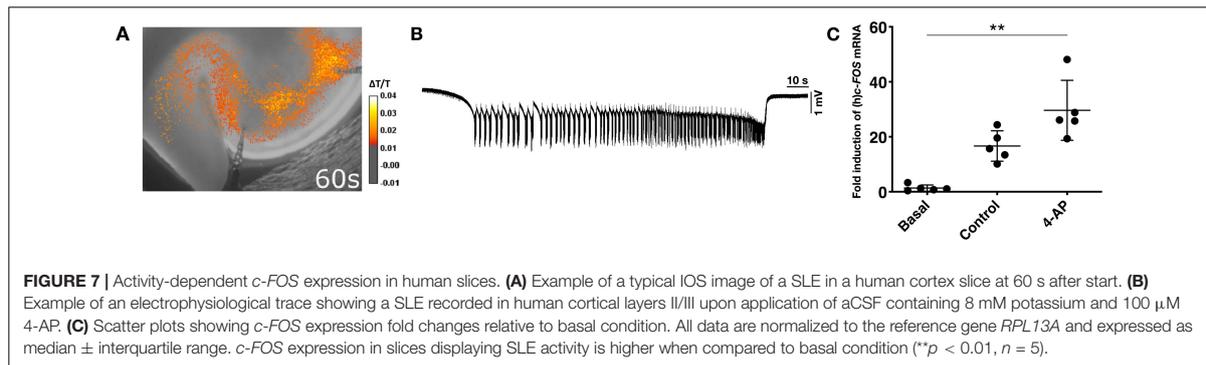
So far, our data demonstrated that gene expression of all examined genes depends on the duration of storage and in

case of *c-Fos* and *Icer* additionally to the chosen condition (control/intervention). Gene expression was also associated with the pattern of epileptiform activity: in case of *c-Fos*, the 4-AP induced increase of gene expression and the rate of SLE onset were positively correlated with highest values in the TC and lowest values in the H (Figure 6C). This positive correlation was also observed between *c-Fos* expression and the intraregional SLE expansion and the maximum increase of IOS intensity (Figures 6D–E). Similar effects could be confirmed for *Icer* (Figures 6C–E), albeit to a weaker extent. Naturally, no such correlation was observed for *mTor* that did not show changes in gene expression.

## Gene Expression Analysis in Human Tissue

In human tissue, the NormFinder algorithm revealed *RPL13A* as the most stable gene (stability values M: *RPL13A* 0.068; *ACTB* 0.07; *TBP* 0.115) (Supplementary Figure 5) and therefore employed as reference gene for the following qPCR experiments. To identify the region of seizure onset in human slices, we likewise performed electrophysiological recordings combined with optical imaging (Figure 7A). During 4 h of application, SLEs (Figure 7B) were recorded for a minimum of 40 min to identify the seizure onset site. In a significant proportion of investigated slices, the onset site varied in the course of the experiment. In these slices, the area with the highest number of SLE onsets was assigned as the onset region and further processed. qPCR revealed that *c-FOS* expression increased both during 4 h storage in standard aCSF (control) and epileptogenic aCSF (intervention). Similar to rat slices, the relative increase of *c-FOS* in the intervention group was higher compared to control and basal conditions (Kruskal–Wallis test,  $p$ -value 0.0031; Dunnett's *post hoc* test, Basal vs. Onset + Rest  $p$ -value  $< 0.01$ ). Values from onset site and the remaining slice were pooled as no difference in *c-FOS* expression could be detected between these regions. As depicted in Figure 7C, in slices subjected to





seizure-like activity, *c-FOS* expression was increased 26.1-fold relative to basal conditions. In contrast, control slices incubated with standard aCSF showed a median fold-increase of *c-FOS* expression of 15.7.

## DISCUSSION

In the present proof-of-principle study, we investigated the association between neuronal activity and gene expression in acute brain slice preparations, mainly from rodents. For the activity-dependent genes *c-Fos* and *Icer*, we found a positive spatiotemporal correlation between gene expression and epileptiform activity while no correlation was found for *mTor*. Increases induced by neuronal activity could be differentiated from increases inherent to slice preparation, temperature variations and incubation time. We were able to partly reproduce the results on *c-Fos* mRNA increase observed in rat slices in human brain slice preparations from epilepsy surgery.

The highest correlation between gene expression and epileptiform activity was observed in case of *c-Fos*, its expression is well established as a marker of neuronal activity (Willoughby et al., 1995; Mihály et al., 2001; Szyndler et al., 2009; Barros et al., 2015). As an immediate early gene within the family of inducible transcription factors, *c-Fos* is involved in regulating cellular responses including differentiation, plasticity and cell degeneration (Chiu et al., 1988; Pennypacker et al., 1994). Proconvulsant stimuli result in an increase of *c-Fos* mRNA as well as *c-FOS* protein in rat brains *in vivo* (Barros et al., 2015; Yang et al., 2019). A regional and persistent induction of *c-FOS* gene expression was also found in human epileptic neocortex regardless of the underlying pathology (Rakhade et al., 2005). So far, only little data exists about *c-Fos* induction in brain slices (Massamiri et al., 1994), and this work suffered from technical limitations as changes in *c-Fos* expression were assessed semiquantitatively using southern blots without accounting for differences between subregions and impact of exposure time.

With a weaker extent than *c-Fos*, SLE activity was also associated with increased *Icer* mRNA. *Icer* is a member of cAMP-dependent transcription factors (*Crem* = cAMP response element modulator). Electroconvulsive seizures *in vivo* increased *Crem*

and *Icer* mRNA in rat brains with a maximum at 1 h after seizures and with a most prominent increase in the dentate gyrus and deep layers of cerebral cortex (Fitzgerald et al., 1996). In a different model using pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Icer* mRNA assessed in the dentate gyrus peaked at 6 h and declined to control levels after 1 week (Lund et al., 2008). Interestingly, phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREP) that is assumed to positively affect *ICER* gene expression was regionally increased in seizure onset zone of human neocortex measured following epilepsy surgery (Rakhade et al., 2005), suggesting that involvement of the *CREM/ICER* pathways is likely in the pathophysiology of human epilepsy. Several studies support the idea that activation of the *ICER* pathway upon seizures represents an adaptive mechanism aiming to reduce excess neuronal activity. *Crem/Icer* null mutant mice suffered from more frequent seizures following status epilepticus than their control littermates (Porter et al., 2008), and overexpression of *Icer* negatively regulated neuronal plasticity (Kojima et al., 2008). By revealing a positive correlation of *Icer* expression and epileptiform activity, we were able to reproduce these results *in vitro* specifically in the TC.

Finally, we investigated gene expression of *mTOR*, a member of a complex regulatory pathway modulating proliferation and neuronal activity. In patients with tuberous sclerosis suffering from severe and treatment-resistant epilepsy, the *mTOR* pathway is hyperactivated due to mutations in *TSC1* and *TSC2* genes (Overwater et al., 2019). In these patients, treatment with *mTOR* inhibitors such as everolimus reduced seizure frequency in up to 40% of individuals (French et al., 2016). Apart from tuberous sclerosis complex, the involvement of the *mTOR* pathway in structural epilepsy was shown in several animal models (Huang et al., 2010; Zhang and Wong, 2012; Wang et al., 2018), including chronic models induced by kainate and pilocarpine. Importantly, the acute phase of *mTor* activation seems to be directly driven by epileptiform activity. Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizures caused a transient *mTor* activation in rat hippocampus and neocortex starting by 1 h and returning to baseline by 16 h after seizure onset (Zhang and Wong, 2012). Activation of the *mTor* pathway is believed to occur by protein phosphorylation rather than gene activation (Zeng et al., 2009; Zhang and Wong, 2012).

In our study, we did not find evidence for additional activation of *mTor* gene expression by epileptiform activity. Rather conversely, *mTor* expression seems to be negatively affected by *in vitro* storage as demonstrated by decreased *mTor* mRNA levels in the entorhinal and temporal cortex.

The results from our cell death assay based on PI/DAPI staining imply that the 4-AP *in vitro* model represents a suitable tool to examine gene expression *in vitro*. Although cell death expectedly increased with increasing incubation intervals, we did not observe spatial or temporal differences between control and intervention groups. Interestingly, 4-AP treatment for 4 h tended to decrease the cell death rate when compared to time-matched controls. Previous studies demonstrated that preconditioning with 4-AP for 48 h protects rat cellular granule neuron culture against excitotoxicity by a number of stressors (glutamate, NMDA and 3-nitropropionic acid) (Smith et al., 2009). The results are consistent with an earlier investigation of 4-AP induced protection of hippocampal and cortical neuron culture (Hardingham et al., 2002; Tauskela et al., 2008). Overall, exposure to 4-AP or other proconvulsant agents such as the GABA<sub>A</sub>-receptor antagonist bicuculline, seems to be involved in neuroprotection (Hardingham et al., 2002; Tauskela et al., 2008), although the exact mechanisms remain unclear.

In our approach, we aimed to systematically overcome previous technical limitations by using various internal controls, applying quantitative means to measure gene expression and comparing different regions within a slice as well as different exposure times to the applied proconvulsant. As an acute *in vitro* model of seizures, we used 4-AP as in this model epileptiform activity remains stable over hours. We could clearly detect spatial differences demonstrated by the highest increase of *c-Fos* expression in the TC, the most frequent onset region for SLEs, while in the hippocampus, only a marginal increase in *c-Fos* mRNA was observed. This correlation applied also to the intraregional SLE expansion and activity-dependent increase of light transmittance.

Our work poses several limitations. According to previous reports, hippocampal slice preparation causes a remarkable induction of *c-Fos* mRNA within 6 h when compared to intact hippocampus (Taubenfeld et al., 2002). We confirmed these results with a hippocampal *c-Fos* mRNA increase up to 70-fold while increase in the entorhinal and temporal cortex was much lower. We assume that structural differences between the investigated regions including strong reciprocal connectivity in the hippocampus renders the latter more sensitive to the transient but massive neuronal activation during slice preparation. This high sensitivity with massive *c-Fos* increase in basal hippocampal slices presents a limiting factor as gene expression is not unlimited. It seems possible that strong initial hippocampal *c-Fos* increase made a further increase upon SLE induction less likely. This aspect together with the low incidence of SLEs in the hippocampal formation might explain the weak effects of SLE activity on hippocampal gene expression. The artificial, *in vitro* setting presents a general limitation that cannot be easily overcome. Gene expression observed *in vitro* might largely

differ from the natural *in vivo* situation. Therefore, future observations from human samples investigated *in vitro* need to be interpreted with caution.

In human slices, *c-FOS* expression correlated with epileptiform activity, but we did not find increased expression in the onset zone, most likely due a high variability of the SLE onset and consequently probable imprecise definition. This onset variability as compared to rat tissue is likely due to the overall variability of human tissue obtained from different patients with consequent impact on the activity *in vitro* (Andersson et al., 2016; Wickham et al., 2018; Kraus et al., 2019) and also due to differences in tissue or different slicing angles (Kraus et al., 2020). All these variables not only influence neuronal survival and network excitability, but also could have affected gene expression. Finally, the infrequent availability and low number of human samples allowed only for a limited analysis and also precluded detailed comparison with rat tissue.

The discussed limitations need to be considered in future studies. In case of human tissue, however, using an *ex vivo* approach remains without alternatives. Overall, our results indicate that irrespective of limitations mostly imposed by *ex vivo* conditions, *in vitro* models in general represent a suitable tool for the investigation of gene expression by epileptiform activity. As an outlook, transcriptome-wide approaches including spatial transcriptomics as well as investigation of single cell profiles might reveal novel candidates involved in the human pathophysiology of epilepsy and possibly other CNS pathologies.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Charité-Universitätsmedizin Berlin (EA2/111/14). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by the Institutional Animal Welfare Officer and the responsible local authority (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, T0336/12).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS, PF, and MH contributed to the conception and design of the study. SS performed and analyzed all experiments in rat brain slices, including electrophysiological and optical recordings, cell death assay, qPCR, and NormFinder analysis. MH selected the patients for operation. JO operated the patients. LM performed and analyzed all measurements in the human tissue. MD-W and PF contributed to the data analysis and statistics. SS, LM, and PF wrote the manuscript, which all authors edited and finalized. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Department of Neuropathology for facilitating the use of brain temporal lobe tissues upon epilepsy surgery, namely Dr. Arend Koch. We also thank Mandy Marbler-Pötter and Claudia Muselmann-Genschow (Department of Neurology with Experimental Neurology) for excellent technical assistance.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.643763/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Persistent epileptiform activity in ventral rat slices. Exemplary electrophysiological recording of 4-AP induced persistent epileptiform activity in the EC observed ventral rat slices (−7.6 to −6.8 mm from bregma) in contrast to separate SLEs in medial and dorsal slices.

**Supplementary Figure 2** | Reference gene identification for rat slices. **(A)** Mean quantification value ( $C_q$ ) and standard deviation of five reference genes determined in two independent samples for each condition (basal; control 1, 2, 3, and 4 h; 4-AP 1, 2, 3, and 4 h;  $n = 18$ ). Values obtained from the three rat brain

regions processed: hippocampus, entorhinal cortex and temporal cortex. **(B)**  $C_q$  of five candidate reference genes in all conditions across the three regions investigated (hippocampus, H, entorhinal cortex, EC, and temporal cortex, TC). The box chart indicates the first and the third interquartile range. The vertical line across the box indicates the median, while the lower and upper dashes show the minimum and maximum values. **(C)** Expression stability values ( $M$ ) of the five candidate reference genes evaluated by NormFinder. A lower stability value indicates a more stable expression. *Reep5* in hippocampus and *Tbp* in temporal cortex showed a standard deviation > 0.25, so they were excluded from the determination of the stability value.

**Supplementary Figure 3** | Gene expression of *c-Fos* in basal rat slices. Duration of brain slice procedure (from decapitation to cell lysis in TRIzol) positively correlated with basal *c-Fos* mRNA levels. Relative to the reference gene *Ywhaz*, *c-Fos* expression in basal slices was highest in temporal cortex (TC) followed by entorhinal cortex (EC) and hippocampus (H) in decreasing order.

**Supplementary Figure 4** | Gene expression of *Icer* and *mTor* in rat slices. Fold induction of *Icer* **(A–C)** and *mTor* **(D–F)** relative to basal gene expression in hippocampus, entorhinal, and temporal cortex, respectively. All investigated conditions are represented: control slices (control) and 4-AP treated slices (4-AP) with experimental duration of 1, 2, 3, or 4 h. For relative quantification in RT-qPCR, *Ywhaz* was used as reference gene. Scatter plots show means of individual rats ( $n = 20$ ) since tissue was pooled before RT-qPCR, superimposed graphs represent median  $\pm$  interquartile range (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

**Supplementary Figure 5** | Reference gene identification for human slices. **(A)** Mean quantification value ( $C_q$ ) and standard deviation of three reference genes determined in two independent samples for each condition considered for human samples (basal, control, onset site, rest of slice;  $n = 8$ ). **(B)**  $C_q$  of three candidate reference genes in all conditions. The box chart indicates the first and the third interquartile range. The vertical line across the box indicates the median, while the lower and upper dashes show the minimum and maximum values. **(C)** Expression stability values ( $M$ ) of the three candidate reference genes evaluated by NormFinder. A lower stability value indicates a more stable expression.

## REFERENCES

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Andersson, M., Avaliani, N., Svensson, A., Wickham, J., Pinborg, L. H., Jespersen, B., et al. (2016). Optogenetic control of human neurons in organotypic brain cultures. *Sci. Rep.* 6:24818. doi: 10.1038/srep24818
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., et al. (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 68, 167–207. doi: 10.1016/S0304-0082(02)00077-1
- Barros, V. N., Mundim, M., Galindo, L. T., Bittencourt, S., Porcionatto, M., and Mello, L. E. (2015). The pattern of *c-Fos* expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front. Cell. Neurosci.* 9:72. doi: 10.3389/fncel.2015.00072
- Bauer, S., van Alphen, N., Becker, A., Chiocchetti, A., Deichmann, R., Deller, T., et al. (2017). Personalized translational epilepsy research — novel approaches and future perspectives: part II: experimental and translational approaches. *Epilepsy Behav.* 76, 7–12. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.06.040
- Becker, A. J. (2018). Review: animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 112–129. doi: 10.1111/nan.12451
- Becker, A. J., Chen, J., Paus, S., Normann, S., Beck, H., Elger, C. E., et al. (2002). Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. *NeuroReport* 13, 1327–1333. doi: 10.1097/00001756-200207190-00023
- Buskila, Y., Breen, P. P., Tapson, J., van Schaik, A., Barton, M., and Morley, J. W. (2014). Extending the viability of acute brain slices. *Sci. Rep.* 4:5309. doi: 10.1038/srep05309
- Chen, Z., Brodie, M. J., Liew, D., and Kwan, P. (2018). Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs a 30-year longitudinal cohort study. *JAMA Neurol.* 75, 279–286. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.3949
- Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., and Karin, M. (1988). The *c-fos* protein interacts with *c-Jun* AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541–552. doi: 10.1016/0092-8674(88)90076-1
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Di Lullo, E., and Kriegstein, A. R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 573–584. doi: 10.1038/nrn.2017.107
- Dreier, J. P. (2011). The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439–447. doi: 10.1038/nm.2333
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C. S., Dykeman, J., et al. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 88, 296–303. doi: 10.1212/WNL.0000000000003509
- Fitzgerald, L. R., Vaidya, V. A., Terwilliger, R. Z., and Duman, R. S. (1996). Electroconvulsive seizure increases the expression of CREM (Cyclic AMP response element modulator) and ICER (Inducible cyclic AMP early repressor) in Rat Brain. *J. Neurochem.* 66, 429–432. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66010429.x
- French, J. A., Lawson, J. A., Yapici, Z., Ikeda, H., Polster, T., Nabbut, R., et al. (2016). Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset

- Willoughby, J. O., Mackenzie, L., Medvedev, A., and Hiscock, J. J. (1995). Distribution of Fos-positive neurons in cortical and subcortical structures after picrotoxin-induced convulsions varies with seizure type. *Brain Res.* 683, 73–87. doi: 10.1016/0006-8993(95)00366-X
- World Health Organization (2006). *WHO, Neurological Disorders: Public Health Challenges, 1. Nervous System Diseases. 2. Public Health. 3. Cost of Illness. I. Switzerland: WHO Press.*
- Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., et al. (2019). C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylenetetrazol-induced seizure mice model. *Neurol. Res.* 41, 749–761. doi: 10.1080/01616412.2019.1610839
- Zeng, L. H., Rensing, N. R., and Wong, M. (2009). The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 29, 6964–6972. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0066-09.2009
- Zhang, B., and Wong, M. (2012). Pentylenetetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. *Epilepsia* 53, 506–511. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03384.x
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Schlabitz, Monni, Ragot, Dipper-Wawra, Onken, Holtkamp and Fidzinski. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Schlabitz, S., Monni, L., Ragot, A., Dipper-Wawra, M., Onken, J., Holtkamp, M. und Fidzinski, P. (2021) Spatiotemporal Correlation of Epileptiform Activity and Gene Expression *in vitro*. *Front Mol Neurosci*. 14:643763.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meines Promotionsvorhabens unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer, PD Dr. Pawel Fidzinski, der mir die Bearbeitung dieses spannenden Forschungsthemas ermöglichte, mich in allen Phasen der Arbeit mit wertvollen Anregungen sowie bereichernden Hilfestellungen begleitet und so einen grundlegenden Beitrag für das erfolgreiche Abschließen des Projekts geleistet hat.

Ebenso möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter, Prof. Dr. Martin Holtkamp, danken für die fortwährende Hilfsbereitschaft, die stets zuverlässige und unentbehrliche Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit und darüber hinaus bei allen wissenschaftlichen sowie klinischen Anliegen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klinische und Experimentelle Epileptologie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die wertschätzende Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und Offenheit bei allen Fragen oder Problemen bedanken. Insbesondere Aliénor Ragot verdanke ich die gründliche Einarbeitung in die elektrophysiologischen und optischen Messungen. Hervorheben möchte ich auch Mandy Marbler-Pötter für die tatkräftige und verlässliche Hilfe bei allen experimentellen Arbeitsschritten. Ein großer Dank gilt auch Claudia Muselmann-Genschow für die kompetente Unterstützung bei sämtlichen molekularbiologischen Messungen. Ich danke ebenfalls Dr. Matthias Dipper-Wawra für die hilfreiche Beratung und Mitwirkung in der Datenauswertung.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Regina Schlabit-Konrad und Holger Konrad, für die liebevolle und beständige Unterstützung in allen Lebensbereichen, den bedingungslosen Rückhalt und das große Vertrauen in mich.