

**Epilepsie-assoziierte Veränderungen der Sigma-1-Expression in
chronischen Mausmodellen der Temporallappenepilepsie**

von Victoria Magna Stocker

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Epilepsie-assoziierte Veränderungen der Sigma-1-Expression in
chronischen Mausmodellen der Temporallappenepilepsie**

von Victoria Magna Stocker
aus Nürnberg

München 2026

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Eva-Lotta C. von Rüden, Ph.D.

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Eva-Lotta C. von Rüden, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andreas F. Parzefall
Priv.-Doz. Dr. Simone M.-L. Renner
Priv.-Doz. Dr. Rebecca A.-M. Kenngott
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 07.02.2026

Meiner Familie –

alles, was ich bin und was ich sein möchte, habe ich von euch.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	10
II	LITERATURÜBERSICHT	12
1	Epilepsie.....	12
1.1	Definition, Bedeutung und Klassifikation.....	12
1.2	Pathophysiologie der Temporallappenepilepsie.....	16
1.3	Aktuelle Therapieoptionen.....	20
1.4	Pharmakoresistenz.....	24
2	Tiermodelle.....	28
2.1	Amygdala-Kindling-Modell.....	30
2.2	Intrahippocampales Kainat-Modell.....	31
3	Sigma-1	32
3.1	Molekularbiologische Eigenschaften und funktionelle Bedeutung	32
3.2	Zelluläre- und subzelluläre Expression	34
3.3	Sigma-1 als potenzielle Zielstruktur pharmakologischer Therapieansätze	35
III	ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELSETZUNG.....	38
IV	MATERIAL UND METHODEN	40
1	Labormethoden, <i>in vivo</i>	40
1.1	Studiendesign	40
1.2	Versuchstiere.....	44
1.3	Amygdala-Kindling-Modell.....	45
1.3.1	Operativer Eingriff	45
1.3.2	Amygdala-Kindling.....	47
1.4	Intrahippocampales Kainat-Modell.....	50
1.4.1	Operativer Eingriff	50
1.4.2	Elektroenzephalografische Analyse	53
2	Labormethoden, <i>in vitro</i>	55
2.1	Gewebeaufbereitung.....	55
2.2	Validierung der Spezifität von Sigma-1-Antikörpern mittels Immunhistochemie	56
2.3	Validierung der Spezifität von Sigma-1-Antikörpern mittels Western Blot	

2.4	Immunhistochemische Detektion von Sigma-1	63
2.5	Bestimmung der optischen Dichte und der markierten Fläche Sigma-1-positiver Zellen.....	64
2.6	Bestimmung der optischen Dichte und der markierten Fläche immunhistochemisch detektierter neuronaler Zellkerne	69
2.7	Stereologische Zellzählung	70
2.8	Nachweis der zellulären Expression von Sigma-1 mittels Immunfluoreszenz-Detektion.....	73
2.9	Analyse der zelltypspezifischen Expression von Sigma-1 mittels Immunfluoreszenz-Detektion.....	77
2.10	Etablierung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription	77
2.11	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription zur Analyse der mRNA-Expression von Sigma-1.....	80
3	Statistik	86
V	ERGEBNISSE.....	88
1	Basierend auf immunhistochemischen- und Western-Blot-Analysen konnte der Sigma-1 Antikörper HPA018002 als spezifisch identifiziert werden ...	88
2	Die Sigma-1-Expression ist im Gehirngewebe von Mäusen aus dem Amygdala-Kindling-Modell und dem intrahippocampalen Kainat-Modell erhalten	94
3	Sigma-1 wird in Neuronen, Astrozyten und Gliazellen exprimiert.....	101
4	Der mRNA-Gehalt bleibt im Hippocampus konstant und ist im entorhinalen Cortex temporär moduliert.....	104
VI	DISKUSSION.....	108
1	Bedeutung der Identifizierung und Validierung von spezifischen Antikörpern im Rahmen der Überprüfung von Zielstrukturen	108
2	Sigma-1 unterliegt nach epileptogenem Insult einer transienten Regulation und bleibt im epileptischen Gehirn als Zielstruktur erhalten	110
3	Bedeutung der zelltypübergreifenden Expression von Sigma-1 im Kontext der Epilepsie	119
4	Erhalt und Modulation der Sigma-1-mRNA-Menge.....	121

5	Schlussfolgerung und Ausblick	123
VII	ZUSAMMENFASSUNG	127
VIII	SUMMARY	129
IX	LITERATURVERZEICHNIS.....	131
X	ANHANG.....	152
1	Abbildungsverzeichnis.....	152
2	Tabellenverzeichnis	153
3	Geräte.....	155
4	Software	157
5	Lösungen.....	158
6	Antikörper	162
7	Kommerzielle Kits, Puffer, Reagenzien und Sonden.....	164
8	Medikamente.....	166
9	Chemikalien.....	167
XI	DANKSAGUNG.....	170

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
ADD	Afterdischarge duration	mM	Millimol/l
ADT	Afterdischarge threshold	MAM	Mitochondrien-assoziierten Membran
AG	Arbeitsgruppe	mg	Milligramm
ANOVA	Analysis of variance	mRNA	Messenger-RNA
ASM	Anti seizure medication	mTLE	Mesiale Temporallappenepilepsie
BiP	Binding immunoglobulin protein	n	Stichprobenumfang
CA1	Cornu-Ammonis-region 1	NeuN	Neuronal nuclei
CA3	Cornu-Ammonis-region 3	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	NoRT	No Reverse transcriptase
CE	Coefficient of error	NoT	No-Template-Kontrolle
Ct	Cycle threshold	OD	Optische Dichte
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	p	p-Wert
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	pH	Potentia Hydrogenii
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
dsDNase	Desoxyribonuklease	PBST	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
EAAT1/2	Excitatory amino acid transporter 1/2	PFA	Paraformaldehyd
EEG	Elektro-enzephalogramm	PVDF	Polyvinylidenfluorid
ELC-Detektion	Chemilumineszenz-Detektion	PostADT	Post afterdischarge threshold
ER	Endoplasmatisches Retikulum	post GST	Post generalized seizure threshold

g	Gramm	qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
G	Gauge	RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
GABA	γ -Aminobuttersäure	RL	Richtlinie
GAD67	Glutamat-Decarboxylase 67	RNAse	Ribonuklease
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	RPL13A	Ribosomal Protein L13a
h	Stunde	s	Sekunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
HPD	Hippocampal paroxysmal discharges	s.c.	Subkutan
HVSW	High-voltage sharp waves	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophorese
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1	SE	Status epilepticus
IHC	Immunhistochemie	SUDEP	Sudden unexpected death in epilepsy
i.p	intraperitoneal	SRS	spontaneous recurrent seizures
IPC	Inter-Plate Calibrator	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
ILAE	International League against Epilepsy	T-PMT	Transmitted Light Photomultiplier Tube
initial ADT	Initial afterdischarge threshold	TLE	Temporallappenepilepsie
kg	Kilogramm	vGlut1	vesikulären Glutamatttransporter 1
KO	Knockout	VO	Verordnung
LMD	Laser-Mikrodissektion	WT	Wildtyp
LSD	Fishers Least Significant Difference Test	ZNS	Zentrales Nervensystem
mm ³	Kubikmillimeter	μ l	Mikroliter
M	Mol/l	°C	Grad Celsius

I EINLEITUNG

Mit einer Prävalenz von 0,5–1 % (insgesamt ca. 84 Millionen, Stand 2025) sind ca. 650.000 Menschen der deutschen Bevölkerung an Epilepsie erkrankt. Etwa 700 Patientinnen und Patienten sterben pro Jahr an einem plötzlichen, unerwarteten Tod, der im Zusammenhang mit Epilepsie auftreten kann (*Sudden unexpected death in epilepsy*, SUDEP). Dies sind aber lediglich 17 % aller Todesfälle von Epilepsiepatienten. Berücksichtigt man neben SUDEP auch weitere Ursachen wie Status epilepticus, Unfälle (z. B. Stürze, Ertrinken oder Verkehrsunfälle), Lungenerkrankungen sowie Suizide, sterben täglich etwa elf Menschen in Deutschland im Zusammenhang mit einer Epilepsie-Erkrankung. Neben dem erhöhten Mortalitätsrisiko ist die Lebensqualität von Epilepsiepatientinnen und -patienten häufig erheblich eingeschränkt. Die Erkrankung geht mit vielfältigen Belastungen einher, darunter Einschränkungen in körperlicher Aktivität, Fahrtüchtigkeit, beruflicher Perspektive und sozialer Integration. Zusätzlich können kognitive Defizite, Nebenwirkungen der Medikamente und die Abhängigkeit von Betreuungspersonen die Alltagsbewältigung und das Selbstbild der Betroffenen erheblich beeinträchtigen. Auch bei Haustieren, insbesondere bei Hunden und Katzen, stellt Epilepsie eine häufige neurologische Erkrankung dar. Ähnlich wie beim Menschen ist die Erkrankung mit Komorbiditäten wie Angst, Aggression und kognitiven Defiziten verbunden, die zu gesundheitlichen Einschränkungen und einem reduzierten Wohlbefinden führen. Trotz der aktuell verfügbaren Behandlungsoptionen lässt sich bei vielen Haustieren keine zufriedenstellende Anfallskontrolle erreichen. Vor diesem Hintergrund stellt die Epilepsitherapie auch in der Veterinärmedizin eine große Herausforderung dar. Die Temporallappenepilepsie ist beim Menschen der am häufigsten auftretende Subtyp. Sie zeichnet sich durch wiederkehrende fokale Anfälle aus. Um das Auftreten eines epileptischen Anfalls zu verhindern, stehen verschiedene Wirkstoffe zur Verfügung. Die derzeitigen medikamentösen Therapieoptionen basieren in erster Linie auf dem Mechanismus der symptomatischen Anfallsunterdrückung. Da bei etwa 30 % der Epilepsiepatienten eine therapieresistente Form der Erkrankung entsteht und damit unkontrolliert Anfälle auftreten, ist es erstrebenswert, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die in die pathophysiologischen Mechanismen eingreifen und nicht nur die Anfallsschwelle

erhöhen. Sigma-1 ist ein multifunktionales Chaperon-Protein, welches unter zellulärem Stress sowohl mitochondriale Funktionen als auch die Aktivität verschiedener spannungsabhängiger Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren beeinflussen kann. Aufgrund seiner homöostatischen und regulatorischen Eigenschaften und damit potenziell neuroprotektiven Effekte könnte Sigma-1 die Pathophysiologie modifizieren und so zu einem mildereren Krankheitsverlauf beitragen. Ziel ist es, durch diese neuen Therapiestrategien zum einen die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und zum anderen Therapieresistenzen und die Mortalität zu verringern. Allerdings können krankheitsassoziierte Veränderungen auf molekularer, zellulärer oder Netzwerk-Ebene einen Einfluss auf die Regulation solcher Zielstrukturen haben. Dies wiederum kann sich auf die Wirksamkeit von anfallssuppressiven Medikamenten auswirken. Diese Zusammenhänge zeigen, wie wichtig daher die Überprüfung der Expression einer Zielstruktur im Verlauf der Erkrankung ist. Von den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen könnten perspektivisch auch Haustiere – wie Hunde und Katzen – profitieren, da bislang keine krankheitsmodifizierenden Therapien für die Behandlung epileptischer Erkrankungen bei Tieren zur Verfügung stehen.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Epilepsie

1.1 Definition, Bedeutung und Klassifikation

Als eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen von Mensch und Tier sind Epilepsien durch eine anhaltende, pathologische Neigung des Gehirns zur Generierung von wiederkehrenden, unprovzierten Anfällen gekennzeichnet (FISHER et al., 2005; STAFSTROM, 2006; BERENDT et al., 2015). Ungefähr 50 – 65 Millionen Menschen der Weltbevölkerung sind an Epilepsie erkrankt (SHAN et al., 2024). Aufgrund unterschiedlicher Faktoren wie zum Beispiel Fehldiagnosen und einer mangelnden medizinischen Infrastruktur in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen wird die Dunkelziffer deutlich höher vermutet (ABRAMOVICI & BAGIĆ, 2016). Ausgehend von einer geschätzten Prävalenz von 0,5 bis 1 % der Bevölkerung leben in Deutschland etwa 650.000 Personen mit Epilepsie (WARTMANN et al., 2024). Eine erhöhte Prävalenz zeigt sich im frühen Kindesalter zwischen einem und zwölf Monaten. Nach einem Rückgang im weiteren Verlauf steigt sie ab dem 65. Lebensjahr wieder an und erreicht den Höhepunkt bei älteren Personen ab einem Alter von 80 Jahren (LANG & HAMER, 2022; SHAN et al., 2024).

Die *International League against Epilepsy* (ILAE) hat Epilepsie als eine anhaltende Veranlagung zur Entstehung von Anfällen definiert, welche mit neurobiologischen, kognitiven und psychosozialen Konsequenzen einhergeht. Per Definition wird von einer Epilepsie gesprochen, wenn mindestens zwei unprovzierte Anfälle aufgetreten sind, die mehr als 24 h auseinanderliegen. Sofern die Wahrscheinlichkeit weiterer Anfälle innerhalb der nächsten zehn Jahre als hoch (mindestens 60 %) angesehen wird, kann die Diagnose auch nach einem einzelnen unprovzierten Anfall gestellt werden. Als ausreichender Hinweis auf das Vorliegen einer Epilepsie kann auch die Diagnose eines spezifischen Epilepsiesyndroms gewertet werden (BEGHI et al., 2005; FISHER et al., 2014; FISHER, 2015; FISHER et al., 2017).

Ein Schlüsselmerkmal der Epilepsie ist die Dysbalance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission im Gehirn (BATEUP et al., 2013; STALEY, 2015; ANWAR et al., 2020). Die zugrunde liegenden Ursachen dieser Dysbalance können sehr unterschiedlich sein. Vielfältige Ätiologien und die damit

einhergehenden Unterschiede im Krankheitsverlauf führen zu einem variabel ausgeprägten Krankheitsbild (MAC et al., 2007; SMITH, 2012). Aus diesem Grund wird auch nicht von einer einzelnen Krankheitsform gesprochen, sondern von einer Erkrankung, die aus einer Kombination von unterschiedlichen Syndromen besteht, welche das Auftreten von epileptischen Anfällen gemeinsam haben (JOHNSTON & SMITH, 2008; STAFSTROM & CARMANT, 2015). Die ILAE hat in den 1980er-Jahren begonnen, die Erkrankung fortwährend systematisch zu klassifizieren und bildete damit einen internationalen Standard aus (FISHER et al., 2017). Die frühen Einteilungen basierten hauptsächlich auf den anatomischen Veränderungen und dem klinischen Erscheinungsbild (RIVIELLO, 2003). Über die Zeit hinweg blieb eine grundlegende Einteilung in fokale, generalisierte und unbekannte Anfälle bestehen, jedoch wurden diese Klassifizierungen weiterhin verfeinert, indem zum Beispiel der Aspekt des Bewusstseins während eines Anfalls miteinbezogen wurde (FISHER et al., 2017). Neben der Unterscheidung zwischen Anfallstypen verfolgen moderne Klassifikationen mehrdimensionale Ansätze, welche unter Verwendung moderner diagnostischer Techniken auch epileptische Syndrome und die zugrunde liegende Ätiologie miteinbeziehen (GRAEFE et al., 2016). Dies hat einen maßgeblichen Einfluss auf eine präzise Kommunikation sowie das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und ist somit entscheidend für eine möglichst personalisierte Behandlungsstrategie (FISHER et al., 2017; BENICZKY et al., 2025). Die ILAE sieht bei der Diagnose eine stufenartige Herangehensweise vor, welche mit der Klassifikation der auftretenden Anfallsform in „fokale“, „generalisierte“ sowie „unbekannte“ Anfälle beginnt (siehe **Abbildung 1**).

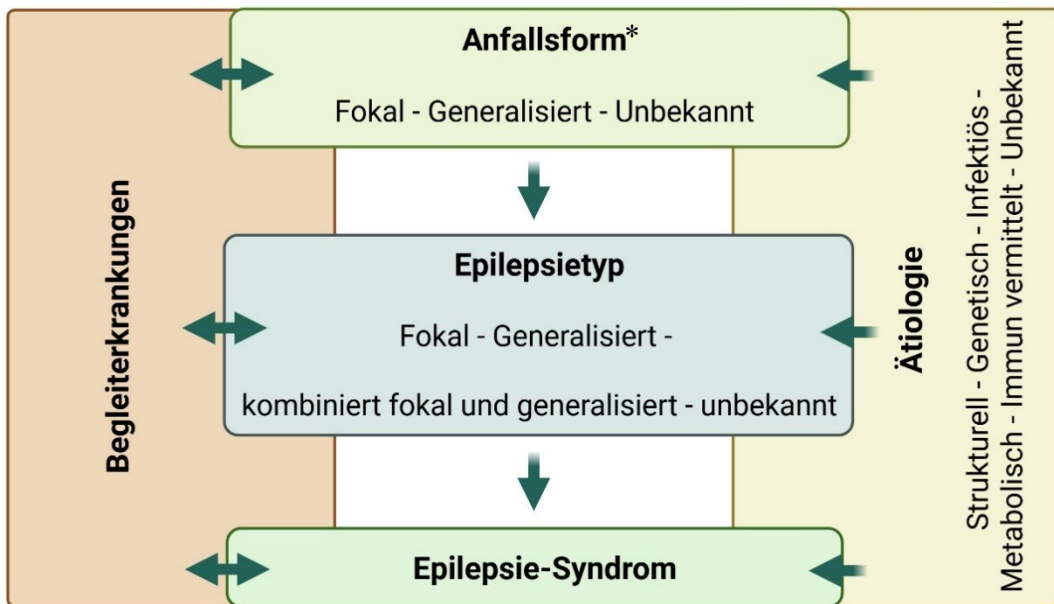


Abbildung 1: ILAE-Klassifikation der Epilepsie.

*Kennzeichnet das Auftreten eines Anfalls. Modifiziert nach SCHEFFER et al. (2017) übersetzt aus dem Englischen. Mit BioRender erstellt.

Ein fokaler Anfall manifestiert sich in einem begrenzten Bereich einer Gehirnhälfte. Im Gegensatz dazu beginnen generalisierte Anfälle nahezu simultan in beiden Hemisphären (SCHEFFER et al., 2017). Die Kategorie „unbekannt“ wird verwendet, wenn die Anfallsform aufgrund unzureichender Informationen nicht eindeutig zugeordnet werden kann. In jedem Fall gilt es bei der Diagnose die Ätiologie zu beachten, welche genetischen, strukturellen, infektiösen, metabolischen, immunvermittelten oder unbekannten Ursprungs sein kann (SCHEFFER et al., 2017). Nachdem eine Epilepsie diagnostiziert wurde, wird eine Einteilung nach der Art der Epilepsie vorgenommen. Die Einführung der Kategorie „kombinierte generalisierte und fokale Epilepsie“ ermöglicht eine präzisere Einordnung von Patienten mit beiden Anfallsformen, wie sie etwa beim Dravet- oder Lennox-Gastaut-Syndrom auftreten (SCHEFFER et al., 2017). Schließlich wird in der dritten Stufe geprüft, ob die erhobenen diagnostischen Befunde ein Epilepsiesyndrom belegen können. Zu jedem Zeitpunkt sollen dabei auch Begleiterkrankungen wie Verhaltensänderungen und andere neuropsychologische Defizite mitberücksichtigt werden (MACALLISTER & SCHAFFER, 2007; NICKELS, 2017; SCHEFFER et al., 2017). Daher besteht weiterhin der Bedarf, das Klassifikationssystem weiterzuentwickeln, um auch komplexe neuronale Netzwerkveränderungen zu berücksichtigen. Ziel dieser kontinuierlichen Weiterentwicklung ist es, den Fokus von isolierten lokalisierten epileptogenen

Zonen auf die Netzwerkanatomie und -dynamiken zu erweitern, um so die Interaktion verschiedener Netzwerke zu inkludieren, ohne die Anwendbarkeit und Praktikabilität zu beeinträchtigen (AVANZINI, 2010; SCHEFFER et al., 2017).

Bei der Temporallappenepilepsie (TLE) handelt es sich um die häufigste Form der fokalen Epilepsie beim Menschen. In Epilepsiezentren macht die TLE etwa 60–70 % aller fokalen Epilepsien aus (BAUMGARTNER et al., 2020). Mit Bezug auf die Klassifikation beinhaltet die TLE wiederkehrende, fokale Anfälle, deren Ursprung im Temporallappen des Gehirns liegt (FERNANDES et al., 2015; ABARRATEGUI et al., 2021; MARTINEZ & PEPLOW, 2023). Darüber hinaus sind mesiale Strukturen wie der Hippocampus und angrenzende kortikale Bereiche von zentraler Bedeutung (ABARRATEGUI et al., 2021). Die Anfälle werden begleitet von Bewusstseinsveränderungen, welche sich durch sensorische, motorische, psychische und autonome Symptome darstellen können (WEIS et al., 2019). Dies resultiert in einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten (STEFAN & SCHMITT, 2020). Einen Subtyp der TLE stellt hier die mesiale Temporallappenepilepsie (mTLE) dar, welche häufig durch einen neuronalen Verlust im Hippocampus, auch Hippocampussklerose genannt, gekennzeichnet ist (THOM, 2014; REN & CURIA, 2021). Neben traumatischen Insulten, Schlaganfällen, strukturellen Läsionen, genetischen Faktoren, autoimmunen Prozessen und postinfektiösen Veränderungen werden auch komplexe Fieberkrämpfe im Kindesalter und perinatale Hypoxien als Ursachen für die mTLE diskutiert (BAUMGARTNER, 2020).

Das Auftreten von Epilepsieerkrankungen weist deutliche tierartspezifische Unterschiede auf. Epileptische Anfälle sind bei Großtieren wie Pferden und Rindern selten und werden nur vereinzelt beschrieben (LACOMBE et al., 2014; D'ANGELO et al., 2015; LACOMBE, 2015; ERLÉN, 2021). Bei Hunden und Katzen hingegen zählt Epilepsie zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (CHANDLER, 2006). Die Prävalenz wurde in Großbritannien und Schweden untersucht und wurde mit etwa 0,6 bis 0,75 % der untersuchten Population angegeben (KEARSLEY-FLEET et al., 2013; HESKE et al., 2014). Definition und Klassifikation orientieren sich an der Humanmedizin, wurden jedoch durch die *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF) an die Bedürfnisse der Kleintiermedizin angepasst (PAKOZDY et al., 2014; BERENDT et al., 2015). In der Kleintierneurologie wird Epilepsie basierend auf der Ätiologie in idiopathische,

strukturelle und reaktive Formen sowie nach Anfallstyp in fokale und generalisierte Anfälle unterteilt (BERENDT et al., 2015; BAKA & POLIZOPOULOU, 2020; LÖSCHER, 2022). Ähnlich wie beim Menschen treten auch bei Hunden verschiedene Begleiterkrankungen wie Angstzustände und kognitive Beeinträchtigungen auf, die sowohl die Lebensqualität der Patienten als auch die der Besitzer beeinträchtigen (PACKER & VOLK, 2015; PEEK et al., 2024).

1.2 Pathophysiologie der Temporallappenepilepsie

Die Pathophysiologie der TLE ist komplex und vielschichtig, da sie zelluläre, molekulare sowie netzwerkbezogene Veränderungen umfasst, deren genaue Mechanismen bis heute nicht vollständig verstanden sind. Die Epileptogenese bezeichnet den Prozess, durch den ein zuvor gesundes Gehirn in ein epileptisches überführt wird (RAKHADE & JENSEN, 2009; MARQUES et al., 2022). Dieser Prozess läuft in der Regel in drei Phasen ab: Zunächst kommt es zu einer initialen Schädigung des Gehirns, gefolgt von einer Latenzphase mit fortschreitenden pathologischen Veränderungen und dem anschließenden Auftreten rezidivierender Anfälle (MATHERN et al., 1996). Die resultierenden strukturellen und molekularen Veränderungen im Temporallappen führen zur Reorganisation physiologischer neuronaler Netzwerke in veränderte Schaltkreise mit anhaltender Übererregbarkeit und Hypersynchronität (COLE & DICHTER, 2002; SUTULA, 2004). Im chronischen Zustand gilt der Hippocampus mit seinen verschiedenen Subregionen CA1, CA3, dem Gyrus dentatus sowie dem Subiculum als zentraler Schaltkreis für die Entstehung epileptischer Anfälle (SPERK et al., 2007; FUJITA et al., 2014). Infolgedessen sind diese Areale durch charakteristische histopathologische und molekulare Veränderungen gekennzeichnet (SCHWARCZ & WITTER, 2002; SPERK et al., 2007). Eine häufig auftretende pathologische Veränderung ist die Hippocampussklerose, die durch einen selektiven neuronalen Verlust in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus gekennzeichnet ist. Diese Form der Neurodegeneration wird auch als Ammonshornsclerose bezeichnet (SCHWARCZ & WITTER, 2002; SPERK et al., 2007; THOM, 2014). Der neuronale Zellverlust wird unter anderem durch exzitotoxische Prozesse vermittelt, die durch eine übermäßige Glutamatfreisetzung während eines Status epilepticus (SE) und die Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDARs) ausgelöst werden (SPERK et al., 2007; BEESLEY et al., 2020). Die überschießende Freisetzung von Glutamat führt zu weitreichenden molekularen Veränderungen

(siehe Abbildung 2).

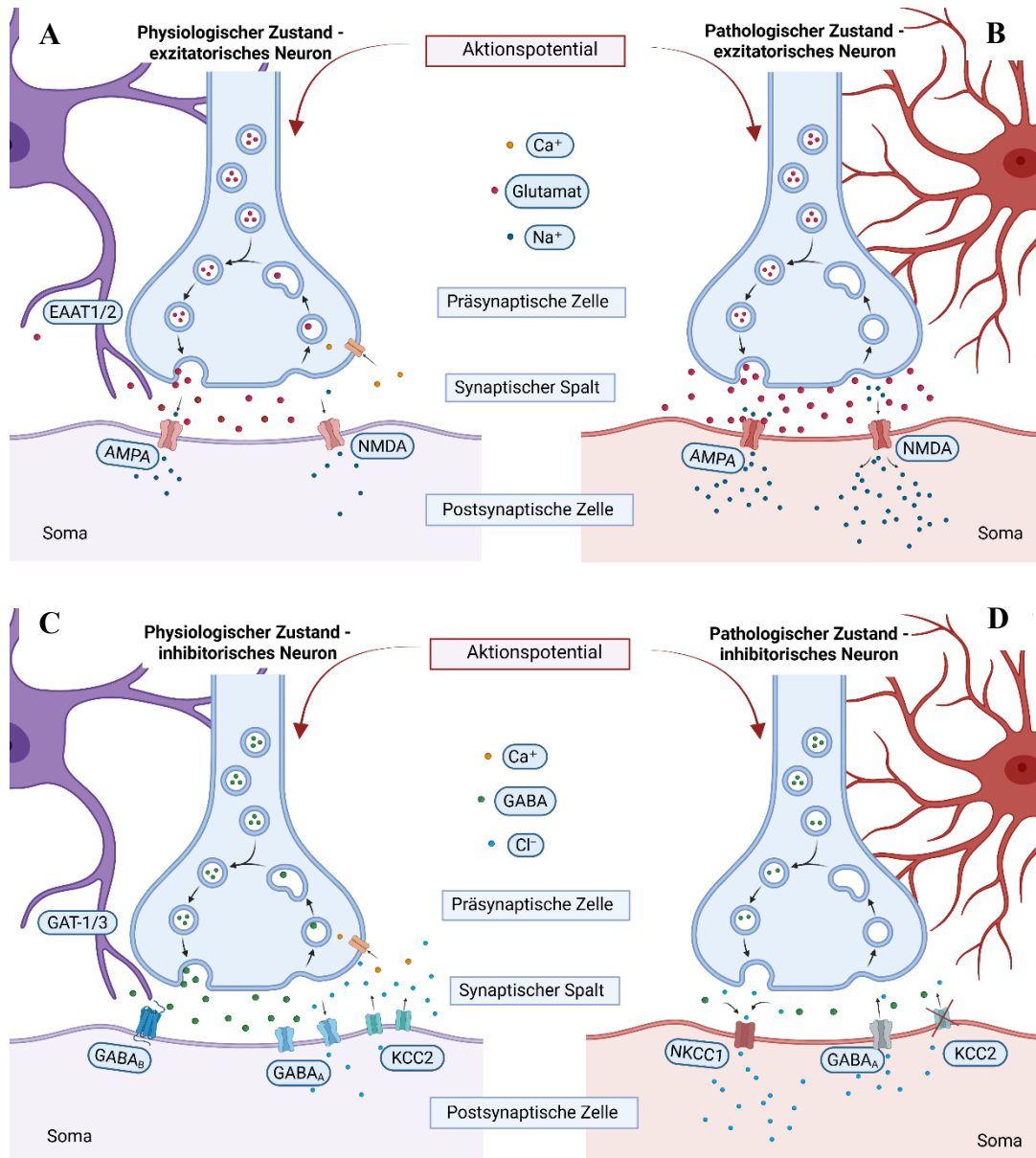


Abbildung 2: Schematische und vereinfachte Darstellung der synaptischen Erregungsübertragung im physiologischen vs. pathologischen, epileptischen Zustand in einem exzitatorischen (A) und inhibitorischen (B) Neuron. Erstellt mit Biorender.

(A, C) Im physiologischen Zustand führt ein Aktionspotential an der präsynaptischen Membran zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Der daraus resultierende Calciumeinstrom (Ca^{2+}) bewirkt die Neurotransmitterausschüttung von Glutamat und GABA in den synaptischen Spalt. Diese werden in einem ausgewogenen Verhältnis ausgeschüttet. Somit besteht eine Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Signalen. Glutamat aktiviert postsynaptisch AMPA- und NMDA-Rezeptoren und bewirkt eine Depolarisation (MELDRUM, 2000). GABA bindet an GABA_A -Rezeptoren, die einen Chlorideinstrom (Cl^-) vermitteln, sowie an GABA_B -Rezeptoren, die einen

K⁺-Ausstrom auslösen. Durch KCC2 wird die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration niedrig gehalten, was eine Hyperpolarisation und damit die hemmende Wirkung ermöglicht (CHAMMA et al., 2012). Nachfolgend werden die freigesetzten Neurotransmitter durch Transporter und Astrozyten (EAAT1/2 und GAT-1/3) wieder aufgenommen und enzymatisch abgebaut, wodurch die synaptische Signalübertragung beendet und die Homöostase wiederhergestellt wird (DANBOLT, 2001; LIU et al., 2022). **(B)** Nach Manifestation einer Epilepsie, im pathologischen Zustand, kommt es in exzitatorischen Neuronen zu einer erhöhten Glutamatfreisetzung und/oder einer gesteigerten Empfindlichkeit der Glutamatrezeptoren sowie einer eingeschränkten Glutamataufnahme durch astrozytäre Glutamattransporter (EAAT1/2). Zusätzlich wird die neuronale Erregbarkeit durch eine verminderte astrozytäre Kalium-Pufferung erhöht (SCHOUSBOE & WAAGEPETERSEN, 2005; SEIFERT et al., 2006). **(D)** In inhibitorischen Neuronen ist die GABA-Freisetzung reduziert und/oder die GABA-Rezeptoren beeinträchtigt. Eine Störung der Chloridhomöostase infolge verminderter KCC2-Aktivität und verstärkter NKCC1-Aktivität führt zu einer intrazellulären Cl⁻-Akkumulation. Außerdem ist die astrozytäre GABA-Aufnahme durch GAT-1/3 gestört (CONTI et al., 2004; HÉJA et al., 2012). Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren bewirkt dadurch einen Cl⁻-Ausstrom und eine Depolarisation statt eines Cl⁻-Einstroms und einer Hyperpolarisation. GABA verliert seine inhibitorische Wirkung und fördert die Hyperexzitabilität (KAILA et al., 2014; STALEY, 2015).

Darüber hinaus verändern sich die Eigenschaften spannungsabhängiger Ionenkanäle, und aktivierte Gliazellen setzen proinflammatorische Zytokine frei, die eine Neuroinflammation fördern. Zusammengenommen resultieren diese Veränderungen in synchronisierten, pathologischen neuronalen Entladungen, die klinisch als epileptische Anfälle in Erscheinung treten (STALEY, 2015; VEZZANI et al., 2019).

Insbesondere kommt es zu einer Dysregulation der Glutamataufnahme und -freisetzung durch reaktive Astrozyten. Eine verminderte Expression von Glutaminsynthetasen und die Dysfunktion von Glutamattransportern (Excitatory Amino Acid Transporter, EAAT1/2) beeinträchtigen den Glutamin-Glutamat-Zyklus und damit die Funktion der Astrozyten bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase. Die verminderte Aufnahme von extrazellulärem Glutamat und Kalium verstärkt die glutamatvermittelte Exzitotoxizität (SCHOUSBOE & WAAGEPETERSEN, 2005; COULTER & EID, 2012; COULTER & STEINHÄUSER, 2015). Durch die Exzitotoxizität werden neuroinflammatorische Prozesse ausgelöst, die durch Infiltration von CD45⁺ Leukozyten, Mikrogliaaktivierung und eine erhöhte Abundanz proinflammatorischer Gene gekennzeichnet sind. Dabei spielen Interaktionen zwischen degenerativen und immunologischen Mechanismen eine zentrale Rolle, vorwiegend unter Beteiligung

von T-Lymphozyten und Makrophagen (ZATTONI et al., 2011; DEVINSKY et al., 2013). Begleitet wird diese pathohistologische Veränderung von Gliose, einer Reorganisation der synaptischen Verbindungen, einschließlich des aberranten Wachstums von Moosfasern im Gyrus dentatus. Diese Veränderungen werden als kompensatorische Reaktion auf den neuronalen Verlust interpretiert (PARENT & LOWENSTEIN, 1997; CAVAZOS & CROSS, 2006; BERTRAM, 2009). Zusätzlich tritt zellulärer Stress als kritischer Bestandteil multipler molekularer pathophysiologischer Mechanismen in Erscheinung (AGUIAR et al., 2012). Der hohe Stoffwechselbedarf der Neuronen bei erhöhter Erregbarkeit führt zu einer übermäßigen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die zusätzlich zu Neuroinflammation und synaptischer Dysfunktion beitragen (PARSONS et al., 2022). Die reaktiven Sauerstoffspezies haben darüber hinaus einen negativen Einfluss auf die mitochondriale Funktion und die Calcium-Homöostase (ROGANOVIC et al., 2019; PARSONS et al., 2022). Dieser Zellstress beeinflusst auch die Funktion des endoplasmatischen Retikulums (ER), bei dem sich entfaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen ansammeln (FU et al., 2020). Langfristig kann anhaltender ER-Stress verschiedene Formen des programmierten Zelltods auslösen (ATABAKI et al., 2023). Die strukturellen Veränderungen im Hippocampus, welche mit einer Umorganisation neuronaler Netzwerke im Temporallappen einhergehen, die Neuroinflammation und auch die Glutamatdysregulation führen zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission (BATEUP et al., 2013; BONANSKO & FUENZALIDA, 2016). **Abbildung 2** stellt schematisch die physiologischen und pathologischen molekularen Vorgänge in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen dar. Dies erhöht die neuronale Erregbarkeit und führt zur Auslösung und Ausbreitung von epileptischen Anfällen (BATEUP et al., 2013; NAVIDHAMIDI et al., 2017). Allerdings muss ebenfalls beachtet werden, dass γ -Aminobuttersäure (GABA)-vermittelnde Interneuronen unter bestimmten Bedingungen selbst zur Förderung und Synchronisation epileptiformer Oszillationen beitragen können. Dies geschieht über depolarisierende und paradoxerweise exzitatorische Wirkungen von GABA, die insbesondere im sich entwickelnden Gehirn beobachtet wurden (BEN-ARI & HOLMES, 2005; KHAZIPOV, 2016). Die molekularen Veränderungen beeinflussen die Expression verschiedener Ionenkanäle und Rezeptoren, was sich auf die neuronale Netzwerkdynamik auswirkt. Diese Veränderungen beeinträchtigen die Dynamik des gesamten Gehirns und können

Komorbiditäten wie Gedächtnisstörungen und andere kognitive Beeinträchtigungen auslösen, was mit einer Funktionsstörung des Hippocampus, insbesondere in Bezug auf räumliche Navigation und deklarative Gedächtnisverarbeitung, in Verbindung gebracht wird (HOLMES, 2015). Neben dem Hippocampus sind weitere mesiale temporale Strukturen wie die Amygdala, der entorhinale, der piriforme und der perirhinale Cortex sowie extratemporalen Areale wie der parietale Cortex und verschiedene Thalamuskern an der Entstehung und der Ausbreitung von Anfallsaktivität sowie der klinischen Manifestation der TLE beteiligt (SCHWARCZ & WITTER, 2002; GUYE et al., 2006; BERTRAM, 2009). Das Konzept eines epileptischen neuronalen Netzwerkes, das multiple Gehirnregionen umfasst, wird durch eine Reihe von Erkenntnissen aus Tiermodellen, intrakraniellen Aufzeichnungen, bildgebenden Verfahren und chirurgischen Analysen gestützt. Diese verdeutlichen, dass die Anfallsentstehung eng mit der funktionellen Integrität und der strukturellen Pathologie dieser beteiligten Regionen verbunden ist (BERNASCONI et al., 2003; BERTRAM, 2009). Vor diesem Hintergrund gelten Hunde mit Epilepsie als relevantes natürliches Tiermodell, da spontan auftretende Epilepsie bei Hunden in Ätiologie, klinischer Manifestation und Verlauf der menschlichen Erkrankung in vielerlei Hinsicht ähnelt. Hunde gelten daher als translational besonders relevant für die Epilepsieforschung (POTSCHKA et al., 2013; LÖSCHER, 2022; VON RÜDEN et al., 2023).

1.3 Aktuelle Therapieoptionen

Zur Behandlung der TLE stehen derzeit verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Im Zentrum steht die pharmakologische Behandlung, deren Ziel es ist, die neuronale Erregbarkeit zu modulieren und so die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfälle zu verhindern (LÖSCHER & KLEIN, 2021). Für diesen Zweck stehen zahlreiche Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung, die sowohl als Monotherapie als auch im Rahmen von Kombinationstherapien eingesetzt werden können. Beide Ansätze können mit relevanten Nebenwirkungen einhergehen, weshalb eine sorgfältige Nutzen- und Risiko-Abwägung erforderlich ist (PERUCCA et al., 2000). Die Deutsche Gesellschaft für Epileptologie veröffentlicht Leitlinien, in denen empfohlene medikamentöse und chirurgische Therapieoptionen sowie ergänzende und psychosoziale Maßnahmen dargelegt werden (HOLTKAMP, 2023). Die meisten

anfallssuppressiven Medikamente (*Anti seizure medication*, ASM) wirken antikonvulsiv, indem sie die neuronale Übererregbarkeit über die Blockade von spannungsabhängigen Natrium- oder Kalziumkanälen hemmen, die hemmenden GABAergen Neurotransmission verstärken, die synaptische Vesikelfreisetzung modulieren oder exzitatorische Glutamaterezeptoren hemmen (siehe **Abbildung 3**) (LANDMARK, 2006; SILLS & ROGAWSKI, 2020; LÖSCHER & KLEIN, 2021). Ziel ist es, die neuronale Erregbarkeit zu modulieren, indem die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen neuronalen Prozessen wiederhergestellt wird (LÖSCHER & KLEIN, 2021). Der genaue Wirkmechanismus der verschiedenen Wirkstoffe ist in vielen Fällen jedoch nicht bekannt (GRAEFE et al., 2016).

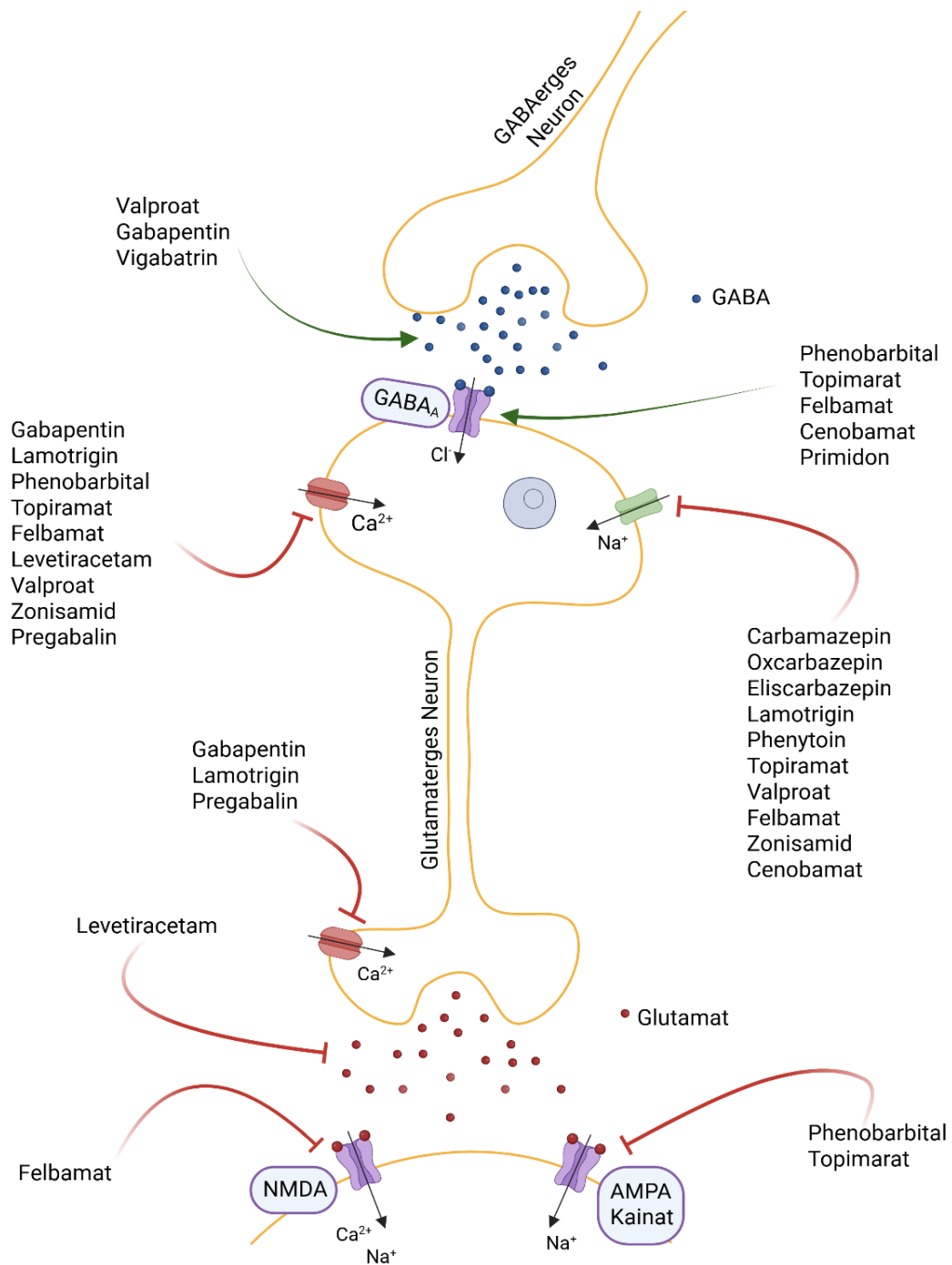


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung zentraler Wirkmechanismen gängiger Wirkstoffe, die für die Behandlung der TLE eingesetzt werden.

Modifiziert nach GRAEFE et al. (2016). Dargestellt ist eine GABAerge und glutamaterge Nervenzelle sowie eine postsynaptische Membran mit für die Darstellung wichtigen Rezeptoren, Ionenkanälen und Neurotransmittern. Therapeutische Ansätze zielen unter anderem darauf ab, die GABA-Synthese oder Freisetzung zu fördern und den GABA-Abbau und die Wiederaufnahme zu hemmen oder die Funktion des GABA_A-Rezeptors positiv allosterisch zu

modulieren. Dadurch wird die inhibitorische Wirkung von GABA verstärkt. Außerdem können spannungsabhängige Natrium- und Calciumkanäle blockiert werden, um das Membranpotential zu stabilisieren und repetitive neuronale Entladungen zu unterdrücken. Weitere Angriffspunkte sind die Hemmung der Glutamatwirkung an AMPA- und NMDA- oder Kainat-Rezeptoren, deren Hemmung die exzitatorische Transmission reduziert. Zudem kann die Bindung an das synaptische Vesikelprotein SV2A die Freisetzung von Neurotransmittern modulieren. Es gilt zu beachten, dass die Darstellung und Beschreibung der Wirkmechanismen vereinfacht ist und viele ASMs über mehrere Wirkmechanismen verfügen (Multitarget-Wirkstoffe).

Ergänzend können Cannabinoide wie Canabidiol zur Modulation von Zielstrukturen wie *G protein-coupled receptor 55*, *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* und *Equilibrative Nucleoside Transporters* eingesetzt werden, die an neuroinflammatorischen und neuromodulatorischen Prozessen beteiligt sind (DEVINSKY et al., 2014; GRAY & WHALLEY, 2020). Zudem wird an Gen- und molekularbasierten Therapien geforscht, welche auf Mutationen in Ionenkanälen oder neuroinflammatorische Signalwege abzielen (OYRER et al., 2018; VAN VLIET et al., 2018).

Wenn trotz adäquater Behandlung mit zwei geeigneten ASMs in Kombination mit dem klinischen Bild keine Anfallsfreiheit erreicht wird, liegt eine pharmakoresistente Epilepsie vor, bei der unter anderem chirurgische Optionen in Betracht gezogen werden können (KWAN et al., 2010). Sofern sich ein genauer Anfallsfokus feststellen lässt, kann eine Temporallappen-Resektion oder eine Laser-induzierte Thermoablation durchgeführt werden. Außerdem stehen zerebrale Stimulationsverfahren, in Form von tiefen Hirn- oder Vagusnervstimulationen, zur Verfügung (THEODORE & FISHER, 2007; GRAEFE et al., 2016; DORFER et al., 2020). Jedoch gilt es zu beachten, dass nicht alle Patienten für eine chirurgische Intervention geeignet sind oder nachfolgend weiterhin auf ASMs angewiesen sind (FATTORUSSO et al., 2021). Zusammenfassend ist festzustellen, dass trotz der bestehenden Therapieoptionen weiterhin bei vielen Patienten keine zufriedenstellende Anfallsfreiheit erreicht werden kann. Es besteht demnach weiterhin Bedarf an der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien und -ansätze.

Die medikamentöse Epilepsitherapie bei Kleintieren ist derzeit auf wenige zugelassene Wirkstoffe beschränkt. Phenobarbital und Imepitoin eignen sich für die Monotherapie, während Kaliumbromid als *Add-on* Therapie zum Einsatz kommt (BHATTI et al., 2015). Bromidsalze sind allerdings für Katzen kontraindiziert, da

sie Atemprobleme auslösen können (MOORE, 2014; BAKA & POLIZOPOULOU, 2020). Bei Hunden wird Phenobarbital eingesetzt, jedoch erfordert die Anwendung aufgrund potenzieller hepatotoxischer Nebenwirkungen eine regelmäßige Überwachung. Imepitoin stellt ebenso eine wirksame und gut verträgliche Option für die initiale Monotherapie dar (BHATTI et al., 2015). Als weiterer Wirkstoff kann Levetiracetam ergänzend oder alternativ eingesetzt werden, da es sich durch seine gute Verträglichkeit auszeichnet (LÖSCHER, 2022). Da dieser Wirkstoff, ebenso wie Zonisamid, Gabapentin und Felbamat, in Deutschland jedoch nicht für die Anwendung in der Veterinärmedizin zugelassen ist, darf er gemäß der rechtlich bindenden Umwidnungskaskade (Verordnung (EU) 2019/6) nur eingesetzt werden, wenn eine Pharmakoresistenz gegenüber den zugelassenen Wirkstoffen nachgewiesen wurde. Es gilt zu beachten, dass alle genannten Wirkstoffe ausschließlich symptomatisch wirken, also lediglich Anfälle unterdrücken. Eine Modifikation der zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse ist in der Tiermedizin bislang nicht möglich, weshalb es nach wie vor schwierig ist, eine vollständige Anfallsfreiheit zu erreichen (CHANDLER, 2006; BERENDT et al., 2015; POTSCHKA et al., 2015).

1.4 Pharmakoresistenz

Eine pharmakoresistente Epilepsie liegt gemäß der Definition der ILAE dann vor, wenn ein Patient unter Verwendung von zwei angemessen ausgewählten ASMs, die in geeigneter Dosierung und über eine ausreichende Behandlungsdauer als Monotherapie oder in Kombination verabreicht wurden, keine anhaltende Anfallsfreiheit erreicht (KWAN et al., 2010; LÖSCHER et al., 2020). Trotz der in **Kapitel II Abschnitt 1.3** beschriebenen Verfügbarkeit zahlreicher ASMs sind etwa 30 % der Patienten von Pharmakoresistenzen betroffen (KWAN & BRODIE, 2000; CHEN et al., 2018; PERUCCA et al., 2020). Als besonders relevanter Risikofaktor für die Entwicklung einer therapieresistenten Epilepsie gilt die mTLE, insbesondere bei frühem Erkrankungsbeginn. Die Wahrscheinlichkeit, auf ein weiteres ASM anzusprechen, nimmt mit jedem weiteren getesteten Medikament ab. Dementsprechend ist die Entwicklung einer Pharmakoresistenz signifikant wahrscheinlicher, wenn der Patient auf das initial eingesetzte Medikament schlecht anspricht (BJØRKE et al., 2018). Vor diesem Hintergrund ist ein vertieftes Verständnis der Resistenzmechanismen entscheidend, um gezielte Strategien zur Überwindung von Pharmakoresistenzen zu entwickeln (LÖSCHER & WHITE,

2023). Betrachtet man die Resistenz auf molekularer Ebene, gibt es verschiedene Faktoren, die einen Einfluss auf die Wirksamkeit von ASM haben. In der Vergangenheit wurden mehrere Ursachen zur Erklärung pharmakoresistenter Mechanismen diskutiert. Dazu gehören die Arzneimitteltransporter-Hypothese (*drug-transporter hypothesis*) und die Zielstruktur-Hypothese (*target-hypothesis*) (REMY & BECK, 2005). Die Transporter-Hypothese postuliert, dass die Pharmakoresistenz auf eine unzureichende Penetration von ASMs durch die Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist, da die Expression von Multidrug-Efflux-Transportern erhöht ist (LÖSCHER & POTSCHKA, 2005b; TANG et al., 2017). Zu diesen Transportern zählen unter anderem die ATP-bindenden Kassetten-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*, ABC-Transporter) sowie das Permeabilitäts-Glykoprotein (P-Glykoprotein). Beide sind in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert und tragen dazu bei, die Wirkstoffkonzentration in der epileptogenen Region zu senken, wodurch die therapeutische Wirksamkeit der ASMs beeinträchtigt wird (LÖSCHER & POTSCHKA, 2005b). Es wird vermutet, dass diese Überexpression sowohl durch wiederholtes Auftreten von Anfällen als auch durch eine anhaltende ASM-Behandlung hervorgerufen wird, da viele ASMs Substrate dieser Efflux-Transporter sind (LÖSCHER et al., 2020). Die zweite Hypothese basiert auf der Annahme, dass multiple pathologische Veränderungen zu einer Veränderung der Expression oder Funktion von medikamentösen Zielstrukturen wie z. B. Natriumkanälen und GABA-Rezeptoren führen (LÖSCHER & FRIEDMAN, 2020; FONSECA-BARRIENDOS et al., 2022; AUVIN et al., 2023). So wurde zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Wirksamkeit von Carbamazepin und einer veränderten Konformation oder Zusammensetzung von Untereinheiten der Natriumkanäle aufgedeckt (REMY et al., 2003). Durch die wie in **Kapitel II Abschnitt 1.2** beschriebenen pathologischen Veränderungen, wie *Mossy-fibre-sprouting*, Gliose und neuronalem Zellverlust, kommt es zum massiven Umbau des neuronalen Netzwerkes und der damit zusammenhängenden zellulären und molekularen Mechanismen (PROPER et al., 2000; GODALE & DANZER, 2018). Die dabei auftretenden intrazellulären Signalveränderungen, insbesondere im Bereich des *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR), des *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) sowie der *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), beeinflussen die neuronale Transmission, die Funktion verschiedener Ionenkanäle sowie die zelluläre Plastizität. Dies kann wiederum die ASM-Wirksamkeit indirekt modulieren

(LÖSCHER & SCHMIDT, 2006; RUSSO et al., 2012; HODGES & LUGO, 2020; LERCHE, 2020; WANG et al., 2021; RAVIZZA et al., 2024). Neben zellulären Mechanismen können auch abnorme neuronale Netzwerke wesentlich zur Entwicklung einer Therapieresistenz beitragen (*neuronal network hypothesis*) (FANG et al., 2011). Insbesondere bei epileptogenen Arealen wie der Hippocampussklerose führen neuronale Degeneration und synaptische Reorganisation zu einer veränderten Architektur, wodurch die Erreichbarkeit der Zielstrukturen eingeschränkt und die Wirksamkeit von ASMs beeinträchtigt werden kann (FANG et al., 2011; SHORVON & SCHMIDT, 2015; HEINRICH et al., 2018). Genetische und epigenetische Faktoren, wie beispielsweise Polymorphismen in Genen von Zielstrukturen, können zusätzlich die individuelle Reaktion auf ASMs beeinflussen (BRUXEL et al., 2022). Zudem können DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen als epigenetische Faktoren Einfluss auf die Expression von ASM-Zielproteinen und -Transportern nehmen (BAZHANOVA et al., 2021; SHLOBIN & SANDER, 2022). Schließlich leisten neuroinflammatorische Prozesse und der damit einhergehende Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke einen wichtigen Beitrag zur Arzneimittelresistenz. Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 β erhöhen die Expression von Effluxtransportern und beeinträchtigen dadurch die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Beides führt zu einem verminderten ASM-Eintritt in die epileptogenen Regionen (LÖSCHER et al., 2020). Schließlich wird angenommen, dass Pharmakoresistenz nicht auf einzelne Faktoren zurückzuführen ist, sondern dass der Schweregrad der Epilepsie auf einem Kontinuum verläuft und die Komplexität der Erkrankung mit dem Schweregrad der Erkrankung zusammenhängt (*intrinsic severity hypothesis*) (ROGAWSKI & JOHNSON, 2008; ROGAWSKI, 2013).

Zusammenfassend stellt sich die Therapieresistenz als multifaktorielles Phänomen dar, das durch ein komplexes Zusammenspiel molekularer, genetischer, struktureller und inflammatorischer Prozesse gekennzeichnet ist (AUVIN et al., 2023). Aus diesem Grund wurde kürzlich eine Konsolidierung der verschiedenen Hypothesen zu Arzneimittelresistenzen vorgeschlagen, welche sowohl die Transporter- als auch die Target-Hypothesen zusammenführt, aber zusätzlich molekulare, genetische, pharmakokinetische und inflammatorische Aspekte miteinbezieht (AUVIN et al., 2023). Dies verdeutlicht sowohl die Notwendigkeit der Identifizierung neuer Zielstrukturen als auch den Bedarf an multimodalen Therapieansätzen. Solche Ansätze kombinieren verschiedene ASMs, die spezifisch

auf pathophysiologische Mechanismen abzielen, wie die Blockade von Effluxtransportern oder die Integration antiinflammatorischer Strategien (AUVIN et al., 2023). Die Komplexität der Epilepsie erfordert die Berücksichtigung vielfältiger Einflussfaktoren, da sowohl genetische Variationen als auch dynamische Veränderungen neuronaler Netzwerke eine entscheidende Rolle spielen (SCHARFMAN, 2007; JUVALE & CHE HAS, 2021; RASTIN et al., 2023; SAN-JUAN & RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, 2023). Krankheitsmodifizierende Medikamente könnten hier frühzeitig den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen und somit gegebenenfalls auch helfen, Resistenzmechanismen zu überwinden und damit die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen sowie das Risiko für SUDEP und psychiatrische Komorbiditäten zu senken. Zukünftige therapeutische Ansätze sollten auf der gleichzeitigen Modulation mehrerer Signalwege basieren, um die komplexe Pathophysiologie angemessen adressieren zu können (SHLOBIN & SANDER, 2022; AUVIN et al., 2023).

Die Epilepsie bei Hunden und Katzen stellt vor allem aufgrund der häufig auftretenden Pharmakoresistenz eine therapeutische Herausforderung dar. Über einen Zeitraum von ein bis drei Jahren konnten bei Hunden trotz Einsatzes von Standardtherapien mit Phenobarbital und Kaliumbromid nur bei einem geringen Anteil von 15–24 % die Anfälle deutlich reduziert und kontrolliert werden (CHANDLER, 2006; POTSCHKA et al., 2015). Die Ursachen für Pharmakoresistenzen in Hunden und Katzen sind ebenso vielschichtig wie beim Menschen. Einflussfaktoren wie ein verzögerter Therapiebeginn, suboptimale Dosierungen, genetische Prädispositionen, rassespezifische Besonderheiten sowie die Expression von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke können die Wirksamkeit von ASMs erheblich beeinträchtigen (PACKER et al., 2014; BERENDT et al., 2015; LÖSCHER, 2022; POTSCHKA et al., 2023). Clusteranfälle und das Entwickeln eines SE gelten als zusätzliche Risikofaktoren für die Entwicklung von pharmakoresistenten Epilepsien (CHANDLER, 2006; PACKER et al., 2014). Bei Katzen liegt der geschätzte Anteil an Therapieresistenzen mit 20–30 % etwas niedriger als beim Hund (PAKOZDY et al., 2013; PAKOZDY et al., 2014). Jedoch wird die Therapie bei Katzen durch die Anfälligkeit gegenüber Nebenwirkungen und die damit einhergehende enge therapeutische Breite erschwert (MOORE, 2014; PAKOZDY et al., 2014; BAKA & POLIZOPOULOU, 2020).

2 Tiermodelle

Für das Verständnis der Pathophysiologie der Epileptogenese, die Bewertung der Reorganisation von neuronalen Netzwerken, die Entwicklung möglicher neuer Behandlungsstrategien und die Aufklärung von Resistenzmechanismen im chronischen Krankheitsverlauf sind Nagetiermodelle der TLE von größter Bedeutung (GRONE & BARABAN, 2015; BECKER, 2018). Die komplexe Pathologie der Epilepsie hat zu der Entwicklung zahlreicher Tiermodelle geführt. Dabei ist zu beachten, dass kein Modell für sich alle Aspekte der Pathophysiologie vollständig imitieren kann (STEFAN & SCHMITT, 2020). Grundlegend lassen sich die Modelle ausgehend von der Ätiologie der Anfälle in akute und chronische Modelle unterteilen (LÖSCHER, 2017b). Während akute Modelle, die in gesunden naiven Tieren durchgeführt werden, nützlich für die Untersuchung einzelner Anfälle oder des SE sind, können chronische Modelle mehr Aufschluss über die Epileptogenese, die Behandlungsmöglichkeiten von chronischem Anfallsgeschehen und Einblicke in die Mechanismen von Pharmakoresistenzen geben (NIRWAN et al., 2018). Darüber hinaus können die Modelle aber auch anhand ihrer Induktionsmethoden klassifiziert werden. Im Pilocarpin- und Kainat-Modell werden die Anfälle chemisch ausgelöst. Hierfür wird das Chemokonvulsivum entweder systemisch (z.B. intraperitoneal) oder lokal in ein bestimmtes Gehirnnareal (z.B. intrahippocampal) verabreicht. Dies führt zur Ausbildung eines SE, gefolgt von einer Latenzphase und der Entwicklung spontaner wiederkehrender Anfälle (LEITE et al., 2002; GRONE & BARABAN, 2015; VENCESLAS & CORINNE, 2017; JAIN et al., 2021). Stellvertretend für die chemisch induzierten Tiermodelle wird das intrahippocampale Kainat-Modell in **Kapitel II Abschnitt 2.2** vorgestellt. Eine weitere Möglichkeit, epileptische Anfälle zu induzieren, ist die wiederholte elektrische Stimulation bestimmter Gehirnregionen. Dies kann langfristig zu der Ausbildung eines übererregbaren neuronalen Netzwerkes und damit zu einer dauerhaft erhöhten Anfallsanfälligkeit führen (SATO et al., 1990; MCNAMARA et al., 1993). **Kapitel II Abschnitt 2.1** erläutert anhand des Amygdala-Kindling-Modells ein Tiermodell, bei denen Anfälle elektrisch induziert werden. Als thermisches Modell simuliert das *Febrile Seizure*-Modell Fieberkrämpfe im frühen Kindesalter, um zu untersuchen, ob diese zur Entwicklung einer TLE im Erwachsenenalter beitragen können (BARAM et al., 1997). Genetisch modifizierte Mausmodelle ermöglichen außerdem die

Untersuchung epileptischer Erkrankungen, beispielsweise durch Defekte in GABAergen Interneuronen oder Mutationen in Ionenkanal-Genen wie SCN1A (CHEAH et al., 2012; HEDRICH et al., 2014). Transgene Modelle mit regional begrenzter Expression im Hippocampus, wie beispielsweise die konditionale Überexpression von mTOR oder Reelin, erlauben durch die daraus resultierende hippocampale Pathologie eine gezielte Untersuchung molekularer Signalwege (POWELL, 2013; GALANOPOULOU & MOSHÉ, 2015).

Um das translationale Potenzial unterschiedlicher Tiermodelle bewerten zu können, gibt es drei unterschiedliche Validitätskategorien, anhand derer das spezifische Modell beurteilt werden kann. Die augenscheinliche Validität (*face validity*) bezieht sich auf das Ausmaß, in dem ein Modell eine angemessene Darstellung des menschlichen Zustands zu sein scheint. Dies kann sich zum Beispiel anhand vergleichbarer klinischer und elektroenzephalografischer Anzeichen von Anfällen bei Nagern und Menschen zeigen (COENEN & VAN LUIJTELAAR, 2003). Ob ein Modell etablierten neurobiologischen Theorien entspricht, wird mit der Konstruktvalidität (*Construct validity*) bewertet. So spiegelt das WAG/Rij-Rattenmodell für Absence-Epilepsie die zugrunde liegenden Mechanismen des thalamo-cortico-thalamischen Netzwerks wider und gilt daher als konstruktvalide (COENEN & VAN LUIJTELAAR, 2003). Ähnlich lässt sich die posttraumatische Epilepsie nach Schädel-Hirn-Trauma in Tiermodellen abbilden, welche die zugrunde liegenden pathophysiologischen Veränderungen repräsentieren und somit ebenfalls eine hohe Konstruktvalidität aufweisen (PITKÄNEN et al., 2009; BRADY et al., 2019). Um eine hohe Voraussagekraft therapeutischer Effekte (*Predictive validity*) zu erreichen, sollten Tiermodelle ausgewählt werden, die die für die jeweilige Therapie relevanten pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung abbilden (DEPAULIS & HAMELIN, 2015; LÖSCHER, 2016). Die ausgeprägte Heterogenität der TLE erschwert die direkte Übertragbarkeit der einzelnen Modelle und setzt eine kontinuierliche Weiterentwicklung sowie eine kontextspezifische, vergleichende Bewertung der Ergebnisse unterschiedlicher Ansätze voraus (NIRWAN et al., 2018). Nagetiermodelle bieten wertvolle Erkenntnisse über die TLE; ihre Limitationen müssen jedoch im Kontext der Translation präklinischer Forschung in die klinische Anwendung berücksichtigt werden (GRONE & BARABAN, 2015).

2.1 Amygdala-Kindling-Modell

Das Kindling-Modell basiert auf einer wiederholten elektrischen oder chemischen (z. B. Pentylenetetrazol, PTZ) Stimulation eines Gehirnareals, woraufhin sich ein hyperexzitable neuronales Netzwerk ausbildet (GODDARD et al., 1969; POTSCHKA, 2021). Da in der vorliegenden Studie mit elektrischen Stimulationen über die Amygdala gearbeitet wurde, liegt der Fokus im Folgenden auf der Beschreibung dieses elektrischen Modells. Hierbei wird mittels einer implantierten Tiefenelektrode die Amygdala gezielt mit einem elektrischen Impuls stimuliert. Die wiederkehrenden elektrischen Stimulationen führen zu einer progressiven Verstärkung der neuronalen Erregbarkeit und zur Ausbildung eines hyperexzitable neuronalen Netzwerks. Zu Beginn des Kindling-Prozesses treten kurze fokale Anfälle auf, die sich im Verlauf zu generalisierten tonisch-klonischen Anfällen entwickeln (MORIMOTO et al., 2004; POTSCHKA, 2021). Ein wesentlicher Vorteil des Amygdala-Kindling-Modells ist die hohe Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, Anfälle kontrolliert zu induzieren. Diese präzise Steuerbarkeit erlaubt, die molekularen und zellulären Veränderungen in der frühen und späten Phase der Entwicklung des hyperexzitable neuronalen Netzwerks gezielt zu untersuchen (GORTER et al., 2016). So konnte eine veränderte Genexpression nachgewiesen werden, insbesondere bei Regulatoren der G-Protein-Signalgebung und der Calcium-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, die durch den Kindling-Prozess beeinflusst wird (LIANG & SEYFRIED, 2001). Da diese Regulatoren mit Neurotransmittersystemen verknüpft sind, wirkt sich diese Modulation direkt auf die neuronale Erregbarkeit aus. Zusätzlich werden die synaptische Plastizität und die Erregbarkeit durch veränderte synaptische Rezeptoren, vorwiegend NMDA- und GABA-A-Rezeptoren, beeinflusst (EBERT & LÖSCHER, 1999). Auf zellulärer Ebene führen die Stimulationen zur Apoptose neuronaler Populationen und zu reaktiver Gliose, ohne dabei eine ausgeprägte neuronale Degeneration zu verursachen (EBERT & LÖSCHER, 1999). Typische histologische Veränderungen wie *Mossy-Fibre-Sprouting* wurden ebenfalls beobachtet, was auf eine gesteigerte synaptische Konnektivität und Erregbarkeit hinweist (CAVAZOS et al., 1991). Durch die Nachahmung des Entstehungsprozesses eines epileptogenen Gehirns in vollgekindelten Tieren können potenziell translationale Erkenntnisse über krankheitsassoziierte Veränderungen erlangt werden, die den progressiven und kumulativen Charakter der Epileptogenese bei der TLE widerspiegeln können (BECKER, 2018). Bei der Entwicklung neuer Therapien kommt dem Kindling-

Modell eine hohe prädiktive Validität zugute (BERTRAM, 2007; LÖSCHER, 2011). So ermöglicht es die Klassifizierung von Tieren in pharmakosensitive und pharmakoresistente Subgruppen und erlaubt damit die Untersuchung der neuronalen Plastizität, der Reorganisation des Netzwerkes und der Wirkung von Medikamenten auf die Entwicklung pharmakoresistenter Anfälle (REPRESA et al., 1989; LÖSCHER & WHITE, 2023). Die Validität wurde unter anderem durch die erfolgreiche Vorhersage der klinischen Wirksamkeit von Levetiracetam bei dessen Entwicklung bestätigt (LÖSCHER, 2011; LÖSCHER, 2017b, 2017c). Limitierend ist jedoch, dass das Modell möglicherweise nicht die Komplexität einer menschlichen Epilepsie vollständig abbilden kann, da es hier in der Regel nicht zur Ausbildung von spontanen, wiederkehrenden Anfällen kommt (MORIMOTO et al., 2004; LÖSCHER & BRANDT, 2010; LÖSCHER, 2017c).

2.2 Intrahippocampales Kainat-Modell

Das intrahippocampale Kainat-Modell ist ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung der TLE. Kainsäure, ein potentes Neurotoxin, wird dabei entweder lokal (z.B. intrahippocampal) oder systemisch (z.B. intraperitoneal) verabreicht. Im Gegensatz zur systemischen Verabreichung vermeidet die direkte Injektion in den Hippocampus eine systemische Toxizität und beschränkt sich somit auf die Hauptstrukturen der TLE-Pathologie, was die klinische Relevanz erhöht (JAIN et al., 2021). Die Kainsäure bindet an Kainat-Rezeptoren in Regionen des Hippocampus, wo sie als exzitatorischer Agonist wirkt und lokale exzitotoxische Schäden verursacht. Dies führt zu einer neuronalen Übererregbarkeit, die für die Anfallsinduktion entscheidend ist (FALCÓN-MOYA et al., 2018; LI et al., 2021). Die Applikation des Chemokonvulsivums führt damit zur Entwicklung eines nicht-convulsiven SE. Nach dem SE tritt eine Latenzphase ein, die mehrere Tage bis Wochen dauern kann und für die Epileptogenese von zentraler Bedeutung ist (COSTA et al., 2020). Während dieser Zeit kommt es im Hippocampus zu synaptischen Umstrukturierungen, einschließlich *Mossy-Fibre-Sprouting*, Gliose, neuronaler Degeneration, besonders in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus und Entzündungsprozessen, die mit der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten sowie der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine einhergehen (VEZZANI et al., 1999; BOUILLERET et al., 2000; HÄUSSLER et al., 2016). In der Folge entsteht eine spontane wiederkehrende Anfallsaktivität (*spontaneous recurrent seizures*, SRS) (KANDRATAVICIUS et al., 2014; LÉVESQUE et al.,

2016; DUDEK & STALEY, 2017). Diese fokale Läsion imitiert die einseitige Hippocampusschädigung, die typischerweise bei der humanen TLE auftritt. Sie ermöglicht dadurch eine detaillierte Untersuchung der Zusammenhänge zwischen lokaler neuronaler Schädigung, Körnerzelldispersion, abnormer synaptischer Konnektivität, Reorganisation des Netzwerks und der Entstehung einer chronischen Epilepsie (RATTKA et al., 2013; JAIN et al., 2021). Der Kainat-induzierte Insult erzeugt ein Modell, das die klassischen Charakteristika der TLE nachahmt und daher zur Testung von antiepileptogenen und anfallssupprimierenden Substanzen in einem klinisch relevanten Kontext eingesetzt wird (RIBAN et al., 2002). Außerdem entwickeln die Tiere kognitive Defizite, Angstverhalten und depressive Symptome, was die klinische Relevanz zusätzlich erhöht (EPPS & WEINSHENKER, 2013). Das intrahippocampale Kainat-Modell bietet damit eine experimentelle Basis, um strukturelle Veränderungen der TLE des Menschen sowie das pharmakologische Ansprechen und die Mechanismen einer Arzneimittelresistenz zu untersuchen. Dies wird durch die Unempfindlichkeit der Anfälle gegenüber gängigen ASMs, wie z.B. Carbamazepin, unterstrichen (RIBAN et al., 2002; RATTKA et al., 2013; TWELE et al., 2016b; RUSINA et al., 2021). Limitierend kann jedoch die Heterogenität des Schweregrades der induzierten Läsion sein, die in Abhängigkeit von der genauen Injektionsstelle, der Kainat-Dosis und der stammspezifischen Anfälligkeit variiert (RUBIO et al., 2010; TWELE et al., 2016b; RUSINA et al., 2021). Darüber hinaus hängt die Anfälligkeit für die Entwicklung von SE und SRS stark vom Maus-/Rattenstamm und dem Geschlecht der Tiere ab (TWELE et al., 2016a). Dennoch ist das intrahippocampale Kainat-Modell aufgrund seiner hohen *face* und *construct validity* ein unverzichtbares Instrument zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen exzitotoxischer Schädigung, Netzwerkreorganisation und chronischer Anfallsentwicklung (LÉVESQUE et al., 2016).

3 Sigma-1

3.1 Molekularbiologische Eigenschaften und funktionelle Bedeutung

Sigma-1 ist ein multifunktionales, atypisches Rezeptorprotein, das insbesondere bei der Stressreaktion und der Kommunikation zwischen Organellen eine entscheidende Rolle spielt. Charakteristisch für Sigma-1 ist seine membrangebundene Struktur, bestehend aus 223 Aminosäuren und einer

Molekülmasse von etwa 25,3 kDa (HANNER et al., 1996). Sigma-1 besitzt eine Transmembrandomäne, einen zytosolischen N-Terminus und eine hydrophobe C-terminale Region, die für die Verankerung im ER entscheidend ist (SCHMIDT et al., 2016; SHARMA et al., 2021). Sigma-1 kann in verschiedenen oligomeren Formen wie Monomeren, Dimeren und Oligomeren vorliegen, welche entscheidend für die Ligandenbindung und damit die Funktion sind (GROMEK et al., 2014; CHU & RUOHO, 2016). Zwar besitzt Sigma-1 eine Liganden-Bindungsstelle, wodurch eine funktionelle Modulation möglich wäre, jedoch fehlt der für andere Rezeptorfamilien bekannte Transduktionsmechanismus (ARNOLD et al., 2012; CHU & RUOHO, 2016). Sigma-1 ist – anders als zunächst angenommen – kein Opioid-Rezeptor und nicht an G-Proteine gekoppelt (HONG & WERLING, 2000; HAYASHI & SU, 2007). Da sich Sigma-1 demnach nicht eindeutig als Rezeptor oder Protein definieren lässt (KIM, 2017), wird in der vorliegenden Arbeit nur von Sigma-1 gesprochen. Sigma-1 fungiert als Chaperon-Protein. Es befindet sich hauptsächlich an der Mitochondrien-assoziierten Membran (MAM), also an der Schnittstelle zwischen ER und Mitochondrien. Dort ist Sigma-1 über die Interaktion mit einem ER-Chaperon, dem Immunglobulin-Bindungsprotein (*Binding immunoglobulin protein*, BiP) an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Zu diesen Prozessen zählen unter anderem die Regulation der Kalzium-Signalübertragung über den Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor (IP3R), der die Kommunikation zwischen ER und Mitochondrien vermittelt, sowie die Reduktion von oxidativem Stress (HAYASHI & SU, 2007; SU et al., 2010; GOGUADZE et al., 2019; LI et al., 2025). Durch die Transmembranhelix und eine C-terminal-gelegene ligandenbindende Domäne wird die Funktion als ligandenreguliertes Chaperon-Protein ermöglicht (ORTEGA-ROLDAN et al., 2013; CHU & RUOHO, 2016; SCHMIDT et al., 2016). Bei Ligandenbindung durch spezifische Agonisten oder zellulärem Stress kann Sigma-1 von seiner Lokalisation an der MAM in andere Zellkompartimente translozieren (HAYASHI & SU, 2003; SU et al., 2010). Translokationsorte sind zum Beispiel die Plasmamembran, das Zytosol, die Kernhülle oder auch Lipidtröpfchen. Dort interagiert Sigma-1 kontextspezifisch mit verschiedenen Rezeptoren, spannungsabhängigen Ionenkanälen sowie Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren (HAYASHI & SU, 2004; SU et al., 2016b) (siehe **Abbildung 4**).

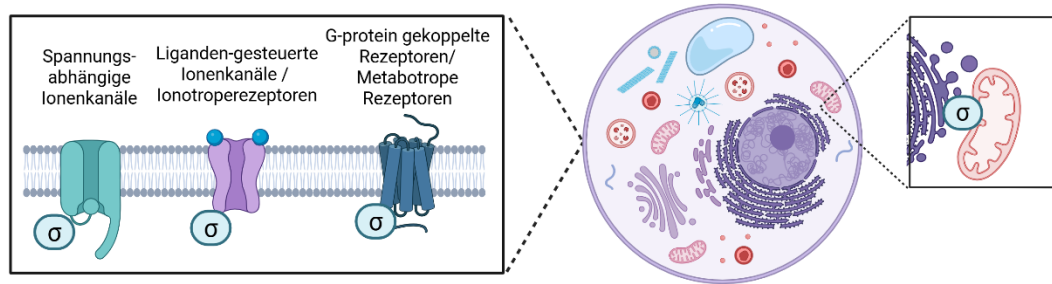


Abbildung 4: Subzelluläre Lokalisation von Sigma-1.

Sigma-1 (σ) ist primär an der MAM, einer Schnittstelle zwischen ER und Mitochondrien, lokalisiert. Nach Ligandenbindung durch spezifische Agonisten oder zellulärem Stress kann Sigma-1 seine Position an der MAM verlassen und in andere Zellkompartimente translozieren, darunter die Plasmamembran. Dort interagiert Sigma-1 mit spannungsabhängigen sowie ligandengesteuerten Ionenkanälen, Rezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und kann dadurch vielfältige zelluläre Signalprozesse modulieren (LACHANCE et al., 2023).

Insbesondere an der Kernmembran kann Sigma-1 über die Modulation von Transkriptionsregulatoren oder durch einen Einfluss auf die Chromatinstruktur die Gentranskription beeinflussen (BENARROCH, 2018; KOPANCHUK et al., 2022; ZHAO et al., 2023). Die ER-Stressreaktion wird reguliert, indem Sigma-1 als Chaperon am MAM den ER-Stresssensor *Inositol-Requiring Enzyme 1* (IRE-1) stabilisiert. Bei zellulärem Stress fördert Sigma-1 die korrekte Faltung und Dimerisierung von IRE-1, wodurch dessen endonukleare Aktivität erhalten bleibt und die stressinduzierte Proteinexpression sowie die Wiederherstellung der Zellhomöostase ermöglicht werden (MORI et al., 2013; HAYASHI, 2019). Durch die Beeinflussung von Zytokinantworten und die Verringerung der Mikrogliaaktivität, besitzt Sigma-1 außerdem immunmodulatorische Eigenschaften (SZABO et al., 2014; MANCUSO & NAVARRO, 2017). Durch diese Funktionen übermittelt Sigma-1 verschiedene überlebensfördernde und antiapoptotische Signalfunktionen und gilt deshalb als multifunktionale Zielstruktur, die für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und Endzündungsprozesse therapeutisch relevant sein kann (KIM, 2017; RYSKAMP et al., 2019; AISHWARYA et al., 2021).

3.2 Zelluläre- und subzelluläre Expression

Sigma-1 ist ubiquitär in verschiedenen Organen und Zelltypen exprimiert. Die Expression wurde unter anderem im Herzen, in der Leber und Milz, im

Gastrointestinaltrakt, in Blutzellen sowie im endokrinen Gewebe nachgewiesen. Sigma-1 wurde ebenfalls in hohen Konzentrationen im zentralen Nervensystem (ZNS) detektiert (KEKUDA et al., 1996; MEI & PASTERNAK, 2001; TSAI et al., 2014). Innerhalb des ZNS ist Sigma-1 in tieferen Schichten des Cortex, im Hippocampus (insbesondere in der Cornu-Ammonis-Region 1 und 3 (CA1, CA3)), im Striatum, im Bulbus olfactorius, in den mesenzephalen Nuclei sowie im Hypothalamus lokalisiert (ALONSO et al., 2000; HAYASHI & SU, 2005). Dort wird Sigma-1 in verschiedenen neuronalen Zellen exprimiert, darunter in Neuronen, Interneuronen, Purkinje-Zellen, Motoneuronen und in sämtlichen Gliazellen (HAYASHI & SU, 2005; MATSUMOTO et al., 2007; LIU et al., 2023). Darüber hinaus wurde Sigma-1 in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, aber auch in reifen Oligodendrozyten gefunden (LIU et al., 2023). Auf subzellulärer Ebene wurde die vorwiegende Lokalisation und Funktion von Sigma-1 an der MAM und die mögliche Translokation bereits in **Kapitel II Abschnitt 3.1** ausgeführt (siehe **Abbildung 4**). In retinalen Neuronen kommt Sigma-1 hauptsächlich in der Kernhülle vor, aber auch in geringem Umfang im ER von Ganglienzellen (MAVLYUTOV et al., 2015b). Außerdem wurde Sigma-1 in lipidreichen Mikrodomänen von Oligodendrozyten nachgewiesen (HAYASHI & SU, 2004). Allerdings gilt es zu beachten, dass die Verteilung je nach Zelltyp und funktionellem Zustand variiert. Diese zelltypspezifische Lokalisation unterstreicht die vielseitige und kontextabhängige Funktion von Sigma-1.

3.3 Sigma-1 als potenzielle Zielstruktur pharmakologischer Therapieansätze

Sigma-1 spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion, insbesondere unter zellulärem Stress und in Wechselwirkung mit verschiedenen Liganden. Durch seine homöostatische Wirkung besitzt Sigma-1 das Potenzial, als therapeutisch relevante Zielstruktur für Interventionen bei unterschiedlichen Erkrankungen genutzt zu werden (HAYASHI, 2019). Studien mit Sigma-1-Knockout (KO)-Tieren liefern wichtige Einblicke in die physiologischen und pathologischen Funktionen von Sigma-1. Während zunächst keine offensichtlichen pathologischen Veränderungen beobachtet wurden, entwickelten Sigma-1-KO-Mäuse im Alter kognitive, psychiatrische, kardiale und motorische Defizite (SABINO et al., 2009; MAVLYUTOV et al., 2015a; RAMAKRISHNAN et al., 2015; ABDULLAH et al., 2018; CASTANY et al., 2018; COULY et al., 2022). Die Studien verdeutlichten,

dass der Verlust oder die Dysfunktion von Sigma-1 zu einem progressiveren Krankheitsverlauf führt (NGUYEN et al., 2017; SMITH, 2017). Diese Befunde unterstreichen die funktionelle Relevanz von Sigma-1 und stützen seine Rolle als potenzielle therapeutische Zielstruktur für unterschiedliche Krankheitsbilder (NGUYEN et al., 2017; SMITH, 2017).

Aus diesem Grund wird Sigma-1 im Kontext verschiedenster Organsysteme außerhalb des zentralen Nervensystems wie beispielsweise diabetischer Nierenerkrankungen, Herzmuskelerkrankungen und Augenerkrankungen untersucht (GAO et al., 2018; SMITH et al., 2018; BALOGH et al., 2024). Darüber hinaus wurde berichtet, dass sich Sigma-1 als potenzielle Zielstruktur für Erkrankungen des Zentralnervensystems, z.B. für Depressionen und Angstzustände, eignen könnte, da Agonisten eine antidepressive Wirkung haben, indem sie Neuroinflammation unterdrücken und Neurotransmitter regulieren (SAŁACIAK & PYTKA, 2022; WANG et al., 2022). Im Rahmen der Alzheimerforschung wurde festgestellt, dass Sigma-1 eine zentrale Rolle bei neurodegenerativen Prozessen spielt (JIN et al., 2015). In präklinischen Modellen der Amyloid- β -Toxizität verbesserte die pharmakologische Aktivierung von Sigma-1 die synaptische Plastizität. Zudem wurden kognitive Defizite und Lernstörungen abgeschwächt (MAURICE & GOGUADZE, 2017; DJEBARI et al., 2025). Basierend auf diesen Erkenntnissen befindet sich der Sigma-1-Ligand ANAVEX®2-73 (Blarcamesine) in klinischen Studien der Phase II und III zur Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Demenz. Zusammenfassend konnte bei positiver Modulation der Krankheitsverlauf in den jeweiligen Modellen verlangsamt werden (NGUYEN et al., 2017; SMITH, 2017).

Auch im Rahmen anfallssupprimierender Ansätze wurde Sigma-1 als therapeutisches Target untersucht. Mehrere Studien belegen, dass eine pharmakologische Modulation von Sigma-1 die Anfallsaktivität beeinflussen kann (VAVERS et al., 2023). In verschiedenen präklinischen Modellen, insbesondere in akuten, chemisch oder elektrisch induzierten Anfallsmodellen, zeigte sich eine antikonvulsive Wirkung durch allosterische Sigma-1-Modulatoren (SHIN et al., 2005; COBOS et al., 2008; GUO et al., 2015; VAVERS et al., 2019). So führte die Behandlung mit dem Sigma-1-Antagonisten NE-100 zu einer Senkung der Anfallsschwelle, während der positive allosterische Modulator E1R eine

antikonvulsive Wirkung zeigte (VAVERS et al., 2017). Die antikonvulsiven Effekte von E1R wurden zunächst in akuten, chemisch induzierten Anfallsmodellen in gesunden, nicht epileptischen Tieren untersucht. Die Aussagekraft hinsichtlich der Wirksamkeit in epileptischen Gehirnen ist daher begrenzt. In einem chronischen PTZ-Kindling-Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass E1R sowohl die Schwere der Anfälle verringerte als auch den Beginn generalisierter Anfallsaktivität verzögerte (VAVERS et al., 2017). In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden der selektive Sigma-1-Agonist E1R und Fenfluramin im Kindling- und intrahippocampalen Kainat-Modell untersucht. Fenfluramin entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über das serotonerge System, indem es die Freisetzung von Serotonin fördert und serotonerge Rezeptoren moduliert. Darüber hinaus wird ein zusätzlicher Wirkmechanismus über Sigma-1-Rezeptoren postuliert, dessen genauer Beitrag jedoch noch unklar ist. E1R zeigte im Kindling-Modell eine dosisabhängige antikonvulsive Wirkung. Im intrahippocampalen Kainat-Modell führte Fenfluramin zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Anfallsfrequenz als auch der Anfallsdauer (PÉREZ-PÉREZ et al., 2024). Die Wirksamkeit beider Substanzen erwies sich als modell- und dosisabhängig (PÉREZ-PÉREZ et al., 2024). Darüber hinaus wurde die Wirkung von Fenfluramin als positiver Modulator von Sigma-1-Rezeptoren auch im Zusammenhang mit Entwicklungs- und epileptischen Enzephalopathien (*Developmental and Epileptic Encephalopathies*, DEE) untersucht. Dabei zeigte sich, dass Fenfluramin nicht nur die Anfallshäufigkeit reduziert, sondern darüber hinaus zentrale exekutive Funktionen, darunter kognitive Kontrolle, Entscheidungsfindung und die Regulation zielgerichteten Verhaltens, bei Patienten und Patientinnen mit Dravet- und Lennox-Gastaut-Syndrom positiv beeinflussen kann (MARTIN et al., 2021). Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Sigma-1 einen Einfluss auf die Anfallsaktivität nehmen kann und ein Ansatzpunkt für zukünftige Therapien sein könnte (SMITH, 2017). Allerdings bedarf der relative Beitrag der Wirkung von Fenfluramin über Sigma-1 noch weiterführender Untersuchungen.

III ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

Sigma-1 ist ein multifunktionales, atypisches Rezeptorprotein, das eine zentrale Rolle bei zellulären Stressreaktionen sowie bei der Kommunikation zwischen Organellen spielt. Insbesondere unter zellulärem Stress beteiligt sich Sigma-1 an Signalübertragungsprozessen und trägt sowohl durch seine Chaperon-Funktion als auch durch die Interaktion mit spannungsabhängigen Ionenkanälen und Neurotransmitterrezeptoren wesentlich zur Regulation der zellulären Homöostase bei. Diese Eigenschaften machen Sigma-1 zu einer vielversprechenden Zielstruktur für die Epilepsitherapie. Krankheitsbedingte Veränderungen und die damit verbundene Regulation pharmakologischer Zielstrukturen können die Wirksamkeit medikamentöser Therapien beeinträchtigen, indem sie die Expression dieser Zielstrukturen modulieren. Dies kann eine unterschiedliche individuelle Wirksamkeit der Therapie bedingen. In der Entwicklung neuer Therapiestrategien ist es daher von entscheidender Bedeutung zu analysieren, ob die Expression von Sigma-1 in verschiedenen Phasen der Krankheitsentwicklung und -manifestation reguliert wird und vor allem erhalten bleibt.

Aus diesem Ansatz ergeben sich folgende Hypothesen für die vorliegende Studie:

- Die Sigma-1-Expression bleibt während der Epileptogenese und nach der Epilepsiemanifestation erhalten.
- Wiederkehrende epileptische Anfälle, die Epileptogenese und die Manifestation der Epilepsie beeinflussen das Expressionsniveau von Sigma-1.

Um unterschiedliche Phasen der Erkrankung darstellen zu können, wurden zwei chronische Mausmodelle der TLE verwendet. Das Amygdala-Kindling-Modell stellt ein etabliertes und validiertes Epilepsiemodell dar, welches sich zur Untersuchung der Mechanismen während der Ausbildung eines hyperexzitablen neuronalen Netzwerkes eignet und in der Erforschung neuer ASMs häufig Anwendung findet. Das intrahippocampale Kainat-Modell wird hingegen besonders zur Untersuchung der Wirksamkeit bei schwierig behandelbaren oder pharmakoresistenten Epilepsien sowie zur Analyse ausgeprägter neuropathologischer Veränderungen verwendet. In diesen Modellen wurde die Expression von Sigma-1 umfassend auf zellulärer, Protein- und Messenger-RNA-(mRNA)-Ebene mittels Immunhistochemie (IHC) und quantitativer Echtzeit-

Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) erfasst und mit Kontrollgruppen verglichen. Die qualitative und quantitative Analyse ermöglicht eine Einschätzung, ob und in welchem Umfang eine Regulation der Sigma-1-Expression erfolgt. Zudem liefert sie Hinweise auf mögliche Unterschiede im Expressionsniveau, die eine Einteilung der Tiere hinsichtlich ihres unterschiedlichen Ansprechverhaltens in der chronischen Phase nahelegen könnten.

IV MATERIAL UND METHODEN

1 Labormethoden, *in vivo*

1.1 Studiendesign

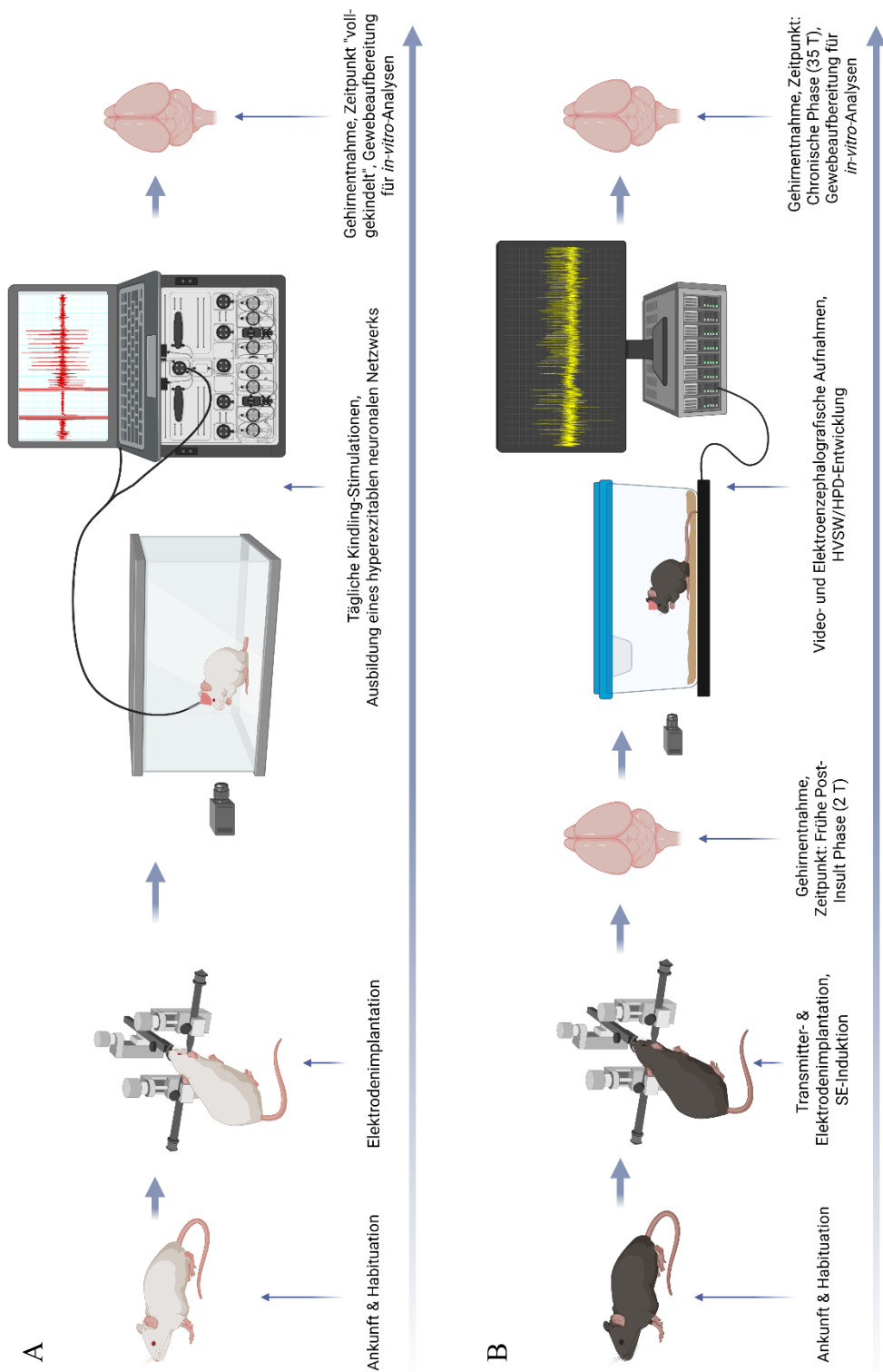


Abbildung 5: In-vivo-Studiendesign für das Amygdala-Kindling-Modell (A) und das intrahippocampale Kainat-Modell (B). Erstellt mit Biorender.

Im Amygdala-Kindling-Modell (siehe **Abbildung 5 A**) erfolgte nach Ankunft und Habituation der weiblichen NMRI-Mäuse ($n = 28$) die Implantation einer Tiefenelektrode in die rechte Amygdala. Anschließend durchliefen die Tiere eine zweiwöchige Rekonvaleszenzphase. Daraufhin wurde bei den Tieren, die elektrische Stimulationen erhielten ($n = 12$), die initiale Nachentladungsschwelle bestimmt. Zur Induktion eines hyperexzitablen neuronalen Netzwerks fanden anschließend tägliche, überschwellige Kindling-Stimulationen statt. Nach dem Auftreten von insgesamt zehn generalisierten Anfällen galten die Tiere als „voll gekindelt“, und erneut wurde die individuelle Nachentladungsschwelle bis zum Auftreten eines generalisierten Anfalls (Racine Stadium 4-5) bestimmt. Die Kontrollgruppe wurde identisch behandelt, erhielt jedoch eine Scheinstimulation ($n = 12$). Sechzig Minuten nach dem letzten induzierten generalisierten Anfall wurden die Tiere euthanasiert und perfundiert. Nach der Euthanasie wurden die Gehirne für die immunhistochemischen Untersuchungen aufbereitet. Der korrekte Sitz der Stimulations- und Ableitungselektrode in der Amygdala wurde mikroskopisch an Thionin-gefärbten Gehirnschnitten überprüft. **Abbildung 6** stellt die zeitabhängige Exklusion von Versuchstieren im Ablauf des Amygdala-Kindling-Experimentes dar.

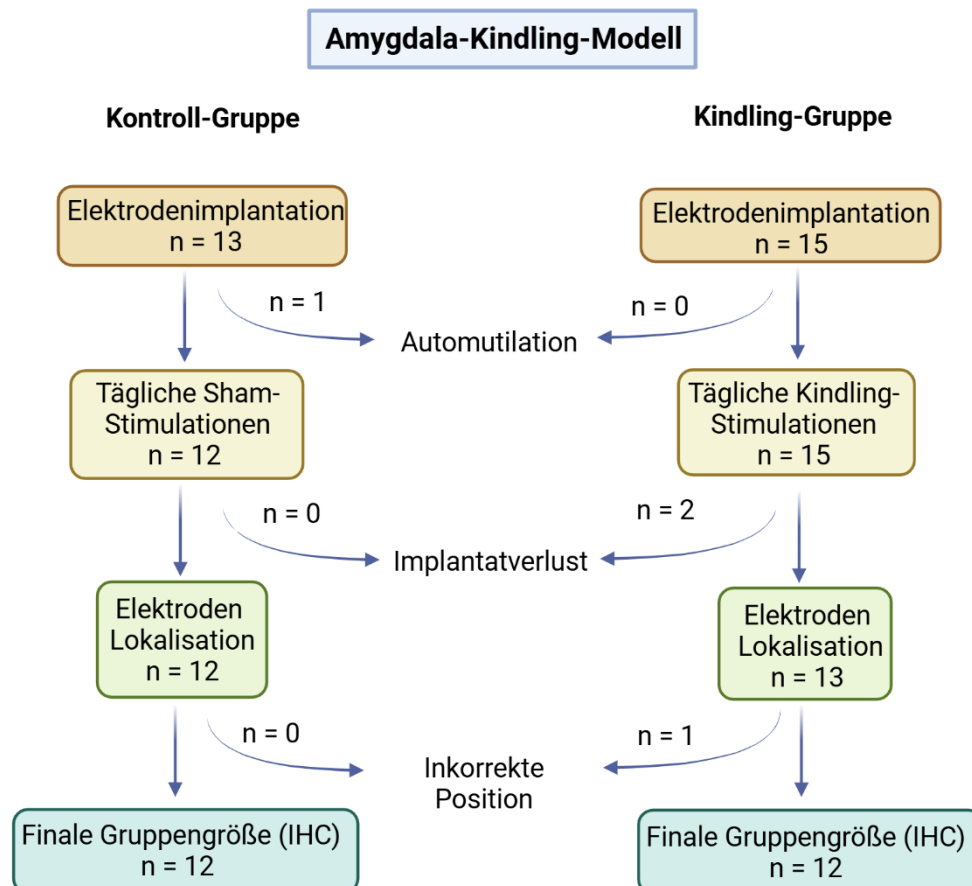


Abbildung 6: Darstellung der Ausschlussrate von Versuchstieren im zeitlichen Verlauf des Amygdala-Kindling-Modells.

Erstellt mit Biorender.

Im intrahippocampalen Kainat-Modell erhielten männliche C57BL/6JRj-Mäuse ($n = 117$) nach einer Habituationsphase eine Kainat-Injektion in die CA1-Region des Hippocampus, wodurch ein nicht-convulsiver SE induziert wurde (siehe **Abbildung 5 B**). In dieselbe Region wurde eine Tiefenelektrode implantiert. Außerdem wurde ein Transmitter subkutan zwischen den Schulterblättern eingesetzt. Dadurch konnte die Anfallsaktivität sowohl elektroenzephalografisch als auch per Video erfasst werden. Die Kontrollgruppe (für qPCR und IHC jeweils $n = 24$) erhielt eine Kochsalz-Injektion in den Hippocampus sowie eine Elektrodenimplantation. Zwei Tage nach Induktion des SE wurde die erste Versuchsgruppe euthanasiert und perfundiert (für qPCR und IHC jeweils $n = 24$). Die zweite Gruppe wurde nach der Entwicklung elektroenzephalografischer Anfälle (*high-voltage sharp waves* (HVSW) und *hippocampal paroxysmal discharges* (HPD)) nach 35 Tagen euthanasiert und perfundiert (für IHC und qPCR jeweils $n = 24$). Die Gehirne der Mäuse, die für die qPCR-Analyse vorgesehen waren, wurden nativ entnommen und unmittelbar eingefroren, um die mRNA-Integrität zu gewährleisten. **Abbildung 7** enthält eine Darstellung der im Ablauf des intrahippocampalen Kainat-Modells erfolgten Tierexklusionen unter Berücksichtigung vorab definierter Ausschlusskriterien.

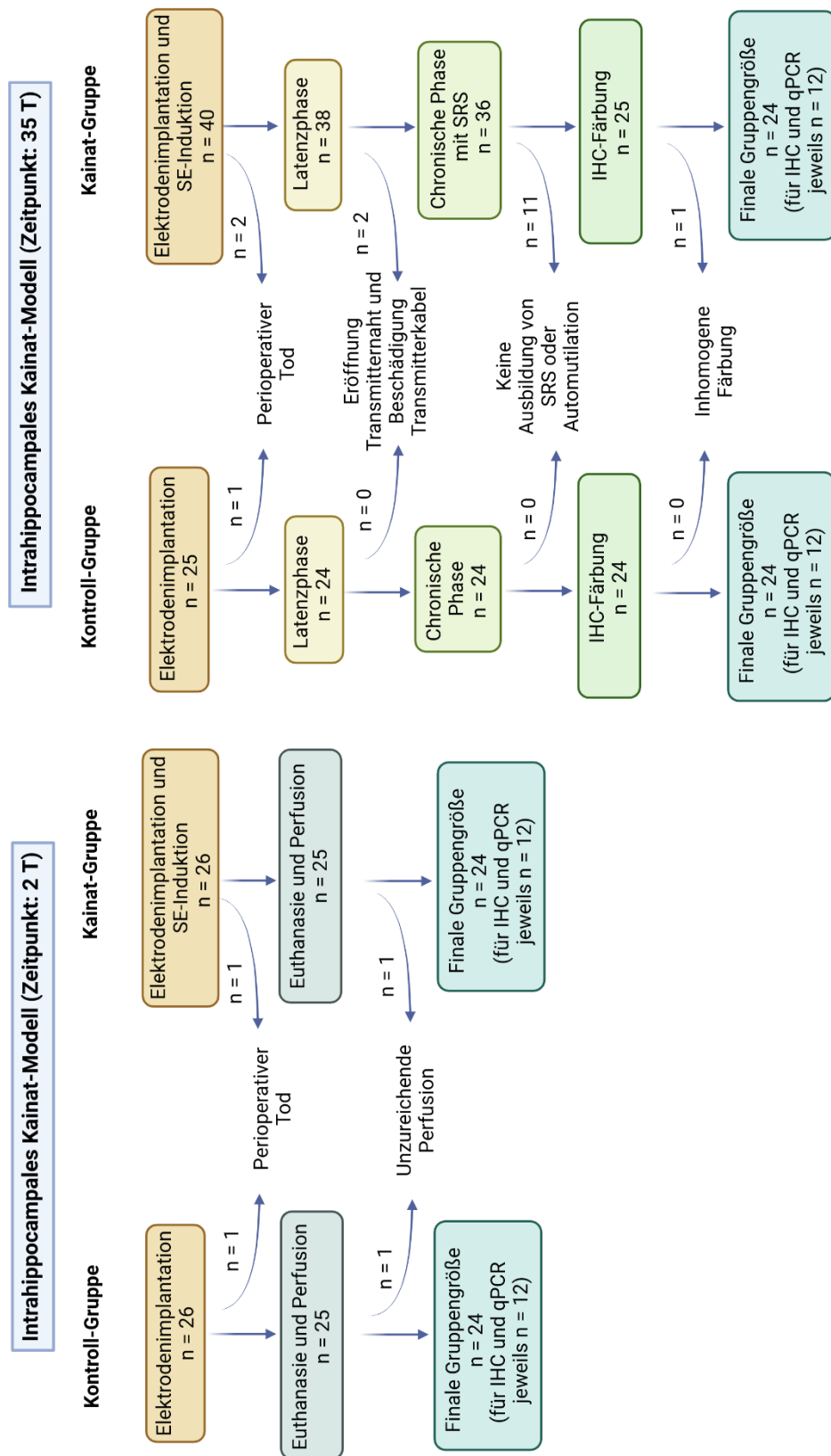


Abbildung 7: Grafische Übersicht über die im Verlauf des intra-hippocampalen-Kainat-Modells erfolgte Exklusion von Versuchstieren aufgrund definierter Ausschlusskriterien. Erstellt mit Biorender.

1.2 Versuchstiere

Zur Durchführung des intrahippocampalen Kainat-Modells wurden neun Wochen alte männliche C57BL/6JRj-Mäuse ($n = 117$; Gewicht: $24,15 \text{ g} \pm 2,95 \text{ g}$; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) nach ihrer Ankunft in Typ-III-Makrolon-Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland) eingesetzt. Aufgrund früherer Studien, die Rangordnungskämpfe bei der Gruppenhaltung männlicher Tiere dokumentierten, erfolgte eine präventive Einzelhaltung, um aggressionsbedingte Verletzungen zu vermeiden. Acht Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse ($n = 28$; Gewicht: $29,55 \pm 5,75 \text{ g}$; Inotiv, West Lafayette, USA) wurden für das Amygdala-Kindling-Modell bis zum operativen Eingriff in Gruppen von vier Tieren pro Käfig untergebracht. Alle Käfige waren mit Holzschnitzeleinstreu (SAFE® Select, J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co KG, Rosenberg, Deutschland), einem Tunnel aus Plastik (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland), einem Maushaus (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) und als weiteres Enrichment einem Baumwollnestlet (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) sowie einem unbehandelten Holzstäbchen (Labodia, Yens, Schweiz) ausgestattet. Außerdem stand den Tieren Futter (Ssniff R/M Haltung, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Alle Tiere wurden in standardisierten Tierhaltungsräumen bei einer konstanten Temperatur von $22 \pm 2 \text{ °C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10 \text{ %}$ gehalten, wobei die Hellphase des 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus von 06:00-18:00 Uhr (Mitteleuropäische Sommerzeit) bzw. 05:00-17:00 Uhr (Mitteleuropäische Winterzeit) andauerte. Einmal in der Woche wurden die Tiere in einen frischen Käfig verbracht. Die Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Täglich wurden die Mäuse in Augenschein genommen und anhand von tierindividuellen Bewertungsbögen (*Scoresheets*) während der Tierversuchsphasen beurteilt. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet_02-20-99 und ROB-55.2-2532.Vet_02-22-44). Die Ergebnisse wurden gemäß der ARRIVE-Empfehlung 2.0 (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) verarbeitet und dargestellt (PERCIE DU SERT et al., 2020). Zur Sicherstellung einer standardisierten und reproduzierbaren Versuchsdurchführung erfolgten alle *in-vivo*-Experimente im Einklang mit den Richtlinien des EQUIPD-Qualitätsmanagements (<https://go-equipd.org/>).

1.3 Amygdala-Kindling-Modell

1.3.1 Operativer Eingriff

Nach einer mindestens zwölf Tage andauernden Akklimatisierungsphase wurden die weiblichen NMRI-Mäuse für die Tiefenelektrodenimplantation vorbereitet. Um das gegenseitige Manipulieren der chirurgischen Wunde zu vermeiden, wurden die weiblichen Mäuse postoperativ ebenfalls einzeln gehalten. Zur perioperativen Schmerztherapie wurde ein multimodales Analgesie-Konzept durchgeführt, welches Buprenorphin (0,05 mg/kg, s.c., Buprenovet® Multidose, 0,3 mg/ml; Elanco Animal Health, Indiana, USA), Meloxicam (5 mg/kg s.c., Metacam® 0,5 % Injektionslösung; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) sowie das Lokalanästhetikum Bupivacain mit Epinephrin (8 mg/kg, s.c., Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 %, Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland, 1:2 verdünnt mit 0,9 % Kochsalzlösung) beinhaltete. Buprenorphin und Metacam wurden 30 Minuten vor der Narkoseeinleitung mit 4 % Isofluran (Isofluran CP, CP-Pharma Handelsgesellschaft, Burgdorf, Deutschland) injiziert, während das Bupivacain mit Epinephrin erst nach der Narkoseeinleitung, 15 Minuten vor der ersten Inzision, appliziert wurde. Während des gesamten operativen Eingriffs war der Schädel in einem Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) fixiert. Die Tiere befanden sich während des Eingriffs sowie in der Aufwachphase auf einer Wärmematte, um eine physiologische Körpertemperatur zu gewährleisten. Die Narkosetiefe wurde in regelmäßigen Abständen überprüft, indem der Zwischenzehenreflex getestet wurde. Unter Erhaltungsnarkose mit 2 % Isofluran, nach Bestimmung der Koordinate des cranialen Kreuzungspunktes der Schädelnähte (Bregma), wurden vier Trepanationsbohrlöcher mit einem Spiral-Bohrer (Durchmesser 1,0 und 1,2 mm, Fischer Goldschmiedebedarf, Pforzheim, Deutschland) in die Schädeldecke gebohrt. Bevor die Implantation der Tiefenelektrode in die rechte Amygdala (bipolar, Edelstahl, teflonisoliert; hauseigene Anfertigung) erfolgte, wurden Befestigungsschrauben (cranial, lateral und caudal relativ zur Elektrode; (BN 650, M 1,2 x 2, Schrauben Preisinger GmbH, München, Deutschland) zur späteren Fixierung der Elektrode eingesetzt (siehe **Abbildung 8**). Die Implantation der Tiefenelektrode erfolgte anhand der folgenden stereotaktischen Koordinaten relativ zu Bregma:

- anteroposterior/craniocaudal: - 1,0 mm
- lateral: + 3,2 mm
- dorsoventral: - 5,2 mm

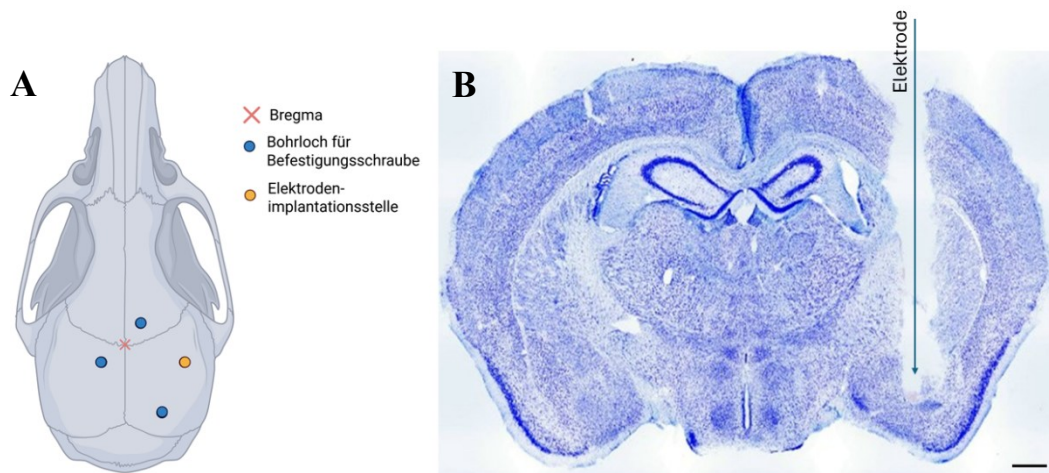


Abbildung 8: Lokalisation der Bohrlöcher (A) und des Elektrodenkanals mit Sitz der Elektrodenspitze in der Amygdala (B).

(A) Dorsale Aufsicht auf die geschlossene Schädeldecke einer Maus. Markiert ist der craniale Kreuzungspunkt der Schädelnähte (Bregma), anhand dessen die Position des Bohrlochs und die spätere Elektrodenimplantation bestimmt wurde. Außerdem ist die Lokalisation der Bohrlöcher für die Befestigungsschrauben eingezeichnet. (B) Koronarschnitt durch ein Mausgehirn, der den Elektrodenkanal und die Implantation der Elektrodenspitze in der rechten Amygdala zeigt. Thioninfärbung, Maßstab: 100 µm. Abbildung erstellt mit Biorender.

Die Elektrode bestand aus zwei elektrisch isolierten Drähten (Durchmesser: jeweils 280 µm), die miteinander verdreht waren (Umdrehungen: 8, Länge: 15 mm). Durch die beiden Drähte wurde zum einen die elektrische Stimulation in die Amygdala geführt und anschließend das Signal abgeleitet. Um ein stabiles Messsignal zu erhalten, wurde der Erdungsdraht der Elektrode um die laterale Schraube gewickelt. Elektrode und Schrauben wurden mit dem Prothesenreparaturkunststoff Paladur® (Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet und so auf der Schädeldecke stabilisiert und dauerhaft befestigt. Der Hautschnitt wurde cranial und caudal vom Implantat mit Einzelknopfnähten (Surgicryl® Monofilament USP 5/0 EP 1, SMI AG, St. Vith, Belgien) verschlossen. Postoperativ erhielten alle Tiere eine vorgewärmte Ringer-Lactat-Lösung (RiLac, 10 ml/kg, s.c., B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) sowie eine analgetische Behandlung mit Meloxicam, welche einmal täglich alle 24 h über weitere drei Tage nach dem Eingriff subkutan verabreicht wurde.

1.3.2 Amygdala-Kindling

Am Ende der zweiwöchigen Regenerationsphase nach der Elektrodenimplantation wurden die Tiere randomisiert entweder der Versuchsgruppe (Kindling-Gruppe, $n=12$) oder der Kontrollgruppe ($n = 12$) zugeteilt (einfache Randomisierung, R Version 4.1.1, R Core Team, 2021). Die Kontrollgruppe erhielt Scheinstimulationen. Die Übereinstimmung zwischen eingestellter und tatsächlich abgegebener Stromstärke der Kindling-Apparatur wurde vor Versuchsbeginn und wöchentlich überprüft. Der Kindling-Prozess begann anschließend mit der Bestimmung der individuellen initialen Nachentladungsschwellen (*initial afterdischarge threshold*, initial ADT). Hierfür wurden die Tiere in ein Glasaquarium gesetzt und die implantierte Elektrode über ein Kabel mit einer Stimulationseinheit (HSE Type 215 E12 SV1, Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) verbunden. Eine zwischengeschaltete, hauseigen hergestellte Switch-Box ermöglichte die Umschaltung zwischen dem Stimulationsimpuls und der Ableitung des Elektroenzephalogramms (EEG), sodass beide Funktionen über dieselbe Elektrode ausgeführt werden konnten. Außerdem wurde das EEG-Signal über einen Amplifikator und einen Analog-Digital-Wandler (BioAmp und PowerLab 4/30, ADInstruments LTD., Hastings, UK) verstärkt. Das EEG wurde unter Nutzung der LabChart Software (ADInstruments LTD., Hastings, UK) digital dargestellt. Die Bestimmung der initialen ADT erfolgte, indem die Kindling-Tiere über ein Kabel sukzessive steigende Stromimpulse erhielten. Jede Stimulation wurde mit einem monophasischen Rechteckimpuls mit einer Frequenz von 50 Hz über eine Dauer von $\sim 0,8$ Sekunden durchgeführt. Die erste Stimulation erfolgte mit einer Stromstärke von 8 μA und wurde bei jedem weiteren Impuls um 20 % erhöht. Die Stimulationen erfolgten alle 60 Sekunden, bis die definierte Nachentladungsschwelle (*afterdischarge threshold*, ADT) erreicht war. Die ADT bezeichnet die Stromstärke in μA , die erforderlich ist, um im EEG ein Anfalls-Muster auszulösen, das als erste elektroenzephalografische Entladung in Form von Spikes mit einer hohen Amplitude und Frequenz mit einer Minstdauer von fünf Sekunden beobachtet wurde. Die Amplitude muss dabei mindestens das Zweifache der EEG-Basallinie erreichen. Das elektroenzephalographische Muster kann von motorischer Anfallsaktivität begleitet sein, die initial meist fokal auftritt. Die Dauer dieser Aktivität wird vom Stimulationsbeginn bis zum Ende beobachtbarer Verhaltensänderungen erfasst und muss mindestens fünf Sekunden betragen. Das Verhalten der Tiere wurde parallel per Video (GoPro, Inc., San Mateo, USA)

dokumentiert. Während jeder elektrischen Stimulation wurden Anfallsparameter wie die Anfallsschwere (*seizure severity*, SS) nach RACINE (1972), die motorische Anfallsdauer (*seizure duration*, SD) sowie die Dauer der elektroenzephalografischen Nachentladungen (*after discharge duration*, ADD) erfasst (siehe **Tabelle 1**)

Anfallsschwere	Anfallsmerkmale
0	Elektroenzephalografische Nachentladungen ohne sichtbare motorische Anfallsaktivität.
1	Immobilität und schwacher Fazialklonus (stereotypes Schnüffeln, rhythmisches Schließen des Auges auf der ipsilateralen Seite der Elektrode, Vibrieren der Vibrissen).
2	Starker Fazialklonus (rhythmisches Kopfnicken, rhythmische Kaubewegungen).
3	Unilateraler Klonus der Vordergliedmaße auf der ipsilateralen Seite der Elektrode.
4	Bilateraler Klonus der Vorderextremitäten ohne/mit Aufbäumen, ohne Verlust des Stehvermögens.
5	Bilateraler Klonus der Vorder- und Hinterextremitäten mit Aufbäumen, generalisierter tonisch-klonischer Anfall, Verlust des Stehvermögens.

Tabelle 1: Stadien zur Einteilung der Anfallsschwere und der Anfallsmerkmale im Kindling-Modell.

Modifiziert nach RACINE (1972)

Gegen Ende des EEG-Anfallsmusters konnte in manchen Fällen eine Änderung, zum Beispiel ein abrupter Abfall der Amplitude, festgestellt werden. Dann wurden die Zeit ab Ende des Impulses bis zur ersten Änderung als ADD1 und die Gesamtdauer der Nachentladung als ADD2 definiert (siehe **Abbildung 9**). Nach Bestimmung der individuellen initialen ADT erfolgte an fünf Tagen pro Woche (Montag bis Freitag, 8:00–10:00 Uhr) jeweils eine einmalige überschwellige Stimulation der Tiere mit 700 μA . Mit der zunehmenden Anzahl der elektrischen Stimulationen stiegen Anfallsschwere und -dauer. Dies wurde so lange fortgesetzt, bis jedes Tier zehn generalisierte Anfälle (Stadium 4 oder 5 nach Racine) entwickelte. Dadurch bildete sich ein hyperexzitables Netzwerk aus. Die Mäuse galten dann als „voll-gekindelt“.

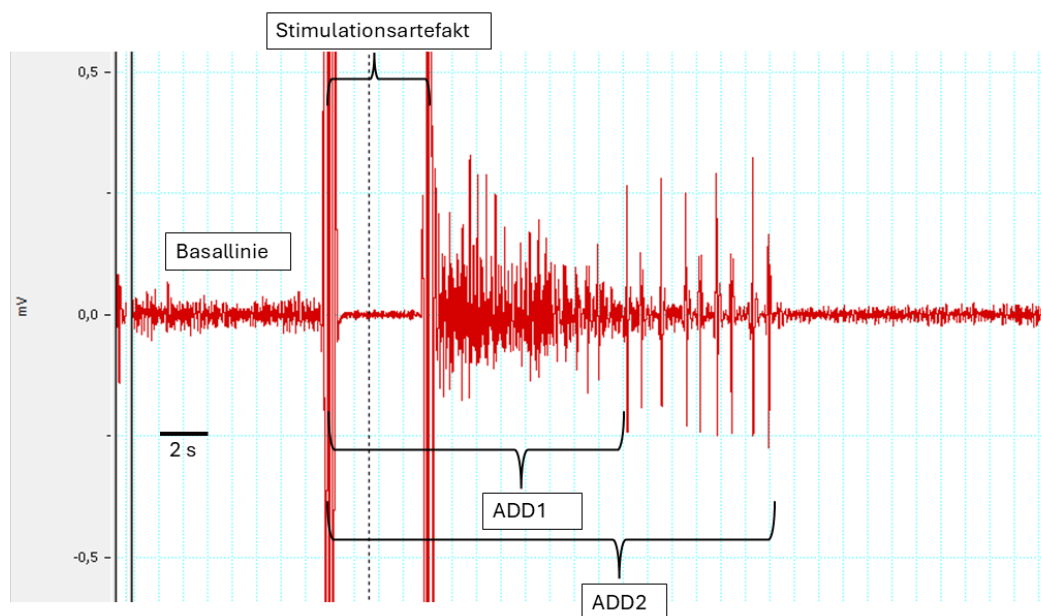


Abbildung 9: Anfalls-assoziiertes EEG im Amygdala-Kindling-Modell.

Abgebildet ist eine anfalls-assoziierte Nachentladung. Die Basallinie wird durch die elektrische Stimulation unterbrochen. Nach einem Stimulationsartefakt von etwa 3–4 Sekunden tritt ein charakteristisches Anfallsmuster auf, das durch eine abrupte Frequenzänderung eine Unterscheidung zwischen den Phasen ADD1 und ADD2 zulässt.

Die zehn generalisierten Anfälle mussten hierbei nicht zwingend an direkt aufeinanderfolgenden Tagen aufgetreten sein. Am darauffolgenden Tag wurde die Anfallsschwelle erneut bestimmt, an welcher das Tier eine generalisierte motorische Anfallsaktivität (*post generalized seizure threshold*, Post GST) mit sichtbarer EEG-Aktivität zeigte. Die Schwelle wurde wie die initiale ADT in

Intervallen von 60 Sekunden mit schrittweiser Erhöhung der Stromstärke bestimmt. Zeigte ein Tier einen fokalen Anfall, verbunden mit einer feststellbaren EEG-Anfallsaktivität (*post afterdischarge threshold*, Post ADT), wurde die Stimulation fortgeführt, bis ein generalisierter Anfall mit elektrografischer Anfallsaktivität auftrat. Die Tiere aus der Kontroll-Gruppe wurden jeweils einem Kindling-Tier zugeordnet und parallel während der täglichen Stimulationen für die gleiche Dauer an ein Kabel angeschlossen und in ein nebenstehendes Aquarium gesetzt. Diese Tiere erhielten jedoch keine Stimulationen. Sechzig Minuten nach Bestimmung der Post GST, wurden die Kindling-Tiere mit ihren jeweils zugeordneten Kontroll-Tieren mit Pentobarbital (600 mg/kg, i.p., Narkodorm® 182,3 mg/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) euthanasiert. Mindestens 30 Minuten vor der Euthanasie erfolgte eine analgetische Vorbehandlung mit Metamizol (100 mg/kg, 1:10 verdünnt in 0,2%iger Saccharinlösung, Vetalgin®, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland).

1.4 Intrahippocampales Kainat-Modell

1.4.1 Operativer Eingriff

Während der Eingewöhnungszeit von sieben Tagen wurden die Tiere randomisiert entweder der Versuchsgruppe (Kainat-Gruppe, n = 24), oder der Kontrollgruppe (n = 24) zugeordnet (R Version 4.1.1, einfache Randomisierung). Vor und nach dem operativen Eingriff erfolgte die Behandlung der Tiere entsprechend dem in **Kapitel IV, Abschnitt 1.3.1** beschriebenen Analgesie-Konzept. Die Tiere der Kainat-behandelten Gruppe erhielten zudem eine lokale Betäubung der Inzisionsstelle im Bereich der Schulterblätter für die Transmitterimplantation. Hierfür wurde Bupivacain ohne Epinephrin (8 mg/kg, s.c., Bupivacain 0,5 %, Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland 1:2 verdünnt mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung) verwendet. Für die Allgemeinanästhesie wurde Chloralhydrat (500 mg/kg i. p., Chloralhydrat, Emprove essential Ph. Eur., Merck KGaA, von VWR, International GmbH, Ismaning, Deutschland), gelöst in Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % ad us. vet., B. Braun Melsungen, Deutschland), verwendet. Die Wahl dieses Anästhetikums basiert auf Studien, die zeigen, dass die Isoflurananästhesie die Induktion und die Schwere des SE in diesem Modell modulieren kann (TWELE et al., 2016a). Wie zuvor beschrieben, war der Schädel der Tiere während der gesamten Prozedur in einem Stereotakten eingespannt.

Außerdem wurde die Narkosetiefe regelmäßig überprüft und gegebenenfalls Chloralhydrat (1/6 der Initialdosis, i.p.) nachdosiert. Der Telemetriesender (ETA F10, Data Sciences International, St. Paul, USA) wurde den Tieren der Kainat-Gruppe subkutan im Bereich der Schulterblätter implantiert. Nachdem Bregma definiert wurde, Trepanationslöcher gebohrt und Befestigungsschrauben eingebracht wurden, wurde Kainsäure (50 nl einer 20 mM Lösung, d. h. 0,21 μg in 50 nL Kochsalzlösung, entsprechend 1 nmol, Kainsäure-Monohydrat, K0250, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) über eine Minute hinweg langsam mithilfe einer Mikroinjektionskanüle (0,5 μl , SGE Analytical Science, über VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland) in die CA1-Region des rechten Hippocampus injiziert, um einen nicht-convulsiven SE auszulösen (siehe **Abbildung 10**). Hierfür wurden folgende Koordinaten relativ zu Bregma verwendet:

- Anteroposterior/craniocaudal: -1.5 mm
- lateral: +2,0 mm
- dorsoventral: -2.0 mm

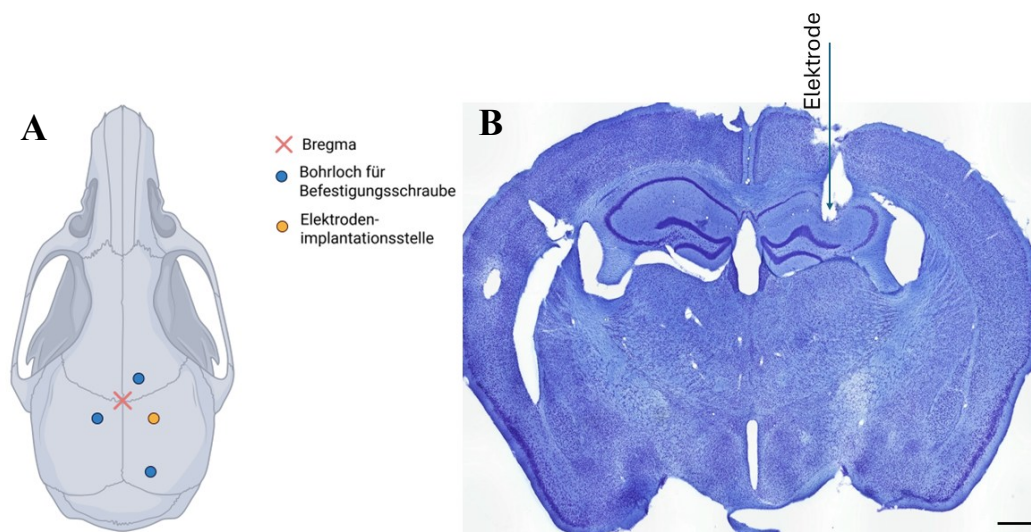


Abbildung 10: Position der Bohrlöcher (A) und des Elektrodenkanals mit tiefstem Punkt der Elektrode in der CA1-Region des Hippocampus (B).

(A) Dorsale Aufsicht auf die geschlossene Schädeldecke einer Maus mit Bregma-Markierung, welche als Referenzpunkt zur Bestimmung sowohl der Injektionsstelle für die Kainat- oder Vehikel-Lösung als auch der Lokalisation der Elektrodenimplantation diente. Außerdem wird die Position der Bohrlöcher für die Befestigungsschrauben dargestellt. (B) Koronarschnitt durch das Gehirn einer Maus, der den Elektrodenkanal und die Platzierung der Elektroden Spitze in der rechten CA1-Region des Hippocampus zeigt. Thioninfärbung, Maßstab 100 μm .

Abbildung erstellt mit Biorender.

Die Kontrolltiere erhielten anstelle der Kainsäure eine Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 % ad us. vet, B. Braun Melsungen, Deutschland). Damit sowohl Kainsäure als auch die Natriumchlorid-Lösung an der Injektionsstelle in die CA1-Region des Hippocampus diffundierten, verblieb die Kanüle, vor und nach der einminütigen Applikationsphase, zwei Minuten an der Injektionsstelle. Anschließend wurde bei allen Tieren eine Tiefenelektrode (Umdrehungen: 8, Länge 12 mm) implantiert, wobei dieselben Koordinaten wie für die vorherige Kainat/NaCl-Applikation verwendet wurden. Die Elektrodenspitze wurde dabei gezielt in der CA1-Region positioniert. Zur Übertragung des elektroenzephalografischen Signals wurde ein Transmitterkabel an dem rechten Draht der Elektrode befestigt, während das Erdungskabel des Transmitters um die caudale Schraube gewickelt wurde. Elektrode, Kabel und Schrauben wurden mit Zahnzement befestigt und die Haut mit resorbierbarem Nahtmaterial zugenäht. Zusätzlich wurde die Transmitternaht mithilfe eines Hautklebers verschlossen. Anschließend wurde den Tieren eine vorgewärmte Ringer-Lactat-Lösung verabreicht. Die postoperative Schmerzbehandlung mit Meloxicam erfolgte an den drei darauffolgenden Tagen für die Tiere des Aktenzeichens AZ-02-20-99 einmal täglich alle 24 h und für die Tiere des Aktenzeichens AZ-02-22-44 zweimal täglich alle 12 h, beginnend am Abend des operativen Eingriffs, ebenfalls für 3 weitere Tage anschließend an den operativen Eingriff. Zusätzlich zur analgetischen Versorgung erhielten die Tiere eine hochenergetische Standarddiät (Dietgel76A, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Bei starkem Gewichtsverlust wurde den Tieren zudem eine Glucoselösung (10 %) angeboten und gegebenenfalls eine Ringer-Lactat-Lösung als Depot subkutan injiziert. Die Gehirnentnahme erfolgte zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. In der frühen Post-Insult-Phase wurden jeweils 12 Tiere aus der Kainat- und Kontrollgruppe individuell genau zwei Tage nach Induktion des SE euthanasiert. Die zweite Gruppe wurde in der chronischen Phase 35 Tage nach der Induktion des SE eingeschläfert und anschließend das Gehirngewebe entnommen und entsprechend der weiteren Probenverarbeitung aufbereitet. Die Euthanasie erfolgte mit Pentobarbital, nachdem die Tiere 30 Minuten zuvor mit Metamizol analgetisch vorbehandelt worden waren.

1.4.2 Elektroenzephalografische Analyse

Nach dem operativen Eingriff wurden die Mäuse in ihren Käfigen auf die Receiverplatten (RPC-1, Data Sciences International, St. Paul, USA) gestellt, welche über eine Matrix (MX 2.0, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) verfügen. Ein angeschlossener Switch (Cisco Small Business Switch, Data Science International, St. Paul, MN, USA) übertrug die gesammelten EEG-Signale auf einen Aufzeichnungscomputer. Motorische Anfälle und das Verhalten der Tiere wurden durch Videoaufnahmen (Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) bestätigt. Die Tiere wurden 48 Stunden postoperativ mittels Video- und EEG-Monitoring überwacht, um den SE vollständig zu erfassen. Die Video- und EEG-Aufnahmen in der chronischen Phase erfolgten ab Tag 20 nach der Operation (jeweils Mittwoch, Freitag und Montag für 24 Stunden), um die elektroenzephalografische Anfallsaktivität zu detektieren. Der letzte Aufzeichnungstag war der 35. Tag. An diesem Tag wurden die Tiere in randomisierter Reihenfolge euthanasiert. Das EEG-Signal wurde mithilfe der Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St. Paul, USA) mit einer Aufzeichnungsrate von 1000 Hz erfasst. Für die Analyse wurden die tierindividuellen EEG-Aufnahmen mithilfe der NeuroScore TM Software v.3.3.1 (Data Sciences International, St. Paul, USA) in ein EDF-Format umgewandelt und mit dem EDFbrowser (Version 1.95, Delft, Niederlande) analysiert. Vor der visuellen EEG-Auswertung wurden ein Bandpassfilter (1–70 Hz) und ein Notch Filter (50 Hz) angewendet. Die Entwicklung von SE und SRS wurde durch Video- und EEG-Aufzeichnungen bestätigt. Elektroenzephalografisch war der SE durch das Vorhandensein von kontinuierlichen, regelmäßigen isolierten Spikes, Spike- und Wellen-Komplexen und Polyspikes gekennzeichnet. Diese Muster wurden häufig von Verhaltensauffälligkeiten wie Erstarren, leichten klonischen Bewegungen der Vordergliedmaßen, stereotypen Bewegungen (wie z.B. Drehung um die eigene Achse) oder generalisierten tonisch-klonischen Anfällen begleitet. Zwischen drei unterschiedlichen epileptiformen EEG-Mustern wurde unterschieden: scharfe Hochspannungswellen (*high-voltage sharp waves*, HVSW), hippocampale paroxysmale Entladungen (*Hippocampal Paroxysmal Discharges*, HPDs) und generalisierte Anfälle (TWELE et al., 2016b) (siehe **Tabelle 2**).

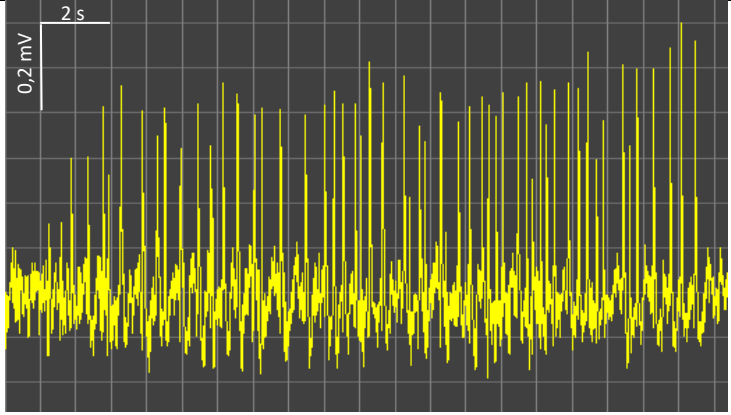
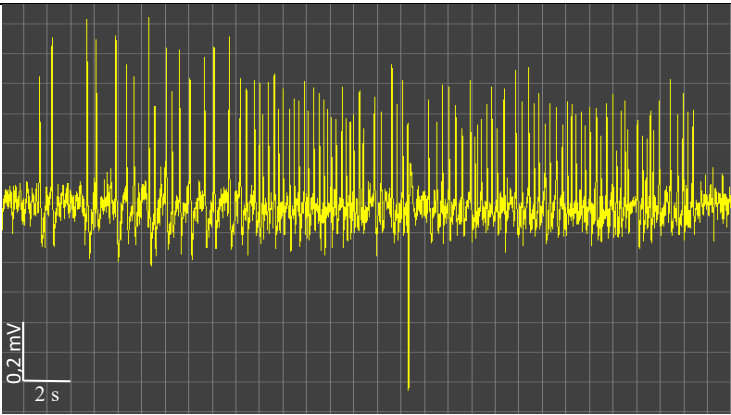
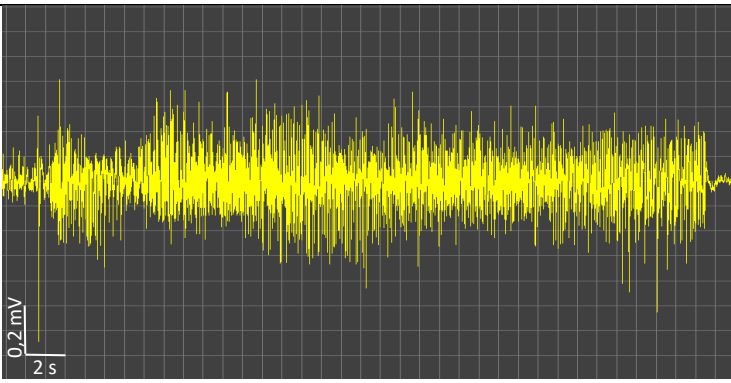
Anfallsmuster	Beispiel
HVSW	
HPD	
Generalisierte Anfallsaktivität	

Tabelle 2: Darstellung der unterschiedlichen Anfallsmuster im EEG.

HVSWs sind durch eine mindestens dreifache Erhöhung der Amplitude gegenüber der Basallinie sowie eine Frequenz von mindestens 2 Hz charakterisiert. Dieses Muster musste eine Minstdauer von 5 Sekunden aufweisen und durch ein Intereventintervall von mindestens drei Sekunden getrennt sein. **HPD:** Der erste Teil der Definition der HPD entspricht dem der HVSW. Im zweiten Teil erfolgt eine Frequenzsteigerung auf mindestens 5 Hz bei gleichzeitig reduzierter Amplitude, die jedoch immer noch mindestens die doppelte Basallinien-Amplitude beträgt. Auch dieser zweite Teil des EEG-Musters musste mindestens fünf

Sekunden andauern. Eine **generalisierte Anfallsaktivität** stellte sich durch sehr hohe Amplituden und eine hohe Frequenz im EEG dar. Die Frequenz überschreitet hierbei 10 Hz, während die Amplitude mindestens das Dreifache der Basallinie beträgt. Diese Anfälle wurden zusätzlich durch Videoaufnahmen bestätigt. An drei Wochentagen (Montag, Mittwoch und Freitag) wurden die Tiere jeweils über 24 Stunden kontinuierlich telemetrisch und videobasiert überwacht, um das Auftreten von SRS zu erfassen.

2 Labormethoden, *in vitro*

2.1 Gewebeaufbereitung

Wie in **Kapitel IV Abschnitten 1.3.2** und **1.4.1** ausführlich beschrieben, erfolgte zunächst die Euthanasie der Tiere nach definierten Zeitpunkten. Nach dem Atemstillstand wurde der Brustkorb mit einer scharfen Schere eröffnet und die transkardiale Perfusion durchgeführt. Hierfür wurde die linke Herzkammer mit einer stumpfen Injektionsnadel (20 Gauge $\times$ 1½ Zoll (0,9 $\times$ 40 mm)) welche über einen Schlauch mit einer Pumpe (hauseigene Herstellung) verbunden war, punktiert, worüber die darauffolgenden zwei Minuten das Blut mithilfe von 0,01 mol/l phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, in NaCl gelöst, pH 7,4) aus dem Körperkreislauf gespült wurde. Der Abfluss des Perfusats erfolgte durch Eröffnung des rechten Herzhohes. Nachfolgend wurde eiskühles 4 % Paraformaldehyd (PFA, granuliert, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) über die Pumpe verabreicht und so das Gewebe vorfixiert. Nach der Entnahme wurde das Gehirngewebe 24 Stunden in 4 % PFA nachfixiert und danach in eine 30 % Saccharoselösung überführt. Zur Aufblockung der Gehirne wurde ein Aufblockmedium (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) verwendet. 40 μ m dicke Koronalschnitte wurden mit einem Kryostaten (CM3050 S, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) in Zehnerserien innerhalb der Koordinaten nach FRANKLIN and PAXINOS (2019): +1,69 mm bis -4,03 mm relativ zu Bregma geschnitten und anschließend bei -20 °C in einer Kälteschutzlösung (Mischung aus Ethylenglykol, 98 % Glycerin und 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und destilliertem Wasser) bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Das für die qPCR verwendete Gehirngewebe wurde nach der Euthanasie innerhalb von zwei Minuten nativ aus dem Schädel entnommen und anschließend

eingefroren. Hierfür wurde der Boden eines zylindrischen Edelstahlbehälters, gefüllt mit 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Dieser befand sich in einem Dewar-Gefäß (KGW Isotherm GmbH, Meckenheim, Deutschland), wodurch der Behälter heruntergekühlt wurde. Das entnommene Gehirn wurde in einem kleinen, mit Alufolie ausgekleideten Zellsieb (Cell Strainer, Falcon®, Corning Life Sciences, Corning, USA) für fünf Sekunden in das 2-Methylbutan vollständig eingetaucht und somit eingefroren. Die Gehirne wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

2.2 Validierung der Spezifität von Sigma-1-Antikörpern mittels Immunhistochemie

Aufgrund der Verfügbarkeit mehrerer kommerziell erhältlicher Sigma-1-Antikörper (siehe **Tabelle 3**) wurde die Spezifität verschiedener Sigma-1-Antikörper unter Verwendung eines standardisierten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbeprotokolls untersucht und die Expressionsmuster in Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Mäusen überprüft. Es ist zu berücksichtigen, dass die Bezeichnung „Antikörperspezifität“ stets im Kontext der jeweils eingesetzten experimentellen Methode und des angewandten Protokolls zu verstehen ist. Im Folgenden bezieht sich der Begriff daher nicht auf eine methodenunabhängige Bindungseigenschaft des Antikörpers, sondern auf die unter den beschriebenen Bedingungen beobachtete Verlässlichkeit und Selektivität der Antikörperbindung. Gehirngewebe homozygoter Sig1R-Knockout-Mäuse dient hierbei als Negativkontrolle, welche somit eine Validierung der Antikörperspezifität in dieser Färbemethode ermöglicht. Dazu wurden freischwimmende Gehirnschnitte von drei WT- und drei Sigma-1-KO-Mäusen fünf Minuten lang in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit 0,1 % Tween20 (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland, TBST) gewaschen. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung durch eine 30-minütige Inkubation in Natriumcitrat (pH 6) in einem 80 °C warmen Wasserbad. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal in TBST für jeweils 5 Minuten gewaschen und dann 90 Minuten lang in einem Blockpuffer (UltraCruz®, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren und die Spezifität der Antikörperbindung zu verbessern. Das Gewebe wurde über Nacht (24 Stunden, 4 °C) mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe **Tabelle 3**) behandelt. Eine Negativkontrolle wurde nicht mit einem primären

Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten vier weitere Waschschriffe in TBST. Die Gehirnschnitte wurden in der Folge mit dem korrespondierenden biotinylierten Sekundärantikörper (siehe **Tabelle 3**) für 60 Minuten inkubiert. Nach vier weiteren Waschschriffen in TBST wurde endogene Peroxidaseaktivität mit 3 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (aus 30 % H_2O_2 , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelöst in TBST für 15 Minuten bei Raumtemperatur unterdrückt. Vor und nach der 60-minütigen Inkubation mit einem ABC-Kit (1:100, P-400, Vector Laboratories, Burlingame, USA) in TBS, wurden die Gehirnschnitte dreimal vor und einmal danach in TBST gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschriffe in TBS. Die Schnitte wurden anschließend eine Minute lang in einer DAB-Lösung, hergestellt aus DAB-Puffer-Tabletten (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und angereichert mit 40 μl einer 3 % H_2O_2 -Lösung, inkubiert, um die Sigma-1 Antigene zu visualisieren. Die Reaktion wurde durch das Spülen mit doppelt destilliertem Wasser gestoppt. Nach weiteren drei Waschschriffen, wurden die Gehirnschnitte mithilfe von Chromgelatine, bestehend aus Gelatine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), deionisiertem Wasser, Kaliumchrom(III)-sulfat-Dodecahydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Thymol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), auf Objektträger aufgezogen und mit Entellan® (Rapid Mounting Medium for Microscopy, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

	Antikörper/ Bestellnummer	Host	Hersteller	LOT- Nummer	Verdün- -nung
Primäre Sigma-1- Antikörper	HPA024071, polyklonal	Rabbit	Atlas	14093	1:200
	HPA018002, polyklonal	Rabbit		14183	1:200
	ab53852, polyklonal	Rabbit	Abcam	GR3366732- 1	1:150
	ab253192, monoklonal	Rabbit		GR3272871- 7	1:150
	GTX115389, polyklonal	Rabbit	GeneTex	44343	1:750

	Bs-5111R, polyklonal	Rabbit	Bioss	WC3226257	1:200
	61994S, monoklonal	Rabbit	Cell Signaling	1	1:250
	N727	Rabbit	AG Ammer (Hauseigene Herstellung)		1:50
	N728	Rabbit	AG Ammer (Hauseigene Herstellung)		1:1000
	N6229	Rabbit	AG Ammer (Hauseigene Herstellung)		1:500
	MABN390, monoclonal	Rat	Merck	3482788	1:100
	sc-137075, monoklonal	Mouse	Santa Cruz	J3119	1:50
Sekundäre Antikörper	Gt α Rb BA-1000	Goat	Vector	ZF0430	1:800
	Gt α RT SAB700566	Goat	Sigma/Aldrich e	RI31714	1:800
	Gt α Ms BA-9200	Goat	Vector	ZG1216	1:800

Tabelle 3: Auflistung der getesteten primären Sigma-1-Antikörper und sekundären Antikörper.

2.3 Validierung der Spezifität von Sigma-1-Antikörpern mittels Western Blot

Die Probenaufbereitung unterscheidet sich für immunhistochemische und Western Blot Analysen deutlich. Dies kann gegebenenfalls dazu führen, dass das nachzuweisende Protein in unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Daher wurde im Rahmen der Validierung zusätzlich die spezifische Antikörperbindung

mittels Western Blot geprüft. Die Untersuchung erfolgte ebenfalls sowohl an WT- als auch an KO-Proben (jeweils $n = 3$). Dies ermöglicht es, eine Aussage darüber zu treffen, ob der verwendete Antikörper am gewünschten Epitop bindet. Hierfür wurde das Gehirngewebe nach der Probenentnahme zunächst gewogen. Anschließend wurde das Gewebe in Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer, bestehend aus doppelt destilliertem Wasser, 1 M Tris-HCl (pH 7,4-7,5), 5 M NaCl, 10 % Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Proteaseinhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) unter Verwendung eines Ultra-Turrax (Kinematica Homogenizer PT 10-35, Kinematica AG, Luzern, Schweiz) homogenisiert. Der Puffer diene der Öffnung der Zellmembranen, wodurch Proteine, DNA und Zell-Organellen im Lysat gelöst wurden. Der Proteaseinhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verhindert die Protein-Degradierung während der Extraktion. Danach wurde das Homogenisat drei Minuten auf Eis inkubiert, nachfolgend zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zur Proteinquantifizierung wurde das Pierce™ BCA-Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt und unter Verwendung des RIPA-Puffers und des Albumin-Standards eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Um die Arbeitsreagenzien herzustellen, wurden BCA Reagent A mit BCA Reagent B (Pierce™ BCA-Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Verhältnis 50:1 vermengt. Anschließend wurden die Standards und die Proben in eine Mikroplatte mit der Arbeitslösung pipettiert, für 30 Sekunden auf eine Schüttelplatte gestellt und anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption mit einem ELISA-Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 562 Nanometern sowie die Berechnung der Proteinmenge. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden Gele mit einem Zweischichtsystem hergestellt: einem Stapelgel (4 %), um die Proteine auszurichten, und einem Trenngel (10 %), um sie nach Molekulargewicht aufzutrennen. Die Gelkomponenten des Trenngels, Polyacrylamid (ROTIPHORESE® Gel 30, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Trennpuffer, 10 % Ammoniumpersulfat, Wasser und TEMED (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden vermischt und in die Gelplatten gegossen. Anschließend wurde Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Deutschland) auf die Oberfläche gegeben, um eine gleichmäßige Geloberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation (ca. 20 Minuten) wurde das Stapelgel mit einer niedrigen Acrylamidkonzentration von 4 % auf das Trenngel aufgetragen. Die Proben wurden durch die Zugabe von Laemmli-Puffer und 0,1 % SDS vorbereitet. Anschließend wurden die Proben zehn Minuten lang bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, indem zunächst ein Proteinmarker (Roti Mark Tricolor, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend die Proben in die Vertiefungen des Gels gegeben wurden. Nach Befüllen der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer wurde die Elektrophorese bei einer Gleichspannung von 80 V durchgeführt, bis die Proben das Stapelgel verließen (ca. 30-40 min). Die Spannung wurde dann auf 100 V erhöht, um die Auftrennung der Proteine im Trenngel fortzusetzen (ca. 2 h). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) übertragen. Die Membran wurde zur Aktivierung 15 s in Methanol inkubiert und daraufhin 20–30 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer äquilibriert. Ein Transfer-Sandwich wurde mit dem Gel, der Membran, der aktivierten PVDF-Membran, den Filterpapieren und den Faserkissen zusammengesetzt, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren. Der Blot erfolgte bei 80 Volt für 1 Stunde und 20 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran zur Kontrolle des Proteintransfers für wenige Minuten mit Ponceau S (Ponceau S-Färbelösung, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefärbt. Dazu wurde die Membran mit der Ponceau S-Lösung bedeckt und vorsichtig geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nachfolgend wurde die Färbung durch wiederholtes Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt, gefolgt von einem abschließenden Waschschrift in TBST. Anschließend wurde die Membran mit der geblotteten Seite nach oben in TBST überführt und gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindung wurde sie eine Stunde lang mit ROTI®Block (1:10 verdünnt in TBST, Th. Geyer, Renningen, Deutschland) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (siehe **Tabelle 4**). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen und mit einem sekundären Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP)-konjugierten Antikörper (siehe **Tabelle 4**) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den letzten Waschvorgängen wurde das Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA) zur Chemilumineszenz-Detektion (*enhanced chemiluminescence* (ECL)-Detektion) für 2 Minuten aufgetragen und das Signal mit einem Fusion Imaging (Fusion SL, Vilber, Collégien, Frankreich) aufgenommen. Um die Membran erneut zu testen, wurde sie zunächst für 10 Minuten in TBST gewaschen, anschließend für 30 Minuten bei 37 °C in Stripping-Puffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) inkubiert und danach erneut in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde lang in ROTI®Block (1:10 in TBST) geblockt und für dieselbe Zeit bei Raumtemperatur mit einem Antikörper gegen die Ladekontrolle β -Tubulin inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte abschließend die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und die ECL-Detektion (siehe **Tabelle 4**).

	Anti-körper/ Bestell- nummer	Herstell er	LOT- Nummer	Ver- dünnung	Verdün- nungs- mittel
Primäre Antikörper	BS-5111R, polyklonal	Bioss	YA3800263 B	1:500	ROTI Block 1:10 in TBST
	ab53852, polyklonal	Abcam	GR3341811- 3	1:125	
	ab253192, monoklonal	Abcam	GR3341811- 8	1:1000	
	HPA024071, polyklonal	Atlas	14093	1:500	
	HPA018002, polyklonal	Atlas	14183	1:1000	
	GTX115389, polyklonal	Genetex	44343	1:500	
	MABN390, monoklonal	Sigma- Aldrich	3482788	1:1000	

	sc-137075, monoklonal	SantaCr uz	J3119	1:500	
	#61994, monoklonal	Cell signalin g	1	1:1000	
	AG Ammer 727	AG Ammer (Hausei gene Herstell ung)	---	1:2000	
	GTX115389, polyklonal	Genetex	44343	1:500	
	β -Tubulin MA5- 16308, monoklonal	Thermo Fisher Scientifi c	XG349243	1:5000	TBST
Sekundäre Antikörper	Ziege gegen Kaninchen, ab97080	Abcam	GR3342713- 2	1:10.000	TBST
	Ziege gegen Kaninchen, ab97080	Abcam	GR3342713- 2	1:20.000	
	Ziege gegen Ratte, 112-035- 167	Jackson/ Biozol	156218	1:10.000	
	Ziege gegen Maus, 112-035- 062	Jackson/ Biozol	156325	1:10.000	

Tabelle 4: Auflistung der für den Western Blot verwendeten primären Sigma-1 und sekundäre Antikörper.

2.4 Immunhistochemische Detektion von Sigma-1

Zur Analyse der Expression von Sigma-1 in bestimmten Gehirnarealen, die mit der Iktogenese, Epileptogenese oder krankheitsbedingten pathologischen Veränderungen in Zusammenhang stehen, wurde eine Sigma-1-spezifische DAB-Detektion durchgeführt. Die Validierung der Spezifität der unterschiedlichen Sigma-1 Antikörper ergab, dass keiner der kommerziell erworbenen Antikörper mit dem oben beschriebenen Protokoll spezifische Expressionsmuster in den Wildtypen ergab. Die erneute Literaturrecherche führte zu einem Protokoll nach Liu et al., welches unter anderem unter Verwendung einer 1 % SDS-Lösung (1 % SDS, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in TBS für den Antigen-Retrieval ein spezifisches Expressionsmuster in einer Immunfluoreszenz-Detektion zeigte (LIU et al., 2023). Für die immunhistochemische Detektion mittels DAB wurde daher das ursprüngliche Protokoll angepasst und der Antikörper (HPA018002, Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden) verwendet. Mit diesen Anpassungen konnte eine spezifische Bindung des Antikörpers am Sigma-1 Antigen erfolgreich nachgewiesen werden. Diese Schnitte wurden sowohl für die stereologische Zellzählung als auch für die Ermittlung der optischen Dichte und der gemessenen Fläche mithilfe der Open-Source-Software ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012) verwendet. Zu diesem Zweck wurden die freischwimmenden Schnitte dreimal für fünf Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde das Antigen-Retrieval für 10 Minuten in einer 1 % SDS-Lösung in TBS durchgeführt. Nach drei Waschschritten in TBST wurden die Schnitte in einer Lösung aus 0,5 % TritonX100 und 1 % Fischgelatine (Biotium, Fremont, CA, USA) in TBS geblockt. Der Sigma-1-spezifische Primärantikörper (1:200, HPA018002, Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden) wurde über Nacht (24 Stunden bei 4 °C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden drei Waschschriffe in TBST durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend 90 Minuten lang mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (1:800, BA-1000, Vector Laboratories, Newark, USA) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBST wurde die endogene Peroxidase mit 3 % H₂O₂, gelöst in TBS, 15 Minuten lang bei Raumtemperatur blockiert. Vor und nach der 60-minütigen Inkubation mit einem ABC-Kit in TBS (1:100, P-400, Vector Laboratories, Newark, USA) wurden die Gehirnschnitte zuvor viermal und danach zweimal in TBST gewaschen. Danach folgten zwei Waschschriffe in TBS. Die Schnitte sind anschließend eine Minute lang in der DAB-Lösung inkubiert worden,

bevor die Reaktion durch das Spülen mit doppelt destilliertem Wasser gestoppt wurde. Eine Negativkontrolle durchlief mit Ausnahme der Inkubation mit dem Primärantikörper die gleichen Arbeitsschritte. Dadurch konnten falsch positive Signale ausgeschlossen und die endogene Enzymaktivität abgeschätzt werden. Anschließend wurden die Gehirnschnitte mit Chromgelatine auf Objektträger aufgezogen und mithilfe von Entellan® eingedeckt.

Um die Lokalisation der Elektroden in der Amygdala und der CA1-Region des Hippocampus zu bestätigen, wurden zwei Serien miteinander kombiniert und für eine Färbung mit Thioninacetat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet (siehe **Abbildung 8 und 10**). Hierfür wurden die zuvor auf Objektträger aufgezogenen Gehirne durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, indem sie jeweils drei Minuten in 50 %, 70 %, 95 % und 100 % Ethanol eingetaucht wurden. Nach einer Spülung in destilliertem Wasser für weitere drei Minuten wurden die Schnitte für 20 Sekunden in Thionin belassen und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe erneut mit jeweils drei Minuten in 100 %, 95 % und 70 % Ethanol rehydriert. Abschließend wurden die Schnitte in Xylol geklärt und mit Entellan® eingedeckt.

2.5 Bestimmung der optischen Dichte und der markierten Fläche Sigma-1-positiver Zellen

Für die *Threshold*-basierte Messung der optischen Dichte (OD) und der markierten Fläche (%) der Sigma-1-Expression wurde die Open Source Software ImageJ (imagej.nih.gov/ij/) verwendet. Zur Festlegung geeigneter Euthanasiezeitpunkte wurden in einer Vorstudie die optische Dichte sowie die markierte Fläche in unterschiedlichen Arealen (parietaler Cortex, piriformer Cortex, CA3-Region und Hilus des Hippocampus) analysiert. Hierzu wurden jeweils zwei Kainat-behandelte Tiere pro Zeitpunkt (24 h und 48 h nach SE-Induktion) mit einem Kontroll-Tier verglichen, das ebenfalls 48 h nach Elektrodenimplantation euthanasiert wurde. Im Kindling-Modell erfolgte die zeitliche Bestimmung anhand von jeweils drei Tieren, die zu den Zeitpunkten 1 h, 6 h und 24 h nach Post GST-Bestimmung untersucht wurden. Die höchsten Messwerte für optische Dichte und markierte Fläche in den untersuchten Gehirnarealen wurden jeweils 48 Stunden nach SE-Induktion sowie 1 Stunde nach der Post-GST-Bestimmung erhoben. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden in der Hauptstudie diese beiden Zeitpunkte für die Euthanasie festgelegt. Die Analyse dieser Studie konzentrierte sich auf Gehirnregionen, die

typischerweise mit histologischen Veränderungen bei Entstehung und Manifestation einer Epilepsie assoziiert sind (siehe **Tabelle 5**) (LÖSCHER & EBERT, 1996; PITKÄNEN et al., 1998; MCCORMICK & CONTRERAS, 2001; SCORZA et al., 2002; MA et al., 2008; BERTRAM, 2009; VISMER et al., 2015). Untersucht wurden vorrangig Areale der ipsilateralen Hemisphäre relativ zur implantierten Elektrode, da bei der TLE die pathologischen Veränderungen überwiegend in der Hemisphäre des epileptischen Fokus auftreten. Jedoch wurden mögliche Artefakte durch die Elektrode und die Kainat-Injektion des jeweiligen Modells berücksichtigt, indem das entsprechende Areal auf der kontralateralen Seite ausgewertet wurde. Daher wurden folgende Gehirnareale ipsi- oder kontralateral zu definierten Bregmakordinaten (FRANKLIN & PAXINOS, 2019) relativ zur Elektrode analysiert:

Areal	Bregmaabstand (mm)	Amygdala- Kindling-Modell		Intra- hippocampales Kainat-Modell	
		Ipsi- lateral	Kontra- lateral	Ipsi- lateral	Kontra- lateral
Hippocampus-Regionen CA1, CA3 <i>(Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum, Stratum lucidum, Stratum lacunosum - moleculare)</i> und Hilus des Gyrus Dentatus	Anterior/Cranial: -1,31 Zentral: -2,03 Posterior/Caudal: -3,27	X			X

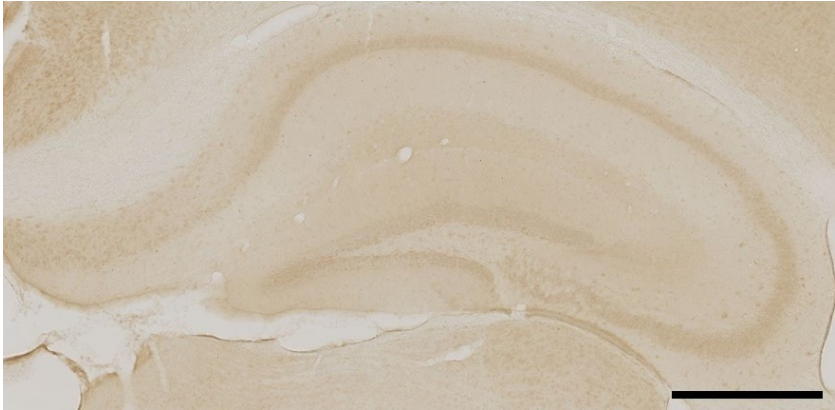
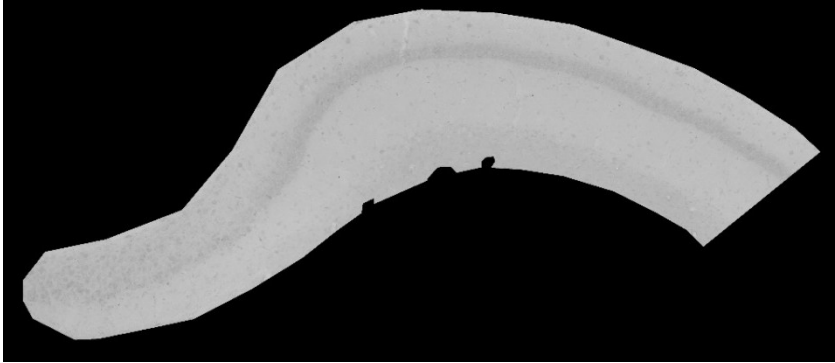
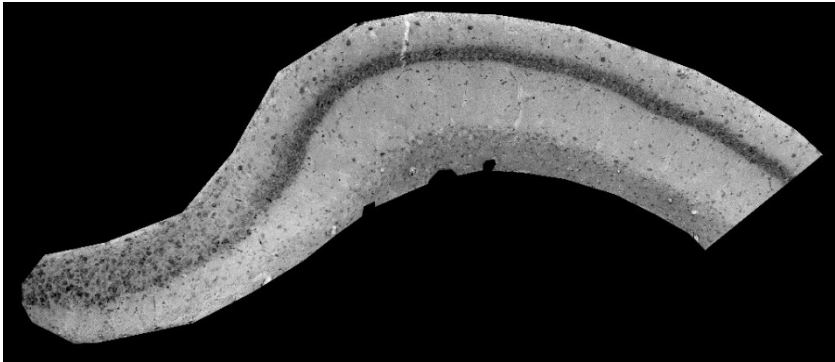
Amygdala	Anterior/Cranial: -0,83 Zentral: -1,31 Posterior/Caudal: -2,03		X	X	
Thalamus-Regionen Mediodorsaler, lateroposteriorer und retikulärer Kern	Anterior/Cranial bis Posterior/Caudal: -1.55 bis -1,91 (Schnittabhängig)	X		X	
Kortikale Regionen Parietaler Cortex	Zentral: -2,03	X			X
Perirhinaler Cortex	Anterior/Cranial: -1.55 Posterior/Caudal: -2,03	X		X	
Entorhinaler Cortex	Anterior/Cranial: -3,27 Posterior/Caudal: -3,87	X		X	
Piriformer Cortex	Anterior/Cranial: 1,69 Zentral: -1,31 Posterior/Caudal: -2,03	X		X	

Tabelle 5: Auflistung der mittels ImageJ analysierten Gehirnnareale zur Bestimmung der optischen Dichte und markierten Fläche der Sigma-1-Expression.

Aus der Tabelle gehen die analysierten Areale sowie die zugehörigen Bregma-Koordinaten hervor. Zudem ist ersichtlich, auf welcher Seite relativ zur Elektrode die jeweiligen Gehirnnareale in den beiden chronischen Epilepsiemodellen

untersucht wurden.

Bevor Bilder der unterschiedlichen Gehirnnareale mit einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-X710, Keyence Corporation, Osaka, Japan) angefertigt wurden, wurde die Beschriftung der Objektträger verdeckt, sodass Gruppenzugehörigkeit und Zeitpunkte sowohl beim Aufnehmen als auch beim Analysieren der Bilder dem Experimentator nicht bekannt waren. Für die Bildaufnahmen der Gehirnnareale an den jeweiligen Bregma-Koordinaten wurden ein 20×-Objektiv sowie eine Belichtungszeit von 1/120 s verwendet. Vor der Bestimmung der optischen Dichte und der markierten Fläche fand eine Kalibrierung der Skala anhand eines Rasters und einer Skalenreferenz statt. Für alle Messungen wurde ein Verhältnis von 3,1800 Pixel/ μm verwendet. Anschließend wurden die Graustufenwerte kalibriert. Hierfür wurde eine Rodabard-Kalibrierung durchgeführt, bei welcher schrittweise Graustufenwerte gemessen wurden. Die Messwerte wurden ebenfalls einheitlich für alle Analysen verwendet. Anschließend wurde das Bild in eine 8 Bit-Aufnahme umgewandelt und die zu analysierenden Gehirnnareale (*Region of interest*, ROI) mit dem Polygon-Werkzeug umrandet und die außenliegenden Bereiche entfernt. Hierbei wurden weiße und schwarze Artefakte wie Risse im Gewebe, angeschnittene Blutgefäße oder dunkle Verunreinigungen entfernt, da diese die Bildnormalisierung stören würden, welche mit einem Sättigungsschwellenwert von 0,3 für die Pixelintensität durchgeführt wurde. Die Normalisierung ermöglichte eine standardisierte Analyse unabhängig von gelegentlich auftretenden inhomogenen Färbeintensitäten (siehe **Tabelle 6**). Zur Auswertung der spezifisch angefärbten Zielstrukturen erfolgte vor der Verblindung eine Sichtung der Gehirnschnitte aus verschiedenen Gruppen. Dabei wurden unterschiedliche Schwellenwerte getestet, um einen möglichst konsistent anwendbaren *Threshold* für die Analyse zu definieren. Außerdem wurden hierfür die Schnitte mithilfe des „Royal-Tools“ in ein buntes Bild mit unterschiedlichen Farbabstufungen umgewandelt, da so eine detaillierte Auswahl der Graustufen, welche in den *Threshold* mit einbegriffen werden sollten, möglich war. Daraus resultierten *Threshold*-Werte von 1 bis 106, welche für alle Analysen standardisiert verwendet wurden.

Bearbeitungs- schritt	Beispielbild
Nativ	 A photograph of a biological specimen, likely a cross-section of a shell or bone, showing a curved, layered structure. The layers are light brown and yellowish. A black scale bar is visible in the bottom right corner.
8-bit	 A grayscale image of the same specimen, showing a curved, layered structure. The layers are light gray and dark gray. The image is set against a black background.
Normalisiert	 A grayscale image of the same specimen, showing a curved, layered structure. The layers are light gray and dark gray. The image is set against a black background.

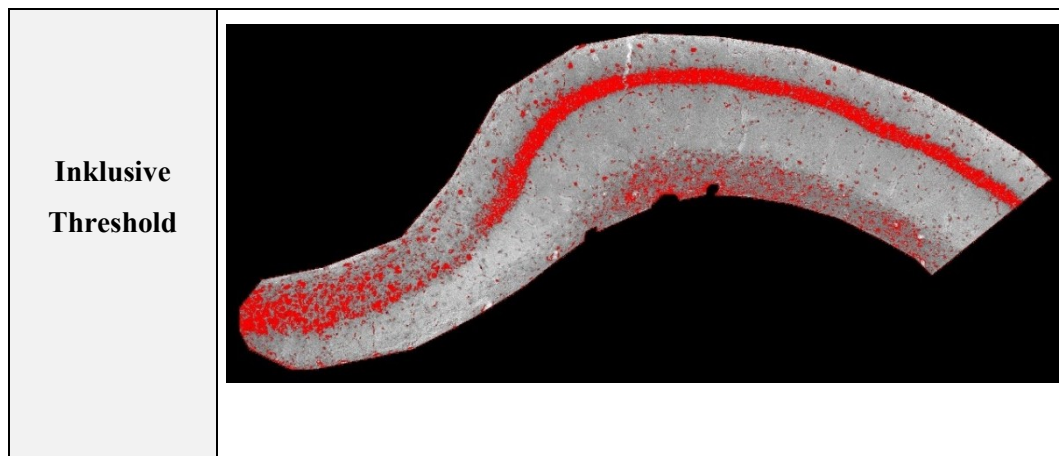


Tabelle 6: Ablauf der Arbeitsschritte für die Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche mittels ImageJ.

Als Beispiel dient die CA1-Region des Hippocampus eines Kontroll-Tiers aus dem intrahippocampalen Kainat-Modell in der frühen Post-Insult-Phase. Maßstab 50 μ m

2.6 Bestimmung der optischen Dichte und der markierten Fläche immunhistochemisch detektierter neuronaler Zellkerne

Um auszuschließen, dass Veränderungen in der Sigma-1-Detektion möglicherweise mit einer Neurodegeneration infolge krankheitsassoziierter Veränderungen zusammenhängen, wurde ein immunhistochemischer Nachweis mit dem neuronalen Zellkernmarker NeuN (*Neuronal nuclei*) an einer Serie von sechs zufällig ausgewählten Tieren pro Gruppe des intrahippocampalen Kainat-Modells durchgeführt. Um die neuronalen Zellkerne zu visualisieren, wurde ein primärer Anti-NeuN-Antikörper verwendet, der mit einem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend mittels DAB-Farbstoff sichtbar gemacht wurde. Das hierfür verwendete Färbeprotokoll wurde ausführlich in der Bachelorarbeit von Emilia Nike Sophie Schneider („Immunohistochemical Analysis of Neurodegeneration in a Chronic Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy“) beschrieben. Anschließend wurden, wie in **Kapitel IV Abschnitt 2.5** erläutert, basierend auf einem Threshold, die optische Dichte und die markierte Fläche der NeuN-positiven Zellen mithilfe der Software ImageJ gemessen. Die analysierten Areale sind in **Tabelle 7** dargestellt.

Areal	Bregmaabstand (mm)	Intra-hippocampales Kainat Modell	
		Ipsi-	Kontra-

		lateral	lateral
Hippocampus-Regionen CA1, CA3 (<i>Stratum oriens</i> , <i>Stratum pyramidale</i> , <i>Stratum radiatum</i> , <i>Stratum lucidum</i> , <i>Stratum lacunosum-moleculare</i>) und Hilus des Gyrus Dentatus	Anterior/Cranial: -1,31 Zentral: -2,03 Posterior/Caudal: -3,27		X
Kortikale Regionen: Entorhinaler Cortex	Anterior/Cranial: -3,27 Posterior/Caudal: -3,87	X	
Piriformer Cortex	Anterior/Cranial: 1,69 Zentral: -1,31 Posterior/Caudal: -2,03	X	

Tabelle 7: Auflistung der mittels ImageJ analysierten Gehirnnareale zur Bestimmung der optischen Dichte und markierten Fläche der NeuN-Expression.

2.7 Stereologische Zellzählung

Um die Dichte der Sigma-1-immunopositiven Zellen in verschiedenen Gehirnregionen zu quantifizieren, wurde eine stereologische Zellzählung durchgeführt. Hierfür wurden die im Abstand von 120 µm aufgezogenen Gehirnschnitte mit dem MicroBrightField-System® (MBF Bioscience, Williston, USA) ausgewertet. Die stereologische Quantifizierung erfolgte mittels systematischer Zufallsstichproben nach erwartungsgetreuen quantitativ-stereologischen Analyseverfahren (GUNDERSEN & JENSEN, 1987). Für die stereologische Quantifizierung wurde ein Lichtmikroskop (LEICA DM LB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit motorisiertem Tisch (BioPoint 2, Ludl Electronic Products Ltd, Hawthorne, NY, USA) und einer Farb-CCD-Kamera (CX9000, MBF Bioscience, Williston, USA) verwendet. Zum Zeitpunkt der Auswertung war der Experimentator hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit verblindet. Für die Quantifizierung wurde die Software "Stereo Investigator" (Version 2023.2.1; MBF Bioscience, Williston, USA) verwendet. Die absolute Zellzahl (N) wurde mittels eines optischen Fraktionator-Verfahrens geschätzt, bei

dem optische Disektoren auf einer systematisch-zufälligen Stichprobe von Schnitten angewendet wurden (WEST et al., 1991). Bei der Disektormethode wurde ein dreidimensionales Testvolumen (Disektorvolumen) in einem 40 µm dicken Schnitt definiert. Dieses Disektorvolumen wurde durch die Flächeninhalte der erwartungsgetreuen Zählrahmen (*unbiased counting frames*) in der oberen und unteren optischen Fokusebene sowie durch den Abstand zwischen diesen Ebenen (Schnittdicke) begrenzt. Innerhalb dieses Volumens wurden die Sigma-1-markierten Zellen gezählt. Die Software erstellt auf Basis eines systematischen Zufallsstichproben-Designs mit gleichförmiger Zufälligkeit ein unverzerrtes Raster virtueller Zählräume, die in allen Dimensionen (X, Y, Z) regelmäßig im zu untersuchenden Areal angeordnet sind. Anhand der in diesen Zählräumen markierten Zellen schätzt die Software die Gesamtpopulation. Die Größe des Rasters und des Zählrahmens wurde für jede Region vor der Analyse experimentell unter Berücksichtigung des Fehlerkoeffizienten (*coefficient of error, CE*) festgelegt (siehe **Tabelle 8**).

	CA1	CA3	Hilus	Entorhinaler Cortex
Auswertungsintervall der Schnitte	5			
Zählrahmen (µm)	26 x 26	28 x 28	43 x 43	36 x 36
Stichprobenraster (µm)	130 x 130	140 x 140	85 x 85	180 x 180
Disektor-Höhe (µm)	25.0	19.9	28.0	30.5
Sicherheitszone (µm)	2.0			
Flächenstichproben- fraktion (asf):	1/16	1/25	1849/7225 ≈ 0.256	1/25
Höhenstichproben- fraktion (hsf):	5/8	19.9/40	7/10	61/80

Tabelle 8: Stereologische Stichprobenparameter.

Die Auswahl und Eingrenzung der zu analysierenden Areale wurde bei einer 5×/0,12 NA Vergrößerung durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen der zuvor durchgeführten Bestimmung der optischen Dichte (OD) und der markierten Fläche (%) erfolgte die Zellzählung in den Kainat-behandelten Tieren sowie in der Kontrollgruppe in verschiedenen Subregionen des Hippocampus sowie im lateralen

und medialen entorhinalen Cortex (siehe **Tabelle 9**).

Areal	Bregma-koordinaten (in mm)	Ipsilateral	Kontralateral
Hippocampus-Regionen CA1, CA3 (<i>Stratum pyramidale</i>) und Hilus des Gyrus Dentatus	-1,07 bis -4,03		X
Entorhinaler Cortex	-1,91 bis 4,03	X	

Tabelle 9: Auflistung der Gehirnareale, in denen eine stereologische Zellzählung durchgeführt wurde.

Die Zellzählung im Hilus wurde mit einem 40×/0,65 NA Objektiv durchgeführt, während im entorhinalen Cortex sowie in den Hippocampusregionen CA1 und CA3 ein 100×/1,30-0,60 NA Ölimmersionsobjektiv verwendet wurde (siehe **Abbildung 11**).

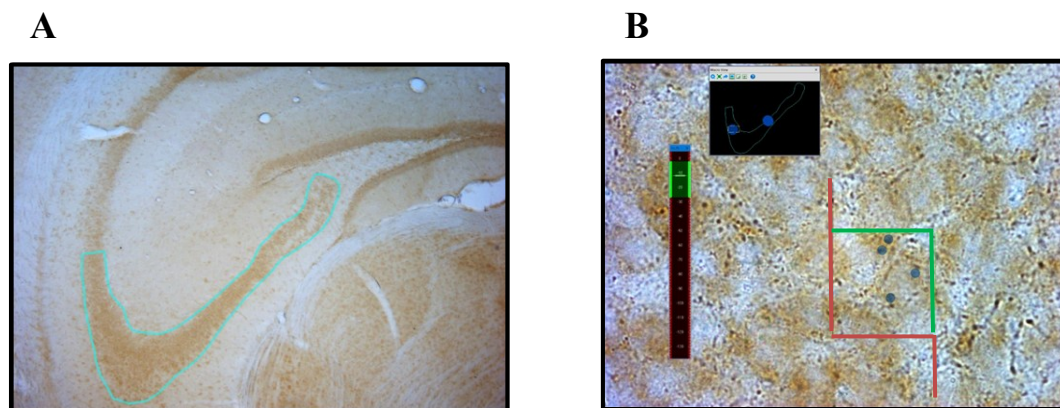


Abbildung 11: Stereologische Zellzählung.

Beispielhafte Darstellung der stereologischen Zellzählung im Gewebe eines Tieres aus dem intrahippocampalen Kainat-Modell in der frühen Post-Insult-Phase **(A)** Übersicht der CA3-Region des Hippocampus mit Umrandung des Stratum pyramidale (5x Objektiv) **(B)** Detailansicht des Zählrahmens innerhalb des markierten Areals mit markierten Zellen, die sich innerhalb der grünen und roten Begrenzung befinden (100x Objektiv) und somit für die Berechnungen berücksichtigt werden.

Innerhalb des Disektorvolumens wurden Zellen nach standardisierten dreidimensionalen Zählregeln markiert. In der X-Y-Ebene wurden Zellen gezählt,

die vollständig innerhalb des Zählrahmens lagen oder die obere und rechte grüne Begrenzung des Zählrahmens berührten. Zellen wurden ausgeschlossen, sofern sie die untere und linke rote Begrenzung berührten. In der Z-Achse wurde eine Sicherheitszone (*guard zone*) von 2 μm verwendet. Gezählt wurden Zellen, deren Zellkerne innerhalb der Disektorhöhe lagen und dabei die untere Begrenzungsebene durchdrangen, jedoch nicht die obere Begrenzungsebene. Die Gesamtzellzahl pro Region wurde auf Basis der gezählten Zellen, des Disektorvolumens, der Sampling-Parameter und der mittleren Schnittdicke geschätzt. Das Volumen jeder Region wurde im Rahmen des Workflows ermittelt. Anschließend wurde die Zelldichte als Quotient aus der absoluten Zellzahl und dem Volumen berechnet ($N_v = \text{Zellen}/\text{mm}^3$). Die Anzahl der in die Analysen integrierten Gehirnschnitte variierte zwischen Regionen und Tieren. Dies ist auf Schnittüberlappungen, fehlende Schnitte oder technische Artefakte zurückzuführen. Diese Variabilität wurde bei der Berechnung des CE automatisch berücksichtigt. Die Präzision der stereologischen Zellzählung wurde nach GUNDERSEN et al. (1999) mit $m = 1$ gewählt, da dieser Wert die Varianz biologischer Proben nachweislich am besten beschreibt. Es sollte ein CE-Wert unter 0,09 angestrebt werden, da dies auf eine verlässliche und präzise Zählung hindeutet. Die berechneten CE-Werte der einzelnen analysierten Gehirnareale sind **Tabelle 10** zu entnehmen.

Areal	Fehlerkoeffizient, CE, $m = 1$
CA1	0,04
CA3	0,06
Hilus	0,07
Entorhinaler Cortex	0,07

Tabelle 10: Berechnung der Präzision der stereologischen Zellzählung.

Mittelwerte der Fehlerkoeffizienten, die in den einzelnen Arealen berechnet wurden. Ein CE-Wert unter 0,09 deutet auf eine verlässliche und präzise Zählung hin.

2.8 Nachweis der zellulären Expression von Sigma-1 mittels Immunfluoreszenz-Detektion

Um zu untersuchen, ob Sigma-1 in Gliazellen exprimiert wird, wurde die Ko-Expression von Sigma-1 mit gliazellspezifischen Markern analysiert. Hierfür wurde das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) zur

Identifikation von Astrozyten und das ionisierte calciumbindende Adaptermolekül 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Iba1) zur Markierung von Mikrogliazellen verwendet. Die Analyse erfolgte vor dem Hintergrund der bekannten Beteiligung glialer Zellen an inflammatorischen Prozessen bei der TLE. Um zwischen inhibitorischen Neuronen, die γ -Aminobuttersäure (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) exprimieren, und exzitatorischen (glutamatergen) Neuronen unterscheiden zu können, wurden Ko-Expressionsanalysen mit entsprechenden Zellmarkern durchgeführt. Dabei wurde Sigma-1 gemeinsam mit der Glutamat-Decarboxylase 67 (GAD67) als Marker für GABAerge Neurone und mit dem vesikulären Glutamatttransporter 1 (vGlut1) als Marker für glutamaterge Neurone untersucht. Zur Identifikation neuronaler Zellkerne wurde zusätzlich der neuronale Marker NeuN verwendet. Für den immunhistochemischen Nachweis wurde jeweils eine Serie von drei zufällig ausgewählten Gehirnen pro Gruppe aus dem intrahippocampalen Kainat-Modell (Kontroll-/Kainat-Gruppe, jeweils zwei und 35 Tage nach SE-Induktion) verwendet. Die freischwimmenden Schnitte wurden dreimal fünf Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit Tween 20 (PBST) gewaschen und zehn Minuten in einer 1 % SDS-Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBST wurden die Schnitte mit einer Lösung aus 0,5 % Triton X-100 und 1 % Fischgelatine in PBS geblockt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C für 24 h mit den primären Antikörpern inkubiert (siehe **Tabelle 11**). Am folgenden Tag wurden die Schnitte vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe **Tabelle 11**) viermal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht (24 Stunden, 4 °C) mit einem oder bei unterschiedlichen Wirtspezies zwei weiteren in **Tabelle 11** aufgeführten primären Antikörpern inkubiert. Am dritten Tag wurden die Schnitte viermal in PBST gewaschen, gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern. Nach einer fünf-minütigen PBST- und drei PBS-Waschschritten wurden die NeuN-markierten Schnitte mit Chromgelatine auf Objektträger aufgezogen und mit einem wässrigen Einbettungsmedium (ROTI®Mount FluorCare, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Versiegelung der Schnitte mit Nagellack. Die Gehirnschnitte, die zum Nachweis von Gliazellen gefärbt worden waren, wurden vor dem Eindecken 30 Sekunden lang in einer Hoechst-Lösung (BisBenzimid H 33342, Invitrogen, Waltham, USA)

inkubiert.

Bei jedem immunhistochemischen Nachweis wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die mit Ausnahme der Inkubation mit den Primärantikörpern die gleichen Arbeitsschritte durchlief. Dadurch konnten unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper und das Ausmaß der Autofluoreszenz eingeschätzt werden. Zusätzlich zu den Mehrfachmarkierungen wurde ein weiterer immunhistochemischer Nachweis durchgeführt, bei dem Sigma-1 mit einer Kern-Detektion (Hoechst-Lösung) kombiniert wurde. Hierfür wurde ebenfalls das beschriebene Protokoll verwendet. Ziel dieses zusätzlichen immunhistochemischen Nachweises war es, die bereits in der DAB-Detektion festgestellte Spezifität der Sigma-1-Markierung auch im Rahmen der Immunfluoreszenz zu überprüfen. Die Detektion erfolgte erneut sowohl an Gehirngewebe von WT- als auch an Gehirngewebe von KO-Tieren, da die Immunfluoreszenz erfahrungsgemäß ein sensitiveres und spezifischeres Signal liefert und damit eine zusätzliche Validierung notwendig war.

Primärer Antikörper/ Bestellnummer	Wirt-spezies	Verdünnung	Hersteller	LOT- Nummer
Sigma-1 , HPA018002, polyklonal	Kaninchen	1:200	Atlas	14183
NeuN , MAB377, monoklonal	Maus	1:500	Merck/Millipore	3468221
Gad67 , PA5- 21397, polyklonal	Kaninchen	1:2000	Invitrogen/ Thermo Fisher	Y1404640
vGlut1 , 75-066, monoklonal	Maus	1:1000	NeuroMab	472-1JU-13
GFAP , ab53554, polyklonal	Ziege	1:1000	Abcam	1071213-1
Iba1 , ab5076, polyklonal	Ziege	1:500	Abcam	GR273528-2

Sekundärer Antikörper/ Bestellnummer	Wirt-spezies	Verdünnung	Hersteller	Lot
Alexa Fluor 488, A-11008	Ziege gegen Kaninchen	1:1000	Invitrogen/ Thermo Fisher	2521157
Alexa Fluor 405, A-31553	Ziege gegen Maus	1:500	Invitrogen/ Thermo Fisher	2491371
Alexa Fluor 568, A-11036	Ziege gegen Kaninchen	1:500	Invitrogen/ Thermo Fisher	2447870
Alexa Fluor 546, A-21123	Ziege gegen Maus	1:1500	Invitrogen/ Thermo Fisher	2438513
Cy3 (Indocarbocyanin), 711-165-152	Esel gegen Kaninchen	1:200	Jackson/Dianova	131748
Alexa Fluor 594, A-11058	Esel gegen Ziege	1:1000	Invitrogen/ Thermo Fisher	2641989

Tabelle 11: Auflistung der für die Immunfluoreszenz-Detektion verwendeten primären und sekundären Antikörper

2.9 Analyse der zelltypspezifischen Expression von Sigma-1 mittels Immunfluoreszenz-Detektion

Um die subzelluläre Expression von Sigma-1 zu untersuchen, wurden Bilder der gefärbten Schnitte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 880, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) angefertigt. Vorab wurde die Expression der Sigma-1-positiven Zellen in den Gehirnschnitten ipsi- und kontralateral zur Elektrode in allen Gehirnnarealen visuell beurteilt, um einen Überblick über das Sigma-1-Expressionsmuster zu erhalten. Anschließend wurde die Sigma-1-Expression speziell in den Subregionen des Hippocampus und im entorhinalen Cortex betrachtet und Übersichtsaufnahmen mit einem 20×/0,8 NA-Objektiv (Zoom: 2) der kontralateralen Seite der Hippocampus-Regionen und der ipsilateralen Seite (relativ zur Elektrode) des entorhinalen Cortex angefertigt. Außerdem wurden einzelne Bildebenen durch Anfertigung eines Z-Stapels mit einem 63 ×/1,4 NA Plan-Apochromat Objektiv (NA 1,4) aufgenommen, um eine hochauflösende und mehrdimensionale Visualisierung der Sigma-1-positiven Zellen zu ermöglichen. Zusätzlich wurde die *Transmitted Light Photomultiplier Tube* (T-PMT) Funktion des Mikroskops genutzt, um zusätzlich zum Fluoreszenzsignal auch das Transmissionslicht zu detektieren. Damit konnte die neuronale Zellmembranstruktur dargestellt und so die Ko-Expression von Sigma-1 mit den verwendeten neuronalen Markern in den einzelnen Neuronen noch klarer belegt werden. Die Bilder wurden mit der ZEN Black-Software (Version 2.3, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) im Modus „*Best signal*“ des „*Smart Setups*“ aufgenommen. Die Bildauflösung lag je nach Bild zwischen 256 × 256 und 2048 × 2048 Pixeln, mit einer Pixelgröße von 0,09-0,10 µm und einer Pixelverweilzeit von 1,02-1,54 µs. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden zwei Scans pro Fokusebene durchgeführt. Die Laserleistung betrug 1,5 % und die Detektorverstärkung lag zwischen 750 und 850. Die so gewonnenen Bilddaten wurden für die qualitative Beschreibung der subzellulären Lokalisierung von Sigma-1 verwendet.

2.10 Etablierung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription

Zur Etablierung eines zuverlässigen Protokolls, welches einen optimalen Erhalt und eine präzise mRNA-Analyse ermöglicht, wurden verschiedene Einfriermethoden

und Färbeprotokolle getestet. Die finale Methode wurde anhand der morphologischen Gewebequalität, der Schnittfähigkeit des Gewebes und der Menge an isolierter mRNA bestimmt. Diese wird detailliert in **Kapitel IV Abschnitt 2.11** beschrieben. Zur Bestimmung der besten Einfriermethode wurden sowohl im Labor etablierte Verfahren als auch Ansätze, die auf Literaturrecherchen basierten, verglichen (ERICKSON et al., 2009; MULISCH & WELSCH, 2015; YODA et al., 2017). Lediglich das kurze Eintauchen des Gehirns für fünf Sekunden in 2-Methylbutan, das zuvor in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt wurde, ermöglichte eine gute Gewebequalität, sodass die Gehirne geschnitten, aufgezogen, gefärbt und nach der Laser-Mikrodissektion für die Extraktion der mRNA verwendet werden konnten. Zur Bewertung des Einflusses der Färbung auf die mRNA-Konzentration wurden drei verschiedene Färbeprotokolle unter Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe (Cresyl Violet, Toluidin blau und Thionin) getestet. Die mRNA-Konzentration der Schnitte wurde, anschließend an die Färbungen, mithilfe eines Fluorometers (Qubit® 4 Fluorometer und Qubit® Teströhrchen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Kombination mit dem Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) quantifiziert. Die Thioninfärbung erwies sich als geeignet, da trotz Färbung eine große Menge mRNA isoliert werden konnte und eine klare morphologische Abgrenzung der Gehirnareale gegenüber der Umgebung möglich war. Um die mRNA-Degradation zu vermeiden, wurde bei der Etablierung des Laser-Mikrodissektions-Protokolls darauf geachtet, dass jeder Schnitt nach einer Auftauzeit von zehn Minuten insgesamt nicht länger als 30 Minuten auf dem Objektisch verblieb. Die Effizienz, der aus der mRNA synthetisierten cDNA wurde, zum einen anhand der Konzentrationsbestimmung mithilfe des Qubit® 1X dsDNA HS Assay Kit und dem Fluorometer, zum anderen durch Effizienzberechnungen bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ($\log_{10}$ von 0 bis -3) angefertigt und mithilfe einer β -Actin-FAM-Sonde (Mm02619580_g1, TaqMan™ Assay, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) die Steigung der Amplifikationskurve zur Effizienzbestimmung berechnet. Nach der Validierung der Reaktionen mit der β -Actin-FAM-Sonde wurde die Effizienzbestimmung mit einer Sigma-1-spezifischen FAM-Sonde (die u. a. Transkripte mit Exon-Junctions 2–3 und 3–4 erkennt, darunter NM_001286541.1, NM_001286551.1 und NM_011014.3) (Mm00448086_m1, TaqMan™ Assay, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Spezifität dieser

Sonde wurde durch Amplifikationen in Triplikaten aus Proben von je drei WT- und KO-Tieren geprüft und bestätigt. Basierend auf Literaturrecherchen wurden mehrere endogene Kontrollen (Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO), Ribosomal Protein L13a (RPL13A), Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) und Tubulin Beta 2A (TUBBA2A)) ausgewählt (SWIJSEN et al., 2012; SADANGI et al., 2017; SCHWARZ et al., 2020). Daraufhin wurde cDNA aus Hemisphären von naiven, Amygdala-Kindling- und intrahippocampalen Kainat-behandelten Tieren verwendet, um eine qPCR mit den ausgewählten endogenen Kontrollen und Sigma-1 durchzuführen. Anschließend wurden die Cycle Threshold (Ct)-Werte verglichen und die beiden stabilsten endogenen Kontrollen NONO und RPL13A (Mm01234361_g1 und Mm05910660_g1, TaqMan™ Assay, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) für den Hauptversuch ausgewählt. Der Unterschied in den Ct-Werten von NONO und RPL13A zwischen naiven Tieren und Tieren aus den Epilepsiemodellen lag unter einem Ct-Zyklus, weshalb beide Gene als endogene Kontrollen in der Hauptstudie verwendet wurden. Zusätzlich lagen die Ct-Werte dieser endogenen Kontrollen in einem ähnlichen Bereich wie die von Sigma-1. In der Studie von SADANGI et al. (2017) wurde NONO als stabiles Referenzgen in hippocampalem Gewebe in verschiedenen Rattenmodellen für die Untersuchung der Epileptogenese, aber auch der chronischen Phase der Epilepsie beschrieben. Diese Eigenschaft bestätigt seine Eignung als normalisierendes Kontrollgen. RPL13A zeigte nach febrilen Krampfanfällen im Gyrus Dentatus eine gute Stabilität (SWIJSEN et al., 2012). Zudem untersuchten SCHWARZ et al. (2020) nach Pentylenetetrazol-induzierten Anfällen in Ratten unterschiedliche endogene Kontrollen in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Gehirnregionen. Dabei wurde RPL13A im ventralen Hippocampus und temporalen Cortex als stabil identifiziert. In beiden Studien kamen jedoch akute Anfallsmodelle zum Einsatz, die sich methodisch von chronischen Epilepsiemodellen unterscheiden. Im nächsten Schritt wurde eine Duplex-qPCR für Sigma-1 und die endogenen Kontrollen etabliert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Dafür wurden erneut Verdünnungsreihen ($\log_{10}$ von 0 bis -3) angefertigt und die Effizienz der Einzelreaktionen (*Singleplex*) als auch der Duplex-Reaktion überprüft und anhand der Ergebnisse die eingesetzte Menge der Sonden angepasst. Die errechneten Effizienzen lagen im optimalen Bereich von 90–110 % und entsprachen denen der jeweiligen Einzelreaktionen.

2.11 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription zur Analyse der mRNA-Expression von Sigma-1

Die Sigma-1-Expression wurde in den zuvor analysierten Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, Hilus des Gyrus Dentatus) und im entorhinalen Cortex mithilfe einer weiteren Methode analysiert, um Erkenntnisse über die Regulation auf der Ebene der mRNA zu erhalten. Für alle folgenden Verarbeitungsschritte wurden alle Oberflächen mit RNase-Zap™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gesäubert und alle zuvor verwendeten Instrumente, Objektträger und Behälter mit UV-Licht vorbehandelt. Alle Färbelösungen wurden mit Ribonuklease (RNase)-freiem Wasser zubereitet. Die – wie in **Kapitel IV Abschnitt 2.1** – beschriebenen nativ entnommenen und eingefrorenen und bis dahin bei –80 °C gelagerten Gehirne wurden für 30 Minuten in einem Kryostaten mit einer Kammertemperatur von –20 °C aufgetaut. Anschließend wurden koronare Schnitte mit einer Dicke von 12 µm angefertigt. Von jedem Gehirn wurde nach dem Protokoll in **Tabelle 12** zu unterschiedlichen Bregmakordinaten jeweils sechs Gehirnschnitte mit der ventralen Seite des Gehirns parallel zur kurzen Seite des Objektträgers auf einen zuvor ebenfalls im Kryostaten gekühlten PEN-Membran-beschichteten Objektträger (2 µm, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) aufgezogen.

Objektträger	Schnittanzahl
1	373-380
2	433-440
3	530-536
4	576-582

Tabelle 12: Schnittprotokoll für das Anfertigen der coronaren Gehirnschnitte.

Außerdem wurden zusätzlich nach Aufnahme des Schnittes auf den ersten Objektträger weitere Schnitte auf einen Reserveobjektträger und auf einen Superfrost® Objektträger (Superfrost® Plus Adhesion Microscope Slides, White Tab, Eprexia, USA) auf Höhe der Elektrodenimplantation aufgenommen. Der letzte Gehirnschnitt wurde für die Überprüfung der Lokalisation der Elektrode in der CA1-Region verwendet. Zur Überprüfung der Lokalisation wurden die Gehirnschnitte dieser Objektträger mit dem zuvor beschriebenen Protokoll mit

Thionin (siehe **Kapitel IV Abschnitt 2.5**) gefärbt. Schnitte und Reserveschnitte wurden bis zur Färbung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Jeder der Objektträger wurde einzeln mithilfe von gekühlten Lösungen gefärbt. Im ersten Schritt wurde RNase-frei hergestelltes Thionin eine Minute lang auf den Schnitt gegeben. Dann wurde der Schnitt zweimal 15 Sekunden lang in RNase-freiem Wasser gespült und anschließend in einer 75 % Ethanol-Lösung (Ethanol für Molekularbiologie, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) belassen. Anschließend wurde der Schnitt jeweils für 30 Sekunden in einer 95 % Ethanol-Lösung und dann in 100 % Ethanol inkubiert. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie in einem mit Silica Gel bestückten 50 ml Falcon bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Laser-Mikrodissektion (LMD) aufbewahrt. Zehn Minuten vor der LMD wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde die mRNA aus den Unterregionen des Hippocampus (CA1 und CA3-Region (Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum, Stratum lucidum, Stratum lacunosum-moleculare) und Hilus des Gyrus Dentatus und dem entorhinalen Cortex (lateral und medialer Anteil) umrandet und anschließend mit einem Laser-Mikrodissektionsmikroskop (DM6000, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgeschnitten (FRANKLIN & PAXINOS, 2019) (siehe **Tabelle 13**). Um die vollständige Erfassung der Gehirnareale zu gewährleisten, wurden die CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus in den ersten drei aufgezogenen Gehirnschnitten isoliert, während der an der CA3-Region anliegende Hilus von den Schnitten drei bis sechs ausgeschnitten wurde. Außerdem wurde aus jedem Gehirn der parietale Cortex zur Überprüfung der mRNA-Integrität entnommen (siehe **Tabelle 13**). Die ausgeschnittene Gewebeprobe fiel in den Deckel eines Reaktionsgefäßes (0,5 ml), in welchen vorab 30 μl eines Lysepuffers (RNAqueous™-Micro Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pipettiert wurde. Sobald alle Gehirnareale des Schnittes isoliert wurden, konnten die Reaktionsgefäße aus der Mikroskop-Halterung genommen, geschlossen und in Trockeneis aufbewahrt werden. Jedes isolierte Areal wurde einer Probennummer zugeordnet.

Gehirnregionen	Bregma-Koordinate	Objektträger / Schnittzahl	Proben- Nummer
CA1 rostral	-1.31mm	1/1-3	1
CA3 rostral			2

Hilus rostral		1/4-6	3
CA1 zentral	-2.03mm	2/1-3	1
CA3 zentral			2
Hilus zentral		2/4-6	3
Parietal Cortex		2/1-6	5
CA1 caudal	-3.27mm	3/1-3	1
CA3 caudal			2
Hilus caudal		3/4-6	3
Entorhinaler Cortex rostral		3/1-6	4
Entorhinaler Cortex rostral	-3.87mm	4/1-6	4

Tabelle 13: Schnittprotokoll für die Laser-Mikrodissektion.

In der Tabelle sind die entnommenen Gehirnareale den zugehörigen Bregma-Koordinaten zugeordnet. Darüber hinaus werden die Probennummern, die Anzahl der Objektträger und Schnitte angegeben.

Vor der Gesamt-mRNA-Isolation, welche unter Verwendung und nach Anleitung des RNAqueous™-Micro Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt wurde, konnten pro Gehirn alle Gewebeproben eines Gehirnareals gepoolt und auf eine Menge von 100 µl mit Lysepuffer aufgefüllt werden. Alle an einem Tag geschnittenen parietalen Cortices (n = 4) wurden zu einer Probe zusammengefasst. Um die LMD-Proben zu lysieren und zu homogenisieren, wurden die Proben bei 42 °C für 30 Minuten inkubiert. Der Lysepuffer enthält unter anderem Guanidinium-Thiocyanat, welches die Zellmembranen aufbrach und Ribonukleasen inaktivierte. Zu Beginn des Aufreinigungsprozesses wurden die Glasfaserfilter einer Filterkartusche mit 30 µl Lysepuffer benetzt. Anschließend wurden 3 µl eines *Laser-Capture-Microdissection* (LCM)-Additivs zum Lysat gegeben, gefolgt von 129 µl Ethanol. Die gesamte Lösung wurde auf den Filter gegeben und zentrifugiert, sodass die mRNA an den Filter binden konnte. Anschließend wurden 180 µl der Waschlösung 1 in die Filterkartusche gegeben und zentrifugiert, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit der Waschlösung 2/3,

jedes Mal gefolgt von einer Zentrifugation. Um die mRNA aus dem Filter herauszulösen, wurde die Elutions-Lösung auf 95 °C erhitzt. Im ersten Schritt wurden 10 µl der erwärmten Elutions-Lösung in die Mitte des Filters gegeben und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine weitere Zentrifugation wurde die mRNA aus dem Filter mithilfe der Elutions-Lösung isoliert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Gesamt-mRNA-Konzentration jeder Probe wurde mit dem Qubit® 4 Fluorometer und Qubit® Teströhrchen gemessen. Die Proben wurden hierfür mit dem Qubit® RNA HS Assay Kit aufbereitet. Dabei wurden 4 µl der extrahierten mRNA in eine vorbereitete Arbeitslösung bestehend aus Assay-Puffer und Farbstoff gegeben. Anschließend erfolgte die Kalibrierung des Fluorometers mittels zweier Standards nach Herstellerprotokoll und nachfolgend die mRNA-Konzentrationsbestimmung.

Für die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) wurde das Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit® (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet und für jeden Zeitpunkt und jede Gehirnregion eine Ziel-mRNA-Konzentration eingesetzt (siehe **Tabelle 14**). Da die mRNA-Konzentration in der chronischen Phase in allen untersuchten Gehirnrealen erhöht war, wurde eine entsprechend höhere Zielkonzentration gewählt, um die vorhandene mRNA optimal auszunutzen.

Gehirnareal	Zeitpunkt	Zielkonzentration mRNA in (ng/µl)
CA1	Frühe Post-Insult-Phase (2 Tage)	15,96
CA3		33,95
Hilus		8,96
Entorhinaler Cortex		29,4
CA1	Chronische Phase (35 Tage)	28,14
CA3		41,3
Hilus		10,64
Entorhinaler Cortex		42,0

Tabelle 14: Ziel-mRNA-Konzentration der einzelnen Areale pro Zeitpunkt, die für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

Pro Gehirnnareal wurden jeweils zwei cDNA-Ansätze nach Herstellerprotokoll angefertigt. Zur individuellen Menge an mRNA-Lysat wurden zur Eliminierung der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) 1 µl 10X Desoxyribonuklease (dsDNase) -Puffer und 1 µl dsDNase hinzugegeben. Das Lysat wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde dann bei 37 °C für 2 Minuten in einem vorgeheizten Thermomixer (5437, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erwärmt. Nach der Eliminierung der genomischen DNA wurden in dasselbe Reaktionsgemisch Primer (jeweils 0,25 µl Oligo(dT)18- und Random-Hexamer-Primer), 1 µl 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix) und 3,5 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt und vermischt. Abschließend wurden 4 µl Reverse Transkriptase Puffer (5X RT-Buffer) und 1 µl Maxima H Minus Enzym-Mix, welcher unter anderem die Reverse Transkriptase enthält, hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermal Cycler (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 10 Minuten bei 25 °C und anschließend 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 85 °C beendet und die Konzentration der synthetisierten cDNA mithilfe des Qubit® 1X dsDNA HS Assay Kits gemessen. Hierfür wurde ebenso wie bei der mRNA-Konzentrationsbestimmung das Qubit® 4 Fluorometer vorab mithilfe von zwei Standardmessungen kalibriert. Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurde 1 µl der cDNA mit 199 µl der Qubit-Arbeitslösung vermengt und die Konzentration in ng/µl gemessen. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne Zugabe der reversen Transkriptase (*No Reverse transcriptase*, NoRT) für die qPCR-Reaktion hergestellt, die alle Reaktionsschritte und -komponenten enthielt, mit Ausnahme des Maxima H Minus Enzym-Mix. Die doppelsträngige cDNA wurde bei –80 °C bis zur finalen qPCR gelagert.

In einer 96-Well-Platte (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden pro Reaktionseinheit 10 µl TaqMan Fast Advance Mastermix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl des endogenen Kontroll-Assays, 0,75 µl des Sigma-Assays sowie 6,25 µl nucleasefreies Wasser eingesetzt. Dem Reaktionsgemisch wurden jeweils 2 µl Proben-cDNA beigemengt. Pro Areal und endogener Kontrolle wurde jeweils ein Triplikat pipettiert. Als Kontrollen wurden eine *No-Template*-Kontrolle (NoT),

bestehend aus 18 µl Mastermix und 2 µl Wasser, sowie die zuvor synthetisierte NoRT-Kontrolle eingesetzt. Für die qPCR wurde der QuantStudio™ 3 & 5 Real Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Insgesamt wurden 40 Zyklen unter den in **Tabelle 15** aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Phase	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
Hold Stage	1	50	2
	2	95	2
PCR Stage	3	95	1
	4	60	20

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen eines Zyklus der qPCR.

Unter Verwendung von 3-15 Baseline-Zyklen und einem einheitlichen Standard-Threshold von 0,2 ΔR_n wurden die Ergebnisse mithilfe der QuantStudio Design & Analysis (Version 1.5.2., Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) angezeigt. Aus den ct-Werten der Triplikate wurden Mittelwerte der Sigma-1-Assays und der endogenen Kontrollen gebildet und der ΔCT -Wert berechnet. Wies einer der drei Ct-Werte eine Abweichung von mehr als 0,5 Ct im Vergleich zu den beiden anderen Proben auf, wurde dieser Wert ausgeschlossen. Die verbliebenen Ct-Werte wurden dann gemittelt, sofern sie nicht mehr als 0,5 Ct voneinander abwichen. Traf auch dies nicht zu, wurde die qPCR der gesamten Probe erneut durchgeführt. Die Differenz der Ct-Werte der beiden endogenen Kontrollen innerhalb eines Gehirnareals eines Tieres lag unter 1 Ct, weshalb Mittelwerte aus den endogenen Kontrollen und den beiden Sigma-1-Werten gebildet wurden. Zur Korrektur von Platteneffekten und zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine einheitliche Referenz-cDNA eingesetzt, die mit allen Sonden amplifiziert wurde und als Inter-Platten-Kalibrator (*Inter-Plate Calibrator*, IPC) diente. Aus allen Platten wurden Mittelwerte der IPCs gebildet und von den jeweiligen endogenen Kontrollen und Sigma-1-Proben abgezogen. Die daraus resultierenden $\Delta\Delta CT$ -Wert wurden für die statistische Auswertung und die Berechnung der relativen Expression (*fold change*) verwendet. Da die Berechnung des *fold change* auf Verhältniswerten basiert, die in der Regel keine Normalverteilung aufweisen und keine Informationen über Streuung und Varianz enthalten, wurden keine

statistischen Tests angewandt.

3 Statistik

Vor Beginn der Experimente wurde für alle Experimente eine Power-Analyse mit dem Programm G*Power 3.1.9.2 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (FAUL et al., 2007)) durchgeführt, um die erforderliche Stichprobengröße der Tiere zu berechnen. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 (α -Fehler) und eine Wahrscheinlichkeit von 80 % ($\beta = 0,2$) angenommen. Bei der immunhistochemischen Auswertung wurden sowohl die stereologische Berechnung der Zellzahlen pro Volumen als auch die Bemessung der optischen Dichte und der markierten Fläche zwischen den Gehirnarealen der Tiere mit elektrischer Stimulation im Vergleich zu Tieren mit Schein-Stimulation durchgeführt. Im intrahippocampalen Kainat-Modell wurde das Sigma-1-Expressionsniveau der Tiere mit Kainat-Injektion und das der Tiere mit Vehikel-Injektion zu den unterschiedlichen Zeitpunkten mit den zuvor genannten Methoden verglichen. Die quantitative Bestimmung der mRNA-Menge in unterschiedlichen Gehirnarealen, normalisiert durch endogene Kontrollen, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei Tieren mit intrahippocampaler Kainat-Injektion und Kontroll-Tieren verglichen. Die Hauptzielvariable war die Veränderung des Expressionsmusters mit einer minimalen relevanten biologischen Differenz von 10 % in der immunhistochemischen Analyse und 20 % in der qPCR. Als eine experimentelle Einheit wurde eine Maus angesehen. Die erhobenen Daten wurden zunächst deskriptiv auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test und auf Ausreißer mithilfe des Grubbs-Tests ($\alpha = 0,05$) getestet. Die Labormethoden im intrahippocampalen Kainat-Modell wurden statistisch mittels Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) analysiert, ohne Korrektur für multiple Vergleiche, da die Gruppenvergleiche unabhängig voneinander betrachtet wurden. Für paarweise Post-hoc-Vergleiche wurde der Fishers Least Significant Difference (LSD) Test verwendet.

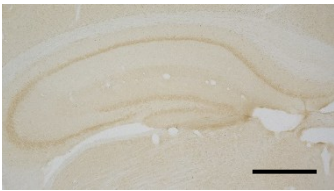
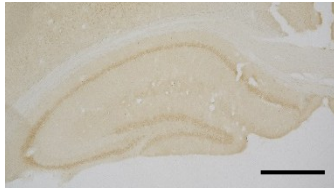
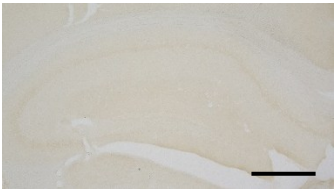
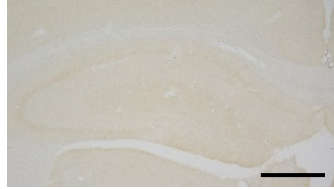
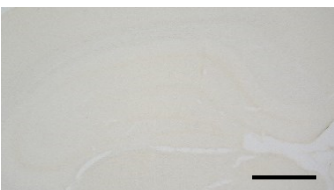
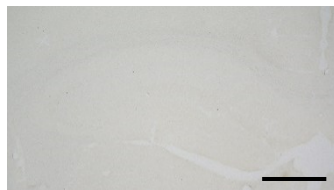
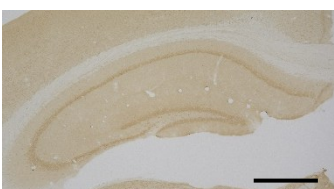
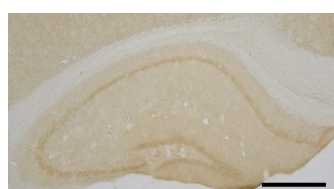
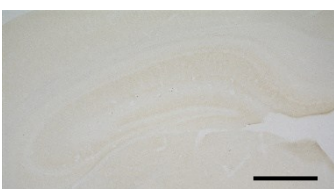
Bei einer Effektstärke von $f = 0,5$ ergab sich eine Gesamtstichprobengröße von 48 Tieren, à 12 Tieren pro Gruppe. Die immunhistochemischen Unterschiede zwischen elektrisch stimulierten und Kontroll-Tieren wurden ebenfalls wie oben beschrieben auf Normalverteilung und Ausreißer geprüft. Anschließend erfolgte die Analyse mittels zweiseitigem Student's t-Tests zur Prüfung von Mittelwertsunterschieden zwischen zwei unabhängigen Gruppen. Durch

Verwendung einer Effektstärke von $d = 1,22$ ergab sich eine Gruppengröße von jeweils 12 Tieren. In seltenen Fällen, in denen keine Normalverteilung bestand, wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test angewendet. Ausreißer wurden aus der statistischen Analyse und der grafischen Darstellung exkludiert. Alle Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung mit signifikanten Abweichungen mit $p < 0,05$ dargestellt. Für die statistischen Berechnungen wurde GraphPad Prism (10.4.1 GraphPad Software, Boston, USA) verwendet.

V ERGEBNISSE

1 Basierend auf immunhistochemischen- und Western-Blot-Analysen konnte der Sigma-1 Antikörper HPA018002 als spezifisch identifiziert werden

Die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern zeigt in der immunhistochemischen Detektion unter Anwendung eines standardisierten Färbeprotokolls sowohl in Gehirngewebe von Wildtyp-Mäusen als auch in Gehirngewebe von Sigma-1-KO-Mäusen (jeweils $n = 3$) entweder ein identisches und somit unspezifisches oder nur sehr schwaches Signal (siehe **Tabelle 16**). Um in dieser Methode ein spezifisches Signal zu erzielen, war eine erneute Anpassung des Protokolls notwendig.

Sigma-1 Antikörper	WT	KO
Abcam ab53852		
Abcam ab253192		
Cell Signaling 61194S		
Atlas HPA018002		
Atlas HPA024071		

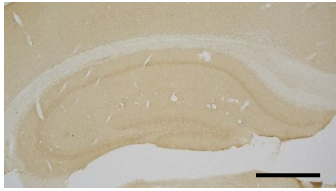
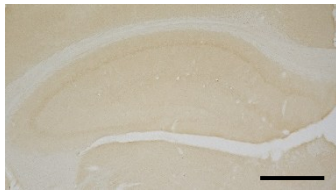
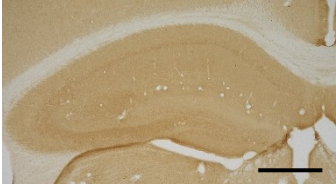
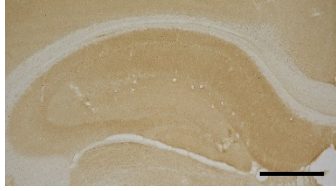
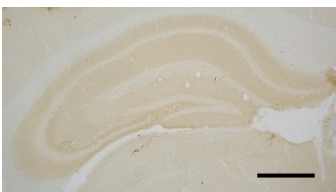
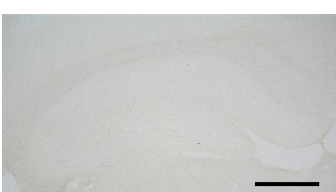
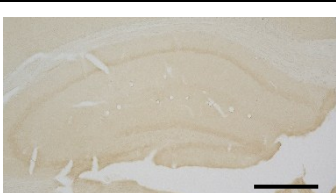
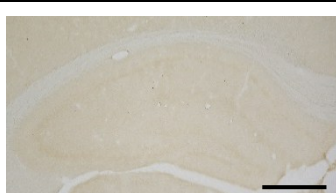
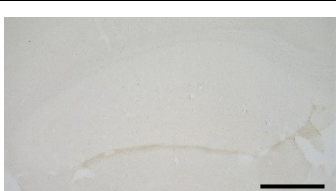
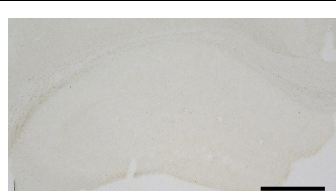
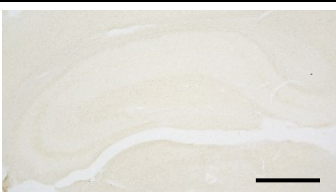
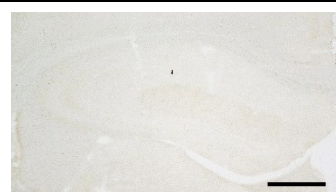
Bioss bs5111R		
GeneTex GTX115389		
Santa Cruz sc-137075		
Sigma/Merck MABN390		
N727 Hauseigene Herstellung		
N728 Hauseigene Herstellung		
N6229 Hauseigene Herstellung		

Tabelle 16: Muster und Intensität der getesteten Sigma-1 Antikörper.

Exemplarische Darstellung der Ergebnisse des Antikörpervergleichs anhand des rechten Hippocampus eines WT- und KO-Tieres. Der Vergleich der Expressionsmuster in WT- und KO-Proben ergab eine ähnliche Verteilung und Intensität der immunhistochemischen Signale der getesteten Antikörper. Daher kann davon ausgegangen werden, dass entweder eine unspezifische Bindung des Antikörpers oder ein Ausbleiben der spezifischen Bindung vorliegt. Maßstab: 50 µm.

Nach Anpassung des Protokolls in Anlehnung an LIU et al. (2023) konnte ein spezifisches Sigma-1-Signal in Gehirngewebe von WT-Mäusen detektiert werden (siehe **Abbildung 12**).

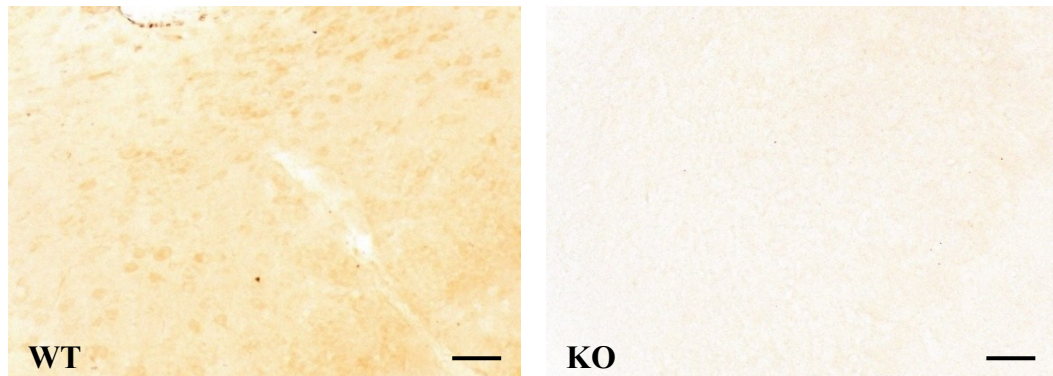


Abbildung 12: Visualisierung der spezifischen Sigma-1-Antigen-Antikörper-Reaktion des Sigma-1-Antikörpers HPA018002.

Immunhistochemische Detektion von Sigma-1 im piriformen Cortex eines WT- und eines KO-Tieres. Das fehlende DAB-Signal im KO-Tier bestätigt die Spezifität des Antikörpers, da in Abwesenheit des Zielantigens keine Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt und somit keine chromogene Reaktion ausgelöst wird. Maßstab: 20 μ m.

Darüber hinaus wurde zur weiteren Kontrolle der spezifischen Antikörperbindung eine Immunfluoreszenz-Detektion mit demselben Antikörper durchgeführt. Im WT-Gewebe war ein deutliches Sigma-1-Fluoreszenzsignal erkennbar, während im KO-Gewebe aufgrund des fehlenden Antigens kein entsprechendes Signal nachgewiesen werden konnte. Die Aufnahmen verschiedener Gehirnregionen, die unter identischen Bedingungen erstellt wurden, bestätigen damit die Spezifität des Sigma-1-Antikörpers (siehe **Abbildung 13**).

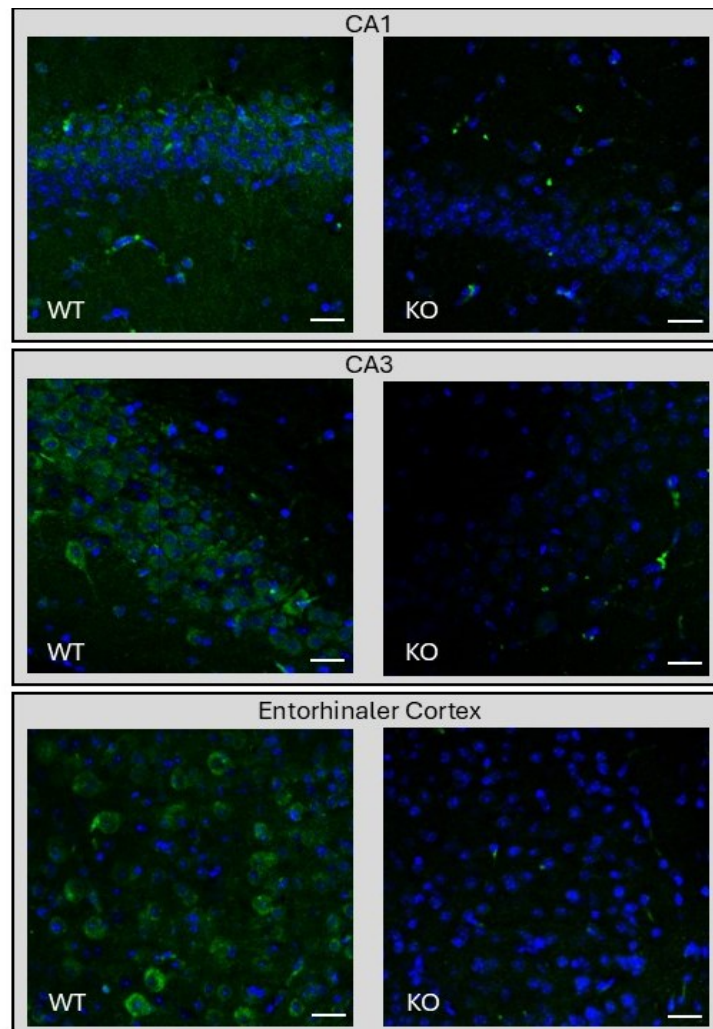


Abbildung 13: Sigma-1- und Kern-Immunfluoreszenz-Detektion in verschiedenen Gehirnarealen von Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Gehirnen.

Exemplarische Darstellung der CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus und des entorhinalen Cortex in WT- und KO-Gehirngewebe. Die Aufnahmen, die unter identischen Bedingungen erstellt wurden, zeigen in Gehirngewebe von WT-Mäusen ein grünes Sigma-1-Signal mit perinukleärer Anordnung um die blau markierten Zellkerne. In den gleichen Gehirnarealen von Knockout-Mäusen sind ausschließlich die blaue Kernfärbung sowie vereinzelte grüne Fluoreszenzsignale zu erkennen, die auf Fluoreszenz-Artefakte zurückzuführen sind. Maßstab: 20 µm.

Die Antikörperspezifität kann sich zwischen verschiedenen Antigen-Detektionsmethoden aufgrund unterschiedlicher Epitop-Konformationen und der damit verbundenen Epitop-Verfügbarkeit deutlich unterscheiden. Auf Grundlage der immunhistochemischen Befunde wurden zehn vielversprechende Antikörper einer ergänzenden Analyse mittels Western Blot unterzogen. Dabei konnte bei vier Antikörpern (siehe **Abbildung 14, A, H-J**) ein WT-spezifisches Sigma-1-Signal nachgewiesen werden. Dieses äußerte sich in Form einer Bande, die durch die

spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht wurde und der erwarteten Größe des Sigma-1-Proteins entsprach (~25 kDa). In der korrespondierenden KO-Probe konnte im Bereich der erwarteten Molekularmasse keine Bande detektiert werden. Der für die immunhistochemische Analyse verwendete Antikörper (HPA018002, Atlas Antibodies) konnte demnach ebenfalls im Western Blot validiert werden.

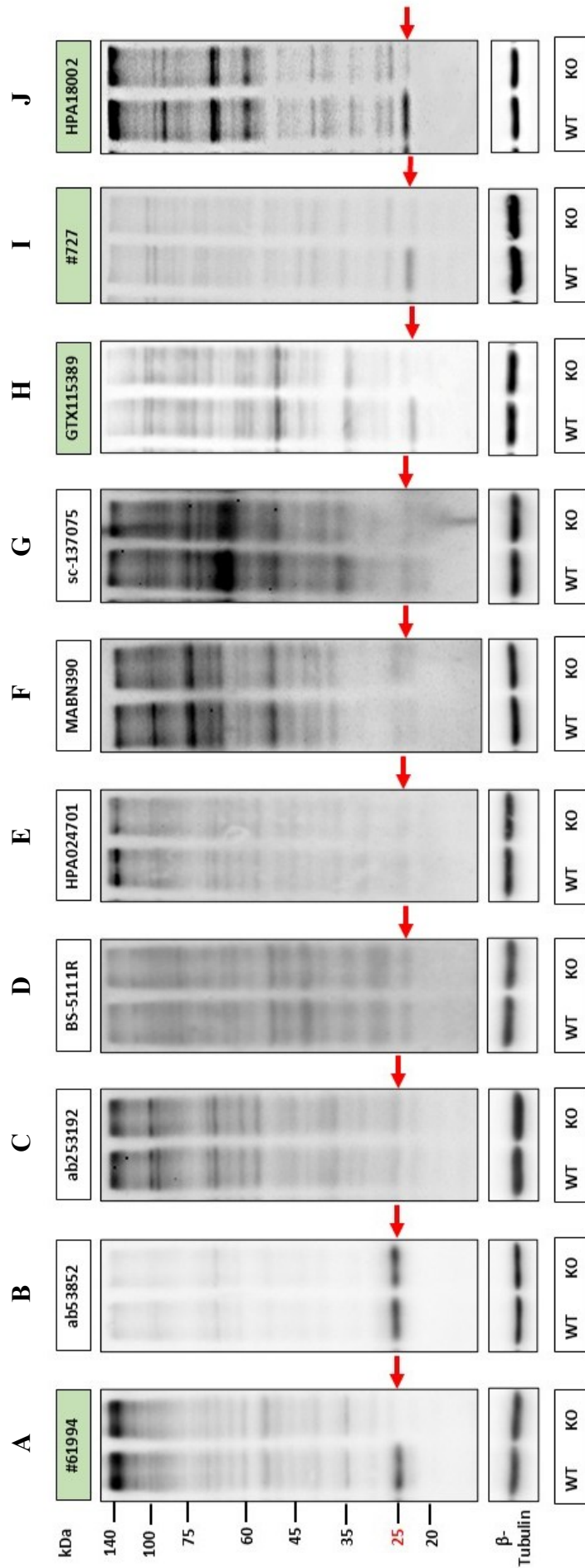


Abbildung 14: Spezifität der getesteten Sigma-1-Antikörper im Western Blot.

Pro Antikörper wurden insgesamt drei unabhängige Proben getestet. Dargestellt ist eine repräsentative Bande einer WT- und einer KO-Probe. Sigma-1 (~25 kDa) ist durch einen roten Pfeil hervorgehoben und konnte bei vier der zehn getesteten Antikörper nachgewiesen werden (A, H–J). β-Tubulin (~50 kDa) diente als Ladekontrolle.

2 Die Sigma-1-Expression ist im Gehirngewebe von Mäusen aus dem Amygdala-Kindling-Modell und dem intrahippocampalen Kainat-Modell erhalten

Bei der Analyse der Sigma-1-Expression ließ sich ein positives Sigma-1-Signal grundsätzlich in allen analysierten Gehirnarealen nachweisen. Im Seitenvergleich der Hemisphären war das Sigma-1-Signal in allen Versuchsgruppen insgesamt gleichmäßig und homogen verteilt. In den Kainat-behandelten Tieren waren auf der Injektionsseite des Hippocampus hingegen erwartungsgemäß deutliche zelluläre und strukturelle Veränderungen erkennbar. Diese manifestierten sich durch eine reduzierte Zellgröße, unregelmäßige Form und verkürzte Fortsätze. Besonders betroffen waren die CA1- und CA3-Regionen des Hippocampus. Im Gyrus dentatus war in der chronischen Phase (35 Tage nach SE-Induktion) eine Auflockerung und Verbreiterung des Stratum granulosum mit veränderter Schichtung erkennbar, welche auf eine charakteristische zelluläre Dispersion des Stratum granulosum hinweist. Auch in morphologisch veränderten Zellen ließ sich ein Sigma-1-Signal erkennen. Abgesehen von den beschriebenen strukturellen Veränderungen war die Sigma-1-Expression in Zellen der Cortex-Regionen, deren Morphologie Neuronen ähnelte, besonders deutlich ausgeprägt. Auch in Subregionen des Hippocampus, insbesondere in den Zellen des Stratum pyramidale, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Sigma-1-Expression (siehe **Abbildung 15 (A)**). Auf subzellulärer Ebene war im Zytoplasma ein Sigma-1-spezifisches, perinukleäres, ringförmiges sowie punktuell Signal erkennbar. Die angefärbten Zellen wiesen eine polygonale bis sternförmige Morphologie mit deutlich erkennbaren Fortsätzen auf. Dieses Muster stimmt mit den typischen morphologischen Merkmalen neuronaler Zellen überein (siehe **Abbildung 15 (B)**). Bei höherer Vergrößerung traten kleinere, kompaktere Zellen mit dreieckiger bis ovaler Form und geringerem Zytoplasmaanteil in Erscheinung. Die immunhistochemische Detektion mittels DAB visualisierte das Sigma-1-Expressionssignal, das in diesen Zellen eine perinukleäre, punktuelle Verteilung zeigte. Die Morphologie dieser Zellen lässt auf eine gliale Herkunft schließen.

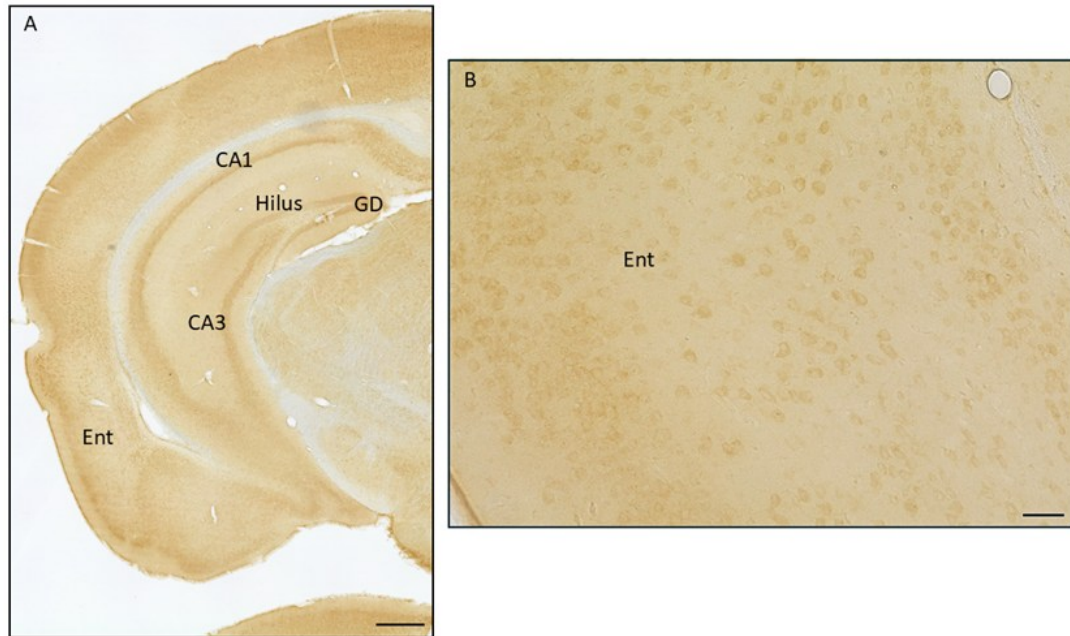
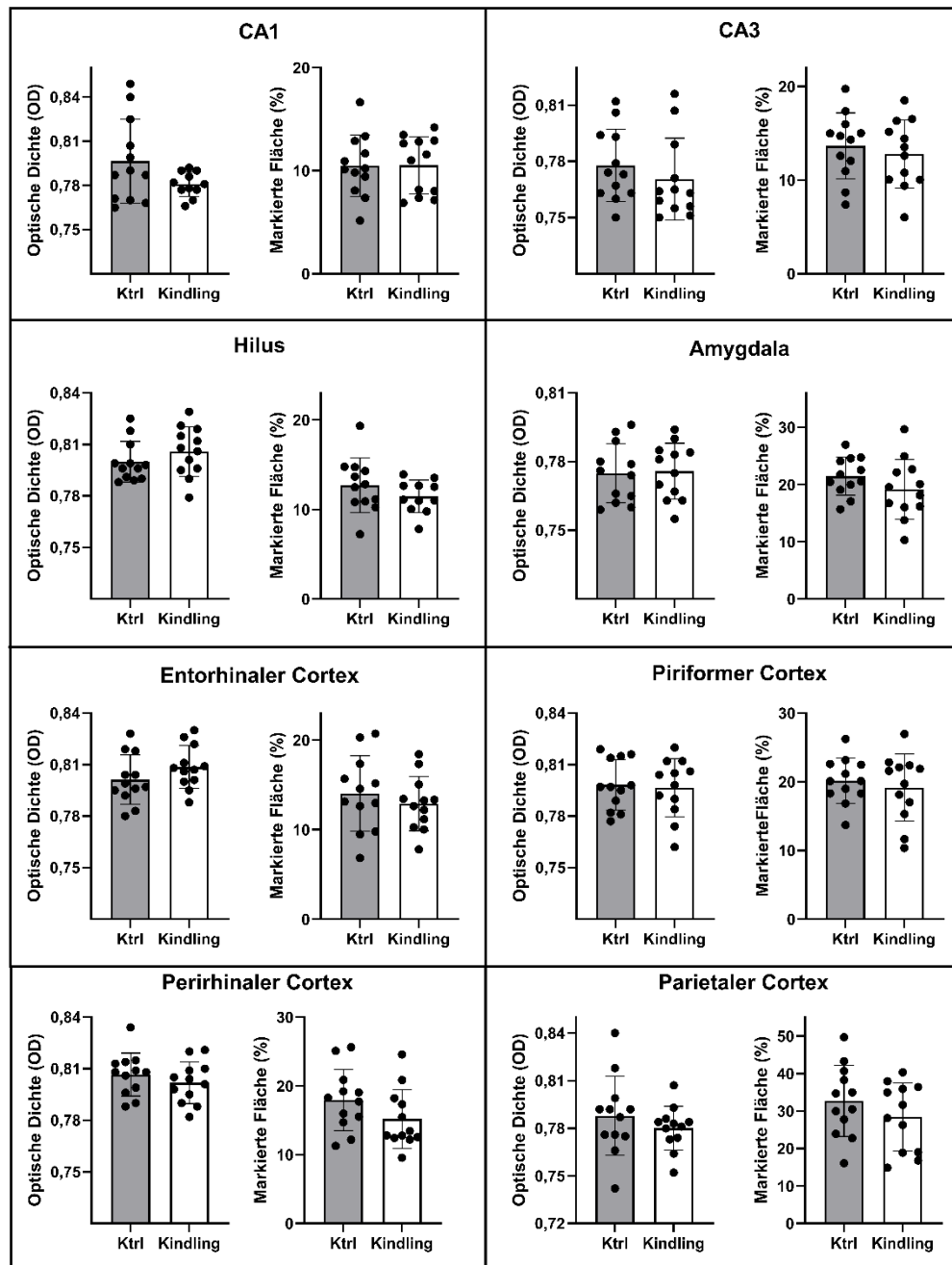


Abbildung 15: Expressionsmuster der Sigma-1-Expression.

Die Abbildung zeigt die Sigma-1-Expression in Gehirnarealen eines Kainat-behandelten Tieres in der frühen Post-Insult-Phase. **(A)** Übersicht des Hippocampus mit seinen Subregionen contralateral zur Elektrode (Cornu-Ammonis-Region 1 (**CA1**) und 3 (**CA3**), **Hilus** des Gyrus Dentatus (**GD**)) und dem entorhinalen Cortex (**Ent**). Maßstab: 1 mm. **(B)** Detailaufnahme des **Ent**. Die Sigma-1-Expression im Zytoplasma der positiv angefärbten Zellen ist deutlich zu erkennen. Maßstab: 40 μ m.

Um zu ermitteln, ob und wie sich die Ausbildung eines hyperexzitablen neuronalen Netzwerkes auf die Sigma-1-Expression auswirkt, wurde die Expression durch Auswertung der optischen Dichte und der markierten Fläche analysiert. Beim Vergleich der Kindling-Gruppe mit der Kontrollgruppe, die nur eine Scheinstimulation erhielt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der CA1- und CA3-Region und im Hilus des Gyrus dentatus des Hippocampus, in der Amygdala, im entorhinalen, piriformen, perirhinalen und parietalen Cortex sowie im lateralen posterioren, mediodorsalen und retikulären Thalamuskern festgestellt werden (siehe **Abbildung 16**).



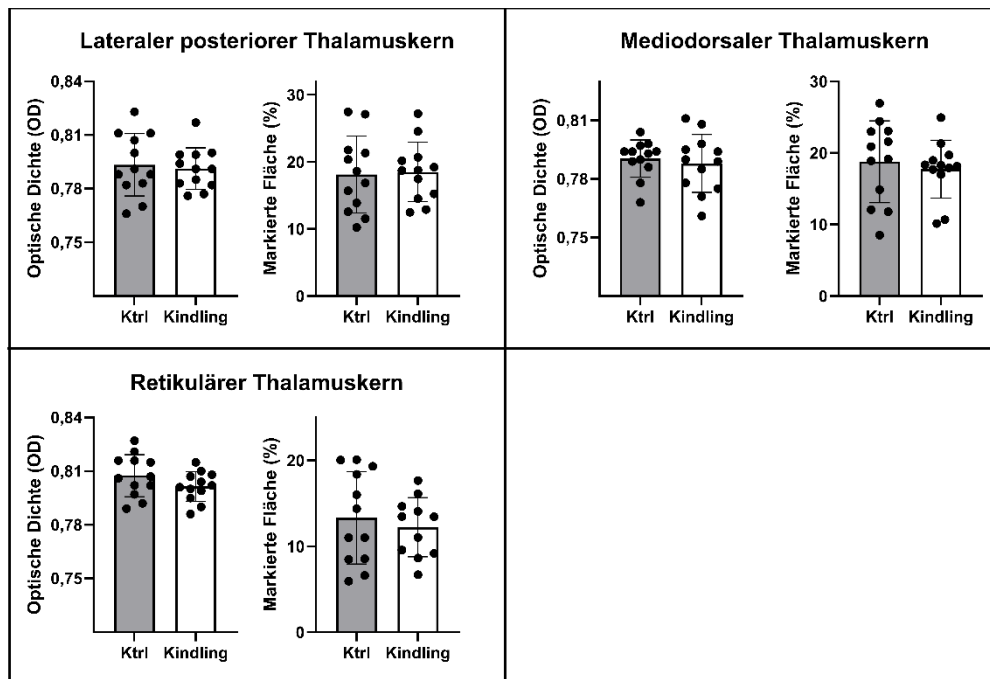
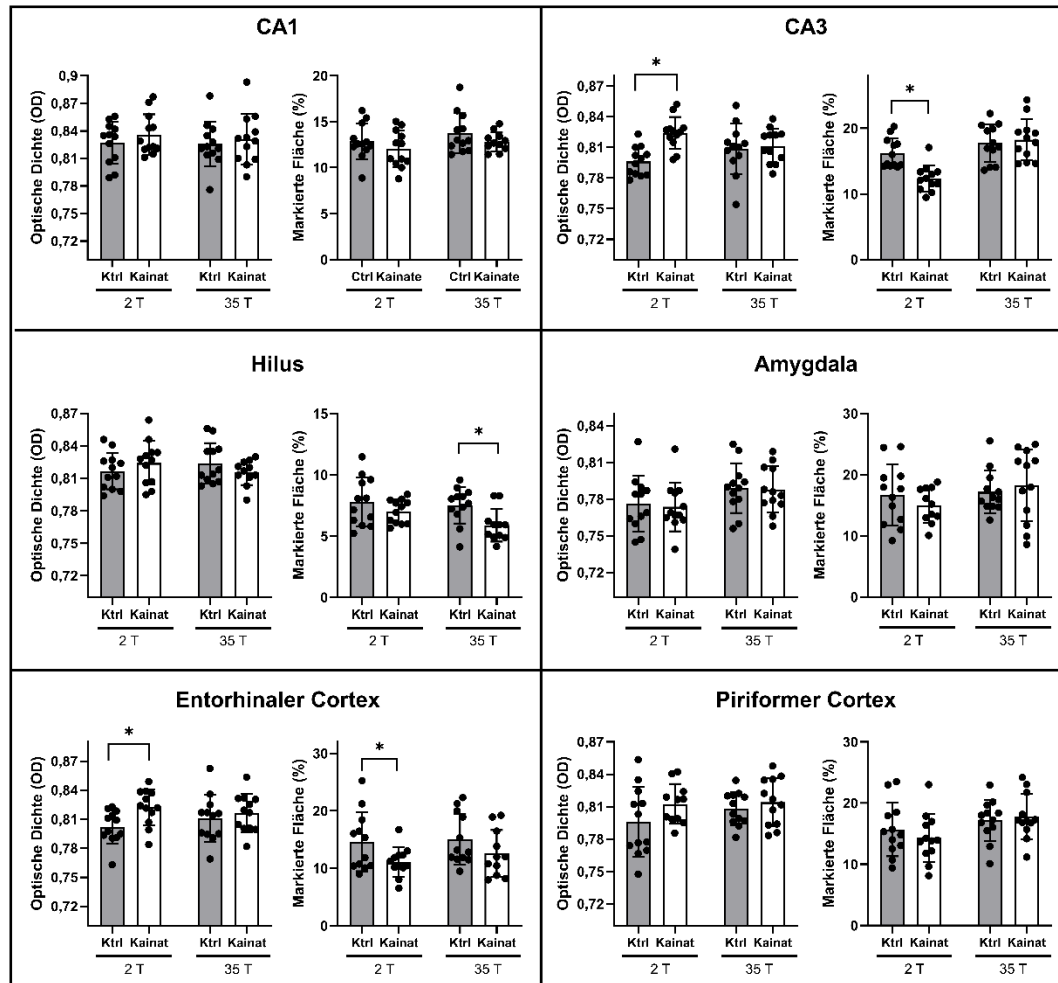


Abbildung 16: Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche der Sigma-1-Expression in vollgekindelten Tieren und Tieren mit Scheinstimulation.

Dargestellt sind die Ergebnisse der gemessenen optischen Dichte (OD) und der markierten Fläche (%) in den untersuchten Gehirnarealen. Die Sigma-1-Expression in vollgekindelten Tieren wurde mit der in Kontroll-Tieren verglichen (jeweils $n = 12$ Tiere). Der Student's t-Test zeigte in keinem der analysierten Gehirnareale signifikante Veränderungen des Sigma-1-Expressionsniveaus zwischen den beiden Tiergruppen. Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte mit dem Mittelwert ($\pm$ SD) der Versuchsgruppen.

Der SE und der damit zusammenhängende zelluläre Stress kann einen maßgeblichen Einfluss auf die Proteinexpression, die korrekte Faltung von Proteinen und neuronalen Zelltod haben (HANSEN et al., 2014; HENSHALL, 2018). Aus diesem Grund wurde die Sigma-1-Expression zusätzlich auch im intrahippocampalen Kainat-Modell untersucht, das nachgewiesenermaßen diese Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene abbildet. In der CA1-Region des Hippocampus, der Amygdala, dem piriformen, perirhinalen und parietalen Cortex sowie im lateralen posterioren, mediodorsalen und retikulären Thalamuskern wurden zu den analysierten Zeitpunkten (2 und 35 Tage) keine signifikanten Unterschiede zwischen Kainat- und Kontrollgruppe festgestellt. Die optische Dichte war jedoch sowohl in der CA3-Region des Hippocampus als auch im entorhinalen Cortex in der frühen Post-Insult-Phase in den Kainat-behandelten Tieren signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu nahm die markierte Fläche in beiden

Arealen zum selben Zeitpunkt deutlich ab. Visuell-Mikroskopisch ließ sich nach der Normalisierung im entorhinalen Cortex in der äußeren Körner- und Pyramidenzellschicht (Lamina II und III) ein weniger stark ausgeprägtes Sigma-1-Expressionssignal in 8 von 12 Kainat-behandelten Tieren zwei Tage nach Induktion des SE feststellen. Außerdem war die markierte Fläche im Hilus in der chronischen Phase in den Kainat-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (siehe **Abbildung 17**).



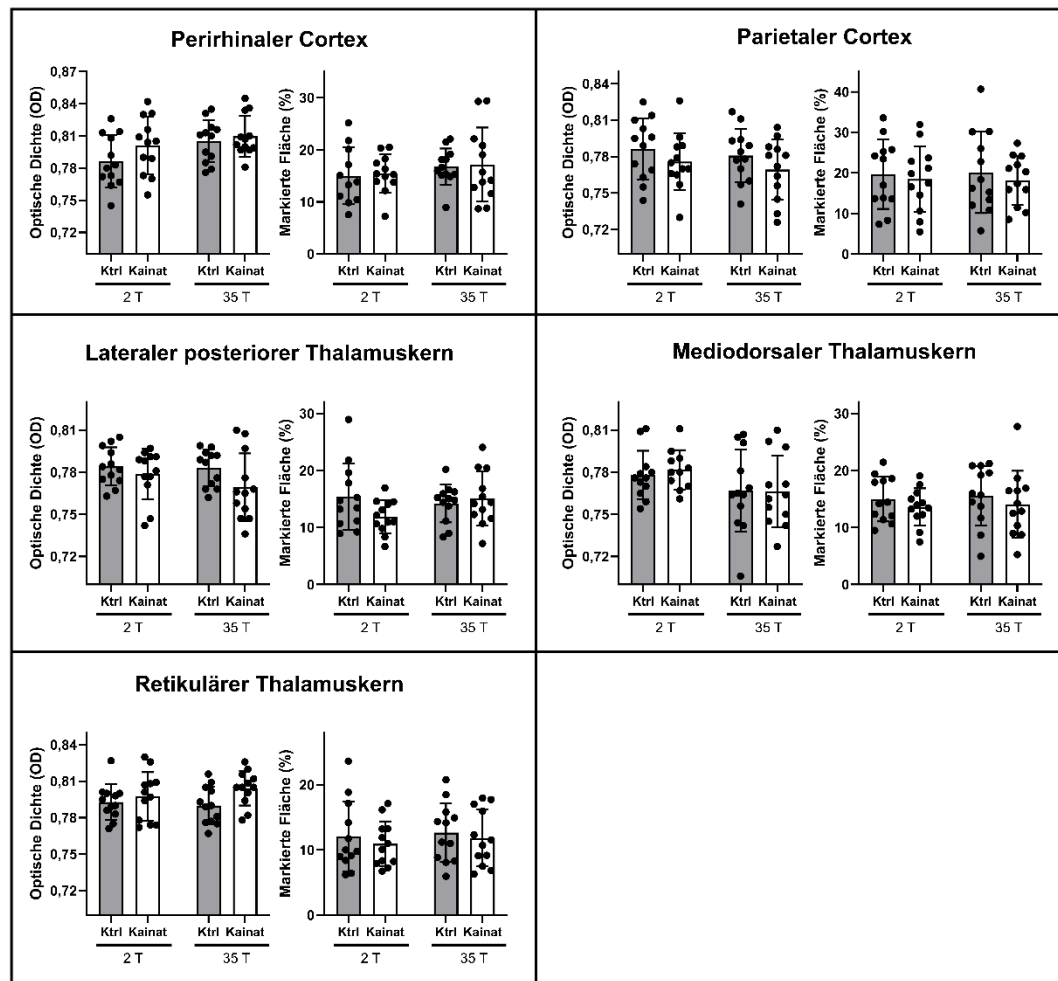


Abbildung 17: Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche der Sigma-1-Expression im intrahippocampalen Kainat-Modell.

Dargestellt sind die optische Dichte (OD) und die markierte Fläche (%) der Sigma-1-Expression in den analysierten Gehirnbereichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die optische Dichte in der CA3-Region des Hippocampus ($p_{CA3}=0,0005$) und im entorhinalen Cortex ($p_{Ent}=0,0181$) in Kainat-behandelten Tieren (2 Tage nach Induktion des SE) signifikant erhöht. Zum selben Zeitpunkt war die markierte Fläche (%) in beiden Arealen verringert ($p_{CA3}=0,0014$; $p_{Ent}=0,0441$). Im Hilus war die markierte Fläche (%) in der chronischen Phase signifikant vermindert ($p_{Hilus}=0,0118$). In allen anderen analysierten Gehirnbereichen blieb das Sigma-1-Expressionsniveau zu beiden Zeitpunkten in den Versuchsgruppen vergleichbar mit der Kontrollgruppe (optische Dichte und markierte Fläche (%)). Statistische Testverfahren: *Two-way ANOVA* mit paarweisen Post-hoc-Vergleichen (*Fishers Least Significant Difference Test*). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte mit Mittelwert ($\pm$ SD) der Gruppen, * = $p < 0,05$.

Der Kainat-induzierte Status epilepticus führt im intrahippocampalen Kainat-Modell zu neuronalem Zellverlust im Hippocampus. Sekundäre Veränderungen wurden auch in der Amygdala sowie im piriformen und entorhinalen Cortex beschrieben (MAGLOCZKY & FREUND, 1993; CHEN & BUCKMASTER,

2005). Diese Zellverluste können sich in der Folge in einer Reduktion der markierten Fläche (%) in den analysierten Gehirnnarealen widerspiegeln. Um ein mögliches Verzerrungspotenzial auszuschließen, wurde die Expression des neuronalen Markers NeuN überprüft. Für die Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche wurden aus den Tiergruppen (Kainat- und Kontrollgruppe) zu beiden Zeitpunkten jeweils sechs Tiere randomisiert ausgewählt. Für diese Auswertungen wurde vorab keine formale Kalkulation der Stichprobengröße durchgeführt, sodass alle durchgeführten statistischen Berechnungen mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden müssen. Die NeuN-Expression zeigte in der CA1-Region des Hippocampus, im piriformen Cortex und im entorhinalen Cortex an beiden Zeitpunkten (2 und 35 Tage) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In der CA3-Region des Hippocampus war zum Zeitpunkt zwei Tage nach SE-Induktion die optische Dichte in den Kainat-behandelten Tieren verringert. Im Hilus konnte sowohl eine Reduktion der optischen Dichte als auch der markierten Fläche in der frühen Post-Insult-Phase in den Kainat-behandelten Tieren festgestellt werden. Die Analyse ergab keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den Gruppen in der chronischen Phase. Die grafische Darstellung der Ergebnisse ist der von mir mitbetreuten Bachelorarbeit von Emilia Nike Sophie Schneider („Immunohistochemical Analysis of Neurodegeneration in a Chronic Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy“) zu entnehmen. Die Analysen wurden von Frau Schneider durchgeführt und die erhobenen Daten wurden in die vorliegende Dissertation einbezogen.

In den relevanten Arealen wurde die Sigma-1-Expression mittels stereologischer Zellzählung analysiert. Diese Methodik gilt als etablierte Referenzmethode für quantitative Gewebeauswertungen. In allen Subregionen des Hippocampus (CA1, CA3 und Hilus) und im entorhinalen Cortex blieb die Anzahl der Sigma-1-positiven Zellen pro Volumen zu den analysierten Zeitpunkten zwischen den Gruppen unverändert und somit erhalten (siehe **Abbildung 18**). Die Volumenberechnung der einzelnen Regionen, die als Nebenparameter während des Zählvorgangs erfasst und berechnet wurde, ergab bei den Kainat-behandelten Tieren in der chronischen Phase eine signifikante Zunahme des Volumens in der CA1-Region, im Hilus und im entorhinalen Cortex. Sowohl die Auswertungen der Sigma-1-Expression mittels ImageJ-Analyse als auch die stereologische Zellzählung zeigten in der chronischen Phase eine vergleichbare Varianz zwischen der Kontroll- und der Kainat-Gruppe.

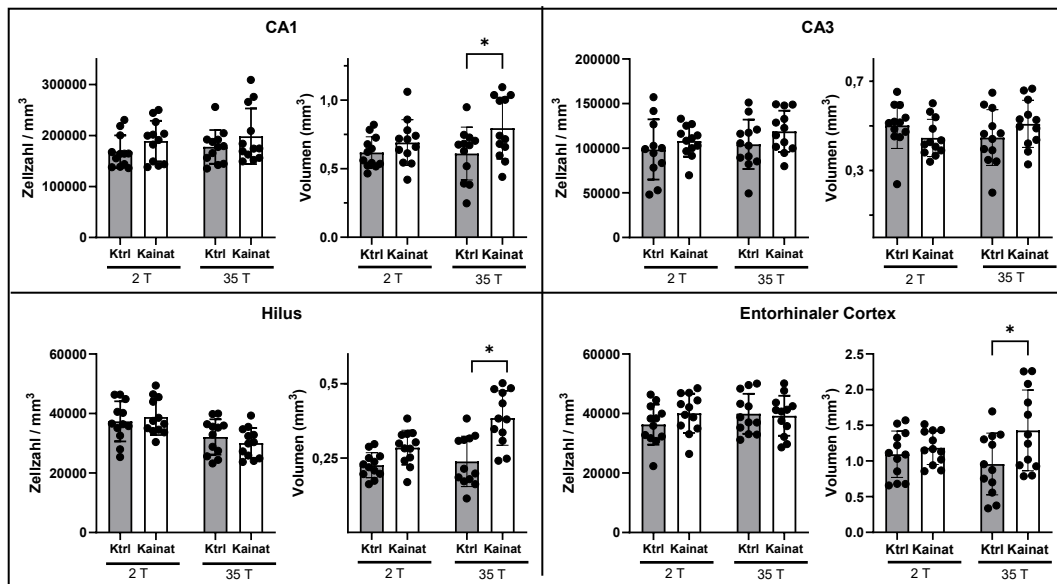


Abbildung 18: Anzahl der Sigma-1 positiven Zellen und Volumen der Subregionen des Hippocampus (CA1, CA3 und Hilus) und im entorhinalen Cortex.

In sämtlichen analysierten Regionen des Hippocampus (CA1, CA3 und Hilus) sowie im entorhinalen Cortex wurde sowohl in den Kainat- als auch in den Kontrollgruppen eine konstante Anzahl an Sigma-1-positiven Zellen pro Volumeneinheit (mm^3) detektiert. Allerdings ergab die Berechnung des Gesamtvolumens in der CA1-Region ($p_{\text{CA1}} = 0,0294$), im Hilus ($p_{\text{Hilus}} = 0,0001$) und im entorhinalen Cortex ($p_{\text{Ent}} = 0,0140$) eine signifikante Erhöhung des Volumens (mm^3) in den Kainat-behandelten Tieren 35 Tage nach SE-Induktion. Statistische Testverfahren: *Two-way* ANOVA mit paarweise Post-hoc-Vergleichen (*Fishers Least Significant Difference Test*, LSD). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte mit Mittelwert ($\pm$ SD) der Gruppen, * = $p < 0,05$.

3 Sigma-1 wird in Neuronen, Astrozyten und Gliazellen exprimiert

Die Auswertung der Immunfluoreszenz ergab sowohl bei Kainat-behandelten als auch bei Kontroll-Tieren ein gleichmäßig verteiltes Sigma-1-Signal. Dieses war sowohl in neuronalen als auch in glialen Zellpopulationen nachweisbar, wie durch Doppel- und Mehrfachmarkierung mit spezifischen Zellmarkern bestätigt. Das Expressionsmuster entsprach grundlegend dem der immunhistochemischen Detektion mittels DAB. Im Seitenvergleich der Hemisphären zeigte sich die Sigma-1-Expression sowohl ipsilateral als auch contralateral zur Elektrode homogen. Abweichungen des gleichmäßigen Sigma-1-Signals traten ausschließlich in den Hippocampus-Regionen auf der Injektionsseite der Kainat-behandelten Tiere auf. In den hippocampalen Subregionen CA1 und CA3 traten ausgeprägte

Abweichungen der physiologischen Zellmorphologie auf, die von einer Reduktion der Sigma-1-Expression begleitet wurden. In der chronischen Phase zeigte sich im Gyrus dentatus eine auffällige Auflockerung und eine veränderte Anordnung der Körnerzellschicht. Diese morphologische Veränderung liefert Hinweise auf eine zelluläre Dispersion, wie sie in der Literatur im Zusammenhang mit epileptogener Reorganisation beschrieben wird (PARENT & LOWENSTEIN, 1997; BERTRAM, 2009). In diesen Arealen war ein verstärktes GFAP-Signal erkennbar, das auf eine mögliche astrogliale Reaktion hindeutet (NIQUET et al., 1994). Zur Charakterisierung der Sigma-1-Expression wurden kombinierte Immunfluoreszenz-Nachweise mit NeuN und vGlut1 zur Identifikation exzitatorischer Neuronen sowie mit NeuN und GAD67 zur Markierung inhibitorischer Neuronen eingesetzt. GFAP diente als Marker für Astrozyten, Iba1 zur Identifikation von Mikrogliazellen. Auf Grundlage dieser Marker-Kombinationen lässt sich die Sigma-1-Expression sowohl in exzitatorischen als auch in inhibitorischen Neuronen nachvollziehen. Darüber hinaus konnte das ringförmige und punktuelle Sigma-1-Signal auch in Astrozyten und Mikrogliazellen nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 19**).

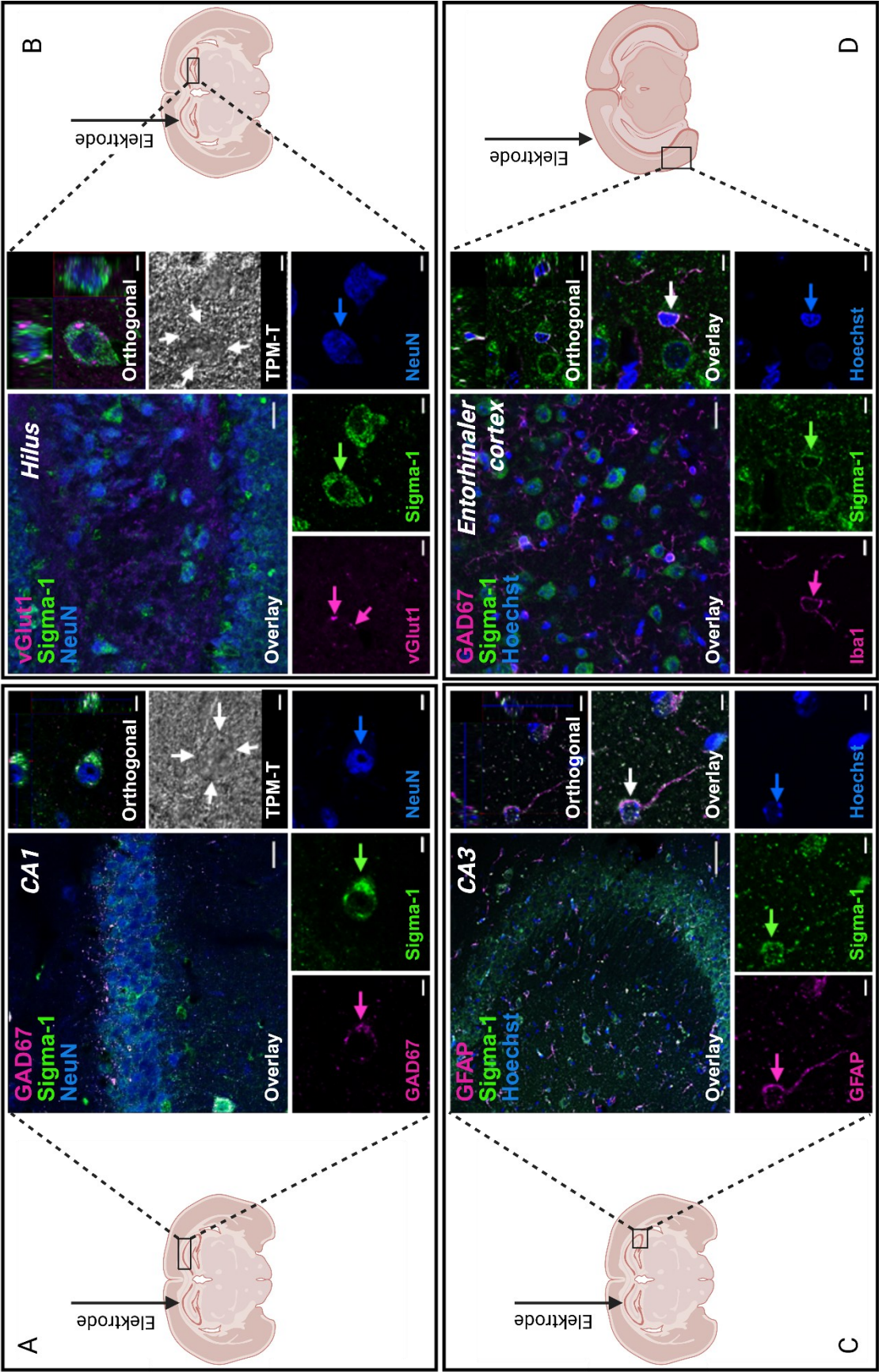


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Detektion von Sigma-1 mit den zelltypspezifischen Markern GFAP, Iba1 und NeuN, in Kombination mit GAD67 und vGlut1, in der CA1- und CA3-Region und im Hilus des Hippocampus sowie im entorhinalen Cortex.

Zu jeder untersuchten Gehirnregion (CA1, CA3, Hilus des Hippocampus, entorhinaler Cortex) ist ein Übersichtsbild mit überlagerten Fluoreszenzsignalen dargestellt. Ergänzend wird eine vergrößerte Detailaufnahme repräsentativer Zellen gezeigt, in der die spezifischen Fluoreszenzsignale der verwendeten Marker getrennt dargestellt sind. (A) und (B) zeigen in den Detailaufnahmen die zelluläre Lokalisation des Sigma-1-Signals (*grün*) in Kombination mit neuronalen Markern. In der CA1-Region des Hippocampus (A) ist Sigma-1 perinukleär lokalisiert und ko-exprimiert mit NeuN (*blau*), einem Marker für Neuronen. Zusätzlich zeigt Sigma-1 eine Ko-Expression mit punktförmigen GAD67-Signalen (*magenta*), die inhibitorische Neurone kennzeichnen. Im Hilus des Gyrus dentatus (B) ist Sigma-1 (*grün*) ebenfalls in NeuN-positiven Zellen (*blau*) lokalisiert und zeigt eine Ko-Expression mit punktförmigen vGlut1-Signalen (*magenta*), die exzitatorische Neurone markieren. Die Ko-Expression von Sigma-1 innerhalb einer Zelle mit NeuN und GAD67 bzw. vGlut1 wurde zusätzlich durch die T-PMT-Funktion des Mikroskops bestätigt. (C) zeigt in der CA3-Region des Hippocampus ein perinukleäres, zytoplasmatisch ringförmiges Sigma-1-Signal (*grün*), das innerhalb des GFAP-markierten Zytoskeletts von Astrozyten (*magenta*) lokalisiert ist und von den *blau* markierten Zellkernen ergänzt wird. (D) visualisiert ein vergleichbares Sigma-1-Signal (*grün*) in Iba1-positiven Mikrogliazellen (*magenta*) im entorhinalen Cortex, ebenfalls mit begleitender Kernfärbung (*blau*). Die ergänzend aufgenommenen Z-Stapel in (A–D) ermöglichen eine orthogonale Durchsicht der Zellen und veranschaulichen somit die räumliche Verteilung des Sigma-1-Signals in Bezug auf die jeweiligen Zellmarker.

4 Der mRNA-Gehalt bleibt im Hippocampus konstant und ist im entorhinalen Cortex temporär moduliert

Um die mRNA-Integrität zu bestimmen, wurden von den gepoolten Proben des parietalen Cortex Verdünnungsreihen hergestellt und eine Effizienzbestimmung durchgeführt. In jeder Poolprobe befanden sich jeweils vier Gehirne, die in einer Duplexreaktion mit Sigma-1 und einem Referenzgen getestet wurden. Die Effizienz aller Poolproben lag innerhalb der empfohlenen 90 – 110 %. Die entsprechenden Werte der Effizienzkalkulation sind **Tabelle 17** zu entnehmen.

Poolprobe	Effizienzkalkulation Sigma-1 (%)	Effizienzkalkulation NONO/RPL13A (%)
1	91,999	90,882

2	102,877	108,372
3	97,236	100,632
4	91,151	104,787
5	107,724	107,421
6	100,705	102,061
7	102,378	99,113
8	90,072	93,317
9	98,631	98,130
10	105,396	103,481
11	104,382	105,331
12	106,128	98,054

Tabelle 17: Ergebnisse der Überprüfung der mRNA-Integrität.

Die Qualität der analysierten mRNA wurde anhand einer Poolprobe, bestehend aus vier isolierten parietalen Cortices, bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und eine Effizienzberechnung mithilfe eines Sigma-1-Assays und einer endogenen Kontrolle durchgeführt. Alle Poolproben lagen innerhalb der akzeptierten Range von 90 bis 110 %.

Zur Untersuchung möglicher regionaler Unterschiede in der Sigma-1-Expression wurden die mRNA-Expressionsniveaus in verschiedenen Gehirnarealen zu zwei Zeitpunkten (2 Tage, 35 Tage) analysiert. Die relative Quantifizierung der einzelnen endogenen Kontrollen sowie die gemittelte Auswertung beider endogenen Kontrollen ergaben zu beiden Zeitpunkten in allen untersuchten Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, Hilus des Gyrus Dentatus) eine vergleichbare Sigma-1-mRNA-Expression zwischen der Kainat- und der Kontrollgruppe. Außerdem zeigte sich in der chronischen Phase eine vergleichbare Varianz zwischen beiden Gruppen. Im entorhinalen Cortex zeigte sich in der frühen Post-Insult-Phase sowohl in der Auswertung der einzelnen endogenen Kontrollen als auch in der gemittelten Berechnung eine signifikante Reduktion der Sigma-1-mRNA-Expression in der Kainat-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe **Abbildung 20**). Zur Ermittlung der prozentualen Reduktion der Expression wurde der *fold change* der gemittelten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte berechnet. Da

es sich hierbei um Verhältnisswerte handelt, die typischerweise keine Normalverteilung aufweisen und keine Informationen über Streuung oder Varianz enthalten, wurde auf statistische Tests verzichtet. Stattdessen erfolgte eine deskriptive Gegenüberstellung der Mittelwerte: Die Kontrollgruppe zeigte einen durchschnittlichen Wert von $\bar{x} = 1,003$, die Kainat-Gruppe von $\bar{x} = 0,859$. Daher zeigte sich im entorhinalen Cortex der Kainat-behandelten Tiere zwei Tage nach SE-Induktion eine Differenz von etwa 14 % in der Sigma-1-Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Die Subregionen des Hippocampus zeigten nur geringfügige Unterschiede im mRNA-Expressionsniveau (siehe **Abbildung 20**).

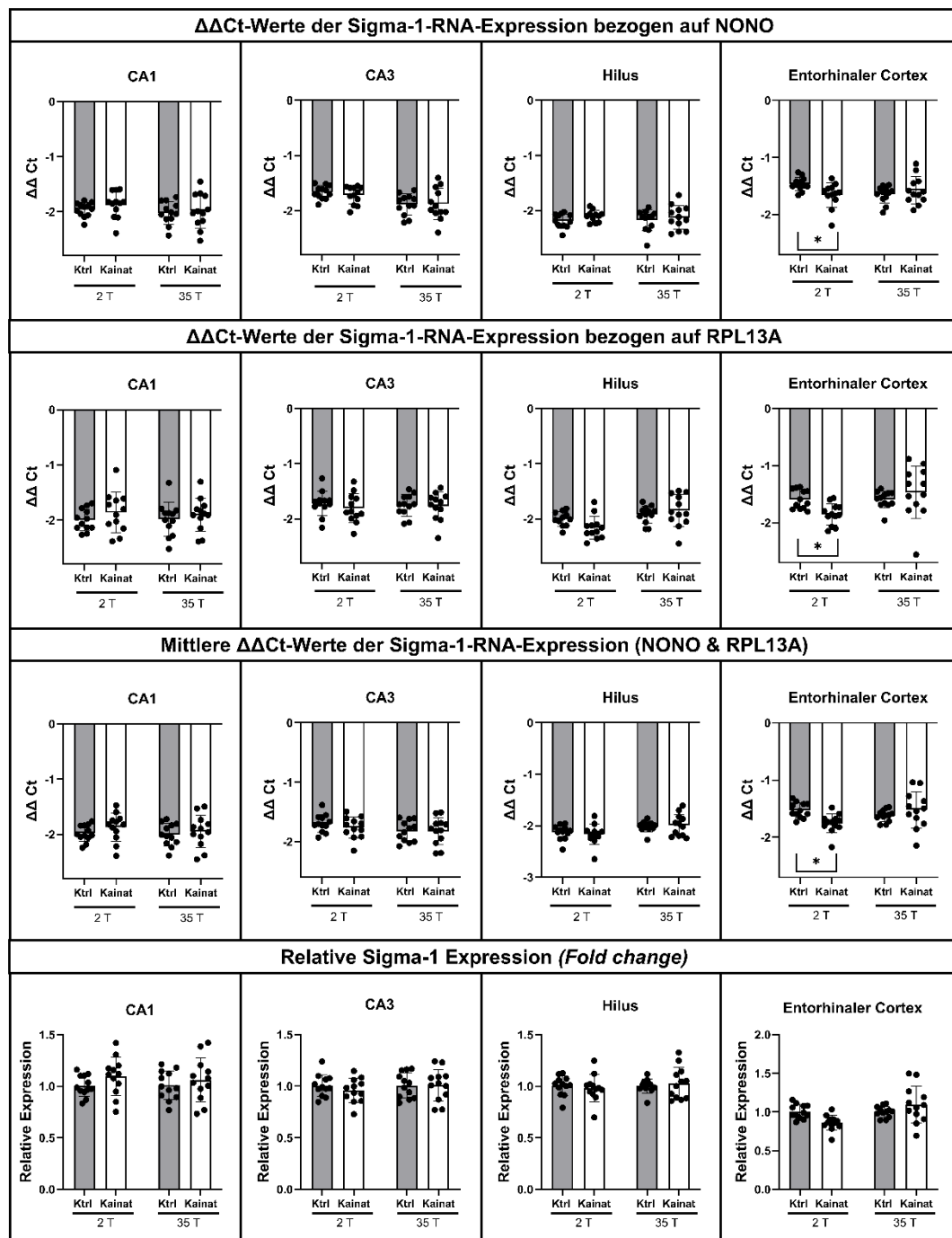


Abbildung 20: Relative Quantifizierung des mRNA-Gehalts in den hippocampalen Subregionen CA1, CA3 und Hilus des Gyrus dentatus und im entorhinalen Cortex.

Dargestellt sind die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Sigma-1-mRNA-Menge sowohl individuell bezogen auf die einzelnen endogenen Kontrollen (NONO und RPL13A) als auch auf die daraus berechneten mittleren $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in den analysierten Gehirnregionen. Die Sigma-1-mRNA-Menge der Kainat-behandelten Tiere war im entorhinalen Cortex im Vergleich zu der Sigma-1-mRNA-Menge der Kontrollgruppe reduziert ($p_{\text{NONO}}=0,03$, $p_{\text{RPL13A}}=0,0439$, $p_{\text{Mittel}}=0,0149$). Darüber hinaus wurde der *fold change* über die relative Expression dargestellt. Statistische Testverfahren: *Two-way* ANOVA mit paarweise Post-hoc-Vergleichen (*Fishers Least Significant Difference Test*, LSD). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte mit Mittelwert ($\pm$ SD) der Gruppen, * = $p < 0,05$.

VI DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sigma-1-Expression während der Epileptogenese und Krankheitsmanifestation zu erfassen und zu charakterisieren. Dabei sollte geprüft werden, ob eine relevante Reduktion der Sigma-1-Expression ausgeschlossen werden kann, sodass Sigma-1 trotz pathophysiologischer Veränderungen als pharmakologische Zielstruktur erhalten bleibt. Für die Analyse wurden das Amygdala-Kindling- und das intrahippocampale Kainat-Modell verwendet. Die Probenentnahme erfolgte zu definierten Zeitpunkten im Verlauf der Epileptogenese und Manifestation. Die Kombination aus sorgfältiger Validierung der eingesetzten Antikörper und Sonden im Kontext der jeweiligen Protokolle, der qualitativen und quantitativen immunhistochemischen Bildanalyse sowie der quantitativen mRNA-Bestimmung mittels qPCR ermöglichte eine umfassende Analyse der Sigma-1-Expression. Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Basis für weiterführende Untersuchungen, die Sigma-1 als pharmakologische Zielstruktur adressieren und deren Relevanz für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien evaluieren.

1 Bedeutung der Identifizierung und Validierung von spezifischen Antikörpern im Rahmen der Überprüfung von Zielstrukturen

Die Spezifität des Sigma-1-Antikörpers HPA018002 in Abhängigkeit von den jeweils eingesetzten Protokollen wurde mittels immunhistochemischer Detektion und Western-Blot-Analysen bestätigt. Die vorliegende Studie unterstreicht die Relevanz der Validierung von Antikörpern an Gewebe von KO-Tieren für das zu detektierende Antigen. In der Literatur beschriebene Expressionsanalysen von Sigma-1 im zentralen Nervensystem weisen teils widersprüchliche Ergebnisse auf, insbesondere hinsichtlich der uneinheitlich beschriebenen zelltypspezifischen Sigma-1-Expression (siehe **Kapitel VI Abschnitt 3**) (ALONSO et al., 2000; PALACIOS et al., 2003a; RUSCHER et al., 2011). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob in den betreffenden Untersuchungen eine Prüfung der Antikörperspezifität in dem verwendeten Protokoll erfolgt ist. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass eine solche Prüfung nicht in vergleichbarer Weise vorgenommen wurde. Bisher konnten lediglich zwei Studien identifiziert werden, die explizit über eine Validierung der

verwendeten Sigma-1-Antikörper an Gewebe von KO-Mäusen berichteten (MAVLYUTOV et al., 2010; LIU et al., 2023), das als Negativkontrolle zur Bestätigung spezifischer Epitop-Bindung diente (AYOUBI et al., 2023). Eine sorgfältige Validierung verhindert falsch-positive Ergebnisse und somit die Generierung und Veröffentlichung von Daten, die auf unspezifischen Interaktionen und Kreuzreaktionen mit homologen Proteinen beruhen. Damit ist die Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper maßgeblich für die Zuverlässigkeit, Aussagekraft, Reproduzierbarkeit und Robustheit der Daten und somit von zentraler Bedeutung für die Identifizierung und Charakterisierung potenzieller Zielstrukturen (BORDEAUX et al., 2010; KURIEN & SCOFIELD, 2017). Mehrere Studien zur Antikörper-Validierung berichten, dass ein erheblicher Anteil der getesteten Antikörper in immunhistochemischen und Western-Blot-Analysen keine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung aufweist (BURGHI et al., 2017; ELLIS et al., 2023; DELACUESTA-BARRUTIA et al., 2024). Darüber hinaus verdeutlicht die vorliegende immunhistochemische Validierung der verschiedenen Antikörper, dass die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung durch mehrere Faktoren beeinflusst wird (HSI, 2001; HICKS & KULKARNI, 2008). So ließ sich mit dem in dieser Studie final eingesetzten Antikörper unter dem anfänglich verwendeten Protokoll keine spezifische Bindung nachweisen. Durch Adaptation des Antigen-Retrievals konnte aber eine nachweislich spezifische Antigen-Antikörper-Bindung in Gehirngewebe von Mäusen erzielt werden. Dies unterstreicht deutlich, dass sowohl die Gewebeart und deren Fixierung als auch die anschließende Antigen-Retrieval-Methode einen Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Bindung haben und damit zum Erfolg oder Misserfolg einer Zielstrukturvalidierung beitragen können (HSI, 2001; HICKS & KULKARNI, 2008). Außerdem ist zu beachten, dass eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion nicht uneingeschränkt von einer Methode auf eine andere übertragen werden kann, etwa von einer Validierung mittels Immunhistochemie auf eine Validierung im Western Blot. Hintergrund hierfür ist, dass die Epitop-Bindung methodenspezifisch variieren kann (FORSSTRÖM et al., 2015). In der vorliegenden Studie wiesen vier der getesteten Antikörper im Western Blot eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung auf, während in der Immunhistochemie diese Spezifität unter den Bedingungen des verwendeten Protokolls lediglich für einen Antikörper gezeigt werden konnte. Dieser Befund verdeutlicht die methodenabhängige Variabilität der Antikörperspezifität und unterstreicht den Bedarf an einem einheitlichen methodischen Vorgehen bei der

Validierung der Antikörperspezifität (MICHEL et al., 2009). Die Verwendung eines Standardprotokolls kann in diesem Zusammenhang hilfreich sein, um unterschiedliche Antikörper, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind, zu screenen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufwändige Anpassungen der Färbeprotokolle durchgeführt werden müssen, um eine Epitop-Spezifität zu erreichen. Zusammenfassend ist die Spezifität des Antikörpers stets im Kontext der konkret angewandten Methode und des spezifischen Protokolls zu betrachten und sollte eine Grundvoraussetzung für alle sich anschließenden Untersuchungen sein. Nur so können zuverlässige, aussagekräftige, reproduzierbare und robuste Daten generiert werden. Für eine weitergehende Beurteilung der Spezifität wäre die Durchführung einer zweidimensionalen Gel-Auftrennung notwendig, da diese eine differenziertere Trennung von Proteinen und damit eine genauere Abgrenzung unspezifischer Signale ermöglicht (PEARSON & LEIGH ANDERSON, 1983; SCHWENK et al., 2007).

2 Sigma-1 unterliegt nach epileptogenem Insult einer transienten Regulation und bleibt im epileptischen Gehirn als Zielstruktur erhalten

In sämtlichen untersuchten Gehirnregionen ließ sich ein Sigma-1-positives Signal nachweisen. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, in denen über eine großflächige räumliche Verteilung von Sigma-1 im Hippocampus, im Cortex, im Septum, im Striatum (Nucleus caudatus und Putamen), im Corpus callosum, Thalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Substantia grisea periaqueductalis, in den motorischen Kernen des Rhombencephalon sowie im Cornu posterius des Medulla spinalis, berichtet wurde (ALONSO et al., 2000; HAYASHI & SU, 2005; LIU et al., 2023). Auf subzellulärer Ebene zeigte die Sigma-1-DAB-Detektion ein charakteristisches, ringförmiges, perinukleäres Signal im Zytoplasma von Neuronen, das sowohl in Mausmodellen als auch in kultivierten Zellen bereits dokumentiert wurde (HAYASHI & SU, 2007; KOPANCHUK et al., 2022; LIU et al., 2023). Wie bereits in **Kapitel VI Abschnitt 1** dargelegt, weisen frühere Expressionsanalysen methodische Schwächen durch das Fehlen einer Antikörpervalidierung an KO-Gewebe auf. Dies könnte die in der Literatur berichteten, teils inkonsistenten Sigma-1-Expressionsmuster mitbedingen.

Im Kindling-Modell konnten immunhistochemisch keine signifikanten

Veränderungen der Sigma-1-Expression in Bezug auf die optische Dichte und die markierte Fläche zwischen der Kindling- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Unsere Arbeitsgruppe hat im Amygdala-Kindling-Modell histologische Veränderungen und funktionelle Anpassungen im Kontext neuronaler Plastizität beschrieben (VON RÜDEN et al., 2015; MÖLLER et al., 2018; VON RÜDEN et al., 2019). Diese Veränderungen fallen jedoch weniger deutlich aus als in anderen chronischen Epilepsiemodellen, in denen ein SE induziert wird, der mit ausgeprägteren Gewebeveränderungen einhergeht (SINGH et al., 2013; MÖLLER et al., 2018). In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass im Kindling-Modell nach der Ausbildung eines hyperexzitablen Netzwerkes die Expression von Sigma-1 unverändert ist.

Im Kainat-Modell konnten in nahezu allen untersuchten Gehirnarealen keine Unterschiede der Sigma-1-Expression zwischen der Kontroll- und der Kainat-Gruppe zu beiden analysierten Zeitpunkten festgestellt werden. Lediglich drei Areale wiesen temporäre Veränderungen auf. In der frühen Post-Insult-Phase war in der CA3-Region des Hippocampus und im entorhinalen Cortex die optische Dichte erhöht bei gleichzeitiger Verringerung der markierten Fläche. Außerdem war die markierte Fläche in der chronischen Phase im Hilus von Kainat behandelten Tieren signifikant reduziert. Zum heutigen Wissensstand wurden noch keine Studien durchgeführt, welche die optische Dichte und die markierte Fläche der Sigma-1-Expression immunhistochemisch untersuchten. Allerdings weist eine Zunahme der optischen Dichte auf eine höhere relative Färbeintensität in den detektierten Strukturen hin und wird in der Literatur mit einer verstärkten Expression des jeweiligen Zielproteins in Verbindung gebracht (RIEUX et al., 2002; MOFIDI et al., 2003; FINNEY et al., 2021; ALEKSEENKO et al., 2022). Demgegenüber liefert eine Veränderung der markierten Fläche in der Bildanalyse Informationen über den Anteil des Gewebes, der ein spezifisches Signal aufweist. Eine Verringerung der markierten Fläche in der ImageJ-Analyse deutet auf eine Reduktion der Anzahl oder der Ausdehnung der immunhistochemisch detektierten Strukturen hin und kann damit eine verminderte Prävalenz oder Verteilung des Zielproteins widerspiegeln (BROADBELT & JONES, 2008; JENSEN, 2013). Eine erhöhte Sigma-1-Expression wird mit der zellulären Stressantwort in Verbindung gebracht, welche die zelluläre Homöostase unter pathologischen Bedingungen stabilisiert (HAYASHI, 2015; LACHANCE et al., 2023). Unabhängig von der

immunhistochemischen Quantifizierung der optischen Dichte liegen bereits Befunde vor, die eine stressinduzierte erhöhte Abundanz der Sigma-1-Expression in verschiedenen Krankheitsmodellen dokumentieren (WATANABE et al., 2016; MANCUSO & NAVARRO, 2017; ZHANG et al., 2017). Studien zu Motoneuronerkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose zeigten eine gesteigerte Sigma-1-Expression, die auf eine Funktion als zellulärer Modulator hindeutet (WATANABE et al., 2016; MANCUSO & NAVARRO, 2017). Des Weiteren konnte eine lokale erhöhte Abundanz der Sigma-1-Expression nach einem ischämischen Infarkt in der Penumbra-Zone nachgewiesen werden. Diese wurde mit neuroprotektiven Mechanismen wie der Reduktion von oxidativem Stress und der Stabilisierung der Kalziumhomöostase in Verbindung gebracht (ZHANG et al., 2017). Diese Studien verdeutlichen, dass Sigma-1 als zellulärer Stresssensor auf pathologische Veränderungen wie Entzündungen, oxidativen Stress und Proteinfehlfaltung reagiert. Die gesteigerte Sigma-1-Expression scheint eine adaptive Reaktion darzustellen, die darauf abzielt, die zelluläre Integrität zu erhalten und degenerative Prozesse zu modulieren (HAYASHI, 2015; DREWES et al., 2025). Zusätzlich zur basalen Expression könnte die durch zellulären Stress ausgelöste Translokation zur Plasmamembran die immunhistochemische Nachweisbarkeit erhöhen und auf eine funktionelle Aktivierung hinweisen (CHEUK & CHAN, 2004; HAYASHI et al., 2011; SU et al., 2016a; BENARROCH, 2018). Die epilepsie-assoziierte Zunahme der optischen Dichte weist auf eine verstärkte Sigma-1-Expression hin, die möglicherweise Teil kompensatorischer oder modulierender zellulärer Mechanismen ist.

Parallel zur Erhöhung der optischen Dichte wurde im Kainat-Modell eine Reduktion der markierten Fläche in der CA3-Region und im entorhinalen Cortex beobachtet. Ein naheliegender Erklärungsansatz hierfür ist die Annahme, dass dies durch die im Kainat-Modell infolge des induzierten Status epilepticus auftretenden neuronalen Zellverluste bedingt sein könnte. Um zu prüfen, ob die beobachtete Flächenreduktion tatsächlich auf neurodegenerative Prozesse zurückzuführen ist, wurden die optische Dichte und die markierte Fläche des neuronalen Markers NeuN im Rahmen einer parallel durchgeführten Bachelorarbeit von Emilia Nike Schneider bestimmt. Bis auf die CA3-Region und den Hilus des Hippocampus, in denen zwei Tage nach SE-Induktion eine reduzierte optische Dichte bzw. markierte Fläche bei Kainat-behandelten Tieren festgestellt wurde, konnten keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die beobachteten Veränderungen in der CA3-Region und im Hilus des Gyrus dentatus zwei Tage nach SE-Induktion könnten durch eine stressbedingte Modulation der Bindungsaffinität von NeuN erklärt werden. Unter zellulären Stressbedingungen, etwa infolge von Exitotoxizität, kann NeuN sowohl in seiner Expression reguliert als auch in seiner Bindungseigenschaft gegenüber Antikörpern verändert werden (GUSEL'NIKOVA & KORZHEVSKIY, 2015; DUAN et al., 2016). Darüber hinaus belegten LIND et al. (2005), dass der Phosphorylierungszustand von NeuN einem komplexen Regulationsnetzwerk unterliegt und maßgeblich die Antikörpererkennung beeinflusst, was die Detektion einschränken kann. Zusätzliche Unterstützung erhält diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die Reduktion der optischen Dichte und der markierten Fläche lediglich transient auftritt. Die Normalisierung der Parameter in der chronischen Phase legt nahe, dass die initiale Reduktion nicht auf irreversible neurodegenerative Prozesse zurückzuführen ist. Zusammenfassend ergaben sich histologisch weder in den kontralateralen hippocampalen Subregionen noch im ipsilateralen entorhinalen Cortex eindeutige Hinweise auf irreversible neurodegenerative Prozesse. Die begrenzte Gruppengröße der NeuN-Analyse limitiert jedoch die Aussagekraft der statistischen Auswertung und erfordert eine vorsichtige Interpretation.

Mögliche weitere Erklärungsansätze für die erhöhte optische Dichte bei gleichzeitig verringerter markierter Fläche könnten eine vorübergehend veränderte räumliche Verteilung von Sigma-1 sein. Diese veränderte Verteilung könnte zum Beispiel durch eine gezielte intrazelluläre Translokation oder durch eine verminderte Expression innerhalb bestimmter Zellpopulationen bedingt sein. Bekanntermaßen löst ein SE weitreichende zelluläre Veränderungen aus, die auf verschiedenen molekularen Ebenen einen maßgeblichen Einfluss auf die Proteinexpression haben (HANSEN et al., 2014; HENSHALL, 2018). Die erhobenen Ergebnisse könnten daher Ausdruck einer intensiven, aber kurzzeitigen zellulären Stressreaktion sein. Dabei ist es denkbar, dass insgesamt weniger Zellen Sigma-1 oberhalb der Nachweisgrenze exprimieren, die verbleibenden positiven Zellen jedoch eine verstärkte Expression zeigen. Dies würde sowohl die beobachtete Zunahme der optischen Dichte als auch die gleichzeitige Einschränkung der markierten Fläche erklären und könnte auf eine kompensatorische Anpassung einzelner Zellpopulationen hindeuten. Zusätzlich zeigt das Sigma-1-Expressionsmuster des

entorhinalen Cortex visuell-mikroskopisch ein weniger ausgeprägtes Signal in der äußeren Körner- und Pyramidenzellschicht (Lamina II und III) in der frühen Post-Insult-Phase. Dies steht im Einklang mit der Literatur, die insbesondere in diesen anatomischen Regionen strukturelle Veränderungen sowohl in Epilepsie-Modellen als auch in Patientinnen und Patienten mit Epilepsie beschreibt (DU et al., 1993; DU et al., 1995; DREXEL et al., 2012). In Kombination mit der erhöhten optischen Dichte deutet dies darauf hin, dass Sigma-1 nicht flächendeckend im gesamten entorhinalen Cortex, sondern verstärkt in Zellen exprimiert ist, die unmittelbar an Lamina II und III angrenzen. Möglicherweise waren andere Bereiche vom SE weniger stark betroffen und reagierten lokal auf den Insult mit einer kompensatorischen, potenziell protektiven Sigma-1-Induktion. Da sowohl die optische Dichte als auch die markierte Fläche in der CA3-Region des Hippocampus in ähnlicher Weise verändert waren, ist es denkbar, dass dort vergleichbare Prozesse stattgefunden haben, ohne dass diese mikroskopisch-visuell identifizierbar waren.

Die detektierten Veränderungen der optischen Dichte und der markierten Fläche könnten aber auch die ligandengesteuerte Migration von Sigma-1 widerspiegeln. Diese Migrationsprozesse werden insbesondere durch ER-Stress oder Kalzium-Dysregulation ausgelöst. Dabei verlässt Sigma-1 seine ursprüngliche Lokalisation an der MAM und transloziert zu anderen subzellulären Kompartimenten wie dem ER, der Plasmamembran, der nukleären Membran und dem Nukleoplasma (HAYASHI & SU, 2007; MORI et al., 2013; MAVLYUTOV et al., 2017; ROSEN et al., 2019). Eine verringerte Immunreaktivität von Sigma-1 wurde in einigen Studien auf eine eingeschränkte immunhistochemische Nachweisbarkeit zurückgeführt, die durch Translokation oder Konformationsänderungen bedingt sein könnte und dadurch die Zugänglichkeit relevanter Epitope reduziert (HAYASHI et al., 2011; BANGARU et al., 2013; MAVLYUTOV et al., 2015b; YANG et al., 2019). So zeigte die Studie von MAVLYUTOV et al. (2015b), dass Sigma-1 zwar in retinalen Photorezeptorzellen nachweisbar ist, jedoch lediglich ein diffuses und schwaches Signal detektiert werden konnte. In einer sich anschließenden Studie untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die Lokalisation von Sigma-1 mittels Elektronenmikroskopie. Dabei zeigte sich, dass Sigma-1 nicht wie zuvor vermutet im Zellkern lokalisiert ist, sondern sich an einer Einstülpung der nuklearen Membran, dem nukleoplasmatischen Retikulum, befindet und dadurch immunhistochemisch schlechter zu detektieren ist (MAVLYUTOV et al., 2017).

Demnach wurde die reduzierte Immunoreaktivität nicht durch eine Abwesenheit des Proteins, sondern durch dessen spezifische Topologie und Kompartimentierung erklärt (MAVLYUTOV et al., 2015b). Eine weitere Studie in retinalen Explantaten bestätigte die Translokation von Sigma-1 unter Stressbedingungen und eine damit zusammenhängende reduzierte mitochondriale Immunoreaktivität (YANG et al., 2019). Auch außerhalb retinaler Zellen wurde die geringere Nachweisbarkeit von Sigma-1 damit erklärt, dass das Protein in andere Bereiche des ERs sowie in dynamische Subkompartimente migriert (BANGARU et al., 2013). In primären Hinterwurzelganglienneuronen zeigte die immunhistochemische Analyse ein schwaches Sigma-1-Signal. In einem anschließenden Western Blot wurden zytosolische und membranangereicherte Fraktionen der Zelle miteinander verglichen. Sigma-1 konnte in beiden Fraktionen nachgewiesen werden, wobei der Anteil in der Membranfraktion deutlich höher war (BANGARU et al., 2013). Diese Befunde legen nahe, dass Sigma-1 bevorzugt in membranassoziierten Kompartimenten lokalisiert ist. Die unterschiedliche subzelluläre Verteilung könnte die heterogene Immunreaktivität erklären (BANGARU et al., 2013). Es gilt jedoch zu beachten, dass die Autoren hervorhoben, dass die beobachteten Ergebnisse stark vom Zelltyp, der gewählten Methodik, dem eingesetzten Antikörper und nicht zuletzt von der Gewebeprozessierung beeinflusst werden. HAYASHI et al. (2011) beschreiben jedoch, dass Sigma-1 Komplexe mit anderen ER-Chaperonen wie dem BIP und Calreticulin bildet und damit Epitope maskiert werden können. Des Weiteren wird hier auf eine Stress-induzierte Konformationsänderung von Sigma-1 verwiesen, welche dazu führen könnte, dass Antikörper nicht mehr an das Epitop binden können. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass das weniger zugängliche Sigma-1-Epitop infolge einer stressinduzierten Translokation oder einer Konformationsänderung von Sigma-1 entstanden sein könnte und nicht ausschließlich auf eine temporäre Abnahme der Expression zurückzuführen ist (HAYASHI et al., 2011; BANGARU et al., 2013; MAVLYUTOV et al., 2015b; YANG et al., 2019).

Unabhängig von den oben diskutierten Mechanismen, die den beschriebenen Expressionsveränderungen zugrunde liegen, deuten die erhobenen Daten darauf hin, dass Sigma-1 auch unter pathologischen Bedingungen pharmakologisch zugänglich ist und gezielt moduliert werden kann. Eine solche Modulation, beispielsweise durch Agonisten oder positiv allosterische Modulatoren, könnte

insbesondere in der frühen Phase der Epileptogenese die endogene Stressantwort unterstützen und dadurch neuroprotektive Mechanismen fördern. Eine entsprechende Studie zum präventiven Einsatz von Sigma-1-Modulatoren wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits initiiert.

Die Daten der CA3-Region des Hippocampus und des entorhinalen Cortex sprechen für eine temporäre Modulation der Sigma-1-Expression, die in der chronischen Phase der Epilepsie nicht mehr nachweisbar ist. Lediglich im Hilus des Gyrus dentatus ließ sich in dieser Phase eine verringerte Sigma-1-positive Fläche beobachten. Gleichzeitig ergab die Volumenberechnung eine signifikante Zunahme der analysierten Region in den Kainat-behandelten Tieren. Die Volumenzunahme im Hilus ist in erster Linie auf eine Erweiterung des extrazellulären Kompartiments zurückzuführen, die durch Anfalls-assoziierte Ionenverschiebungen, gliale Puffermechanismen und eine gestörte Blut-Hirn-Schranke begünstigt werden kann (LUX et al., 1986; MARCHI et al., 2016). Letztere kann zu einer extravasalen Flüssigkeitsansammlung führen und die Homöostase des interstitiellen Milieus nachhaltig beeinträchtigen (LUX et al., 1986; FRIEDMAN & HEINEMANN, 2012). Ergänzend könnten eine anfallsinduzierte adulte Neurogenese sowie die aberrante Integration neu gebildeter Neuronen zur Volumenzunahme beitragen (RAIKOV et al., 2017; KASAHARA et al., 2023). Über die Projektion von Commissuralfasern in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus ist zudem denkbar, dass ipsilaterale Umbauprozesse Einfluss auf die kontralaterale Hilus-Seite nehmen (LUX et al., 1986; DELLER et al., 1995). Methodisch kann diese strukturelle Volumenzunahme die zweidimensionale ImageJ-Auswertung beeinflussen. Dies verdeutlicht, dass die gemessene Fläche im histologischen Schnitt nicht unabhängig von volumetrischen Veränderungen zu interpretieren ist. Beide Parameter stehen in einem Zusammenhang und können die immunhistochemischen Auswertungen maßgeblich beeinflussen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit stereologischer Zellzählverfahren, da diese volumetrischen Veränderungen systematisch berücksichtigen und somit eine differenziertere Bewertung ermöglichen (KUBÍNOVÁ, 1998; STARK et al., 2005).

Die quantitative Analyse mittels Stereologie zeigt zu keinem Zeitpunkt, weder in der frühen Post-Insult-Phase noch in der Phase der manifesten Epilepsie, einen Unterschied in der relativen Zellzahl zwischen den untersuchten Gruppen. Diese Daten bestätigen erneut, dass Sigma-1 als potenzielle Zielstruktur erhalten bleibt.

Stereologische Methoden werden routinemäßig zur quantitativen Zellzählung in neuroanatomischen Studien eingesetzt (DENIZ et al., 2018), jedoch wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt Sigma-1 bislang in keiner Studie stereologisch quantifiziert. Die dreidimensionale Auswertung berücksichtigt dabei krankheitsassoziierte Volumenänderungen und verhindert damit Fehlinterpretationen wie die fälschliche Annahme einer verminderten Expression aufgrund einer Volumenzunahme des gesamten Areals (STARK et al., 2005). Allerdings liefert die Methode ausschließlich strukturelle Informationen, ohne eine Aussage über eine Induktion der Expression in der einzelnen Zelle, die neuronale Funktion oder die Netzwerkaktivität und -Ausbildung treffen zu können (MAYHEW, 1992). In Kombination mit einer Analyse der optischen Dichte können jedoch ergänzende Informationen gewonnen werden, die eine differenziertere Bewertung expressionsbezogener Veränderungen ermöglichen.

Jedoch können Proteine lokalen Regulationsprozessen unterliegen und Zellverluste oft zellschicht- und zelltypspezifisch sein (DO CANTO et al., 2020). Dadurch könnten die Analysen des entorhinalen Cortex methodisch durch Verdünnungseffekte beeinflusst sein, da in dieser Region eine Gesamtanalyse durchgeführt wurde und die anatomischen Unterstrukturen nicht einzeln erfasst wurden. Weiterhin sollte beachtet werden, dass die Epilepsie phasenhaft verläuft, sodass Proteinregulationen, Zellverluste und Netzwerkveränderungen je nach Krankheitsphase und betroffenem Gehirnnareal variieren können (KECK et al., 2017). Somit konnten möglicherweise bestimmte Regulationsprozesse in nicht analysierten Arealen oder zu anderen Zeitpunkten nicht erfasst worden sein.

Außerdem birgt die Analyse der Gehirnnareale auf der kontralateralen Seite des epileptischen Fokus eine Limitation der vorliegenden Studie. Die markantesten histologischen Veränderungen sind erfahrungsgemäß auf der ipsilateralen Seite des epileptischen Fokus zu erwarten (BEN-ARI et al., 1980; BOUILLERET et al., 1999). MAGLOCZKY and FREUND (1993) belegen aber, dass sich die epileptiforme Aktivität nach einer einseitigen Kainat-Injektion auch auf die gegenüberliegende Seite ausbreitet und dort zu bilateralen Veränderungen der neuronalen Aktivität sowie zu pathologischen Veränderungen führen kann. Eine seitenvergleichende Untersuchung zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre wäre aus wissenschaftlicher Sicht grundsätzlich interessant. Allerdings führen die Injektion der Kainsäure sowie die Implantation der Elektrode zu methodisch bedingten Artefakten, die die Aussagekraft eines solchen Vergleichs massiv

beeinflussen würden.

Die vorliegende Studie nutzt zwei chronische Mausmodelle der TLE, die eine hohe Augenschein- und Konstruktvalidität aufweisen und so entscheidend zum Verständnis der Mechanismen von Epileptogenese und Anfallsentstehung beitragen. Dennoch sind die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Modellen nur begrenzt auf den Menschen übertragbar, da bislang kein Modell die volle Komplexität der menschlichen Erkrankung abbilden kann (KANDRATAVICIUS et al., 2014). So kann das Amygdala-Kindling-Modell zum Beispiel nicht gänzlich auf die Epileptogenese des Menschen übertragen werden, da in diesem Modell keine spontanen Anfälle auftreten und somit die Komplexität der menschlichen TLE nur teilweise dargestellt werden kann (LÖSCHER & BRANDT, 2010; GORTER et al., 2016). Allerdings zeigen mehrere Studien, dass das Amygdala-Kindling-Modell im Vergleich zu anderen derzeit verfügbaren Tiermodellen eine sehr hohe prädiktive Validität für die klinische Wirksamkeit neuartiger ASMs bei fokalen Anfällen besitzt (LÖSCHER, 2016; BARKER-HALISKI & STEVE WHITE, 2020; LÖSCHER & WHITE, 2023; ANDERSON et al., 2025). Daher eignet sich das Modell zur gezielten Untersuchung definierter pharmakologischer Fragestellungen (STEFAN & SCHMITT, 2020). Im Gegensatz dazu bilden Post-SE-Modelle wie das Pilocarpin-Modell oder das elektrisch induzierte Post-SE-Rattenmodell zwar die Epileptogenese nach einem Status epilepticus mit charakteristischen histopathologischen Veränderungen ab, weisen jedoch eine geringere prädiktive Validität für die klinische Wirksamkeit neuer ASMs auf (LÖSCHER, 2002). Auch bei vergleichbaren Plasmakonzentrationen zeigen pharmakologische Untersuchungen in diesen Modellen nicht die gleiche Vorhersagekraft wie im Amygdala-Kindling-Modell, was auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen und Netzwerkveränderungen zurückgeführt wird (LÖSCHER, 2002; LÖSCHER, 2011, 2017a). Im Gegensatz zum Amygdala-Kindling-Modell ist das intrahippocampale Kainat-Modell durch spontane, wiederkehrende Anfälle gekennzeichnet. Es wird zudem als Modell zur Untersuchung pharmakoresistenter Anfälle eingesetzt, da verschiedene gängige ASMs in diesem Modell nur eine eingeschränkte Wirksamkeit zeigen (KLEIN et al., 2015; LÖSCHER, 2017b). Dennoch bleibt offen, inwieweit die zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen mit denen der menschlichen Pharmakoresistenz vergleichbar sind (LÖSCHER, 2017b). Insbesondere stellt sich

die Frage, ob die im Modell beobachteten molekularen und zellulären Veränderungen tatsächlich die therapeutisch relevanten Zielstrukturen und Resistenzmechanismen adäquat abbilden, was die direkte Übertragung präklinischer Befunde auf pharmakoresistente Epilepsien beim Menschen erschwert (LÖSCHER, 2017b). Die vorliegende Studie untersucht die Sigma-1-Rezeptor-Expression im Kontext epilepsie-assoziiierter Veränderungen. Die eingesetzten Tiermodelle erlauben Einblicke in verschiedene Stadien der Krankheitsentwicklung; ihre Aussagekraft für die menschliche Pathophysiologie ist jedoch nur unter Berücksichtigung methodischer Limitationen zu interpretieren (KANDRATAVICIUS et al., 2014).

In diesem Kontext sind naturgemäß speziesspezifische und geschlechtsspezifische Hürden zu berücksichtigen (BEERY & ZUCKER, 2011). Im Kindling-Modell wurden weibliche Tiere verwendet, da ihr hormoneller Zyklus mit einer erhöhten biologischen Variabilität einhergeht. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass bei weiblichen Tieren beobachtete Effekte auf männliche Tiere übertragbar sind. Im intrahippocampalen Kainat-Modell zeigten männliche Mäuse nach der SE-Induktion eine häufigere und intensivere epileptiforme Aktivität als weibliche Mäuse. Insbesondere traten HPDs bei Männchen signifikant häufiger auf (TWELE et al., 2016a). Zudem wurden deutliche stammspezifische Unterschiede beim Auftreten und bei der Entwicklung epileptiformer Aktivität beobachtet (TWELE et al., 2016a). Aufgrund dieser Befunde wurden in der vorliegenden Studie männliche Mäuse des Stammes C57BL/6JRj verwendet. Diese Fokussierung auf ein Geschlecht diente zudem der Reduktion der Tierzahlen. Grundsätzlich stehen die genetische Homogenität, kontrollierte Umweltbedingungen und standardisierte Protokolle im Tiermodell im Kontrast zur hohen individuellen Variabilität beim Menschen. Diese Variabilität wird durch Faktoren wie Genetik, Komorbiditäten, zirkadiane Rhythmen sowie die Patienten-Compliance beeinflusst (WILLIAMS et al., 2004; RICHTER et al., 2009).

3 Bedeutung der zelltypübergreifenden Expression von Sigma-1 im Kontext der Epilepsie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte über Immunfluoreszenz-basierte Ko-Expressionsanalysen nachgewiesen werden, dass Sigma-1 sowohl in inhibitorischen als auch in exzitatorischen Neuronen exprimiert ist. Darüber hinaus

ist Sigma-1 auch in Astrozyten und Mikroglia nachweisbar.

Aus der Literatur ergeben sich widersprüchliche Berichte über die subzelluläre Expression von Sigma-1. In frühen Studien wurde die Expression von Sigma-1 nur in Neuronen von Gehirn und Rückenmark festgestellt (ALONSO et al., 2000). Drei Jahre später wurde von Sigma-1-positiven Oligodendrozyten berichtet (PALACIOS et al., 2003b). Daraufhin wurde gezeigt, dass auch reaktive Astrozyten Sigma-1 exprimieren (RUSCHER et al., 2011). Diese Befunde konnten in einem Parkinson-Modell bestätigt werden (FRANCARDO et al., 2014). In einer weiteren Studie, die mittels KO-Gewebe validierte Antikörper nutzte, konnte die Expression von Sigma-1 in Motoneuronen nachgewiesen werden (MAVLYUTOV et al., 2010; MAVLYUTOV et al., 2016). Die umfassende und sorgfältig durchgeführte Analyse von LIU et al. (2023) steht im Einklang mit der zelltypspezifischen Sigma-1 Expression in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. LIU et al. (2023) verwendeten ebenfalls einen mittels KO-Gewebe validierten Antikörper und zeigten die zelltypspezifische Expression von Sigma-1 in (exzitatorischen) Neuronen, Interneuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, oligodendrozytären Vorläuferzellen und Mikroglia. Die Sigma-1-Expression in unterschiedlichen Zelltypen, auch unter pathologischen Bedingungen, unterstreicht die besondere Relevanz von Sigma-1 für sein pharmakologisches Potenzial. In exzitatorischen Neuronen könnte Sigma-1 die neuronale Erregbarkeit direkt modulieren, etwa durch Stabilisierung von Ionenkanälen, Rezeptoren oder durch Einfluss auf ER-Stressmechanismen. In einem Mausmodell für chronischen Stress konnte gezeigt werden, dass die gezielte Modulation von Sigma-1 die Aktivität glutamaterger Neuronen im anterioren cingulären Cortex direkt beeinflusst (WANG et al., 2025). Die Aktivierung von Sigma-1 verstärkte in dieser Studie die dendritische Komplexität und korrelierte mit erhöhter glutamaterger Erregbarkeit, während eine wiederholte Hemmung zu einer reduzierten dendritischen Komplexität und einer abgeschwächten glutamatergen Erregbarkeit führte (WANG et al., 2025). In inhibitorischen Neuronen hingegen könnte eine Sigma-1-vermittelte Stabilisierung die GABAerge Transmission stärken und so potenziell antikonvulsiv wirken. *In-vivo*-Studien belegten darüber hinaus eine Interaktion zwischen Sigma-1 und metabotropen GABA_B-Rezeptoren (VAVERS et al., 2023). In Sigma-1-Knockout-Mäusen führte das Fehlen des Proteins zu einer reduzierten Expression der GABA_B-R2-Untereinheit, was wiederum mit einer erhöhten Anfallsneigung korrelierte (VAVERS et al., 2023).

Eine weitere Studie zeigt, dass die gezielte Aktivierung von Sigma-1 in Astrozyten des Sehnervenkopfes diese Zellen vor oxidativem Stress schützt, indem sie die ERK1/2-Phosphorylierung und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies hemmt (ZHAO et al., 2017). Dieser zelluläre Schutzmechanismus könnte insbesondere im Hinblick auf die Dysregulation der Aufnahme und Freisetzung von Glutamat durch reaktive Astrozyten von Bedeutung sein, da dies ein Schlüsselement in der Epilepsiepathologie darstellt (COULTER & EID, 2012; COULTER & STEINHÄUSER, 2015; ÇARÇAK et al., 2023). In Mikroglia ist Sigma-1 mit antiinflammatorischen Effekten assoziiert. So hemmt Sigma-1 in Schmerz- und Stressmodellen proinflammatorische Zytokine und reduziert die Mikroglia-vermittelte Neuroinflammation (CASTANY et al., 2018; JIA et al., 2018). Diese Wirkung könnte auch bei Entzündungsprozessen im Rahmen der Epileptogenese und Anfallsaktivität eine Rolle spielen (DEVINSKY et al., 2013).

Die Expression von Sigma-1 in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen, Astrozyten und Mikroglia – auch unter pathologischen Bedingungen – unterstreicht die heterogene zelluläre Lokalisation von Sigma-1 und die daraus resultierende funktionelle Vielschichtigkeit. Die zelltypübergreifende Expression legt nahe, dass Sigma-1 nicht nur die neuronale Aktivität, sondern auch gliale und immunologische Prozesse modulieren kann. Sigma-1 stellt damit eine pharmakologisch besonders interessante Zielstruktur dar, deren gezielte Ansprache die gleichzeitige Beeinflussung verschiedener zellulärer und molekularer Mechanismen ermöglicht.

4 Erhalt und Modulation der Sigma-1-mRNA-Menge

Die quantitative PCR-Analyse ergab, dass die Sigma-1-Expression auch auf Transkriptionsebene weitgehend erhalten bleibt. Lediglich im entorhinalen Cortex war in der frühen Post-Insult-Phase ein leichter Rückgang der Sigma-1-mRNA-Expression nachweisbar. Da diese Veränderung in der Phase der manifesten Epilepsie nicht mehr nachweisbar war, scheint es sich hier ebenfalls um eine transiente Regulation zu handeln. Dabei ist zu beachten, dass die mRNA-Expression keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinmenge zulässt. Post-transkriptionale und -translationale Modifikationen sowie der Protein-*Turnover*, also das Gleichgewicht zwischen Protein-Synthese und -Abbau, spielen eine entscheidende Rolle (NOLAN et al., 2006; LEWIS et al., 2017). Es wurde berichtet, dass sich nur ca. 40 % der Variation in den Proteinmengen durch die

gemessenen mRNA-Level erklären lässt (VOGEL & MARCOTTE, 2012). Zwar führt ein reduzierter mRNA-Gehalt tendenziell zu einer geringeren Proteinbiosynthese, jedoch können Stresssignale die Translation gezielt verstärken und die Stabilität ausgewählter Proteine erhöhen (LIU & QIAN, 2014; ADVANI & IVANOV, 2019). Trotz der verminderten Transkriptionsrate könnte weiterhin eine ausreichende Menge funktioneller Sigma-1-Proteine vorhanden sein, um die physiologische Funktion aufrechtzuerhalten. In diesem Zusammenhang ist es essenziell, die Protein-Turnoverrate einzubeziehen. Sie beschreibt das dynamische Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau und bestimmt, wie lange ein Protein in der Zelle funktionsfähig bleibt (PRATT et al., 2002; ROSS et al., 2021). Ihre Berücksichtigung ist entscheidend, da sie maßgeblich die Beziehung zwischen mRNA- und Proteinlevel beeinflusst und in die Interpretation regulatorischer Mechanismen auf Transkriptions-, Translations- und Abbauebene einbezogen werden muss (PRATT et al., 2002). Allerdings liegen derzeit keine publizierten Daten zum Protein-Turnover von Sigma-1 vor.

Neben dem Protein-Turnover könnten darüber hinaus auch Feedback-Mechanismen zwischen Transkriptions- und Proteinebene zur beobachteten Herunterregulation beitragen. Transkribierte mRNA kann dabei rückkoppelnd auf die Genexpression wirken, indem sie regulatorische Prozesse beeinflusst, die ihre eigene Synthese hemmen oder fördern (HENNINGER et al., 2021). Auch Proteine können über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren, regulatorischen Komplexen oder Signalwegen die Genexpression modulieren und in autoregulatorische Kontrollmechanismen eingebunden sein (CALKHOVEN & AB, 1996). In der frühen Post-Insult-Phase könnte zunächst eine gesteigerte Transkription der Sigma-1-mRNA einsetzen, gefolgt von einer verstärkten Translation. Sobald eine ausreichende Menge an Sigma-1 gebildet wurde, könnte ein negativer Feedback-Mechanismus die mRNA-Produktion reduzieren. Dieses Regulationsprinzip könnte den reduzierten Sigma-1-mRNA-Gehalt im entorhinalen Cortex in den Kainat-behandelten Tieren während der frühen Post-Insult-Phase erklären.

Die genaue zeitliche Dynamik dieses Regulationsprozesses und die Frage, ob die Sigma-1-mRNA möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt erhöht gewesen wäre, bleiben offen. Derzeit stehen nur wenige Untersuchungen der zeitlichen Regulation von Sigma-1 auf der mRNA-Ebene zur Verfügung. MITSUDA et al. (2011) zeigten, dass Sigma-1 *in vitro* bei ER-Stress binnen kurzer Zeit hochreguliert wird. Während einer 120-minütigen Messung der mRNA-Level,

wurde die mRNA bereits nach 30 Minuten stark hochreguliert und erreichte den Höhepunkt nach 60 Minuten (MITSUDA et al., 2011). Außerdem sprechen Untersuchungen anderer Chaperon-Proteine für eine sehr schnelle mRNA-Regulation (SAIBIL, 2013). Für das Heat Shock Protein 70 (HSP70) konnte eine stressinduzierte Zunahme der mRNA-Expression innerhalb von wenigen Stunden gezeigt werden (ABE et al., 1992). Daher stellt die Auswahl der Euthanasie-Zeitpunkte einen kritischen Punkt in dieser Studie dar. Insbesondere, weil die dynamische Regulation von Chaperon-Proteinen in der akuten Phase stark zeitabhängig ist. Eine Zeitachse mit unterschiedlichen Euthanasie-Zeitpunkten und der anschließenden Untersuchung mittels qPCR und immunhistochemischen Verfahren wäre notwendig, um die Sigma-1-Regulation ganzheitlich erfassen zu können. Da sich die durchgeführte Analyse auf gesamte Gehirnareale bezieht, ohne zwischen einzelnen Zelltypen oder kortikalen Layern zu differenzieren, ist eine zellspezifische Bewertung der Regulationsmechanismen nicht möglich. Darüber hinaus ist zu beachten, dass das Sigma-1-Gen in mindestens fünf unterschiedlichen Spleiß-Varianten vorliegt (PAN et al., 2017). Die Sigma-1-mRNA-Sonde erkennt bei der qPCR eine spezifische Exon-Exon-Grenze im Sigma-1-Gen, beispielsweise zwischen Exon 2 und 3 oder zwischen Exon 3 und 4. Sie erfasst ausschließlich korrekt gespleißte mRNA-Transkripte, die diese Sequenz enthalten. Transkriptvarianten, bei denen bestimmte Exons übersprungen werden (z. B. Exon 3) oder die alternative Junktionsstellen aufweisen, werden entweder gar nicht oder nur gering detektiert. Die gemessenen Werte spiegeln daher die Gesamtmenge aller Varianten wider, welche die erkannten Exon-Grenzen enthalten, ohne zwischen den Isoformen zu differenzieren. Die qPCR-Analyse zeigt, dass die Sigma-1-Expression auf mRNA-Ebene insgesamt erhalten bleibt, jedoch zeitlich begrenzten Schwankungen unterliegen kann. Diese konstitutive Transkriptionsstabilität unterstreicht die Eignung von Sigma-1 als pharmakologische Zielstruktur.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

In einer umfassenden Analyse der Sigma-1-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass keine relevante Reduktion während der Epileptogenese und nach Manifestation der Epilepsie auftrat, sodass Sigma-1 als molekulare Zielstruktur weiterhin erhalten bleibt. Die kurzfristige, regionsspezifische Regulation in der CA3-Region und im entorhinalen Cortex deutet auf eine differenzierte Beteiligung einzelner Gehirnareale an den

molekularen Prozessen der Pathophysiologie der Epilepsie hin (SPENCER & SPENCER, 1994). Die untersuchten Areale spielen alle eine zentrale Rolle bei der Synchronisation und Ausbreitung epileptischer Aktivität. Daher ist der Erhalt von Sigma-1 als potenzielle Zielstruktur in diesen Gehirnarealen entscheidend für die Effektivität potenzieller zukünftiger therapeutischer Interventionen. Ein früher Therapieansatz erscheint basierend auf der Expression von Sigma-1 besonders vielversprechend, da die frühe Post-Insult-Phase nach einem SE durch dynamische Veränderungen der Proteinexpression geprägt ist (HANSEN et al., 2014; HENSHALL, 2018). Dennoch bleibt offen, ob ein lokal begrenzter therapeutischer Zugang ausreicht, um den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. In der Phase der klinisch manifesten Epilepsie im Tiermodell bleibt Sigma-1 als therapeutisch relevante Zielstruktur erhalten. Dies ermöglicht auch zu späteren Zeitpunkten eine Intervention auf Basis einer pharmakologischen Modulation von Sigma-1.

Zusammenfassend, liefert diese Studie wichtige Informationen und eine Grundlage, um Sigma-1 als potenzielles therapeutisches Ziel für die Epilepsie in Betracht zu ziehen. Die Bestätigung einer Sigma-1-Expression in unterschiedlichen Zellpopulationen ist in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung, da sie die Untersuchung funktioneller Wirkmechanismen in spezifischen zellulären Kontexten ermöglicht. Dies ist besonders relevant, da sich neue therapeutische Ansätze zunehmend auf gliale Modulatoren konzentrieren, zum Beispiel im Kontext von Neuroinflammation, metabolischer Unterstützung und der Stabilisierung neuronaler Netzwerke (ÇARÇAK et al., 2023). Die gliale Modulation über Sigma-1 könnte dazu beitragen, nicht-synaptische Mechanismen der Epileptogenese und Epilepsie gezielt zu adressieren, insbesondere durch die Beeinflussung relevanter Signalwege (NGUYEN et al., 2017). Frühere und auch eigene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die pharmakologische Modulation von Sigma-1 die Anfallsaktivität beeinflussen kann (VAVERS et al., 2019; PÉREZ-PÉREZ et al., 2024). Das unterstreicht die Bedeutung von Sigma-1 als potenziellen Modulator und als potenzielle Zielstruktur für zukünftige Therapieansätze.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob eine präventive Verabreichung von Sigma-1-Modulatoren während der Latenzphase nach dem initialen Insult die Manifestation verzögern und die Anfallshäufigkeit senken kann. In einer aktuellen Studie unserer Arbeitsgruppe wird der mögliche Einfluss von E1R sowie Fenfluramin auf die Krankheitsmanifestation untersucht. Während E1R gezielt als selektiver positiver

allosterischer Sigma-1-Modulator eingesetzt wird, ist der Wirkmechanismus von Fenfluramin komplex und umfasst sowohl die serotonerge Signalübertragung als auch eine potenzielle Interaktion mit Sigma-1. Da bislang unklar ist, ob Sigma-1 in relevantem Ausmaß zu den Effekten von Fenfluramin beiträgt, dient die Studie dazu, den möglichen Beitrag dieser Interaktion in der frühen Phase nach einem induzierten Status SE zu evaluieren. Parallel dazu wird überprüft, ob Sigma-1-Knockout-Mäuse im Kainat-Modell einen schwereren Krankheitsverlauf als Wildtyp-Tiere zeigen und sich somit der in anderen Krankheitsmodellen nachgewiesene neuroprotektive Effekt von Sigma-1 auch auf Epilepsie-Modelle übertragen lässt.

Die vergleichbare Varianz der Daten der ImageJ-Analyse, der stereologischen Zellzählung und der qPCR zwischen Kontroll- und Kainat-Gruppe spricht gegen eine ausgeprägte Heterogenität der Sigma-1-Expression nach der Epilepsiemanifestation. Da keine klaren Hinweise auf abgrenzbare Subgruppen vorliegen, lassen sich keine Rückschlüsse auf eine Einteilung der Tiere nach unterschiedlichem Therapieansprechen ziehen. Im Amygdala-Kindling-Modell konnten die Tiere anhand ihres Ansprechens auf eine Phenytoin-Behandlung in Responder- und Non-Responder eingeteilt werden (LÖSCHER & WHITE, 2023). Die Korrelation dieser funktionellen Einteilung mit post mortem erhobenen molekularen Daten zeigte teilweise deutliche Unterschiede in der Expression ausgewählter Gene zwischen diesen Gruppen (LÖSCHER & WHITE, 2023). Zudem ist hervorzuheben, dass therapieresistente Tiere häufig eine Überexpression von Efflux-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke aufweisen, was die Verfügbarkeit von Wirkstoffen im ZNS verringern kann (LÖSCHER & POTSCHKA, 2005a; LÖSCHER & WHITE, 2023). Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob sich nach Einteilung in Responder und Non-Responder eine weitere Differenzierung anhand der Sigma-1-Expression vornehmen lässt. Eine solche Differenzierung könnte zur Identifikation von Sigma-1 als potenziellen Biomarker für interindividuelle Unterschiede im Therapieansprechen beitragen.

Darüber hinaus könnten zukünftige Studien mithilfe moderner bildgebender und molekularbiologischer Verfahren wie Lebendzell-Imaging, fluoreszierender Tagging-Technologien und optogenetischer Ansätze die Echtzeit-Erfassung der dynamischen Translokation von Sigma-1 ermöglichen. Ergänzende Untersuchungszeitpunkte sowie Leyer- und zelltypspezifische Analysen sind

darüber hinaus unerlässlich, um die komplexe zeitliche Regulation von Sigma-1 differenziert zu erfassen. Die gezielte Isolierung einzelner Zellen mittels Laser-Mikrodissektion könnte dabei neue Einblicke in die mRNA-Regulation auf zellulärer Ebene ermöglichen. Methoden wie die mehrdimensionale Gelelektrophorese, Proteomik und Metabolomik könnten eine umfassende Analyse der Protein- und Stoffwechselregulation ermöglichen und so bestehende Befunde validieren und erweitern. In Kombination könnten diese Methoden Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung der zeitlichen Abfolge der subzellulären Migration von Sigma-1 liefern, insbesondere im Zusammenhang mit Kalziumhomöostase, Neuroprotektion und synaptischer Plastizität bei epileptischen Prozessen.

Auch für Hunde als veterinärmedizinische Patienten könnte Sigma-1 eine vielversprechende Zielstruktur für die Epilepsiebehandlung darstellen. Zur Bewertung der Eignung von Sigma-1 als pharmakologische Zielstruktur beim Hund sind in unserer Arbeitsgruppe Expressionsanalysen in verschiedenen Gehirnarealen geplant. Um die regionale Expression der Zielstruktur zu erfassen, werden gezielt funktionell relevante Areale untersucht. Ziel ist es, mögliche Unterschiede zwischen gesunden und epileptischen Tieren zu identifizieren. Diese neuen Erkenntnisse könnten einen deutlichen Beitrag zum vertieften pathophysiologischen Verständnis der Epilepsie bei Hund und Mensch leisten und die Entwicklung innovativer Therapieansätze in der Veterinär- und Humanmedizin fördern.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Sigma-1 ist ein multifunktionales, atypisches Rezeptorprotein, das zentrale zelluläre Stressreaktionen und die Kommunikation zwischen Organellen steuert. Dabei beeinflusst Sigma-1 mitochondriale Prozesse, Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren und reguliert Mechanismen wie Kalziumhomöostase, oxidative Stressantworten und Proteinfaltung. Trotz verfügbarer Medikamente bleibt die Epilepsiebehandlung herausfordernd, da zentrale Mechanismen der Temporallappenepilepsie und Therapieresistenzen weiterhin nicht vollständig verstanden sind. Daher sind neue krankheitsmodifizierende Therapieansätze erforderlich, die über die reine Anfallskontrolle hinausgehen und pathophysiologische Prozesse gezielt beeinflussen. Sigma-1 könnte aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften eine krankheitsmodifizierende Wirkung haben und gilt daher als vielversprechende Zielstruktur. Krankheitsbedingte Veränderungen auf zellulärer Ebene und auf Netzwerkebene können die Expression pharmakologischer Zielstrukturen modulieren. Dadurch kann eine interindividuelle Variabilität entstehen, welche die Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen einschränken kann. Um zu prüfen, ob Sigma-1 während verschiedener Krankheitsstadien weiterhin als Zielstruktur erhalten bleibt, wurde in dieser Studie die Sigma-1-Expression in zwei chronischen Mausmodellen der Temporallappenepilepsie charakterisiert. Das Amygdala-Kindling-Modell erlaubt gezielte Einblicke in neuropathologische Prozesse bei der Ausbildung eines hyperexzitablen neuronalen Netzwerkes. In diesem Modell wurden weibliche NMRI-Mäuse einmal täglich überschwellig elektrisch stimuliert, bis sie zehn generalisierte Anfälle zeigten. Die Kontroll-Gruppe erhielt Scheinstimulationen. Das intrahippocampale Kainat-Modell hingegen eignet sich besonders zur Untersuchung therapieresistenter Epilepsien und zur Analyse komplexer hippocampaler Pathologien. Entsprechend erhielten männliche C57BL/6JRj-Mäuse eine intrahippocampale Kainat- oder Kochsalz-Injektion, um einen nicht-convulsiven Status epilepticus auszulösen. Das Gehirngewebe wurde zwei Tage (frühe Post-Insult-Phase) oder 35 Tage (chronische Phase mit spontaner elektrografischer Anfallsaktivität) nach Induktion des Status epilepticus entnommen. Anschließend wurde das Sigma-1-Expressionmuster in ausgewählten Gehirnarealen, die an Iktogenese und Epileptogenese beteiligt oder krankheitsbedingt typischerweise verändert sind, analysiert. Das

Expressionsmuster wurde immunhistochemisch in den Subregionen des Hippocampus (Cornu-Ammonis-Regionen 1 (CA1) und 3 (CA3) und Hilus des Gyrus dentatus), in der Amygdala, dem perirhinalem, parietalem, piriformem und entorhinalem Cortex, sowie verschiedenen Thalamuskernen (lateraler posteriorer, mediodorsaler und retikulärer Nucleus) erhoben. Die Bestimmung der optischen Dichte und markierten Fläche in beiden Modellen mittels ImageJ ergab, dass das Expressionsniveau in den meisten untersuchten Gehirnregionen konstant blieb. Im Kainat-Modell stieg jedoch die optische Dichte der Sigma-1-Expression in der CA3-Region des Hippocampus und im entorhinalen Cortex in der frühen Post-Insult-Phase an, was auf eine Induktion der Expression hindeutet. Zum selben Zeitpunkt war die markierte Fläche in beiden Arealen und in der chronischen Phase im Hilus der Kainat-Tiere signifikant verringert. Um einen möglichen Beitrag neuronalen Zellverlusts zu bewerten, erfolgte parallel eine ergänzende Analyse mit einem neuronalen Marker. Diese Untersuchung ergab keinen Hinweis auf eine Neurodegeneration. Darüber hinaus wurde die Anzahl Sigma-1-positiver Zellen stereologisch erfasst, um volumetrische Verzerrungen durch Krankheits- oder Modelleffekte auszuschließen. Die Ergebnisse der Zellzählung ergaben, dass die Anzahl der Sigma-1-positiven Zellen pro Volumen in den hippocampalen Subregionen (CA1, CA3 und Hilus des Gyrus dentatus) und im entorhinalen Cortex zwischen den Kontroll- und Kainat- Gruppen unverändert ist. Außerdem konnte die Ko-Expression von Sigma-1 in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen sowie Astrozyten und Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Ergänzend wurde eine qPCR eingesetzt, um eine mögliche Regulation der Sigma-1-Expression auf transkriptionaler Ebene zu erfassen. Hierfür erfolgte eine Mikrodissektion der Subregionen des Hippocampus (CA1, CA3 und Hilus Gyrus dentatus) sowie des entorhinalen Cortex im Kainat-Modell. Die relative RNA-Expression der Kainat-Tiere unterschieden sich in den Regionen des Hippocampus zu beiden Zeitpunkten nicht von denen der Kontroll-Gruppe. In der akuten Post-Insult-Phase wurde jedoch eine signifikante Verringerung der RNA-Expression im entorhinalen Cortex belegt. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Sigma-1-Expression während der Epileptogenese und nach der Epilepsiemaniifestation erhalten bleibt und nur eine vorübergehende Regulation in der frühen Post-Insult-Phase auftritt. Die vorliegende Studie liefert damit wichtige Informationen und eine Grundlage für die Betrachtung von Sigma-1 als potenzielle therapeutische Zielstruktur für Epilepsie.

VIII SUMMARY

Sigma-1 is a multifunctional, atypical receptor protein that regulates cellular stress responses and inter-organelle communication. Moreover, Sigma-1 influences mitochondrial processes, ion channels, and neurotransmitter receptors, and modulates mechanisms such as calcium homeostasis, oxidative stress responses, and protein folding. Despite the availability of antiseizure medications, epilepsy treatment remains challenging, as key mechanisms underlying temporal lobe epilepsy and therapy resistance are still not fully understood. Therefore, novel disease-modifying therapeutic approaches are needed that go beyond mere seizure control and specifically target pathophysiological processes. Due to its potential neuroprotective properties, Sigma-1 may exert disease-modifying effects and is thus considered a promising therapeutic target. Disease-related changes at the cellular and network level can affect the expression of pharmacological target structures. Such alterations may contribute to interindividual variability, potentially reducing the efficacy of therapeutic agents. To determine whether Sigma-1 remains a viable target during different disease stages, this study characterized Sigma-1 expression in two chronic mouse models of temporal lobe epilepsy. The amygdala kindling model allows insights into neuropathological processes during the development of a hyperexcitable neuronal network. In this model, female NMRI mice received suprathreshold electrical stimulations until they exhibited ten generalized seizures. Data were compared to those from sham control groups. In contrast, the intrahippocampal kainate model is particularly suitable for investigating drug-resistant epilepsies and analyzing complex hippocampal pathologies. In this context, male C57BL/6JRj mice received an intrahippocampal injection of kainate or saline to induce a non-convulsive status epilepticus. Brain tissue was collected either two days (early post-insult phase) or 35 days (chronic phase with spontaneous electrographic seizure events) after induction of status epilepticus. Subsequently, Sigma-1 expression patterns were analyzed in selected brain regions involved in ictogenesis and epileptogenesis or typically altered by disease. The expression patterns were assessed immunohistochemically in hippocampal subregions (cornu ammonis regions 1 (CA1) and 3 (CA3) and hilus of the dentate gyrus), the amygdala, perirhinal, parietal, piriform, and entorhinal cortex, as well as various thalamic nuclei (lateral posterior, mediodorsal, and reticular). Quantification of optical density and area fraction in both models using

ImageJ revealed that expression levels remained constant in most brain regions examined. However, in the kainate model, the optical density of Sigma-1 expression increased in the CA3-region of the hippocampus and in the entorhinal cortex during the acute post-insult phase, indicating an induction of expression. At the same time, a significant reduction in the labelled area (%) was observed in both regions, as well as in the hilus of kainate-treated animals in the chronic phase. To assess a possible contribution of neuronal cell loss, an additional analysis using a neuronal marker was performed in parallel, which revealed no evidence for neurodegeneration. Furthermore, the number of Sigma-1-positive cells was determined stereologically to exclude volumetric distortions due to disease or model effects. Cell counts showed that the number of Sigma-1-positive cells per volume in the hippocampal subregions (CA1, CA3, and hilus of the dentate gyrus) and in the entorhinal cortex did not differ between control and kainate groups. In addition, co-expression of Sigma-1 in inhibitory and excitatory neurons as well as astrocytes and microglia was demonstrated. Moreover, qPCR was used to assess regulation of Sigma-1 expression at the mRNA level. For this purpose, microdissection of hippocampal subregions (CA1, CA3, and hilus of the dentate gyrus) and the entorhinal cortex was performed in the kainate model. The relative RNA levels in kainate-treated animals did not differ from controls in the hippocampal regions at either time point. However, in the acute post-insult phase, a significant reduction in RNA levels was observed in the entorhinal cortex. In summary, the results suggest that Sigma-1 expression is maintained during epileptogenesis and after epilepsy manifestation, with only transient regulation occurring in the acute post-insult phase. Thus, this study provides important information and a basis for considering Sigma-1 as a potential therapeutic target for epilepsy.

IX LITERATURVERZEICHNIS

- Abarrategui B, Mai R, Sartori I, Francione S, Pelliccia V, Cossu M, Tassi L. Temporal lobe epilepsy: A never-ending story. *Epilepsy & Behavior* 2021; 122
- Abdullah CS, Alam S, Aishwarya R, Miriyala S, Panchatcharam M, Bhuiyan MAN, Peretik JM, Orr AW, James J, Osinska H, Robbins J, Lorenz JN, Bhuiyan MS. Cardiac Dysfunction in the Sigma 1 Receptor Knockout Mouse Associated With Impaired Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics. *Journal of the American Heart Association* 2018; 7: e009775.
- Abe K, Kawagoe J, Araki T, Aoki M, Kogure K. Differential expression of heat shock protein 70 gene between the cortex and caudate after transient focal cerebral ischaemia in rats. *Neurol Res* 1992; 14: 381-5.
- Abramovici S, Bagić A. Epidemiology of epilepsy. *Handb Clin Neurol* 2016; 138: 159-71.
- Advani VM, Ivanov P. Translational Control under Stress: Reshaping the Translatome. *Bioessays* 2019; 41: e1900009.
- Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PVP, Abreu RND, Chaves EMC, Vale OCd, Macêdo DS, Woods DJ, Fonteles MMdF, Vasconcelos SMM. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 2012: 795259.
- Aishwarya R, Abdullah CS, Morshed M, Remex NS, Bhuiyan MS. Sigmar1's Molecular, Cellular, and Biological Functions in Regulating Cellular Pathophysiology. *Frontiers in Physiology* 2021; Volume 12 - 2021
- Alekseenko SV, Solnushkin SD, Chikhman VN. Quantitative evaluation of the functional activity in multilayered brain structures using histological sections. *Journal of Optical Technology* 2022; 89: 502-5.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anol M, Maurice T. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 2000; 97: 155-70.
- Anderson LL, Kahlig KM, Barker-Haliski ML, Matthews LG, Toop HD, Hannigan B, French J, White HS, Souza M, Petrou S. PAC-FOS: A novel translational concordance framework identifies preclinical seizure models with highest predictive validity for clinical focal onset seizures. *Epilepsia* 2025; 66: 4983-95.
- Anwar H, Khan QU, Nadeem N, Pervaiz I, Ali M, Cheema FF. Epileptic seizures. *Discoveries (Craiova)* 2020; 8: e110.
- Arnold ER, Uyen BC, Subramaniam R, Dominique F, Timur M, Abdol RH. The Ligand Binding Region of the Sigma-1 Receptor: Studies Utilizing Photoaffinity Probes, Sphingosine and N-Alkylamines. *Current Pharmaceutical Design* 2012; 18: 920-9.
- Atabaki R, Khaleghzadeh-Ahangar H, Esmaeili N, Mohseni-Moghaddam P. Role of Pyroptosis, a Pro-inflammatory Programmed Cell Death, in Epilepsy. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2023; 43: 1049-59.
- Auvin S, Galanopoulou AS, Moshé SL, Potschka H, Rocha L, Walker MC, Force tTwod-reotIAJTT. Revisiting the concept of drug-resistant epilepsy: A TASK1 report of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia* 2023; 64: 2891-908.
- Avanzini G. A sound conceptual framework for an epilepsy classification is still lacking. *Epilepsia* 2010; 51: 720-2.

- Ayoubi R, Alshafie W, Shlaifer I, Southern K, McPherson PS, Laflamme C. The identification of high-performing antibodies for Sequestosome-1 for use in Western blot, immunoprecipitation and immunofluorescence. *F1000Res* 2023; 12: 324.
- Baka RD, Polizopoulou ZS. Feline Epilepsy: An update. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2020; 70: 1749-56.
- Balogh DB, Hodrea J, Saeed A, Cserhalmi M, Rozsahegyi A, Lakat T, Lenart L, Szabo AJ, Wagner LJ, Fekete A. Sigma-1 Receptor as a Novel Therapeutic Target in Diabetic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25: 13327.
- Bangaru ML, Weihrauch D, Tang QB, Zoga V, Hogan Q, Wu HE. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol Pain* 2013; 9: 47.
- Baram TZ, Gerth A, Schultz L. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Developmental Brain Research* 1997; 98: 265-70.
- Barker-Haliski M, Steve White H. Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. *Neuropharmacology* 2020; 167: 107750.
- Bateup Helen S, Johnson Caroline A, Denefrio Cassandra L, Saulnier Jessica L, Kornacker K, Sabatini Bernardo L. Excitatory/Inhibitory Synaptic Imbalance Leads to Hippocampal Hyperexcitability in Mouse Models of Tuberous Sclerosis. *Neuron* 2013; 78: 510-22.
- Baumgartner C, Koren JP, Lang C, Zoche L. Temporallappenepilepsien – Ätiologie und elektroklinische Subtypen. *Zeitschrift für Epileptologie* 2020; 33: 6-14.
- Baumgartner C. Resektionen. In: *Epileptische Anfälle und Epilepsien im Erwachsenenalter: Diagnostik und Therapie*. Schmitt FC, Stefan H, Holtkamp M, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2020: 493-503.
- Bazhanova ED, Kozlov AA, Litovchenko AV. Mechanisms of Drug Resistance in the Pathogenesis of Epilepsy: Role of Neuroinflammation. A Literature Review. *Brain Sciences* 2021; 11: 663.
- Becker AJ. Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2018; 44: 112-29.
- Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2011; 35: 565-72.
- Beesley S, Sullenberger T, Crotty K, Ailani R, D'Orio C, Evans K, Ogunkunle EO, Roper MG, Kumar SS. D-serine mitigates cell loss associated with temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 2020; 11: 4966.
- Beghi E, Berg A, Carpio A, Forsgren L, Hesdorffer DC, Hauser WA, Malmgren K, Shinnar S, Temkin N, Thurman D, Tomson T. Comment on Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 1698-9.
- Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: An electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1980; 5: 515-28.
- Ben-Ari Y, Holmes GL. The multiple facets of γ -aminobutyric acid dysfunction in epilepsy: review. *Current Opinion in Neurology* 2005; 18: 141-5.
- Benarroch EE. Sigma-1 receptor and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2018; 91: 743 - 7.

- Beniczky S, Trinka E, Wirrell E, Abdulla F, Al Baradie R, Alonso Vanegas M, Auvin S, Singh MB, Blumenfeld H, Bogacz Fressola A, Caraballo R, Carreno M, Cendes F, Charway A, Cook M, Craiu D, Ezeala-Adikaibe B, Frauscher B, French J, Gule MV, Higurashi N, Ikeda A, Jansen FE, Jobst B, Kahane P, Kishk N, Khoo CS, Vinayan KP, Lagae L, Lim KS, Lizcano A, McGonigal A, Perez-Gosiengfiao KT, Ryvlin P, Specchio N, Sperling MR, Stefan H, Tatum W, Tripathi M, Yacubian EM, Wiebe S, Wilmshurst J, Zhou D, Cross JH. Updated classification of epileptic seizures: Position paper of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 2025; 66: 1804-23.
- Berendt M, Farquhar RG, Mandigers PJ, Pakozdy A, Bhatti SF, De Risio L, Fischer A, Long S, Matiassek K, Muñana K, Patterson EE, Penderis J, Platt S, Podell M, Potschka H, Pumarola MB, Rusbridge C, Stein VM, Tipold A, Volk HA. International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res* 2015; 11: 182.
- Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 2003; 126: 462-9.
- Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48 Suppl 2: 65-74.
- Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin? *Epilepsy & Behavior* 2009; 14: 32-7.
- Bhatti SF, De Risio L, Muñana K, Penderis J, Stein VM, Tipold A, Berendt M, Farquhar RG, Fischer A, Long S, Löscher W, Mandigers PJ, Matiassek K, Pakozdy A, Patterson EE, Platt S, Podell M, Potschka H, Rusbridge C, Volk HA. International Veterinary Epilepsy Task Force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe. *BMC Vet Res* 2015; 11: 176.
- Bjørke AB, Nome CG, Falk RS, Gjerstad L, Taubøll E, Heuser K. Evaluation of long-term antiepileptic drug use in patients with temporal lobe epilepsy: Assessment of risk factors for drug resistance and polypharmacy. *Seizure* 2018; 61: 63-70.
- Bonansco C, Fuenzalida M. Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plast* 2016; 2016: 8607038.
- Bordeaux J, Welsh AW, Agarwal S, Killiam E, Baquero MT, Hanna JA, Anagnostou VK, Rimm DL. Antibody validation. *BioTechniques* 2010; 48: 197-209.
- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1999; 89: 717-29.
- Bouilleret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM. Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2000; 10: 305-24.
- Brady RD, Casillas-Espinosa PM, Agoston DV, Bertram EH, Kamnaksh A, Semple BD, Shultz SR. Modelling traumatic brain injury and posttraumatic epilepsy in rodents. *Neurobiology of Disease* 2019; 123: 8-19.

- Broadbelt K, Jones LB. Evidence of altered calmodulin immunoreactivity in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *J Psychiatr Res* 2008; 42: 612-21.
- Bruxel EM, do Canto AM, Bruno DCF, Geraldís JC, Lopes-Cendes I. Multi-omic strategies applied to the study of pharmacoresistance in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia Open* 2022; 7 Suppl 1: S94-s120.
- Burghi V, Fernández NC, Gándola YB, Piazza VG, Quiroga DT, Guilhen Mario É, Felix Braga J, Bader M, Santos RAS, Dominici FP, Muñoz MC. Validation of commercial Mas receptor antibodies for utilization in Western Blotting, immunofluorescence and immunohistochemistry studies. *PLoS One* 2017; 12: e0183278.
- Calkhoven CF, Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *The Biochemical journal* 1996; 317 (Pt 2): 329-42.
- Çarçak N, Onat F, Sitnikova E. Astrocytes as a target for therapeutic strategies in epilepsy: current insights. *Front Mol Neurosci* 2023; 16: 1183775.
- Castany S, Gris G, Vela JM, Verdú E, Boadas-Vaello P. Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain-related behaviours after mild spinal cord injury in mice. *Sci Rep* 2018; 8: 3873.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 1991; 11: 2795-803.
- Cavazos JE, Cross DJ. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 2006; 8: 483-93.
- Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci* 2012; 6: 5.
- Chandler K. Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Vet J* 2006; 172: 207-17.
- Cheah CS, Yu FH, Westenbroek RE, Kalume FK, Oakley JC, Potter GB, Rubenstein JL, Catterall WA. Specific deletion of NaV1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14646-51.
- Chen S, Buckmaster PS. Stereological analysis of forebrain regions in kainate-treated epileptic rats. *Brain Research* 2005; 1057: 141-52.
- Chen Z, Brodie MJ, Liew D, Kwan P. Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs: A 30-Year Longitudinal Cohort Study. *JAMA Neurol* 2018; 75: 279-86.
- Cheuk W, Chan JK. Subcellular localization of immunohistochemical signals: knowledge of the ultrastructural or biologic features of the antigens helps predict the signal localization and proper interpretation of immunostains. *Int J Surg Pathol* 2004; 12: 185-206.
- Chu UB, Ruoho AE. Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Mol Pharmacol* 2016; 89: 142-53.
- Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6: 344-66.
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 2003; 33: 635-55.
- Cole AJ, Dichter M. Neuroprotection and antiepileptogenesis: overview, definitions, and context. *Neurology* 2002; 59: S1-2.

- Conti F, Minelli A, Melone M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45: 196-212.
- Costa AM, Lucchi C, Simonini C, Rosal Lustosa Í, Biagini G. Status Epilepticus Dynamics Predicts Latency to Spontaneous Seizures in the Kainic Acid Model. *Cell Physiol Biochem* 2020; 54: 493-507.
- Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 2012; 60: 1215-26.
- Coulter DA, Steinhäuser C. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a022434.
- Couly S, Gogvadze N, Yasui Y, Kimura Y, Wang S-M, Sharikadze N, Wu H-E, Su T-P. Knocking Out Sigma-1 Receptors Reveals Diverse Health Problems. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2022; 42: 597-620.
- D'Angelo A, Bellino C, Bertone I, Cagnotti G, Iulini B, Miniscalco B, Casalone C, Gianella P, Cagnasso A. Seizure Disorders in 43 Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29: 967-71.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1-105.
- DelaCuesta-Barrutia J, Hidema S, Caldwell HK, Nishimori K, Erdozain AM, Peñagarikano O. In need of a specific antibody against the oxytocin receptor for neuropsychiatric research: A KO validation study. *Journal of Psychiatric Research* 2024; 173: 260-70.
- Deller T, Nitsch R, Frotscher M. Phaseolus vulgaris –leucoagglutinin tracing of commissural fibers to the rat dentate gyrus: Evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer. *Journal of Comparative Neurology* 1995; 352: 55-68.
- Deniz ÖG, Altun G, Kaplan AA, Yurt KK, von Bartheld CS, Kaplan S. A concise review of optical, physical and isotropic fractionator techniques in neuroscience studies, including recent developments. *Journal of Neuroscience Methods* 2018; 310: 45-53.
- Depaulis A, Hamelin S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding? *Revue Neurologique* 2015; 171: 217-26.
- Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences* 2013; 36: 174-84.
- Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt WG, Martinez-Orgado J, Robson PJ, Rohrback BG, Thiele E, Whalley B, Friedman D. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* 2014; 55: 791-802.
- Djebbari S, Jiménez-Herrera R, Iborra-Lázaro G, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. Social and contextual memory impairments induced by Amyloid- β oligomers are rescued by Sigma-1 receptor activation. *Biomed Pharmacother* 2025; 184: 117914.
- do Canto AM, Vieira AS, H.B. Matos A, Carvalho BS, Henning B, Norwood BA, Bauer S, Rosenow F, Gilioli R, Cendes F, Lopes-Cendes I. Laser microdissection-based microproteomics of the hippocampus of a rat epilepsy model reveals regional differences in protein abundances. *Scientific Reports* 2020; 10: 4412.
- Dorfer C, Czech T, Rössler K. Chirurgie der Temporallappenepilepsie. *Zeitschrift für Epileptologie* 2020; 33: 37-41.

- Drewes N, Fang X, Gupta N, Nie D. Pharmacological and Pathological Implications of Sigma-1 Receptor in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines* 2025; 13(6):1409.
- Drexel M, Preidt AP, Sperk G. Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology* 2012; 63: 806-17.
- Du F, Whetsell WO, Abou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothman EW, Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 1993; 16: 223-33.
- Du F, Eid T, Lothman EW, Köhler C, Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 1995; 15: 6301-13.
- Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, Yin Q. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 1637-47.
- Dudek FE, Staley KJ. Chapter 40 - Post-Status Epilepticus Models: Systemic Kainic Acid. In: *Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)*. Pitkänen A, Buckmaster PS, Galanopoulou AS, Moshé SL, eds.: Academic Press 2017: 599-610.
- Ebert U, Löscher W. Pathophysiologie des Kindling. Phänomens: Ansätze zur Entwicklung neuer Antiepileptika. *e-Neuroforum* 1999; 5: 76-9.
- Ellis MJ, Lekka C, Tulmin H, O'Brien DP, Dhayal S, Zeissler M-L, Knudsen JG, Kessler BM, Morgan NG, Todd JA, Richardson SJ, Stefana MI. Validation of Tau Antibodies for Use in Western Blotting and Immunohistochemistry. *bioRxiv* 2023: 2023.04.13.536711.
- Epps SA, Weinshenker D. Rhythm and blues: Animal models of epilepsy and depression comorbidity. *Biochemical Pharmacology* 2013; 85: 135-46.
- Erickson HS, Albert PS, Gillespie JW, Rodriguez-Canales J, Marston Linehan W, Pinto PA, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR. Quantitative RT-PCR gene expression analysis of laser microdissected tissue samples. *Nat Protoc* 2009; 4: 902-22.
- Erlen A (2021) Epidemiologische Studie zur Prävalenz von Krampfanfällen in der Hundepopulation des Vereinigten Königreichs. Dissertation, Tierärztliche Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München
- Falcón-Moya R, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Kainate Receptors: Role in Epilepsy. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 217.
- Fang M, Xi ZQ, Wu Y, Wang XF. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis. *Med Hypotheses* 2011; 76: 871-6.
- Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, Dell'Isola GB, Di Cara G, Striano P, Verrotti A. The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existent and New Emerging Therapies. *Front Neurol* 2021; 12: 674483.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39: 175-91.
- Fernandes MJ, Carneiro JE, Amorim RP, Araujo MG, Nehlig A. Neuroprotective agents and modulation of temporal lobe epilepsy. *Front Biosci (Elite Ed)* 2015; 7: 79-93.
- Finney CA, Jones NM, Morris MJ. A scalable, fully automated approach for regional quantification of immunohistochemical staining of astrocytes in the rat brain. *J Neurosci Methods* 2021; 348: 108994.

- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-2.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel Jr J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-82.
- Fisher RS. Redefining epilepsy. *Current Opinion in Neurology* 2015; 28: 130-5.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58: 522-30.
- Fonseca-Barriendos D, Frías-Soria CL, Pérez-Pérez D, Gómez-López R, Borroto Escuela DO, Rocha L. Drug-resistant epilepsy: Drug target hypothesis and beyond the receptors. *Epilepsia Open* 2022; 7: S23-S33.
- Forsström B, Axnäs BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One* 2015; 10: e0121673.
- Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain* 2014; 137: 1998-2014.
- Franklin K, Paxinos G (2019) Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates 5th Edition. Academic Press (Elsevier)
- Friedman A, Heinemann U. 353 Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen R, Delgado-Escueta A, eds.: Oxford University Press 2012: 0.
- Fu J, Tao T, Li Z, Chen Y, Li J, Peng L. The roles of ER stress in epilepsy: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Biomed Pharmacother* 2020; 131: 110658.
- Fujita S, Toyoda I, Thamattoor AK, Buckmaster PS. Preictal Activity of Subicular, CA1, and Dentate Gyrus Principal Neurons in the Dorsal Hippocampus before Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 2014; 34: 16671-87.
- Galanopoulou AS, Moshé SL. Neonatal and Infantile Epilepsy: Acquired and Genetic Models. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 6: a022707.
- Gao Q-J, Yang B, Chen J, Shi S-B, Yang H-J, Liu X. Sigma-1 Receptor Stimulation with PRE-084 Ameliorates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Chinese Medical Journal* 2018; 131: 539-43.
- Godale CM, Danzer SC. Signaling Pathways and Cellular Mechanisms Regulating Mossy Fiber Sprouting in the Development of Epilepsy. *Front Neurol* 2018; 9: 298.
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.
- Gogvadze N, Zhuravliova E, Morin D, Mikeladze D, Maurice T. Sigma-1 Receptor Agonists Induce Oxidative Stress in Mitochondria and Enhance Complex I Activity in Physiological Condition but Protect Against Pathological Oxidative Stress. *Neurotoxicity Research* 2019; 35: 1-18.

- Gorter JA, Vliet EA, Silva FHLd. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 96-108.
- Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*, 2., vollständig überarbeitete Auflage edn. Thieme, Stuttgart
- Gray RA, Whalley BJ. The proposed mechanisms of action of CBD in epilepsy. *Epileptic Disord* 2020; 22: 10-5.
- Gromek KA, Suchy FP, Meddaugh HR, Wrobel RL, LaPointe LM, Chu UB, Primm JG, Ruoho AE, Senes A, Fox BG. The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands. *J Biol Chem* 2014; 289: 20333-44.
- Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nature Neuroscience* 2015; 18: 339-43.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.
- GUNDERSEN HJG, JENSEN EBV, KIËU K, NIELSEN J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. *Journal of Microscopy* 1999; 193: 199-211.
- Guo L, Chen Y, Zhao R, Wang G, Friedman E, Zhang A, Zhen X. Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits anti-seizure activities. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 4052-65.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 2015; 7: 42-7.
- Guye M, Régis J, Tamura M, Wendling F, Gonigal AM, Chauvel P, Bartolomei F. The role of corticothalamic coupling in human temporal lobe epilepsy. *Brain* 2006; 129: 1917-28.
- Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, Glossmann H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma-1-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8072-7.
- Hansen KF, Sakamoto K, Pelz C, Impey S, Obrietan K. Profiling status epilepticus-induced changes in hippocampal RNA expression using high-throughput RNA sequencing. *Scientific Reports* 2014; 4: 6930.
- Häussler U, Rinas K, Kiliass A, Egert U, Haas CA. Mossy fiber sprouting and pyramidal cell dispersion in the hippocampal CA2 region in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2016; 26: 577-88.
- Hayashi T, Su TP. Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 726-33.
- Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14949-54.
- Hayashi T, Su TP. The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. *Current Neuropharmacology* 2005; 3: 267-80.
- Hayashi T, Su T-P. Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell* 2007; 131: 596-610.
- Hayashi T, Lewis A, Hayashi E, Betenbaugh MJ, Su TP. Antigen retrieval to improve the immunocytochemistry detection of sigma-1 receptors and ER chaperones. *Histochem Cell Biol* 2011; 135: 627-37.
- Hayashi T. Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2015; 69: 179-91.

- Hayashi T. The Sigma-1 Receptor in Cellular Stress Signaling. *Front Neurosci* 2019; 13: 733.
- Hedrich UB, Liautard C, Kirschenbaum D, Pofahl M, Lavigne J, Liu Y, Theiss S, Slotta J, Escayg A, Dihné M, Beck H, Mantegazza M, Lerche H. Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J Neurosci* 2014; 34: 14874-89.
- Heinrich A, Zhong XB, Rasmussen TP. Variability in expression of the human MDR1 drug efflux transporter and genetic variation of the ABCB1 gene: implications for drug-resistant epilepsy. *Curr Opin Toxicol* 2018; 11-12: 35-42.
- Héja L, Nyitrai G, Kékesi O, Dobolyi A, Szabó P, Fiáth R, Ulbert I, Pál-Szenthe B, Palkovits M, Kardos J. Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol* 2012; 10: 26.
- Henninger JE, Oksuz O, Shrinivas K, Sagi I, LeRoy G, Zheng MM, Andrews JO, Zamudio AV, Lazaris C, Hannett NM, Lee TI, Sharp PA, Cissé, II, Chakraborty AK, Young RA. RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell* 2021; 184: 207-25.e24.
- Henshall DC. Epigenetic changes in status epilepticus. *Epilepsia* 2018; 59: 82-6.
- Heske L, Nødtvedt A, Jäderlund KH, Berendt M, Egenvall A. A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: Incidence, mortality and survival after diagnosis. *The Veterinary Journal* 2014; 202: 471-6.
- Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *American Journal of Clinical Pathology* 2008; 129: 263-73.
- Hodges SL, Lugo JN. Therapeutic role of targeting mTOR signaling and neuroinflammation in epilepsy. *Epilepsy Research* 2020; 161: 106282.
- Holmes GL. Cognitive impairment in epilepsy: the role of network abnormalities. *Epileptic Disorders* 2015; 17: 101-16.
- Holtkamp MM, TW. Berkenfeld, R. Bien, CG. Coban, I. Knake, S. Michaelis, R. Rémi, J. Seeck, M. Surges, R. Weber, Y. et al. (2023) Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter, S2k-Leitlinie. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (abgerufen am 28.08.2025)
- Hong W, Werling LL. Evidence that the sigma(1) receptor is not directly coupled to G proteins. *Eur J Pharmacol* 2000; 408: 117-25.
- Hsi ED. A Practical Approach for Evaluating New Antibodies in the Clinical Immunohistochemistry Laboratory. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2001; 125: 289-94.
- Jain S, Nirwan N, Agarwal NB, Vohora D. Methods for the Induction of Status Epilepticus and Temporal Lobe Epilepsy in Rodents: The Kainic Acid Model and the Pilocarpine Model. In: *Experimental and Translational Methods to Screen Drugs Effective Against Seizures and Epilepsy*. Vohora D, ed. New York, NY: Springer US 2021: 121-44.
- Jensen EC. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *The Anatomical Record* 2013; 296: 378-81.
- Jia J, Cheng J, Wang C, Zhen X. Sigma-1 Receptor-Modulated Neuroinflammation in Neurological Diseases. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 314.
- Jin JL, Fang M, Zhao YX, Liu XY. Roles of sigma-1 receptors in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 4808-20.

- Johnston A, Smith P. Epilepsy: A General Overview. In: Epilepsy and Intellectual Disabilities. Prasher VP, Kerr MP, eds. London: Springer London 2008: 7-27.
- Juvale IIA, Che Has AT. Possible interplay between the theories of pharmacoresistant epilepsy. *Eur J Neurosci* 2021; 53: 1998-2026.
- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15: 637-54.
- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014; 10: 1693-705.
- Kasahara Y, Nakashima H, Nakashima K. Seizure-induced hilar ectopic granule cells in the adult dentate gyrus. *Front Neurosci* 2023; 17: 1150283.
- Kearsley-Fleet L, O'Neill DG, Volk HA, Church DB, Brodbelt DC. Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *Vet Rec* 2013; 172: 338.
- Keck M, Fournier A, Gualtieri F, Walker A, von Rüden EL, Russmann V, Deeg CA, Hauck SM, Krause R, Potschka H. A systems level analysis of epileptogenesis-associated proteome alterations. *Neurobiol Dis* 2017; 105: 164-78.
- Kekuda R, Prasad PD, Fei Y-J, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and Functional Expression of the Human Type 1 Sigma Receptor (hSigmaR1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 229: 553-8.
- Khazipov R. GABAergic Synchronization in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: a022764.
- Kim FJ. Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. In: Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. Kim FJ, Pasternak GW, eds. Cham: Springer International Publishing 2017: 1-11.
- Klein S, Bankstahl M, Löscher W. Inter-individual variation in the effect of antiepileptic drugs in the intrahippocampal kainate model of mesial temporal lobe epilepsy in mice. *Neuropharmacology* 2015; 90: 53-62.
- Kopanchuk S, Vavers E, Veiksina S, Ligi K, Zvejniece L, Dambrova M, Rinken A. Intracellular dynamics of the Sigma-1 receptor observed with super-resolution imaging microscopy. *PLoS One* 2022; 17: e0268563.
- Kubínová L. Advantages of stereological methods in biomedicine. Efficiently obtaining unbiased estimates of geometrical characteristics for 3-D structures. *IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society* 1998; 17 2: 110-5.
- Kurien BT, Scofield RH. Validating Antibody Specificities for Immunohistochemistry by Protein Blotting Methods. In: Signal Transduction Immunohistochemistry: Methods and Protocols. Kalyuzhny AE, ed. New York, NY: Springer New York 2017: 61-73.
- Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 342: 314-9.
- Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010; 51: 1069-77.

- Lachance V, Bélanger SM, Hay C, Le Corvec V, Banouvong V, Lapalme M, Tarmoun K, Beaucaire G, Lussier MP, Kourrich S. Overview of Sigma-1R Subcellular Specific Biological Functions and Role in Neuroprotection. *Int J Mol Sci* 2023; 24
- Lacombe VA, Mayes M, Mosseri S, Reed SM, Ou TH. Distribution and predictive factors of seizure types in 104 cases. *Equine Veterinary Journal* 2014; 46: 441-5.
- Lacombe VA. Seizures in horses: diagnosis and classification. *Vet Med (Auckl)* 2015; 6: 301-8.
- Landmark CJ. Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 2006; 13 1: RA1-7.
- Lang JD, Hamer HM. Epidemiologie der Epilepsie im höheren Lebensalter. *Zeitschrift für Epileptologie* 2022; 35: 110-4.
- Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* 2002; 50: 93-103.
- Lerche H. Drug-resistant epilepsy — time to target mechanisms. *Nature Reviews Neurology* 2020; 16: 595-6.
- Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 45-52.
- Lewis CJ, Pan T, Kalsotra A. RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 202-10.
- Li X, Yang C, Shi Y, Guan L, Li H, Li S, Li Y, Zhang Y, Lin J. Abnormal neuronal damage and inflammation in the hippocampus of kainic acid-induced epilepsy mice. *Cell Biochem Funct* 2021; 39: 791-801.
- Li Z, Ran Q, Qu C, Hu S, Cui S, Zhou Y, Shen B, Yang B. Sigma-1 receptor activation attenuates DOX-induced cardiotoxicity by alleviating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial calcium overload via PERK and IP3R-VDAC1-MCU signaling pathways. *Biology Direct* 2025; 20: 23.
- Liang D, Seyfried TN. Genes differentially expressed in the kindled mouse brain. *Molecular Brain Research* 2001; 96: 94-102.
- Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 2005; 79: 295-302.
- Liu B, Qian SB. Translational reprogramming in cellular stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014; 5: 301-15.
- Liu J, Feng X, Wang Y, Xia X, Zheng JC. Astrocytes: GABAceptive and GABAergic Cells in the Brain. *Front Cell Neurosci* 2022; 16: 892497.
- Liu Q, Guo Q, Fang L-P, Yao H, Scheller A, Kirchhoff F, Huang W. Specific detection and deletion of the sigma-1 receptor widely expressed in neurons and glial cells in vivo. *Journal of Neurochemistry* 2023; 164: 764-85.
- Löscher W, Ebert U. The role of the piriform cortex in kindling. *Prog Neurobiol* 1996; 50: 427-81.
- Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 2002; 50: 105-23.
- Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 2005a; 6: 591-602.

- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRX* 2005b; 2: 86-98.
- Löscher W, Schmidt D. Experimental and Clinical Evidence for Loss of Effect (Tolerance) during Prolonged Treatment with Antiepileptic Drugs. *Epilepsia* 2006; 47: 1253-84.
- Löscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 668-700.
- Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011; 20: 359-68.
- Löscher W. Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Research* 2016; 126: 157-84.
- Löscher W. The Search for New Screening Models of Pharmacoresistant Epilepsy: Is Induction of Acute Seizures in Epileptic Rodents a Suitable Approach? *Neurochem Res* 2017a; 42: 1926-38.
- Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research* 2017b; 42: 1873 - 88.
- Löscher W. Chapter 50 - Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy. In: *Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)*. Pitkänen A, Buckmaster PS, Galanopoulou AS, Moshé SL, eds.: Academic Press 2017c: 743-60.
- Löscher W, Potschka H, Sisodiya SM, Vezzani A. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacological Reviews* 2020; 72: 606-38.
- Löscher W, Friedman A. Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 591.
- Löscher W, Klein P. The Pharmacology and Clinical Efficacy of Antiseizure Medications: From Bromide Salts to Cenobamate and Beyond. *CNS Drugs* 2021; 35: 935-63.
- Löscher W. Dogs as a Natural Animal Model of Epilepsy. *Front Vet Sci* 2022; 9: 928009.
- Löscher W, White HS. Animal Models of Drug-Resistant Epilepsy as Tools for Deciphering the Cellular and Molecular Mechanisms of Pharmacoresistance and Discovering More Effective Treatments. *Cells* 2023; 12
- Lux H, Heinemann U, Dietzel ID. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Advances in neurology* 1986; 44: 619-39.
- Ma DL, Tang YC, Tang FR. Cytoarchitectonics and afferent/efferent reorganization of neurons in layers II and III of the lateral entorhinal cortex in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1324-42.
- Mac TL, Tran DS, Quet F, Odermatt P, Preux PM, Tan CT. Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review. *Lancet Neurol* 2007; 6: 533-43.
- MacAllister WS, Schaffer SG. Neuropsychological Deficits in Childhood Epilepsy Syndromes. *Neuropsychology Review* 2007; 17: 427-44.

- Magloczky Z, Freund TF. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience* 1993; 56: 317-35.
- Mancuso R, Navarro X. Sigma-1 Receptor in Motoneuron Disease. *Advances in experimental medicine and biology* 2017; 964: 235-54.
- Marchi N, Banjara M, Janigro D. Blood–brain barrier, bulk flow, and interstitial clearance in epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 118-24.
- Marques FVBS, Kawamura LRdSM, Quintanilha MVT, Mota IFL, Vasconcelos AS, da Silva JFF, Mortari MR. Pharmacological perspectives and mechanisms involved in epileptogenesis. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 2022; 11: 97.
- Martin P, Reeder T, Sourbron J, de Witte PAM, Gammaitoni AR, Galer BS. An Emerging Role for Sigma-1 Receptors in the Treatment of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22: 8416.
- Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as potential biomarkers in temporal lobe epilepsy and mesial temporal lobe epilepsy. *Neural Regeneration Research* 2023; 18: 716-26.
- Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 1996; 26: 151-61.
- Matsumoto RR, Bowen WD, Su T-P (2007) Sigma receptors : chemistry, cell biology and clinical implications. New York : Springer, New York (State), United States
- Maurice T, Gogvadze N. Sigma-1 (σ_1) Receptor in Memory and Neurodegenerative Diseases. In: *Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors*. Kim FJ, Pasternak GW, eds. Cham: Springer International Publishing 2017: 81-108.
- Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L, Ruoho AE. The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* 2010; 167: 247-55.
- Mavlyutov TA, Guo LW, Epstein ML, Ruoho AE. Role of the Sigma-1 receptor in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *J Pharmacol Sci* 2015a; 127: 10-6.
- Mavlyutov TA, Epstein M, Guo L-W. Subcellular Localization of the Sigma-1 Receptor in Retinal Neurons — an Electron Microscopy Study. *Scientific Reports* 2015b; 5: 10689.
- Mavlyutov TA, Duellman T, Kim HT, Epstein ML, Leese C, Davletov BA, Yang J. Sigma-1 receptor expression in the dorsal root ganglion: Reexamination using a highly specific antibody. *Neuroscience* 2016; 331: 148-57.
- Mavlyutov TA, Yang H, Epstein ML, Ruoho AE, Yang J, Guo LW. APEX2-enhanced electron microscopy distinguishes sigma-1 receptor localization in the nucleoplasmic reticulum. *Oncotarget* 2017; 8: 51317-30.
- Mayhew TM. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *Journal of Neurocytology* 1992; 21: 313-28.
- McCormick DA, Contreras D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 815-46.
- McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C. The kindling model of epilepsy. In: *Epilepsy: Models, Mechanisms and Concepts*. Schwartzkroin PA, ed. Cambridge: Cambridge University Press 1993: 27-47.
- Mei J, Pasternak GW. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma-1 receptor. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 349-55.

- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000; 130: 1007s-15s.
- Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2009; 379: 385-8.
- Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 519-25.
- Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, Crotty T, McDermott EW, Keaveny TV, Duffy MJ, Hill ADK, O'Higgins N. Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *European Journal of Surgical Oncology* 2003; 29: 20-4.
- Möller C, Wolf F, van Dijk RM, Di Liberto V, Russmann V, Keck M, Palme R, Hellweg R, Gass P, Otzdorff C, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia* 2018; 59: 765-77.
- Moore SA. Seizures and epilepsy in cats. *Vet Med (Auckl)* 2014; 5: 41-7.
- Mori T, Hayashi T, Hayashi E, Su TP. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS One* 2013; 8: e76941.
- Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004; 73: 1-60.
- Mulisch M, Welsch U (2015) *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- Navidhamidi M, Ghasemi M, Mehranfard N. Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. *Reviews in the Neurosciences* 2017; 28: 307-34.
- Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee S, Kaushal N, Matsumoto RR. Sigma-1 Receptors and Neurodegenerative Diseases: Towards a Hypothesis of Sigma-1 Receptors as Amplifiers of Neurodegeneration and Neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 2017; 964: 133-52.
- Nickels K. How Have We Come This Far? Epilepsy Classification Through the Ages. *Epilepsy Curr* 2017; 17: 229-31.
- Niquet J, Ben-Ari Y, Represa A. Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *Journal of Neurocytology* 1994; 23: 641-56.
- Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Reviews in the Neurosciences* 2018; 29: 757-70.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 2006; 1: 1559-82.
- Ortega-Roldan JL, Ossa F, Schnell JR. Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *J Biol Chem* 2013; 288: 21448-57.
- Oyrer J, Maljevic S, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S, Reid CA. Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacological Reviews* 2018; 70: 142-73.
- Packer RM, Shihab NK, Torres BB, Volk HA. Clinical risk factors associated with anti-epileptic drug responsiveness in canine epilepsy. *PLoS One* 2014; 9: e106026.

- Packer RM, Volk HA. Epilepsy beyond seizures: a review of the impact of epilepsy and its comorbidities on health-related quality of life in dogs. *Vet Rec* 2015; 177: 306-15.
- Pakozdy A, Sarchahi AA, Leschnik M, Tichy AG, Halasz P, Thalhammer JG. Treatment and long-term follow-up of cats with suspected primary epilepsy. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 267-73.
- Pakozdy A, Halasz P, Klang A. Epilepsy in cats: theory and practice. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 255-63.
- Palacios G, Muro A, Vela JM, Molina-Holgado E, Guitart X, Ovalle S, Zamanillo D. Immunohistochemical localization of the signal-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Res* 2003a; 961: 92-9.
- Palacios G, Muro A, Vela JM, Molina-Holgado E, Guitart X, Ovalle S, Zamanillo D. Immunohistochemical localization of the $\sigma 1$ -receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Research* 2003b; 961: 92-9.
- Pan L, Pasternak DA, Xu J, Xu M, Lu Z, Pasternak GW, Pan YX. Isolation and characterization of alternatively spliced variants of the mouse signal receptor gene, *Sigmar1*. *PLoS One* 2017; 12: e0174694.
- Parent JM, Lowenstein DH. Mossy fiber reorganization in the epileptic hippocampus. *Current Opinion in Neurology* 1997; 10: 103-9.
- Parsons ALM, Bucknor EMV, Castroflorio E, Soares TR, Oliver PL, Rial D. The Interconnected Mechanisms of Oxidative Stress and Neuroinflammation in Epilepsy. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11
- Pearson TW, Leigh Anderson N. [16] Use of high-resolution two-dimensional gel electrophoresis for analysis of monoclonal antibodies and their specific antigens. In: *Methods in Enzymology*: Academic Press 1983: 196-220.
- Peek SI, Meller S, Twele F, Packer RMA, Volk HA. Epilepsy is more than a simple seizure disorder: Parallels between human and canine cognitive and behavioural comorbidities. *Vet J* 2024; 303: 106060.
- Pérez-Pérez D, Monío-Baca C, von Rüden EL, Buchecker V, Wagner A, Schönhoff K, Zvejniece L, Klimpel D, Potschka H. Preclinical efficacy profiles of the sigma-1 modulator E1R and of fenfluramine in two chronic mouse epilepsy models. *Epilepsia* 2024; 65: 2470-82.
- Perucca E, Beghi E, Dulac O, Shorvon S, Tomson T. Assessing risk to benefit ratio in antiepileptic drug therapy. *Epilepsy Research* 2000; 41: 107-39.
- Perucca E, Brodie MJ, Kwan P, Tomson T. 30 years of second-generation antiseizure medications: impact and future perspectives. *Lancet Neurol* 2020; 19: 544-56.
- Pitkänen A, Tuunanen J, Kälviäinen R, Partanen K, Salmenperä T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 1998; 32: 233-53.
- Pitkänen A, Immonen RJ, Gröhn OH, Kharatishvili I. From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia* 2009; 50 Suppl 2: 21-9.
- Potschka H, Fischer A, von Rüden E-L, Hülsmeier V, Baumgärtner W. Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 2013; 54: 571-9.

- Potschka H, Fischer A, Löscher W, Patterson N, Bhatti S, Berendt M, De Risio L, Farquhar R, Long S, Mandigers P, Matiassek K, Muñana K, Pakozdy A, Penderis J, Platt S, Podell M, Rusbridge C, Stein V, Tipold A, Volk HA. International veterinary epilepsy task force consensus proposal: outcome of therapeutic interventions in canine and feline epilepsy. *BMC Vet Res* 2015; 11: 177.
- Potschka H. Procedures for Electrical and Chemical Kindling Models in Rats and Mice. In: *Experimental and Translational Methods to Screen Drugs Effective Against Seizures and Epilepsy*. Vohora D, ed. New York, NY: Springer US 2021: 103-19.
- Potschka H, Fischer A, Löscher W, Volk HA. Pathophysiology of drug-resistant canine epilepsy. *Vet J* 2023; 296-297: 105990.
- Powell EM. Interneuron Development and Epilepsy: Early Genetic Defects Cause Long-Term Consequences in Seizures and Susceptibility: Links Between Disrupted Interneuron Development and Human Disorders. *Epilepsy Currents* 2013; 13: 172-6.
- Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I, Robertson DHL, Gaskell SJ, Oliver SG, Beynon RJ. Dynamics of Protein Turnover, a Missing Dimension in Proteomics*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; 1: 579-91.
- Proper EA, Oestreicher AB, Jansen GH, Veelen CWMv, van Rijen PC, Gispen WH, de Graan PNE. Immunohistochemical characterization of mossy fibre sprouting in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 2000; 123: 19-30.
- Raikov I, Plitt M, Soltesz I. Chapter 23 - Network Models of Epilepsy-Related Pathological Structural and Functional Alterations in the Dentate Gyrus. In: *The Rewiring Brain*. van Ooyen A, Butz-Ostendorf M, eds. San Diego: Academic Press 2017: 485-503.
- Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nature Reviews Neurology* 2009; 5: 380-91.
- Ramakrishnan NK, Marosi K, Nyakas CJ, Kwizera C, Elsinga PH, Ishiwata K, Luiten PG, Dierckx RA, van Waarde A. Altered sigma-1 receptor expression in two animal models of cognitive impairment. *Mol Imaging Biol* 2015; 17: 231-8.
- Rastin C, Schenkel LC, Sadikovic B. Complexity in Genetic Epilepsies: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24: 14606.
- Rattka M, Brandt C, Löscher W. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: Epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations, pharmacological response, and hippocampal damage in epileptic rats. *Epilepsy Research* 2013; 103: 135-52.
- Ravizza T, Scheper M, Di Sapia R, Gorter J, Aronica E, Vezzani A. mTOR and neuroinflammation in epilepsy: implications for disease progression and treatment. *Nature Reviews Neuroscience* 2024; 25: 334-50.
- Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE, Heinemann U, Beck H. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53: 469-79.
- Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 2005; 129: 18-35.
- Ren E, Curia G. Synaptic Reshaping and Neuronal Outcomes in the Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Mol Sci* 2021; 22
- Represa A, Salle GLGL, Ben-Ari Y. Hippocampal plasticity in the kindling model of epilepsy in rats. *Neuroscience Letters* 1989; 99: 345-50.

- Riban V, Bouilleret V, Pham-Lê BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2002; 112: 101-11.
- Richter SH, Garner JP, Würbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* 2009; 6: 257-61.
- Rieux C, Carney R, Lupi D, Dkhisssi-Benyahya O, Jansen K, Chounlamountri N, Foster RG, Cooper HM. Analysis of Immunohistochemical Label of Fos Protein in the Suprachiasmatic Nucleus: Comparison of Different Methods of Quantification. *Journal of Biological Rhythms* 2002; 17: 121 - 36.
- Riviello JJ. Classification of seizures and epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2003; 3: 325-31.
- Roganovic M, Pantovic S, Dizdarevic S. Role of the oxidative stress in the pathogenesis of epilepsy. *Neurological Sciences and Neurophysiology* 2019; 36: 1-8.
- Rogawski MA, Johnson MR. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Curr* 2008; 8: 127-30.
- Rogawski MA. The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 2: 33-40.
- Rosen DA, Seki SM, Fernández-Castañeda A, Beiter RM, Eccles JD, Woodfolk JA, Gaultier A. Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis. *Sci Transl Med* 2019; 11
- Ross AB, Langer JD, Jovanovic M. Proteome Turnover in the Spotlight: Approaches, Applications, and Perspectives. *Mol Cell Proteomics* 2021; 20: 100016.
- Rubio C, Rubio-Osornio M, Retana-Márquez S, Verónica Custodio ML, Paz C. In vivo experimental models of epilepsy. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010; 10: 298-309.
- Ruscher K, Shamloo M, Rickhag M, Ladunga I, Soriano L, Gisselsson L, Toresson H, Ruslim-Litrus L, Oksenberg D, Urfer R, Johansson BB, Nikolich K, Wieloch T. The sigma-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* 2011; 134: 732-46.
- Rusina E, Bernard C, Williamson A. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. *eNeuro* 2021; 8
- Russo E, Citraro R, Constanti A, De Sarro G. The mTOR Signaling Pathway in the Brain: Focus on Epilepsy and Epileptogenesis. *Molecular Neurobiology* 2012; 46: 662-81.
- Ryskamp DA, Korban S, Zhemkov V, Kraskovskaya N, Bezprozvanny I. Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 2019; 13: 862.
- Sabino V, Cottone P, Parylak SL, Steardo L, Zorrilla EP. Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype. *Behav Brain Res* 2009; 198: 472-6.
- Sadangi C, Rosenow F, Norwood BA. Validation of reference genes for quantitative gene expression analysis in experimental epilepsy. *J Neurosci Res* 2017; 95: 2357-66.
- Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 630-42.
- Sałaciak K, Pytka K. Revisiting the sigma-1 receptor as a biological target to treat affective and cognitive disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2022; 132: 1114-36.

- San-Juan D, Rodríguez-Méndez DA. Epilepsy as a disease affecting neural networks: a neurophysiological perspective. *Neurología (English Edition)* 2023; 38: 114-23.
- Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990; 76: 459-72.
- Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2007; 7: 348-54.
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang Y-H, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58: 512-21.
- Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. Crystal structure of the human $\sigma 1$ receptor. *Nature* 2016; 532: 527-30.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-5.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res* 2005; 8: 221-5.
- Schwarcz R, Witter MP. Memory impairment in temporal lobe epilepsy: the role of entorhinal lesions. *Epilepsy Research* 2002; 50: 161-77.
- Schwarz AP, Kovalenko AA, Malygina DA, Postnikova TY, Zubareva OE, Zaitsev AV. Reference Gene Validation in the Brain Regions of Young Rats after Pentylentetrazole-Induced Seizures. *Biomedicines* 2020; 8
- Schwenk JM, Lindberg J, Sundberg M, Uhlén M, Nilsson P. Determination of Binding Specificities in Highly Multiplexed Bead-based Assays for Antibody Proteomics * S. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; 6: 125-32.
- Scorza F, Arida R, Priel M, Calderazzo L, Cavalheiro E. The contribution of the lateral posterior and anteroventral thalamic nuclei on spontaneous recurrent seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 2002; 60: 572-5.
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7: 194-206.
- Shan T, Zhu Y, Fan H, Liu Z, Xie J, Li M, Jing S. Global, regional, and national time trends in the burden of epilepsy, 1990-2019: an age-period-cohort analysis for the global burden of disease 2019 study. *Front Neurol* 2024; 15: 1418926.
- Sharma N, Patel C, Shenkman M, Kessel A, Ben-Tal N, Lederkremer GZ. The Sigma-1 receptor is an ER-localized type II membrane protein. *J Biol Chem* 2021; 297: 101299.
- Shin EJ, Nah SY, Kim WK, Ko KH, Jhoo WK, Lim YK, Cha JY, Chen CF, Kim HC. The dextromethorphan analog dimemorfan attenuates kainate-induced seizures via sigma1 receptor activation: comparison with the effects of dextromethorphan. *Br J Pharmacol* 2005; 144: 908-18.
- Shlobin NA, Sander JW. Current Principles in the Management of Drug-Resistant Epilepsy. *CNS Drugs* 2022; 36: 555-68.
- Shorvon WL, Schmidt D. Mechanisms of Drug Resistance and Tolerance. In: *The Treatment of Epilepsy*. 2015: 92-102.
- Sills GJ, Rogawski MA. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology* 2020; 168: 107966.

- Singh SP, He X, McNamara JO, Danzer SC. Morphological changes among hippocampal dentate granule cells exposed to early kindling-epileptogenesis. *Hippocampus* 2013; 23: 1309-20.
- Smith PE. Introduction: The causes of epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53 Suppl 4: 1-2.
- Smith SB. Introduction to Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets. *Adv Exp Med Biol* 2017; 964: 1-4.
- Smith SB, Wang J, Cui X, Mysona BA, Zhao J, Bollinger KE. Sigma 1 receptor: A novel therapeutic target in retinal disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 2018; 67: 130-49.
- Spencer SS, Spencer DD. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35: 721-7.
- Sperk G, Drexel M, Tasan R, Wieselthaler A. Epilepsy, Brain Injury and Cell Death. In: *Interaction Between Neurons and Glia in Aging and Disease*. Malva JO, Rego AC, Cunha RA, Oliveira CR, eds. Boston, MA: Springer US 2007: 363-74.
- Stafstrom CE. Epilepsy: A Review of Selected Clinical Syndromes and Advances in Basic Science. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2006; 26: 983-1004.
- Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5
- Staley K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nature Neuroscience* 2015; 18: 367-72.
- Stark AK, Pelvig DP, Jørgensen A-MB, Andersen BB, Pakkenberg B. Measuring morphological and cellular changes in Alzheimer's dementia: a review emphasizing stereology. *Current Alzheimer research* 2005; 2 4: 449-81.
- Stefan H, Schmitt FC. Epilepsie als Netzwerkerkrankung. In: *Epileptische Anfälle und Epilepsien im Erwachsenenalter: Diagnostik und Therapie*. Schmitt FC, Stefan H, Holtkamp M, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2020: 21-7.
- Su T-P, Su T-C, Nakamura Y, Tsai S-Y. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends in Pharmacological Sciences* 2016a; 37: 262-78.
- Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 557-66.
- Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol Sci* 2016b; 37: 262-78.
- Sutula TP. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res* 2004; 60: 161-71.
- Swijssen A, Nelissen K, Janssen D, Rigo JM, Hoogland G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures. *BMC Res Notes* 2012; 5: 685.
- Szabo A, Kovacs A, Frecska E, Rajnavolgyi E. Psychedelic N,N-dimethyltryptamine and 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine modulate innate and adaptive inflammatory responses through the sigma-1 receptor of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One* 2014; 9: e106533.
- Tang F, Hartz AMS, Bauer B. Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Front Neurol* 2017; 8: 301.
- Theodore WH, Fisher R. Brain stimulation for epilepsy. In: *Operative Neuromodulation: Volume 2: Neural Networks Surgery*. Sakas DE, Simpson BA, eds. Vienna: Springer Vienna 2007: 261-72.

- Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 520-43.
- Tsai S-YA, Pokrass MJ, Klauer NR, De Credico NE, Su T-P. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2014; 18: 1461-76.
- Twele F, Töller K, Brandt C, Löscher W. Significant effects of sex, strain, and anesthesia in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2016a; 55: 47-56.
- Twele F, Töller K, Bankstahl M, Löscher W. The effects of carbamazepine in the intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy depend on seizure definition and mouse strain. *Epilepsia Open* 2016b; 1: 45-60.
- van Vliet EA, Aronica E, Vezzani A, Ravizza T. Review: Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2018; 44: 91-111.
- Vavers E, Svalbe B, Lauberte L, Stonans I, Misane I, Dambrova M, Zvejniece L. The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models in vivo. *Behav Brain Res* 2017; 328: 13-8.
- Vavers E, Zvejniece L, Maurice T, Dambrova M. Allosteric Modulators of Sigma-1 Receptor: A Review. *Front Pharmacol* 2019; 10: 223.
- Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Sigma-1 receptor and seizures. *Pharmacological Research* 2023; 191: 106771.
- Venceslas D, Corinne R. A Mesiotemporal Lobe Epilepsy Mouse Model. *Neurochem Res* 2017; 42: 1919-25.
- Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci* 1999; 19: 5054-65.
- Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 459-72.
- Vismer MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K, Koubeissi MZ. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front Neural Circuits* 2015; 9: 27.
- Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 227-32.
- von Rüden E-L, Potschka H, Tipold A, Stein VM. The role of neuroinflammation in canine epilepsy. *The Veterinary Journal* 2023; 298-299: 106014.
- von Rüden EL, Jafari M, Bogdanovic RM, Wotjak CT, Potschka H. Analysis in conditional cannabinoid 1 receptor-knockout mice reveals neuronal subpopulation-specific effects on epileptogenesis in the kindling paradigm. *Neurobiol Dis* 2015; 73: 334-47.
- von Rüden EL, Wolf F, Gualtieri F, Keck M, Hunt CR, Pandita TK, Potschka H. Genetic and Pharmacological Targeting of Heat Shock Protein 70 in the Mouse Amygdala-Kindling Model. *ACS Chem Neurosci* 2019; 10: 1434-44.
- Wang X, Hu Z, Zhong K. The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Epileptogenesis: an Update. *Front Pharmacol* 2021; 12: 758232.
- Wang X, Wu S, Zuo J, Li K, Chen Y, Fan Z, Wu Z, Yang J-X, Song W, Cao J-L, Cui M. Selective activation of SIGMAR1 in anterior cingulate cortex glutamatergic neurons facilitates comorbid pain in depression in male mice. *Communications Biology* 2025; 8: 150.

- Wang Y-M, Xia C-Y, Jia H-M, He J, Lian W-W, Yan Y, Wang W-P, Zhang W-K, Xu J-K. Sigma-1 receptor: A potential target for the development of antidepressants. *Neurochemistry International* 2022; 159: 105390.
- Wartmann H, Effenberger T, Klähn H, Volmer T, Surges R. Inzidenz des plötzlichen Epilepsietodes (SUDEP): Update und Limitationen. *Der Nervenarzt* 2024; 95: 544-52.
- Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, Nomura H, Komine O, Endo F, Jin S, Mancias P, Kiyama H, Yamanaka K. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO Molecular Medicine* 2016; 8: 1421-37.
- Weis S, Sonnberger M, Dunzinger A, Voglmayr E, Aichholzer M, Kleiser R, Strasser P. Epilepsies: Temporal Lobe Epilepsy. In: *Imaging Brain Diseases: A Neuroradiology, Nuclear Medicine, Neurosurgery, Neuropathology and Molecular Biology-based Approach*. Weis S, Sonnberger M, Dunzinger A, Voglmayr E, Aichholzer M, Kleiser R, Strasser P, eds. Vienna: Springer Vienna 2019: 1143-56.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.
- Williams SM, Haines JL, Moore JH. The use of animal models in the study of complex disease: all else is never equal or why do so many human studies fail to replicate animal findings? *Bioessays* 2004; 26: 170-9.
- Yang H, Shen H, Li J, Guo LW. SIGMAR1/Sigma-1 receptor ablation impairs autophagosome clearance. *Autophagy* 2019; 15: 1539-57.
- Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara H. Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. *Scientific Reports* 2017; 7: 4325.
- Zattoni M, Mura ML, Deprez F, Schwendener RA, Engelhardt B, Frei K, Fritschy JM. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2011; 31: 4037-50.
- Zhang X, Wu F, Jiao Y, Tang T, Yang L, Lu C, Zhang Y, Zhang Y, Bai Y, Chao J, Teng G, Yao H. An Increase of Sigma-1 Receptor in the Penumbra Neuron after Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2017; 26: 1981-7.
- Zhao J, Mysona BA, Wang J, Gonsalvez GB, Smith SB, Bollinger KE. Sigma 1 receptor regulates ERK activation and promotes survival of optic nerve head astrocytes. *PLoS One* 2017; 12: e0184421.
- Zhao J, Veeranan-Karmegam R, Baker FC, Mysona BA, Bagchi P, Liu Y, Smith SB, Gonsalvez GB, Bollinger KE. Defining the ligand-dependent proximate of the sigma 1 receptor. *Front Cell Dev Biol* 2023; 11: 1045759.

X ANHANG

1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: ILAE-Klassifikation der Epilepsie.</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2: Schematische und vereinfachte Darstellung der synaptischen Erregungsübertragung im physiologischen vs. pathologischen, epileptischen Zustand in einem exzitatorischen (A) und inhibitorischen (B) Neuron. Erstellt mit Biorender.</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung zentraler Wirkmechanismen gängiger Wirkstoffe, die für die Behandlung der TLE eingesetzt werden.</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 4: Subzelluläre Lokalisation von Sigma-1.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 5: In-vivo-Studiendesign für das Amygdala-Kindling-Modell (A) und das intrahippocampale Kainat-Modell (B). Erstellt mit Biorender.</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 6: Darstellung der Ausschlussrate von Versuchstieren im zeitlichen Verlauf des Amygdala-Kindling-Modells.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 7: Grafische Übersicht über die im Verlauf des intrahippocampalen-Kainat-Modells erfolgte Exklusion</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 8: Lokalisation der Bohrlöcher (A) und des Elektrodenkanals mit Sitz der Elektroden spitze in der Amygdala (B).</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 9: Anfalls-assoziiertes EEG im Amygdala-Kindling-Modell.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 10: Position der Bohrlöcher (A) und des Elektrodenkanals mit tiefstem Punkt der Elektrode in der CA1-Region des Hippocampus (B).</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 11: Stereologische Zellzählung.</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 12: Visualisierung der spezifischen Sigma-1-Antigen-Antikörper-Reaktion des Sigma-1-Antikörpers HPA018002.</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 13: Sigma-1- und Kern-Immunfluoreszenz-Detektion in verschiedenen Gehirnarealen von Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Gehirnen.</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 14: Spezifität der getesteten Sigma-1-Antikörper im Western Blot.</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 15: Expressionsmuster der Sigma-1-Expression.</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 16: Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche der Sigma-1-Expression in vollgekindelten Tieren und Tieren mit Scheinstimulation.</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 17: Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche der Sigma-1-Expression im intrahippocampalen Kainat-Modell.</i>	<i>99</i>

<i>Abbildung 18: Anzahl der Sigma-1 positiven Zellen und Volumen der Subregionen des Hippocampus (CA1, CA3 und Hilus) und im entorhinalen Cortex.</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Detektion von Sigma-1 mit den zelltypspezifischen Markern GFAP, Iba1 und NeuN, in Kombination mit GAD67 und vGlut1, in der CA1 und CA3-Region und Hilus des Hippocampus sowie im entorhinalen Cortex.</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 20: Relative Quantifizierung des mRNA-Gehalts in den hippocampalen Subregionen CA1, CA3 und Hilus des Gyrus dentatus und im entorhinalen Cortex.</i>	<i>107</i>

2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Stadien zur Einteilung der Anfallsschwere und der Anfallsmerkmale im Kindling-Modell.</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 2: Darstellung der unterschiedlichen Anfallsmuster im EEG.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 3: Auflistung der getesteten primären Sigma-1-Antikörper und sekundären Antikörper.</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 4: Auflistung der für den Western Blot verwendeten primären Sigma-1 und sekundäre Antikörper.</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 5: Auflistung der mittels ImageJ analysierten Gehirnnareale zur Bestimmung der optischen Dichte und markierten Fläche der Sigma-1-Expression.</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 6: Ablauf der Arbeitsschritte für die Analyse der optischen Dichte und der markierten Fläche mittels ImageJ.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 7: Auflistung der mittels ImageJ analysierten Gehirnnareale zur Bestimmung der optischen Dichte und markierten Fläche der NeuN-Expression.</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 8: Stereologische Stichprobenparameter.</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 9: Auflistung der Gehirnnareale, in denen eine stereologische Zellzählung durchgeführt wurde.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 10: Berechnung der Präzision der stereologischen Zellzählung.</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 11: Auflistung der für die Immunfluoreszenz-Detektion verwendeten primären und sekundären Antikörper.</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 12: Schnittprotokoll für das Anfertigen der coronaren Gehirnschnitte... </i>	<i>80</i>
<i>Tabelle 13: Schnittprotokoll für die Laser-Mikrodissektion.</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 14: Ziel-mRNA-Konzentration der einzelnen Areale pro Zeitpunkt, die für</i>	

<i>die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.</i>	84
<i>Tabelle 15: Reaktionsbedingungen eines Zyklus der qPCR.</i>	85
<i>Tabelle 16: Muster und Intensität der getesteten Sigma-1 Antikörper.</i>	89
<i>Tabelle 17: Ergebnisse der Überprüfung der mRNA-Integrität.</i>	105
<i>Tabelle 18: Übersicht Geräte.</i>	157
<i>Tabelle 19: Übersicht Software.</i>	158
<i>Tabelle 20: Übersicht Antikörper.</i>	164
<i>Tabelle 21: Übersicht kommerzielle Kits, Puffer, Reagenzien und Sonden.</i>	166
<i>Tabelle 22: Übersicht Medikamente.</i>	167
<i>Tabelle 23: Übersicht Chemikalien.</i>	169

3 Geräte

Geräte	Hersteller
Amplifikator und Analog-Digital-Wandler	BioAmp und PowerLab 4/30, ADInstruments LTD., Hastings, UK
Analysenwaage acculab ATILON	Acculab Corporation, New York, USA
Analysenwaage CPA124 5-0CE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Confocal laser scanning microscope Zeiss LSM880	Zeiss LSM 880 with Airyscan, RRID:SCR_015963, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany
Dentalbohrer	Fischer Goldschmiedebedarf, Pforzheim, Deutschland
Dewar-Gefäß	KGW Isotherm GmbH, Meckenheim, Deutschland
DSI Reciever + Matrix	Data Sciences International, St. Paul, USA
Elisa-Reader	Biotek Instruments, Winooski, VT, USA
Fusion SL	Vilber, Collégien, Frankreich
Gekühlte Tisch-Mikrozentrifuge 5418 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Stimulationseinheit	HSE Type 215 E12 SV1, Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Narkosegerät (Isofluran vet. Med Vapor)	Dräger, Lübeck, Deutschland
Keyence BZ X-710 fluorescent microscope	BZ X-710 fluorescent microscope, RRID:SCR_017202, Keyence, Japan
Kinematica Homogenizer PT 10-35	Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Kryosat CM3050 S	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Laser-Mikrodissektionsmikroskop, DM6000	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop, Zeiss LSM 880	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Leica DMLB bright field microscope	CM3050 S, Leica Microsystems GmbH, Germany
Makrolon-Typ-II und Typ-III-Käfige und Trinkflaschen	Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Matrix	MX 2.0, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA
Mikroinjektionskanüle, 0,5 µl	SGE Analytical Science, über VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland
Mikrozentrifuge MIKRO 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Motorised stage	MBF Bioscience, Williston, USA
Perfusionspumpe	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
pH-meter	Hanna instruments, Croatia
QuantStudio™ 3 & 5 Real Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quant Studio Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qubit® 4 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Receiverplatten	RPC-1, Data Sciences International, St. Paul, USA
Schüttler Stuart SI 50 Orbital Shaking Incubator	Stuart Scientific Co. Ltd, Nottingham, Großbritannien
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Switch	Cisco Small Business Switch, Data Science International, St. Paul, MN, USA
Telemetriesender	ETA F10, Data Sciences International, St. Paul, USA
Thermal Cycler, SimpliAmp™ Thermal Cycler	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tiefenstimulationselektrode	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-

	Maximilians-Universität München
Tischwaage FCB 3KO.1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
(Video-)Kameras	GoPro Hero 9, GoPro, San Mateo, USA; Axis M1065-L Netzwerk Kamera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Vortexer RapidVap	LABCONCO, Kansas City, MO, USA
Zentrifuge Eppendorf 5418	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 18: Übersicht Geräte.

4 Software

Software	Hersteller
BioRender	BioRender AG, Toronto, Ontario, Kanada. Akademische Lizenz von Dr. Eva-Lotta von Rüden
BZ Analyzer	BZ Analyzer software, RRID:SCR_017205, Keyence, Japan
DeepL	DeepL SE, Köln, Deutschland
EDFbrowser, Version 1.95	van Beelen, Teunis, Delft, Niederlande
EndNote TM 21	EndNote, Clarivate Analytics, USA
G*Power 3.1.9.2	Universität Düsseldorf
Gen5	HP Inc., Palo Alto, CA, USA; BioTek Instruments, Winooski, USA
GraphPad Prism, Version 10.0.2.	GraphPad Software, Boston, MA, USA; RRID:SCR_002798
ImageJ, Version 1.53t	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
LabChart Software	ADInstruments LTD., Hastings, UK
MbF Stereo Investigator	MBF Bioscience, Williston, USA
NeuroScore TM Software v.3.3.1	Data Sciences International, St. Paul, USA
Ponemah® Software 5.20	Data Sciences International, St. Paul, USA
QuantStudio Design & Analysis v1.5.2.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

R Version 4.1.1	R Core Team, 2021, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
Zen Blue and black	Version 2.3, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Tabelle 19: Übersicht Software.

Für die Literaturrecherche wurde teilweise ergänzend die kostenlose Basisversion von Elicit (Elicit Research PBC, Covina, USA) und Scispace (Scispace Inc., Bengaluru, Indien) verwendet. Außerdem wurden für die Umformulierung einzelner Sätze Copilot (Microsoft Corporation, Redmond, USA) oder ChatGPT Version 3.5 (OpenAI, San Francisco, USA) verwendet.

5 Lösungen

Blocklösung

- 1 ml Fischgelatine (10×)
- 10 ml TBS
- 50 µl Triton X-100 (0,5 %)

Elektrophoresepuffer

- 1,51 g Tris-Base
- 7,5 g Glycin
- 0,5 g SDS
- 1 l doppelt destilliertes Wasser

Kälteschutzlösung

- 30 ml Ethylenglykol
- 30 ml Glycerin (98 %)
- 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
- 10 ml doppelt destilliertes Wasser

Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0)

- 2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- 900 ml doppelt destilliertes Wasser
- Mit HCl auf pH 6 einstellen und auf Endvolumen von 1 l mit doppelt destilliertem Wasser auffüllen

PBS-Puffer 10x

- 80 g NaCl
- 2 g KCl

- 14,4 g Na_2HPO_4
- 2,72 g KH_2PO_4
- 1000 ml bidestilliertes und mit H_3PO_4 auf pH 7,4 einstellen

PBS 1x: 100 ml PBS 10× mit 900 ml doppelt destilliertem Wasser verdünnen.

Anschließend den pH-Wert auf 7,4 einstellen

PBST: 0,1 % Tween 20 zu TBS 1× geben

Proben-Puffer

- 4 ml 10 % SDS
- 2 ml Glycerol
- 1,2 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 1,8 ml doppelt destilliertes Wasser
- 1 ml β -Mercaptoethanol

TBS 10x (pH 7,4)

- 175,3 g NaCl (1,5 M)
- 121,14 g Tris (0,5 M)
- 1800 ml doppelt destilliertes Wasser
- 60 ml 32% HCL
- Mit doppelt destilliertem Wasser auf 2 l auffüllen

TBS 1 x: 100 ml TBS 10× mit 900 ml doppelt destilliertem Wasser verdünnen.

Anschließend den pH-Wert auf 7,4 einstellen

TBST: 0,1% Tween20 zu TBS 1x geben

Transferpuffer

- 5,81 g Tris-Base
- 2,92 g Glycin
- 3,74 ml 10 % SDS
- 1 l doppelt destilliertes Wasser

Trenngel (10 %)

- 1,5 ml doppelt destilliertes Wasser
- 3,3 ml 30 % Polyacrylamid
- 5 ml 2x Trennpuffer
- 0,1 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,01 TEMED

Trennpuffer (pH ist 8,8)

- 90,8 g Tris-Base
- 2,0 g SDS

- Wenige Tropfen 32 % HCl
- 800 ml doppelt destilliertes Wasser

Tris-HCl (pH 7,4 – 7,5)

- 121,1 g Tris-Base
- 800 ml doppelt destilliertes Wasser
- 60 mL 32 % HCl

Triton x100 0,3 %

- 10 ml TBS
- 30 µl Triton x100

Paraformaldehyd (4%ig)

- 8%ig Paraformaldehyd (200 ml)
- mit 0,2 M Phosphatpuffer (200 ml) verdünnen

RIPA-Puffer

- 900 µL doppelt destilliertes Wasser
- 50 µL 1 M tris-HCl, pH 7.4 – 7.5
- 30 µL 5 M NaCl
- 10 µL 10 % SDS
- 10 µL Triton X-100
- 5 ml Protease Inhibitor

Saccharin-Lösung (0,2%ig)

- 0,2 g Saccharin $\geq$ 98%
- 100 ml Wasser

Stapelgel (4 %)

- 1,4 ml destilliertes Wasser
- 0,5 ml 30 % Polyacrylamid
- 2 ml 2x Stapelpuffer
- 0,04 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,004 ml TEMED

Stapelpuffer (pH 6,8)

- 30,35 g Tris-Base
- 2,0 g SDS
- Wenige Tropfen 32 % HCl
- 800 ml doppelt destilliertes Wasser

Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (30%ig)

- 6 g Haushaltszucker
- ad 20 ml 0,1 mol Phosphatpuffer

5 M NaCl

- 145 g NaCl
- 500 ml doppelt destilliertes Wasser

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung, pH 7,4)

- 45,43 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei)
- 12,48 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- in Aqua bidest. lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

- 0,4 M Phosphatpuffer (1l) mit deionisiertem H_2O (1l) verdünnen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9-prozentige Kochsalzlösung (pH 7,6)

- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl zugeben
- mit deionisiertem Wasser. auf 2000 ml auffüllen

10 % Ammoniumpersulfat

- 1 g Ammoniumpersulfat
- 10 ml doppelt destilliertes Wasser

10% Natriumdodecyl Sulfat (SDS)

- 20 g SDS
- 200 ml doppelt destilliertes Wasser

0,1 % SDS

- 2,5 ml 10% SDS
- 247,5 ml doppelt destilliertes Wasser

6 Antikörper

Antikörper, LOT-Nummer	Hersteller
ABC-Kit, P-400	Vector Laboratories, Burlingame, USA
A-11008, 2521157	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
A-11036, 2447870	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
A-11058, 2641989	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
A-21123, 2438513	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
A-31553, 2491371	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
ab253192, GR3272871-7, GR3341811-8, monoklonal	Abcam plc, Cambridge, UK
ab5076, GR273528-2, polyklonal	Abcam plc, Cambridge, UK
ab53852, GR3366732-1, GR3341811-3, polyklonal	Abcam plc, Cambridge, UK
ab53554, 1071213-1, polyklonal	Abcam plc, Cambridge, UK
ab97080, GR3342713-2	Abcam plc, Cambridge, UK
BA-1000, ZF0430	Vector Laboratories, Burlingame, USA
BA-9200, ZG1216	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bs-5111R, WC3226257,	Bioss Antibodies Inc., Woburn, USA

YA3800263B, polyklonal	
GTX115389, 44343, polyklonal	GeneTex, Inc., Irvine, USA
HPA018002, 14183, polyklonal	Atlas Antibodies AB, Bromma, Sweden
HPA024071, 14093, polyklonal	Atlas Antibodies AB, Bromma, Sweden
MA5-16308, XG349243, monoklonal	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MAB377, 3468221, monoklonal	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
MABN390, 3482788, monoklonal	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
N727, N728, N6229	AG Ammer, hauseigene Herstellung
PA5-21397, Y1404640, polyklonal	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Waltham, USA
SAB700566, RI31714	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
sc-137075, J3119, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
112-035-062, 156325	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA / Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Germany
112-035-167, 156218	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA / Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Germany
61994S, 1, monoklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
711-165-152, 131748	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West

	Grove, USA / dianova GmbH, Hamburg, Germany
75-066, 472-1JU-13	NeuroMab, University of California Davis, Davis, USA

Tabelle 20: Übersicht Antikörper.

7 Kommerzielle Kits, Puffer, Reagenzien und Sonden

Kommerzielle Kits, Puffer, Reagenzien und Sonden	Hersteller
BCA-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blockpuffer UltraCruz®	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
DAB-Puffer-Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entellan® Rapid Mounting Medium for Microscopy	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst-Lösung, BisBenzimid H 33342	Invitrogen, Waltham, USA
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Lot#3044674, #2807287
NONO, Mm01234361_g1, LOT# P241030-002 TaqMan™ Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polyacrylamid, ROTIPHORESE® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyvinylidenfluorid- Membran	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Ponceau S-Färbelösung	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	
Proteaseinhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Qubit® RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
RNAqueous™-Micro Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Lot#26246684, #01336178, #2840861, 2864980	
RNase-Zap™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
ROTI®Block	Th. Geyer, Renningen, Deutschland	
Roti Mark Tricolor	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
ROTI®Mount FluorCare	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
RPL13A, Mm05910660_g1, LOT# P241030-002 TaqMan™Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Sigma-1, Mm00448086_m1, TaqMan™Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
	Target	Gen Sigmar1 (sigma non-opioid intracellular receptor 1)
	Spezies	Maus
	Katalog-/Lot-Nr.	Cat# 4351370 75; Lot# P250516-000 H10
	Design-Info	_m1-Assay (Probe über Exon-Exon-Junktion, keine gDNA-Amplifikation)
	Ampliconlänge	~72 bp
	Zielregion & Transkripte	erkannt werden u. a. RefSeq-Transkripte NM_001286541.1

		(Junktion Exon 2–3), NM_001286551.1 (Exon 3–4), NM_011014.3 (Exon 3–4).
Stripping-Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (2X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Lot#3007145, #3047298	
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland	
β-Actin FAM-Sonde, Mm02619580_g1, TaqMan™ Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	

Tabelle 21: Übersicht kommerzielle Kits, Puffer, Reagenzien und Sonden

8 Medikamente

Medikamente	Hersteller
Aqua iniectionabilia	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Bupivacain 0,5 % JENAPHARM®, Injektionslösung	Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1:200 000) JENAPHARM®, Injektionslösung	Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Buprenorphin 0,05 mg/kg, s.c., Buprenovet® Multidose, 0,3 mg/ml, Injektionslösung	Elanco Animal Health, Indiana, USA
Chloralhydrat	Chloralhydrat, Emprove essential Ph. Eur., Merck KGaA, von VWR, International GmbH, Ismaning, Deutschland
Isofluran CP® (Isofluran 1	VP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf,

ml/ml)	Deutschland
Kaliumchrom(III)-sulfat-Dodecahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Metamizol (Vetalgin®)	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland
Metacam 0,5 % Injektionslösung	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung, isoton	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Octenisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Pentobarbital (Narkodorm®), 182,3 mg/ml, Injektionslösung	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Ringer-Laktat- Infusionslösung	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland

Tabelle 22: Übersicht Medikamente.

9 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (≥ 99.8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol für Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Besamungsstation München/Grub, Deutschland
Gefriermedium (Tissue-Tek® O.C.T Compound)	Sakura Fintec Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande

Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kainsäure, Kainsäure-Monohydrat®, K0250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol (100%ig)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Saccharin >98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 32 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thymol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Zahnzement (Paladur®)	Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG,

	Renningen, Deutschland
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Deutschland

Tabelle 23: Übersicht Chemikalien.

XI DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Priv.-Doz. Dr. Eva-Lotta von Rüden, Ph.D., für ihre herausragende wissenschaftliche Begleitung, ihr Vertrauen und ihre zahlreichen wertvollen Impulse. Ihre umfassende fachliche Expertise, ihre konstruktive Kritik, ihre stetige Erreichbarkeit und ihre motivierende Art haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus hat sie mich nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht, sondern auch auf persönlicher Ebene intensiv gefördert und meine Entwicklung in zentralen Bereichen wie kritischem Denken, Eigenverantwortung und wissenschaftlicher Selbstständigkeit nachhaltig geprägt. Ich freue mich sehr auf die weitere gemeinsame Zusammenarbeit und darauf, auch künftig von ihrem Erfahrungsschatz und ihrer inspirierenden Art profitieren zu dürfen.

Ebenso möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka, der Leiterin des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, meinen herzlichen Dank aussprechen. Sie hat mir die Möglichkeit gegeben, in einem inspirierenden Forschungsumfeld zu arbeiten, und mich durch ihre fachliche Beratung, den intensiven wissenschaftlichen Austausch sowie vielfältige Fortbildungsangebote maßgeblich unterstützt. Die Förderung meiner Weiterbildung zur Fachtierärztin für Pharmakologie und Toxikologie sowie die Teilnahme an Kongressen und Workshops haben mir wertvolle Einblicke eröffnet und mich entscheidend bestärkt, in diesem Forschungsfeld Fuß zu fassen. Besonders dankbar bin ich ihr für das Vertrauen, meine wissenschaftliche Tätigkeit am Institut fortsetzen zu dürfen – eine wertvolle Basis und zugleich große Motivation für zukünftige gemeinsame Projekte.

Ein herzliches Dankeschön richte ich an meine Kolleginnen und Kollegen – insbesondere Anna Munk, Amelie Wagner, Daniel Perez-Perez, Miriam Maihöfner und Sarah Glisic – für ihre fachliche Unterstützung, die stets verlässliche Zusammenarbeit und ihre tatkräftige Hilfe. Vor allem aber danke ich euch für eure Freundschaft, eure Motivation, euren Humor sowie für die zahlreichen Feierabendaktivitäten, die diese Zeit zu etwas ganz Besonderem gemacht haben.

Mein Dank gilt ebenso meinen engagierten Praktikantinnen und Praktikanten Christian Lad, Alexander Markov und Yulia Golovkina, die mich tatkräftig unterstützt und mir gezeigt haben, wie bereichernd die Betreuung junger

Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler sein kann. Ebenso bedanke ich mich bei Cristina Monio Baca, Lisa Cieslik, Maaïke Wagner, Ignacio Gamboa Hidalgo, Claudia Siegl, Leon Fischer, Isabella Waclawczyk und Andreas Kutschka für ihre wertvolle technische Assistenz im Labor sowie in der Hauswerkstatt. Ein besonderer Dank gilt außerdem Sabine Vican, Uwe Roßberg und Isabel Fodor für die liebevolle und zuverlässige Versorgung meiner Versuchstiere. Darüber hinaus danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) herzlich für die finanzielle Förderung des Sigma-1-Projekts (DFG PO 681/12-1).

Mein besonderer Dank gilt meinem Papa Thomas und meinem Bruder Maximilian für das Korrekturlesen dieser Arbeit und unsere vielen wissenschaftlichen Diskussionen am Esstisch. Papa, danke, dass du mich immer dazu ermutigt hast, Tiermedizin zu studieren, meinen Weg zu jedem Zeitpunkt bedingungslos unterstützt und mir ermöglicht hast, während der Arbeit an dieser Dissertation wieder zu Hause bei dir zu sein. Danke für deine Fürsorge und dafür, dass du mir in dieser Zeit auf so viele Arten zur Seite gestanden hast – mit einer warmen Mahlzeit, einem offenen Ohr oder einem humorvollen Ratschlag. Und danke auch für deine schwäbische Lebensweisheit „älles wissa isch bessr als alles hann“, die mich sehr geprägt hat. Maxi, danke für dein jederzeit verfügbares Informatiker-Wissen und deine geduldige Unterstützung bei der Optimierung der ImageJ-Analyse. Danke auch, dass du dich selbst spätabends sofort auf den Weg machst, wenn ich emotionalen Beistand brauche. Meine liebe Mama – danke, dass du mir eine so wundervolle Mama warst. Ich wünschte, du wärst hier, damit ich dich stolz machen kann. Ich hoffe, es geht dir gut, da, wo du jetzt bist. Danke, dass du mir immer Liebe, Geborgenheit und Vertrauen geschenkt hast und dass ich in allem, was ich tue, dich und deine Unterstützung spüre.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freundinnen und Freunden, insbesondere Julia Dieterich, Anne Hönl und Jana Pöhmerer, die mich schon während des Studiums und auch in dieser intensiven Zeit begleitet haben. Ihr gebt mir unglaublich viel Rückenwind.