

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Zaměření: Neurobiologie



Bc. Jana Populová

Úloha parvalbuminových interneuronů v průběhu iniciace, propagace a terminace
epileptického záchvatu v myším modelu fokální kortikální dysplázie typu II
The role of parvalbumin interneurons in seizure initiation, propagation and termination in a
mouse model of focal cortical dysplasia of type II

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Monika Řehořová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25. 4. 2023

Bc. Jana Populová

.....

Poděkování

Mé největší díky patří školitelce Mgr. Monice Řehořové Ph.D. za vše, co mě s obrovskou trpělivostí za dobu mého studia naučila. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ondřeji Novákovi Ph.D., Ing. Minh Thao Nguyen a Ing. Janu Kudláčkovi, DiS., Ph.D. za vytvoření skriptů potřebných pro zpracování mých výsledků, jejich pomoc při vyhodnocování a cenné rady. Nelze vynechat ani všechny ostatní kolegy, kteří zodpověděli mé četné dotazy a pomohli se zvládnutím všech metod. Mé poslední poděkování patří mojí mámě Mgr. Janě Populové za podporu během studia a psaní této práce.

Abstrakt

Fokální kortikální dysplázie je strukturní a funkční malformací kortikálního vývoje vznikající mutacemi v mTOR signální kaskádě vedoucí k rozvoji farmakorezistentní epilepsie. Parvalbuminové interneurony tvoří největší inhibiční sílu v mozku podílející se na blokování rozvoje epileptických záchvatů a je možné, že dochází ke změně v jejich funkci související právě s fokální kortikální dysplázií. Tato práce se zabývala vytvořením myšího modelu fokální kortikální dysplázie typu II s označenými parvalbuminovými interneurony. Model byl vytvořen pomocí *in utero* elektroporace plazmidu s mutovaným mTOR genem. Následně bylo implantováno kraniální okno v oblasti vytvořené léze zároveň s injikací kalciového indikátoru pro sledování aktivity neuronů pomocí dvoufotonového mikroskopu. Naše výsledky potvrzují shodu zde vytvořeného modelu s dosavadní literaturou na základě morfologických znaků a přítomnosti spontánních záchvatů. Byly zaznamenány statisticky signifikantní rozdíly ve velikosti pyramidových neuronů v lézi a mimo lézi, zatímco u parvalbuminových interneuronů nebyly v závislosti na umístění objeveny signifikantní změny. Rozdíly v počtu pyramidových neuronů a parvalbuminových interneuronů ukázaly trend snížení počtu v lézi, avšak nebyly statisticky signifikantní. Data z epileptických záchvatů indukovaných pomocí pentylentetrazolu ukazují pomalejší pokles fluorescence kalciového signálu u parvalbuminových interneuronů naznačující přechod do stavu depolarizačního bloku. Tento výsledek se ukázal jako statisticky signifikantní. Další výsledky zahrnují mírnou aktivaci parvalbuminových interneuronů před začátkem záchvatu, výskyt vlny šířící se depolarizace a aktivaci některých neuronů před postupující depolarizační vlnou. Tato data byla ovšem z důvodu malého počtu pozorování pouze diskutována a nebyla statisticky vyhodnocována.

Klíčová slova: fokální kortikální dysplázie, parvalbuminové interneurony, mTOR signální kaskáda, epilepsie, calcium imaging

Abstract

Focal cortical dysplasia is a structural and functional malformation of cortical development caused by mutations in mTOR signalling cascade that can result in pharmaco-resistant epilepsy. Parvalbumin interneurons are probably the most important inhibition force in the brain that can help to stop epileptic seizures and it is possible that there are changes in function of these interneurons that are dependent on focal cortical dysplasia. This thesis had the aim to create a murine model of focal cortical dysplasia type II with labeled parvalbumin interneurons. This model was created by injecting plasmid with mutated mTOR gene during *in utero* electroporation. Cranial window implantation was then performed over created lesion together with calcium indicator injection for measuring neuronal activity under two-photon microscope. Our results confirm the same morphological characteristics as other studies has shown and also occurrence of spontaneous seizures. We have shown statistically significant differences in size of pyramidal neurons depending on lesional or non-lesional position. For parvalbumin interneurons there was no such difference. Counting these two types of neurons in lesion and outside of lesion shown a trend towards reduced numbers in lesion, however it was not significant. Data from pentylentetrazol-induced seizures show slower decay of calcium signal fluorescence in parvalbumin interneurons compared to pyramidal neurons suggesting depolarization block of these interneurons. This was proven as statistically significant. Other results show moderate activation of parvalbumin interneurons before the onset of seizures, spreading depolarization after seizure termination and activation of some neurons in front of the spreading wave. These results were just discussed as there was not enough of data to statistically evaluate any of them.

Keywords: focal cortical dysplasia, parvalbumin interneurons, mTOR signalling cascade, epilepsy, calcium imaging

Seznam použitých zkratek

4-AP	4-amonipyridin, chemokonvulzant
4E-BP(1)	Translační inhibitor
A1	Adenosinový receptor spřažený s G-proteinem
ad libitum	Dle libosti
AK	Adenosin kináza
Akt/PKB	Protein kináza B, serin-threoninová kináza
AKT3	Isoforma protein-kinázy B, regulátor mTOR signální dráhy
AMPA	Aminopropionová kyselina, agonista glutamátových AMPA receptorů
AMPK	AMP aktivovaná protein kináza
ATP	Adenosintrifosfát
CACNA1a	α podjednotka Cav2.1 kanálů
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
Cav2.1	Typ napětově řízených vápenatých kanálů
c-fos	Protoonkogen, marker časné aktivity neuronů
CRISPR/CAS9	Nástroj pro editaci genomu
DEPDC5	Protein tvořící komplex GATOR1
EEG	Elektroencefalogram
eIF4E	Eukaryotický iniciační translační faktor
FCD	Fokální kortikální dysplázie
FCDI	Fokální kortikální dysplázie typu I
FCDII	Fokální kortikální dysplázie typu II
FCDIIa	Fokální kortikální dysplázie typu IIa
FCDIIb	Fokální kortikální dysplázie typu IIb
FCDIII	Fokální kortikální dysplázie typu III
FOV	Field of view, pozorované pole
GABA	Kyselina γ -aminomáselná, inhibiční neurotransmiter v mozku
GABA _A	Receptor pro GABA spřažený s iontovým chloridovým kanálem
GATOR1	Komplex regulující mTOR signální kaskádu
GFP	Zelený fluorescenční protein
GluA1	Podjednotka AMPA receptorů
GluA2	Podjednotka AMPA receptorů
GluA3	Podjednotka AMPA receptorů
GluA4	Podjednotka AMPA receptorů
HME	Hemimegaencefalie
i.c.v.	Intracerebroventrikulární podání
i.p.	Intraperitoneální podání
i.v.	Intravenózní podání
IPSP	Inhibiční postsynaptický potenciál
iRFP	Infračervený fluorescenční protein
jGCamp8	Kalciový indikátor
KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ symportér
Kv1.1	Podjednotka napětově řízených draselných kanálů
Kv3.1	Podjednotka napětově řízených draselných kanálů

K _v 3.2	Podjednotka napětově řízených draselných kanálů
LKB1	Protein tvořící komplex STRADa
MO25	Protein tvořící komplex STRADa
mTOR	Mammalian target of rapamycin, součást mTORC1 a mTORC2
mTORC1	Regulační komplex mTOR signální kaskády 1
mTORC2	Regulační komplex mTOR signální kaskády 2
Nav1.1	Podjednotka napětově řízených sodných kanálů
Nav1.6	Podjednotka napětově řízených sodných kanálů
NDRG1	Marker hyperaktivace mTORC2
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ kotransportér
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina, agonista glutamátových NMDA receptorů
NPRL2	Protein tvořící komplex GATOR1
NPRL3	Protein tvořící komplex GATOR1
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PIK3CA	Katalytická podjednotka PI3K
PKC	Proteinkináza C
pS6	Fosforylovaný protein S6, marker hyperaktivace mTORC1
PTEN	Tumor supresorový gen
PTZ	Pentylentetrazol, chemokonvulzant
PV+	Parvalbumin-pozitivní
RHEB	GTP-vazebný protein
ROI	Region of interest, oblast zájmu
s.c.	Subkutánní podání
SCN1a	α podjednotka napětově řízených sodných kanálů
SGK1	Sérum a glukokortikoidy regulovaná kináza 1
SOM+	Somatostatin-pozitivní
STRAD	Protein tvořící komplex STRADα
STRADα	Komplex regulující mTOR signální kaskádu
SUDEP	Sudden unexpected death in epilepsy, náhlá neočekávaná smrt v epilepsii
TBC1D7	Protein tvořící komplex TSC
tdTomato	Červený fluorescenční protein
TOS	Konzervovaný motiv pro vazbu mTORC1
TSC	Komplex tuberózní sklerózy
TSC1	Protein tvořící komplex TSC, tuberin
TSC2	Protein tvořící komplex TSC, hamartin
VEGFA	Vaskulární endoteliální růstový faktor A
VEGFB	Vaskulární endoteliální růstový faktor B
VIP+	Vasointestinální peptid-pozitivní

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Fokální kortikální dysplázie	2
2.1.1. mTOR signální kaskáda	2
2.1.2. Animální modely FCDII	4
2.1.3. Patogeneze u FCDII a shoda s animálními modely	6
2.2. Parvalbuminové interneurony	9
2.2.1. Vlastnosti PV+ interneuronů	10
2.2.2. Úloha parvalbuminových interneuronů v epilepsii	15
2.3. Fokální epileptické záchvaty	17
2.3.1. Úloha interneuronů v průběhu epileptických záchvatů	18
2.3.2. Epileptogeneze u FCD	20
2.4. Akutní model epilepsie: pentylenetetrazol	23
3. Cíle práce	25
4. Materiál a metody	26
4.1. Experimentální zvířata	26
4.2. <i>In utero</i> elektroporace	26
4.3. Screening P0	27
4.4. Screening P21	28
4.5. Implantace kraniálního okna	28
4.6. Video-EEG monitoring	30
4.7. Calcium imaging	31
4.8. PTZ	33
4.9. Perfúze	33
4.10. Zpracování dat	34
4.10.1. Kalciový signál	34
4.10.2. EEG data	34
4.10.3. Statistická analýza	35
5. Výsledky	36
5.1. Charakterizace myšího modelu fokální kortikální dysplázie II	36
5.2. Vyhodnocení dat z funkčního měření	40
5.3. Vyhodnocení záchvatů indukovaných pomocí PTZ	40

5.3.1. Reprezentativní záznam epileptického záchvatu indukovaného pomocí PTZ	41
5.3.2. Úbytek fluorescence PV+ interneuronů a pyramidových neuronů po záchvatu	44
5.3.3. Mírná aktivace PV+ interneuronů před počátkem záchvatu	45
5.3.4. Průběh depolarizační vlny	46
6. Diskuze	48
7. Závěr	55
8. Seznam použité literatury	56

1. Úvod

Epilepsie je závažnou chorobou výrazně snižující kvalitu života v důsledku epileptických záchvatů, které se mohou vyskytnout v podstatě kdykoliv. Ačkoliv byla publikována řada studií popisující periodické oscilace v pravděpodobnosti vzniku těchto záchvatů, šance na spolehlivé predikce jejich propuknutí je stále v nedohlednu. Stejně tak informace týkající se mechanismu jejich vzniku a šíření jsou nedostatečné a převážně pocházejí z *in vitro* studií, či akutních modelů epilepsie.

O tom, jakou úlohu interneurony, tedy inhibiční neurony, zaujímají v epileptických procesech se stále diskutuje a existuje mnoho teorií, které je ovšem třeba ověřit. Z dosavadních výzkumů je patrné, ačkoliv se tato myšlenka zdá neintuitivní, že pravděpodobně přispívají či dokonce mohou zapříčinit vznik epileptických záchvatů. Navíc se zdá, že rozdílné skupiny interneuronů, například parvalbuminové o nichž je psána tato práce, zaujímají různé role v těchto procesech, což významně rozšiřuje pole výzkumu epilepsie.

Cílem této práce je objasnit roli parvalbuminových interneuronů u fokální kortikální dysplázie, která je jednou z příčin epilepsie postihující převážně pacienty v dětském věku. Vzhledem k nedostatečným informacím o příčině stojící za vznikem epileptických záchvatů a rezistenci vůči dosud známým antiepileptickým lékům je léčba velice náročná a sestává se buď z režimových opatření nebo chirurgického odnětí poškozené části mozku. I takto radikální krok ovšem nemusí vést k úspěšnému potlačení epileptických záchvatů a je tedy nutné rozklíčovat mechanismy způsobující vznik epilepsie v případě této malformace.

2. Literární přehled

2.1. Fokální kortikální dysplázie

Fokální kortikální dysplázie je strukturální a funkční malformací kortikálního vývoje související s mutacemi v mTOR signální kaskádě vedoucí k rozvoji epilepsie (Subramanian et al., 2019). Z důvodu rezistence vůči medikaci se často přistupuje k chirurgickému odnětí léze (Fauser et al., 2015) za účelem potlačení epileptických záchvatů. Pokud se však epileptické ložisko nachází v některé kriticky důležité oblasti mozku, kterou nelze odstranit, je třeba použít alternativní neinvazivní metody. Mezi takové patří, mimo jiné, například ketogenní dieta (Neal et al., 2008).

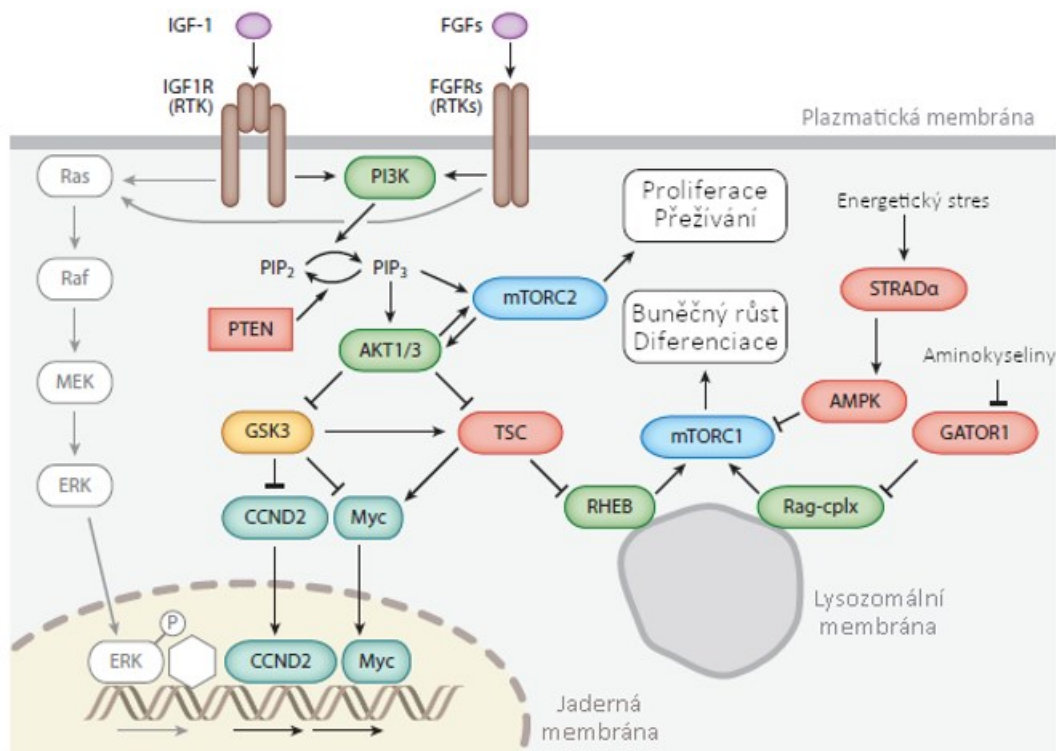
Podle doporučení International League Against Epilepsy (Najm et al., 2022) se fokální kortikální dysplázie dělí do několika typů. Všechny (FCDI, II, III) se vyznačují abnormálním uspořádáním kortikálních vrstev, některé navíc přítomností abnormálních neuronů (FCDII), či aditivním poškozením mozku (FCDIII). FCDIIa značí přítomnost dysmorfních neuronů, FCDIIb dysmorfních neuronů a balónových buněk.

Fokální kortikální dysplázie typu II byla poprvé popsána roku 1971 Davidem C. Taylorem a jeho kolegy na deseti vzorcích mozku odebraných epileptickým pacientům z oblastí temporálního, frontálního či okcipitálního laloku. Pacienti kromě epileptických záchvatů často trpí i sníženým intelektem či dalšími behaviorálními poruchami (Taylor et al., 1971)

2.1.1. mTOR signální kaskáda

mTOR signální kaskáda hraje klíčovou roli v regulaci buněčného růstu a diferenciaci (skrže mTORC1 komplex) a proliferace a přežívání (skrže mTORC2 komplex), přičemž v případě fokální kortikální dysplázie dochází k její hyperaktivaci (Juric-Sekhar & Hevner, 2019).

Regulace mTORC1 je zprostředkována prostřednictvím komplexů TSC, GATOR1 a STRAD α , zatímco mTORC2 je regulován především růstovými faktory či inzulinem (viz. obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Přehled regulačních drah v rámci mTOR signální kaskády. Převzato a upraveno podle (Juric-Sekhar & Hevner, 2019)

2.1.1.1. mTORC1

Komplex mTORC1 vzniká interakcí mezi mTOR kinázou, proteinem Raptor a dalšími komponenty. Na rozdíl od komplexu mTORC2 je citlivý na rapamycin a jeho působením dochází k oslabení interakce mezi mTOR kinázou a proteinem Raptor (D.-H. Kim et al., 2002).

TSC komplex je složen z proteinů TSC1 (hamartin), TSC2 (tuberin) a TBC1D7 (Nakashima et al., 2007) a zajišťuje inhibici mTORC1 (Tee et al., 2002). Zároveň je sám regulován pomocí Akt/PKB zprostředkovanou fosforylací vedoucí k inhibici TSC komplexu (Inoki et al., 2002).

GATOR1 komplex je tvořen proteiny DEPDC5, NPRL2 a NPRL3 zajišťující inhibici mTORC1 za nepřítomnosti aminokyselin (Bar-Peled et al., 2013).

Komplex STRADα tvořený LKB1, STRAD a MO25 aktivuje AMPK inhibující mTORC1 komplex (Hawley et al., 2003), konkrétně přes fosforylaci proteinu Raptor (Gwinn et al., 2008). STRADα a AMPK reagují na energetický stres v důsledku zvýšené koncentrace cAMP (Gwinn et al., 2008).

Cíle pro komplex mTORC1 obsahují konzervovaný TOS vazebný motiv pro vazbu proteinu Raptor. Mezi důležité cíle z hlediska regulace syntézy proteinů patří pS6 a 4E-BP1 (Nojima et al., 2003; Schalm & Blenis, 2002). Také de novo syntéza lipidů, glykolýza, část pentóza-fosfátové dráhy (Düvel et al., 2010) a syntéza pyrimidinových nukleotidů (Ben-Sahra et al., 2013) jsou pod kontrolou mTORC1 komplexu.

Fosforylace pS6 je významným markerem hyperaktivace komplexu mTORC1 (Chodraui et al., 2020).

2.1.1.2. mTORC2

Komplex mTORC2 obsahuje stejně jako mTORC1 kinázu mTOR, tentokrát ovšem ve vazbě na protein Rictor, který je vůči rapamycinu rezistentní (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004).

Růstové faktory a inzulin stimulují PI3K k fosforylaci Akt/PKB a mTOR kinázy v mTORC2 komplexu (Chenal et al., 2008).

Mezi funkce mTORC2 patří fosforylace dalších kináz, například Akt/PKB (Facchinetti et al., 2008; Sarbassov et al., 2005), PKC (Facchinetti et al., 2008; Sarbassov et al., 2004) nebo SGK1 dále fosforylující NDRG1, což může sloužit jako marker hyperaktivace mTORC2 (García-Martínez & Alessi, 2008). Dále mTORC2 kontroluje polymerizaci aktinového cytoskeletu (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004).

2.1.2. Animální modely FCDII

Používané modely se dají rozdělit do dvou skupin: transgenní a tvořené pomocí *in utero* elektroporace (viz. tabulka č. 1).

Transgenní modely využívají nejčastěji Cre/LoxP systém při křížení myší buď pro vložení loss of function mutací¹ genů zapojených v mTOR signální kaskádě (Meikle et al., 2007; Yuskaitis et al., 2018; Zeng et al., 2011; Zhou et al., 2009) nebo vložení mutací vedoucích k hyperaktivaci daného genu (Roy et al., 2015). Problém s těmito modely spočívá v tom, že mutace se vyskytují v celém mozku, což nereprezentuje fokální kortikální dysplázii, u které mutované neurony tvoří pouze část mozku. Toto omezení se dá ovšem obejít podmíněnou expresí daných genů do neurálních prekursorů (Kassai et al., 2014), či postnatální injikací Cre rekombinázy do laterální komory mozkové (Prabhakar et al., 2013), což vede k omezení exprese pouze do určité části mozku.

¹ Loss of function mutace = mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu

Modely využívající *in utero* elektroporaci jsou velmi užitečné, jelikož vložení konstruktů s mutovaným genem během embryonálního vývoje do laterálních komor mozkových způsobí mutaci pouze části zasažených buněk, což vede ke tvorbě léze. Většinou je používáno vložení plazmidu s mutovaným genem (Baek et al., 2015; Lim et al., 2015; Reijnders et al., 2017; Zhong et al., 2021). Využívá se ovšem i CRISPR/CAS9 (Chen et al., 2015; Lim et al., 2017; Ribierre et al., 2018) či injekce Cre rekombinázy (Feliciano et al., 2011).

Přestože naprostá většina animálních modelů využívá pro studium fokální kortikální dysplázie myši, objevují se například i modely založené na *Daniu* pruhovaném (S.-H. Kim et al., 2011).

Tabulka č. 1: Studie odkazované výše v textu s vyznačením genu, ve kterém se mutace nachází. Autor: Jana Populová.

Mutovaný gen	Studie	Mutovaný gen	Studie
PTEN	(Zhou et al., 2009)	AKT3	(Baek et al., 2015)
TSC1	(Meikle et al., 2007)	mTOR	(Lim et al., 2015)
TSC2	(Zeng et al., 2011)	RHEB	(Reijnders et al., 2017)
DEPDC5	(Yuskaitis et al., 2018)	TSC1,2	(Lim et al., 2017)
PIK3CA	(Roy et al., 2015)	DEPDC5	(Ribierre et al., 2018)
mTOR	(Kassai et al., 2014)	PTEN	(Chen et al., 2015)
TSC1	(Prabhakar et al., 2013)	TSC1	(Feliciano et al., 2011)
PIK3CA	(Zhong et al., 2021)	TSC2	(S.-H. Kim et al., 2011)

Nejčastější mutace se u pacientů objevují v genu mTOR a dále v jeho aktivátorech (AKT3, PIK3CA, RHEB), ačkoliv i mutace v represorech této signální kaskády jsou přítomny (Baldassari et al., 2019). Tyto mutace mohou být zárodečné i somatické (Møller et al., 2016).

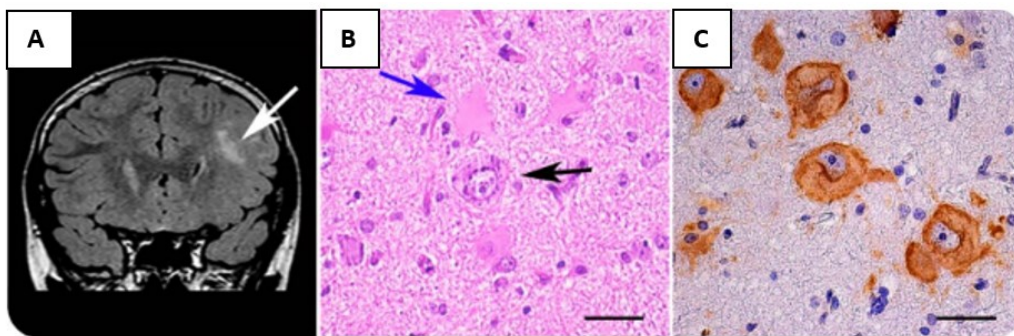
Počet neuronů v mozku obsahujících nějakou ze somatických mutací způsobující FCDII se pohybuje v rozmezí 2 – 20 %. Množství zasažených neuronů pak odpovídá fázi embryonálního vývoje, ve které k mutaci došlo (D’Gama et al., 2017). Například v modelu

nesoucím loss of function mutaci v TSC1,2 stačí pouze 1 % mutovaných buněk pro indukci spontánních záchvatů (Lim et al., 2017).

2.1.3. Patogeneze u FCDII a shoda s animálními modely

Studie prováděné na lidských mozcích (Alonso-Nanclares et al., 2005; Baldassari et al., 2019; Garbelli et al., 1999; Møller et al., 2016; Taylor et al., 1971) poukazují na přítomnost abnormálních oblastí mozku většinou rozeznatelných od okolní tkáně vyznačující se kortikální dyslaminací, výskytem abnormálních (viz. obrázek č. 2) a ektopických neuronů, abnormalitami gliových buněk, spontánními epileptickými záchvaty, sníženým intelektem a dalšími behaviorálními poruchami.

Dále byly dokumentovány i změny týkající se interneuronů, přičemž primárně se studie zaměřovaly na možnost jejich redukce (či pouze některých frakcí) v rámci léze nebo rozdílnou konektivitu (viz. kapitola č. 2.3.2.).



Obrázek č. 2: Pacient trpící FCDIIb. (A) Snímek z magnetické rezonance znázorňující umístění léze. (B) Histologický preparát zhotovený po chirurgickém odnětí léze barvený pomocí hematoxylinu a eosinu. Modrá šipka ukazuje na balónovou buňku, černá šipka na dysmorfní neuron. (C) Preparát kombinující barvení na hematoxylin/eosin a barvením proti fosforylovanému proteinu S6 znázorňující expresi pS6 v dysmorfních neuronech. Měřítko = 20 μ m. Převzato a upraveno podle (Møller et al., 2016).

2.1.3.1. Abnormální neurony a kortikální dyslaminace

Abnormální neurony u pacientů s FCDII se dají rozdělit na základě morfologie a elektrofyziologických vlastností do několika skupin: cytomegalické dysmorfní neurony, balónové buňky, špatně orientované a ektopické pyramidové neurony a neurony vlastnostmi připomínající nezralé buňky (Cepeda et al., 2003, 2005; Hanai et al., 2010).

Cytomegalické dysmorfní neurony mají somata o průměru 30-40 μ m a abnormální výběžky (axony i dendrity) vybíhající z těla. Z důvodu zvětšení membránového povrchu je i kapacitance, a tedy množství náboje potřebného pro depolarizaci, vyšší. Po depolarizaci

následuje výrazně vyšší influx vápenatých iontů v porovnání s pyramidovými neurony (Cepeda et al., 2003, 2005). Zároveň mají nižší senzitivitu pro hořčnaté ionty, což vede k aktivaci NMDA receptorů při více hyperpolarizovaném membránovém potenciálu (André et al., 2004).

Balónové buňky vykazují znaky neuronů (velké tělo o průměru 20-30 μm , mohutný dendritický strom) i glií (nerozeznatelné axony). Charakteristická je absence napěťově řízených sodných a vápenatých proudů a necitlivost vůči aplikaci excitačních aminokyselin (Cepeda et al., 2003, 2005).

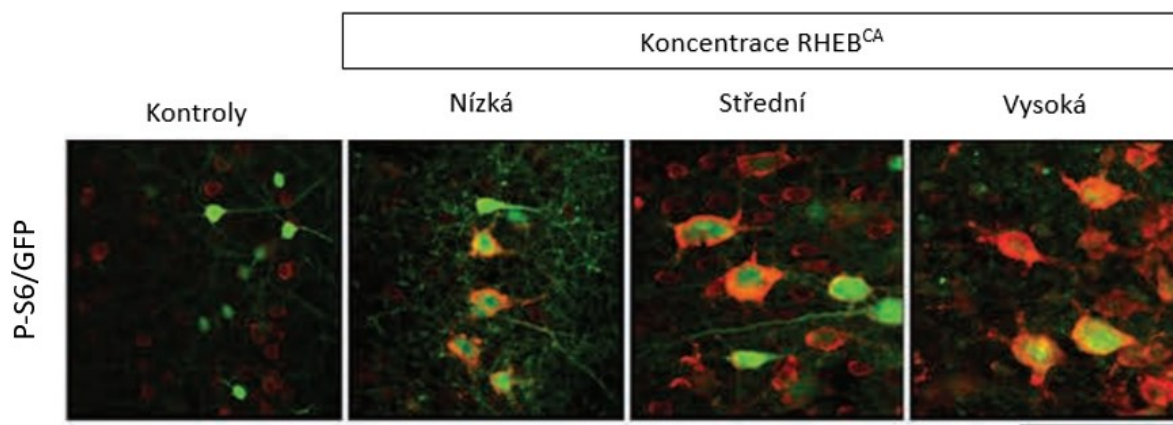
Dysmorfní i ektopické neurony se často nacházejí i v bílé hmotě mozkové pod kortexem (Alonso-Nanclares et al., 2005). Hranice bílé a šedé hmoty je často nerozeznatelná stejně jako jednotlivé kortikální vrstvy (Alonso-Nanclares et al., 2005; Garbelli et al., 1999; Taylor et al., 1971).

Přítomnost dysmorfních neuronů spojenou se zvýšenou expresí pS6, ektopických neuronů i kortikální dyslaminaci popisují i animální modely uvedené v tabulce č. 1. Přítomnost balónových buněk v animálních modelech ovšem dosud nebyla potvrzena, vyjma jedné studie (Ribierre et al., 2018).

2.1.3.2. Spontánní epileptické záchvaty

Spontánní epileptické záchvaty se začínají objevovat převážně v dětském věku, či během adolescence (Baldassari et al., 2019). Z této studie je také patrné, že období počátku výskytu záchvatů je závislé i na konkrétní mutaci, kterou je jedinec postižen. Například mutace v genu pro RHEB je spojená s průměrným počátkem ve třetím měsíci, zatímco v genu pro mTOR kinázu se jedná průměrně o 1,2 roku. Něco podobného můžeme vidět i v myších modelech. U těch využívajících *in utero* elektroporaci plazmidu s mutací v genu pro RHEB začínají spontánní záchvaty dříve (Hsieh et al., 2016) než v případě mutovaného mTOR genu (Lim et al., 2015).

Pravděpodobnost výskytu spontánních záchvatů v animálních modelech není vždy stejná a pohybuje se mezi 50 – 100 % v závislosti na mutovaném genu (Hsieh et al., 2016; Lim et al., 2015, 2017; Nguyen et al., 2019) a jeho použité koncentraci (Nguyen et al., 2019). Různou koncentrací plazmidů s mutovaným genem je možno dosáhnout i různé úrovně hyperaktivace mTOR signální kaskády, což se projeví rozdíly v závažnosti malformace (hypertrofie a migrace neuronů, frekvence záchvatů), jak lze vidět na obrázku č. 3. (Nguyen et al., 2019).



Obrázek č. 3: RHEB^{CA} indukuje fosforylaci S6 v závislosti na dávce. Obrázek znázorňuje rozdíly v intenzitě barvení proti pS6 v kombinaci s GFP a hypertrofii neuronů mezi kontrolami a různými úrovněmi koncentrace RHEB^{CA}. Měřítko 100 μ m. Převzato a upraveno podle (Nguyen et al., 2019).

Také umístění léze hraje svou roli. Například studie (Hsieh et al., 2016) poukázala na výskyt spontánních záchvatů u myši s lézí v oblasti mediálního prefrontálního kortexu, zatímco v somatosenzorickém kortexu k jejich vzniku nedošlo.

U pacientů trpících FCDII spolu s výskytem záchvatů je léze nejčastěji umístěna ve frontálním laloku, následně temporálním a méně v parietálním a okcipitálním (Wagstyl et al., 2022). Pozice léze souvisí i s dobou propuknutí prvních záchvatů, přičemž primární senzorycké oblasti jsou spojeny s jejich dřívějším vznikem oproti asociačním oblastem, kdy se záchvaty začínají objevovat až v pozdějším věku. Léze v oblasti frontálního laloku také často bývají menší v porovnání s většími lézemi v okcipitálním laloku (Wagstyl et al., 2022).

Vzhledem k vlastnostem dysmorfních cytomegalických neuronů (viz. výše) je pravděpodobné, že se podílejí na vzniku spontánních epileptických záchvatů. Naopak balónové buňky takový potenciál nemají (Cepeda et al., 2005). Také se předpokládá, že za záchvatování není zodpovědná nedokončená migrace postižených neuronů (Hsieh et al., 2016).

2.1.3.3. Hypervaskularizace

S fokální kortikální dysplázií je spojená i hypervaskularizace v místě léze. Cévy jsou hustší, více rozvětvené, delší a neurony jsou umístěny blíže cévám, než ve zdravém mozku. Pravděpodobně to umožňuje přístup dysplastických neuronů ke kyslíku a jiným živinám (L. Zhang et al., 2019). Dále bylo zjištěno, že právě tyto neurony mají zvýšenou expresi VEGFA a VEGFB spolu s jejich receptory, což by mohlo předcházet jejich zániku (Boer et al., 2008).

2.1.3.4. Kontinuum FCD-TSC-HME

Definice jednotlivých malformací kortikálního vývoje není vždy jednoznačná a mTORopatie zahrnující fokální kortikální dysplázi, komplex tuberózní sklerózy a hemimegaencefalii jsou často považovány za kontinuum.

FCD a HME mohou být způsobené mutacemi ve stejných genech, rozdílem je pouze mutace v dřívější fázi kortikálního vývoje pro vznik HME a ve výsledku tedy postihuje větší množství buněk. Vyjma toho ale FCD i HME sdílejí stejné znaky (D’Gama et al., 2017). Stejně tak FCD a TSC vznikají v důsledku stejných mutací vedoucích k podobnému fenotypu a rozdílem je pouze kalcifikace v rámci léze, která je přítomna pouze u TSC (Hulshof et al., 2021).

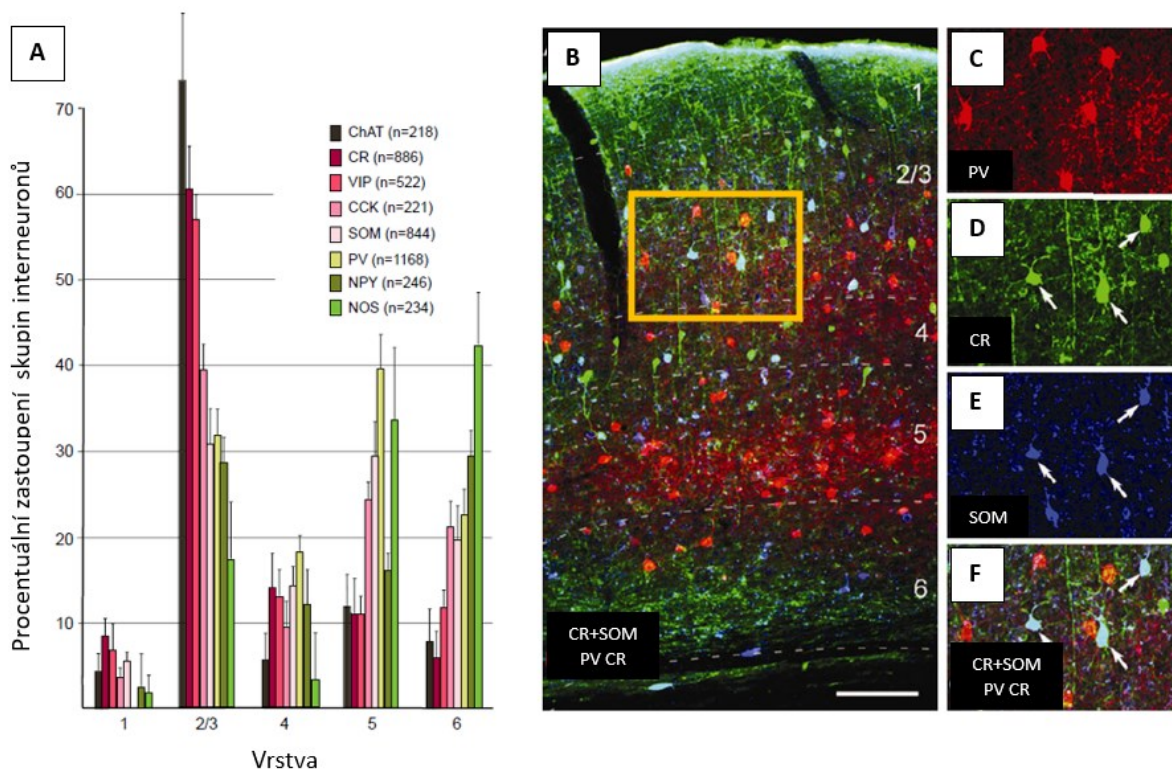
2.2. Parvalbuminové interneurony

Interneurony se dají rozlišit na základě exprese kalcium-vazebných proteinů a neuropeptidů a elektrofyziologických vlastností. Tyto konkrétní interneurony se vyznačují produkcí parvalbuminu (kalcium-vazebný protein) a „fast-spiking²“ fenotypem (Gonchar et al., 2007; Y Kawaguchi & Kubota, 1997; Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1993; Yasuo Kawaguchi, 1995).

Parvalbumin pozitivní (PV+) interneurony jsou nejpočetnější skupinou interneuronů v kortexu (viz. obrázek č. 4), kde tvoří přibližně 40 % ze všech GABAergních neuronů u hlodavců (Gonchar et al., 2007; Kooijmans et al., 2020) a téměř 50 % u primátů (Kooijmans et al., 2020). Vyskytují se ve všech kortikálních vrstvách kromě té první (Gonchar et al., 2007; Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1993; Yasuo Kawaguchi, 1995; Seto-Ohshima et al., 1989), přičemž více jsou zastoupeny v hlubších vrstvách kortexu (Gonchar et al., 2007).

Mimo kortex se hojně nacházejí v mozečku, hippocampu a thalamu a v menším počtu i v mozkovém kmeni, striatu či amygdale (Ohshima et al., 1991; Seto-Ohshima et al., 1989).

² Fast-spiking = elektrofyziologická vlastnost umožňující tvorbu akčních potenciálů s vysokou frekvencí



Obrázek č. 4: (A) Rozložení počtu různých skupin interneuronů v kortikálních vrstvách myšího mozku. (B) Trojitě barvení kortikálních vrstev protilátkami proti parvalbuminu (PV, červeně), calretininu (CR, zeleně) a somatostatinu (SOM, modře). Měřítko = 100 μ m. (C-F) Zvětšený výřez z obrázku B (žlutý obdélník). Převzato a upraveno podle (Gonchar et al., 2007).

2.2.1. Vlastnosti PV+ interneuronů

Dvě hlavní skupiny PV+ interneuronů jsou tzv. „basket“³ a „chandelier“⁴ neurony. Z těchto dvou jsou „basket“ neurony zastoupeny v neokortexu více. Jejich morfologické i elektrofyziologické vlastnosti se v průběhu postnatálního vývoje postupně vyvíjejí (Doischer et al., 2008) a až po dosažení dospělosti vykazují typické vlastnosti, které se už dále nemění (Gonchar et al., 2007; Luhmann & Prince, 1991).

2.2.1.1. Morfologické vlastnosti

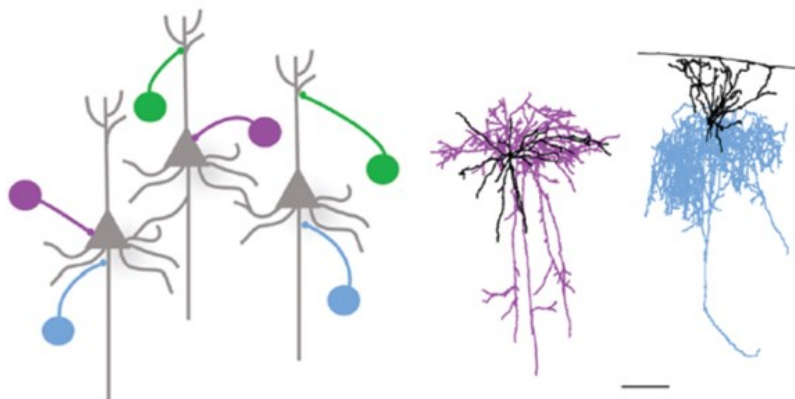
Oba typy PV+ interneuronů jsou převážně multipolární (Yasuo Kawaguchi, 1995). Jejich těla dosahují velikosti přibližně 15 μ m (Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1993; Kooijmans et al., 2020). Axony tvoří v blízkosti těla hustou síť (Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1993), která u „basket“ neuronů vysílá výběžky spíše horizontálně (Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1993), zatímco u „chandelier“ neuronů směřují více vertikálně (DeFelipe et al., 1988). Důležitý rozdíl

³ Basket neurony = košíčkové neurony

⁴ Chandelier = lustrové neurony

mezi PV+ interneurony je ve způsobu, kterým inervují pyramidální neurony (viz. obrázek č. 5). „Basket“ typ inervuje těla neuronů a „chandelier“ typ iniciální segmenty axonů (Y Kawaguchi & Kubota, 1997).

Během vývoje po narození dochází hlavně k masivnímu nárůstu délky axonů a dendritů a rozvětvení axonálního systému. Zároveň s tím dochází pravděpodobně ke zvýšení počtu inervovaných neuronů (Doischer et al., 2008).



Obrázek č. 5: Způsob inervace různých typů interneuronů na pyramidální buňky a reprezentativní morfologická rekonstrukce dvou typů parvalbuminových interneuronů. Pyramidové neurony (šedá), PV+ „basket“ neurony (fialová), PV+ „chandelier“ neurony (modrá), Somatostatin-pozitivní neurony (zeleně). V morfologické rekonstrukci jsou dendrity zobrazeny černě, axony barevně. Převzato a upraveno podle (Fino et al., 2013). Měřítko = 100 μ m.

2.2.1.2. Elektrofyziologické vlastnosti

Elektrofyziologické vlastnosti PV+ interneuronů vykazují charakteristické znaky, na jejichž základě se dají snadno rozpoznat od ostatních neuronů. Jsou schopné produkovat salvy akčních potenciálů s vysokou konstantní frekvencí, přičemž krátké trvání mezi akčními potenciály je umožněno rychlou hyperpolarizací. Jejich klidový membránový potenciál dosahuje zápornějších hodnot v porovnání s jinými interneurony (Yasuo Kawaguchi, 1995).

Ačkoliv oba typy PV+ interneuronů vykazují tyto vlastnosti, jsou mezi nimi určité rozdíly. Například v myším mozku mají „chandelier“ neurony výrazně vyšší amplitudu hyperpolarizace než „basket“ neurony. Dalším rozdílem je frekvence, se kterou neurony pájí akční potenciály; pro „chandelier“ neurony je vyšší než u „basket“ neuronů (Povyseva et al., 2013).

Stejně jako morfologické vlastnosti, i ty elektrofyziologické se mění v průběhu postnatálního vývoje. Nezralé interneurony mají pozitivnější klidový membránový potenciál, nižší amplitudy akčních potenciálů s delším trváním a nižší rychlost vedení (Luhmann & Prince, 1991). Schopnost interneuronů produkovat inhibiční postsynaptické potenciály (IPSP) se také objevuje až v průběhu vývoje nejprve v kortikální vrstvě V (později následují i zbylé), kdy například během pátého postnatálního dne jen polovina buněk umí IPSP vytvořit (Doischer et al., 2008; Komatsu, 1983).

Za tento „fast-spiking“ fenotyp jsou zodpovědné některé iontové kanály, kterými jsou PV+ interneurony vybaveny. Jedná se konkrétně o napěťově řízené draselné, sodné a vápenaté kanály (Erisir et al., 1999; Hua Hu & Jonas, 2014; Zaitsev et al., 2007). Přispívá také přítomnost kalcium-vazebného proteinu parvalbuminu (B Schwaller et al., 2004).

2.2.1.3. Napěťově řízené sodné iontové kanály

Napěťově řízené sodné kanály jsou zodpovědné za depolarizaci membrány axonu, když je neuron dostatečně stimulován a membránový potenciál dosáhne kritické hodnoty pro vytvoření akčního potenciálu. Depolarizace způsobená těmito kanály také aktivuje napěťově řízené vápenaté kanály umístěné na synaptickém rozšíření presynaptického neuronu. PV+ interneurony exprimují primárně podjednotky $Na_v1.1$ a $Na_v1.6$ lokalizované na tělech a neuronálních výběžcích (Whitaker et al., 2001) s tím rozdílem, že $Na_v1.1$ se ve větším množství nachází v proximální části axonu a $Na_v1.6$ distální části (T. Li et al., 2014). Zároveň množství těchto kanálů je mnohonásobně vyšší v axonech než v tělech neuronů (T. Li et al., 2014).

Jak už bylo řečeno, pro PV+ interneurony je specifická vysoká hustota těchto kanálů v membráně, přičemž směrem od těla k distálnímu konci axonu se jejich počet postupně zvyšuje. Kanály v proximální části axonu jsou zodpovědné za nastavení frekvence produkovaných akčních potenciálů, zatímco kanály v odlehlejší části axonu pomáhají rychle a spolehlivě signál po axonu vést (Hua Hu & Jonas, 2014).

2.2.1.4. Napěťově řízené draselné iontové kanály

Napěťově řízené draselné kanály jsou zodpovědné za repolarizaci membrány axonu po depolarizaci způsobené napěťově řízenými sodnými kanály. PV+ interneurony exprimují primárně $K_v3.1$ a $K_v3.2$ podjednotky (Marco et al., 1998). $K_v3.1a$ jsou exprimovány primárně v axonech a synaptických terminálech, zatímco $K_v3.1b$ jsou na povrchu těl interneuronů, na proximálních dendritech, axonech a v synaptických terminálech (Ozaita et al., 2002). $K_v3.2$

pokrývají těla interneuronů, proximální dendrity a presynaptické terminály (Chow et al., 1999; Tansey et al., 2002). $K_v3.1$ i $K_v3.2$ podjednotky jsou do neuronů zabudovávány postupně až v průběhu postnatálního vývoje (Du et al., 1996; Tansey et al., 2002).

V iniciálním segmentu se nacházejí $K_v1.1$ kanály regulující práh pro vznik akčního potenciálu a potlačující excitabilitu (Goldberg et al., 2008). Ovšem pouze 33 % „fast-spiking“ interneuronů tyto kanály exprimuje (Marco et al., 1998) a efekt na tvorbu akčních potenciálů je minimální (Erisir et al., 1999).

Důležitou vlastností vzhledem k elektrofyziologickým vlastnostem PV+ interneuronů je rapidní aktivace těchto kanálů umožňující urychlit regeneraci napěťově řízených sodných kanálů, což způsobí jejich opětovnou aktivaci vedoucí k tvorbě akčních potenciálů o vysoké frekvenci (Erisir et al., 1999). Tato souhra mezi napěťově řízenými sodnými a draselnými kanály umožňuje minimalizovat energetickou náročnost a zvýšit efektivitu, která je pro tuto vysokofrekvenční tvorbu akčních potenciálů klíčová (Hua Hu et al., 2018).

2.2.1.5. Napěťově řízené vápenaté iontové kanály

Napěťově řízené vápenaté kanály jsou aktivované depolarizací způsobenou napěťově řízenými sodnými kanály. Jsou zodpovědné za influx vápenatých iontů do synaptického zakončení neuronu, který je důležitý pro výlev neurotransmiterů. PV+ interneurony exprimují primárně P/Q typ ($Ca_v2.1$) napěťově řízených vápenatých iontových kanálů (Zaitsev et al., 2007). Nacházejí se blíž k proteinovým systémům zodpovědných za vypouštění neurotransmiterů než jiné typy a jsou s nimi těsněji propojeny (Bucurenciu et al., 2008; Wu et al., 1999; Zaitsev et al., 2007). Tato blízkost pravděpodobně umožňuje efektivněji aktivovat uvolnění synaptických vezikulů (Wu et al., 1999). Pro výlev neurotransmiterů stačí velice málo těchto kanálů (2-3) a v blízkosti každého synaptického vezikulu se jich nachází 3-5. To umožňuje minimalizovat asynchronní výlev (Bucurenciu et al., 2010).

2.2.1.6. AMPA receptory

AMPA receptory jsou ionotropní glutamátové receptory na membránách neuronů propouštějící do intracelulárního prostoru ionty sodíku, draslíku a vápníku. Tvoří tetramery složené z kombinace 4 podjednotek (GluA1, GluA2, GluA3, GluA4), konkrétní složení pak udává vlastnosti receptoru, například propustnost pro ionty. Ve vztahu k PV+ interneuronům je důležitá podjednotka GluA2 zajišťující nepropustnost pro vápenaté ionty, respektive její nepřítomnost či pouze minimální výskyt (Catania et al., 1998; Matta et al., 2013; Moga et al., 2002) například oproti pyramidovým neuronům, kde je zastoupena hojně (Catania et al., 1998).

To způsobuje, že PV+ interneurony jsou v důsledku zvýšeného toku těchto iontů do buňky náchylnější k excitotoxickému poškození.

2.2.1.7. Parvalbumin

Parvalbumin, marker pro tuto konkrétní skupinu interneuronů, je malý cytosolický kalcium-vazebný globulární protein s „EF-hand⁵“ doménou schopný vázat dva vápenaté ionty (Permyakov, 2006). Mimo mozek se nachází ve svalech a v mizivém množství i v dalších orgánech (Baron et al., 1975). Jeho úkolem je snížit intracelulární nárůst koncentrace vápenatých iontů po depolarizaci. Část parvalbuminu je za fyziologických podmínek obsazena hořečnatými ionty, a tedy než může vázat vápenaté ionty, musí nejprve dojít k disociaci hořečnatých iontů (Chard et al., 1993).

Jeho exprese v interneuronech se stejně jako charakteristické vlastnosti PV+ interneuronů vyvíjí s věkem. Zatímco u myši po narození nelze tento protein detekovat, během P21 až P33 se exprese zvyšuje a poté se ustálí (de Lecea et al., 1995; Gonchar et al., 2007). Zajímavé je, že stejně jako první IPSP (viz. kapitola Elektrofyziologické vlastnosti) se objevuje nejprve v páté kortikální vrstvě (de Lecea et al., 1995).

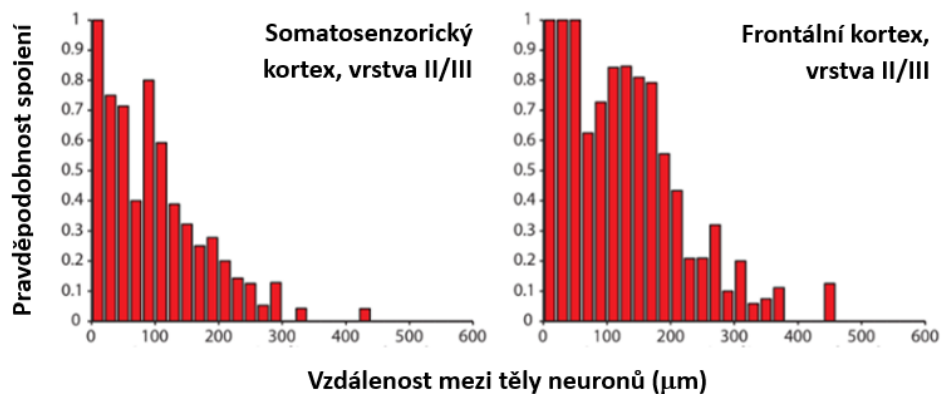
2.2.1.8. Konektivita

PV+ interneurony inhibují výhradně další PV+ interneurony nebo pyramidové neurony. Zároveň dostávají inhibiční vstupy od interneuronů exprimujících somatostatin nebo vasointestinální peptid a excitační vstupy od pyramidových neuronů (Hioki et al., 2013; Pfeffer et al., 2013).

PV+ a somatostatin pozitivní (SOM+) interneurony vytvářejí synapse především na dendritech, zatímco vasointestinální peptid pozitivní (VIP+) interneurony preferenčně inervují těla PV+ interneuronů. 60 % GABAergní dendritické inervace tvoří PV+ interneurony, 25 % SOM+ interneurony, zatímco VIP+ interneurony tvoří 62 % GABAergních vstupů na těla PV+ interneuronů (Hioki et al., 2013).

Tvorba synapsí je závislá na vzdálenosti mezi těly neuronů (viz. obrázek č. 6). Nejvíce spojení se vytváří do vzdálenosti 200 μm a s rostoucí vzdáleností pravděpodobnost spojení klesá. Platí, že PV+ interneurony nespecificky kontaktují všechny možné pyramidové neurony v blízkosti. Pravděpodobnost inervace dvou pyramidových neuronů PV+ interneurony nezávisí na tom, zda jsou tyto pyramidové neurony synapticky propojeny (Packer & Yuste, 2011).

⁵ EF-hand = proteinový vazebný motiv složený ze dvou alfa-helixů



Obrázek č. 6: Histogram pravděpodobnosti propojení v závislosti na vzdálenosti mezi PV+ interneurony a pyramidovými neurony. Převzato a upraveno podle (Packer & Yuste, 2011).

PV+ interneurony jsou kromě chemických synapsí propojeny i elektrickými synapsemi. Ve vzdálenosti 80 μm mezi těly PV+ interneuronů je elektricky propojeno 66 %. Tato spojení se ovšem nevyskytují mezi PV+ interneurony a pyramidovými neurony nebo gliemi. Elektrické synapse pravděpodobně pomáhají synchronizovat PV+ interneurony a propagují tvorbu akčních potenciálů (M Galarreta & Hestrin, 1999; Mario Galarreta & Hestrin, 2002).

2.2.1.9. Perineurální síť

Perineurální síť jsou formou extracelulární matrix nesoucí záporný náboj obklopující neurony a zajišťující široké spektrum funkcí. Tvoří se především kolem inhibičních neuronů, přičemž nejčastěji pokrývají PV+ interneurony (Härtig et al., 1992; McRae et al., 2010), z nichž pokrývají většinu (Pollock et al., 2014). Od období pozdního embryonálního vývoje dochází k jejich vývoji a plně zformované perineurální síť se objevují až když je neuronální síť plně zformována (Hockfield et al., 1990; Matthews et al., 2002). Dospělé perineurální síť pak inhibují reorganizaci neuronálních výběžků a regeneraci, tedy synaptickou plasticitu (Gundelfinger et al., 2010).

Mezi další funkce patří ochrana před oxidativním stresem (Cabungcal et al., 2013) a glutamátem zapříčiněnou excitotoxicitou (Okamoto et al., 1994), restrikce pro pohyb iontů a jejich možné pufrování v extracelulárním prostoru (Hrabetová et al., 2009; Morawski et al., 2015), omezení pohybu molekul/receptorů na povrchu neuronů (Frischknecht et al., 2009) či podpora excitability „fast-spiking“, a tedy PV+ interneuronů (Balmer, 2016).

2.2.2. Úloha parvalbuminových interneuronů v epilepsii

Za fyziologických podmínek je úkolem těchto interneuronů inhibovat a synchronizovat další neurony. V případě propuknutí epileptického záchvatu dochází u PV+ interneuronů

bohužel často k jejich selhání (viz. kapitola č. 2.3.1.) i když nedošlo k jejich poškození či změně funkce. Tato kapitola se zabývá různými mutacemi, či poškozením, které jsou u PV+ interneuronů spojeny s rozvojem epilepsie.

2.2.2.1. Napětově řízené kanály

Mutace v genu SCN1a pro Nav1.1 způsobuje ztrátu těchto kanálů v hippocampu a kortexu a je příčinou vzniku Dravetova syndromu vyznačujícího se spontánními záchvaty spojenými se zvýšením tělesné teploty (Cheah et al., 2012).

Co se týče napětově řízených draselných kanálů a jejich účasti v epilepsii, výsledky studií jsou rozporuplné a některé poukazují (na příkladu mutací v podjednotce Kv3.1) na spojitost s epilepsií (X. Li et al., 2021), zatímco jiné (Ho et al., 1997) pozorovali široké spektrum symptomů, avšak ne spontánní záchvaty.

Odstranění genu CACNA1a pro $\alpha 1$ podjednotku napětově řízených vápenatých kanálů z kortikálních PV+ interneuronů způsobila u myši epilepsii v P17 a do P30 smrt v důsledku generalizovaných záchvatů. Nedošlo ale k ovlivnění počtu PV+ interneuronů či změnám v jejich distribuci. Jako kompenzace došlo k up-regulaci⁶ N-typu vápenatých kanálů, které ale v případě PV+ interneuronů nebyly schopny kompenzovat narušené vylučování GABA (na rozdíl od SOM+ neuronů). Ztráta funkce P/Q kanálů vede k desynchronizaci a redukci výlevu GABA (Rossignol et al., 2013). I další studie (Jun et al., 1999) potvrdila kompenzační up-regulaci N-typu kanálů v případě narušení funkce P/Q kanálů.

2.2.2.2. Parvalbumin

Na myším PV^{-/-} modelu prokázali (B Schwaller et al., 2004), že oproti kontrolním a heterozygotním zvířatům, byl počet myši dosahující status epilepticus⁷ po administraci pentylentetrazolu (PTZ) vyšší. U PV^{-/-} myši byla také vyšší pravděpodobnost úmrtí po podání PTZ. V tomto modelu nedošlo ke změnám v distribuci nebo počtu PV+ interneuronů.

2.2.2.3. Perineurální síť

Status epilepticus způsobuje rozklad komponent perineurálních sítí kolem neuronů (Yuan et al., 2002), který se dá pozorovat ještě po dvou měsících (McRae et al., 2012; Rankin-Gee et al., 2015) spolu s porušenou strukturou těchto sítí (McRae et al., 2012). Zatímco tyto studie byly prováděny vyvoláním záchvatu u dospělých zvířat, podáním kainátu během

⁶ Up-regulace = regulace směrem k zvýšení exprese

⁷ Status epilepticus = epileptický záchvat trvající déle než 5 minut nebo výskyt více než jednoho záchvatu během 5-ti minut

desátého postnatálního dne došlo naopak k významné několikadenní indukci exprese aggreganu (jedna ze složek perineuronálních sítí) v porovnání s kontrolními zvířaty (McRae et al., 2010). Zdá se tak, že změny v kompozici a struktuře perineuronálních sítí po záchvatu jsou závislé na věku, a tedy i úrovni vyvinutí perineuronálních sítí.

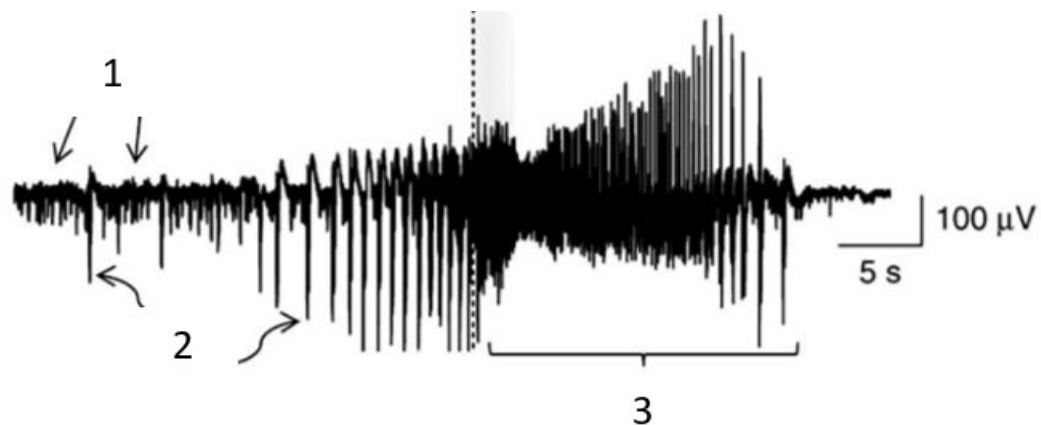
Za zvýšeným rozkladem komponent perineuronálních sítí mohou být matrixové metaloproteázy štěpící složky extracelulární matrix. Jejich množství a aktivita je významně zvýšená po záchvatu (Wilczynski et al., 2008) a inhibice těchto proteáz předchází rozkladu perineuronálních sítí a vede k inhibici záchvatů (Pollock et al., 2014; Wilczynski et al., 2008).

Zároveň po umělém rozrušení perineuronálních sítí bylo pozorováno skoro třikrát více myoklonických záchvatů (po podání PTZ) (Rankin-Gee et al., 2015), snížení excitability PV+ interneuronů (Balmer, 2016) či zvýšení difúze Ca^{2+} iontů v extracelulárním prostoru (Hrabetová et al., 2009).

2.3. Fokální epileptické záchvaty

O iniciaci, propagaci a terminaci i mechanismech spojených s epileptickými záchvaty se stále ví velmi málo. Ačkoliv některé nové studie přinesly spoustu užitečných informací, naprostá většina je prováděna pouze *in vitro* a hypotézy je teprve nutné ověřit *in vivo* za využití akutních, či chronických modelů epilepsie.

Epileptický záchvat (viz. obrázek č. 7) předchází určité pozorovatelné změny mozkové aktivity. V období mezi záchvaty lze na záznamu EEG pozorovat interiktální výboje související převážně s aktivitou interneuronů a pre-iktální výboje vzniklé působením pyramidových neuronů. Interiktální výboje se v čase směrem k rozvoji záchvatu zrychlují. Pre-iktální výboje bezprostředně předcházejí záchvatu a oproti inter-iktálním jsou rychlejší a mají vyšší amplitudu (Huberfeld et al., 2011; Panuccio et al., 2009).

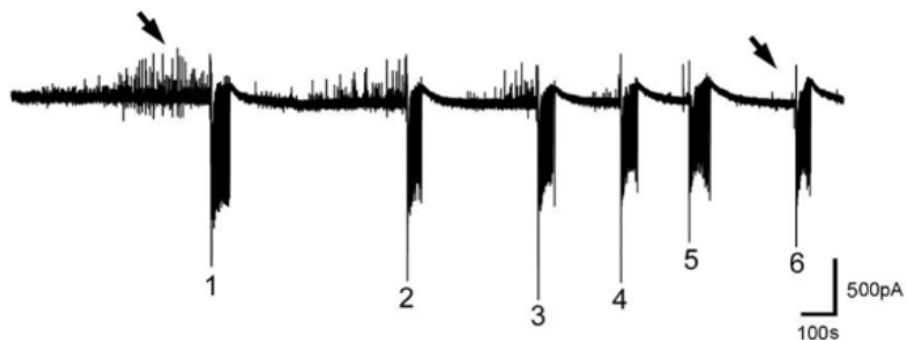


Obrázek č. 7: Záznam EEG zobrazující interiktální výboje (1), preiktální výboje (2) a epileptický záchvat (3). Přerušovaná čára znázorňuje počátek záchvatu. Převzato a upraveno podle (Huberfeld et al., 2011)

V případě fokální epilepsie vzniká epileptický záchvat v konkrétní části mozku, odkud se šíří dál jako vlna a postupně aktivuje pyramidové neurony v důsledku selhání inhibičních mechanismů (Trevelyan et al., 2006; Tryba et al., 2019). Zdá se, že oblast neuronů rekrutovaných během epileptického záchvatu se dá jasně odlišit od okolí. Zatímco oblast přímo zapojená do epileptické aktivity se vyznačuje vysoce rytmickou a intenzivní aktivitou každého z neuronů, okolní oblast, ač stále ovlivněná touto aktivitou, nevykazuje takovou úroveň synchronizace mezi neurony a jejich amplituda je výrazně menší (Schevon et al., 2012).

Nejdůležitější inhibiční silou působící proti šíření záchvatů jsou pravděpodobně PV+ interneurony (Camarota et al., 2013), jejichž aktivita výrazně stoupne před počátkem záchvatu. Spolu s nimi se na inhibici během této periody podílí i SOM+ interneurony (Parrish et al., 2019).

V případě opakujících se záchvatů dochází k poklesu účinnosti inhibice (Trevelyan et al., 2007). V této studii využívající akutní model epilepsie dochází postupně ke zkracování interiktální periody a rychlejšímu nástupu záchvatů (viz. obrázek č. 8) a zároveň dochází i ke zrychlení propagace.



Obrázek č. 8: Záznam z voltage clamp měření pěti pyramidových neuronů znázorňující postupnou ztrátu inhibiční síly (černé šipky) a zvyšování rychlosti propagace. Čísla označují jednotlivé iktální události. Převzato a upraveno podle (Trevelyan et al., 2007).

2.3.1. Úloha interneuronů v průběhu epileptických záchvatů

Z výše uvedeného popisu těchto interneuronů se zdá jako zřejmé, že jejich úlohou by měla být inhibice epileptických záchvatů. V praxi to ovšem není tak jednoduché a tyto neurony v tomto svém úkolu bohužel často selžou, či dokonce mohou působit jako iktogenní faktor.

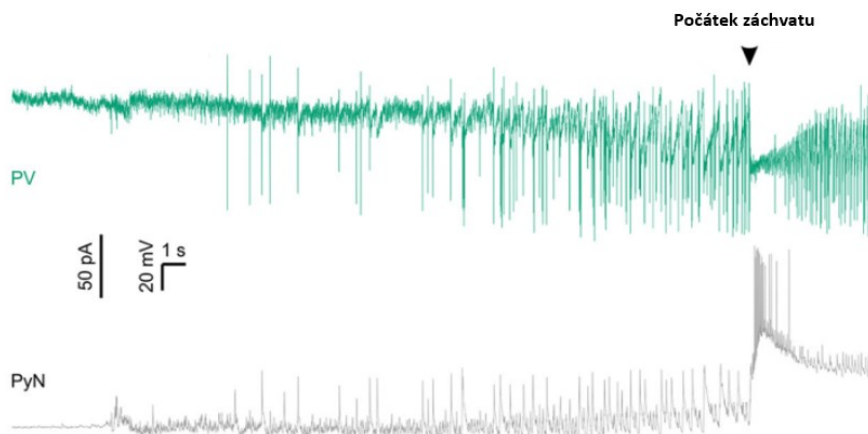
Jedním z mechanismů, kterým mohou PV⁺ interneurony (spolu s dalšími typy interneuronů) přispívat k vzniku epileptických záchvatů je vyvolání nadměrné synchronizované aktivity excitačních neuronů, která se objevuje po vymizení silného inhibičního stimulu, vedoucí k rozvoji záchvatu (Assaf & Schiller, 2016; Chang et al., 2018; Sessolo et al., 2015).

Další teorie jsou založené na zvýšeném vtoku Cl⁻ iontů do pyramidových neuronů v důsledku zvýšené aktivity interneuronů během interiktálních výbojů. Toto zvýšení intracelulární koncentrace pozmění rozložení Cl⁻ iontů uvnitř a vně buňky a při další inhibiční stimulaci neuronu a otevření chloridových kanálů, tečou Cl⁻ ionty ven z neuronu namísto dovnitř a typická hyperpolarizace a inhibice neuronu se buď oslabí nebo dokonce změní na depolarizaci (Alfonsa et al., 2015; Lillis et al., 2012).

Zvýšená aktivita GABAergních interneuronů během interiktálních výbojů může také způsobit vyčerpání synaptických váčků s GABA neurotransmiterem a inhibice je tedy neúčinná (Z. J. Zhang et al., 2012). Dále v důsledku této aktivity dochází k nárůstu extracelulární koncentrace K⁺ iontů, která může vést k hyperaktivaci neuronů, korelující s nástupem aktivity pyramidových neuronů (Librizzi et al., 2017).

Důležitý jev spojený primárně s PV⁺ interneurony a jimi zprostředkovanou inhibicí je nazýván jako depolarizační blok. Příčinou je inaktivace napěťově řízených sodných kanálů vedoucí k neschopnosti interneuronu tvořit akční potenciály (Călin et al., 2021; Fleidervish et al., 1996). *In vitro* studie prokázaly vysokou aktivitu PV⁺ interneuronů následovanou jejich depolarizačním blokem a zrekutování okolních pyramidových neuronů (viz. obrázek č. 9), což dále vedlo k iniciaci (Călin et al., 2021) či propagaci (Cammarota et al., 2013) epileptických záchvatů.

Depolarizační blok je možné narušit vyvoláním hyperpolarizace v PV⁺ interneuronech, čímž je umožněna regenerace napěťově řízených sodných kanálů vedoucí k posílení inhibice a narušení vzniku epileptických záchvatů (Călin et al., 2021).



Obrázek č. 9: Aktivita PV+ interneuronu (zeleně) měřená v cell-attached voltage clamp módu a pyramidového neuronu (šedě) ve whole-cell current clamp módu během epileptického záchvatu. Lze vidět, že na počátku epileptického záchvatu dochází k výraznému snížení aktivity PV+ interneuronů. Převzato a upraveno podle (Călin et al., 2021).

Účinným nástrojem pro studium epileptických záchvatů jsou optogenetické metody. *In vivo* studie z roku 2016 (Assaf & Schiller, 2016) na myších PV+ interneuronech ukázala zajímavé výsledky při optogenetické stimulaci těchto neuronů v závislosti na časovém vztahu k záchvatu. Pokud došlo k stimulaci během interiktální fáze, došlo k iniciaci záchvatu pravděpodobně v důsledku synchronizace pyramidových neuronů (viz. dříve v této kapitole). Naopak stimulace v průběhu záchvatu se ukázala jako účinná pro jeho terminaci.

V další (tentokrát *in vitro*) studii (Sessolo et al., 2015) stimulace v epileptickém ložisku vedla k iniciaci záchvatů, zatímco stimulace PV+ interneuronů mimo ložisko vedla k potlačení propagace záchvatů, či k jejich zkrácení.

2.3.2. Epileptogeneze u FCD

Ačkoliv mechanismy způsobující vznik epileptických záchvatů nejsou v případě fokální kortikální dysplázie objasněné, existuje již řada hypotéz, které by mohly objasnit změny excitačně-inhibiční rovnováhy v oblasti léze projevující se sníženou inhibicí vůči pyramidovým neuronům (Calcagnotto et al., 2005; Cheng et al., 2022).

2.3.2.1. Receptory a transportéry

V rámci léze dochází ke změnám v expresi podjednotek AMPA (Crino et al., 2001), NMDA (André et al., 2004; Crino et al., 2001; Finardi et al., 2006) a GABA_A receptorů (Sharma et al., 2021, 2023; Talos et al., 2012). Exprese AMPA receptorů je pravděpodobně pod kontrolou mTOR signální kaskády (Y. Wang et al., 2006). Podle (Sharma et al., 2023)

souvisí změny v expresi podjednotek GABA_A receptorů s obdobím počátku epileptických záchvatů a zároveň mohou změny ve složení těchto receptorů způsobovat farmakorezistenci (Sharma et al., 2021).

Změny v expresi se týkají i chloridových transportérů NKCC1 a KCC2 (Shao et al., 2022; Sharma et al., 2023; Talos et al., 2012) a vezikulárního GABA transportéru (Koh et al., 2021; Shao et al., 2022). Tyto změny mohou mít za následek posun reverzního potenciálu pro GABA a následný depolarizační účinek na dysmorfní neurony (Shao et al., 2022). Také změny v expresi vezikulárního glutamátového transportéru byly nalezeny (Koh et al., 2021).

2.3.2.2. mTOR dependentní translace

Jelikož mTOR signální kaskáda řídí translaci nepřeborného množství genů, byly produkty těchto genů prozkoumány za účelem zjištění jejich případné úlohy v epileptogenezi. Mezi slibné cíle patří translační inhibitor 4E-BP a další geny, které reguluje; konkrétně adenosin kináza.

Fosforylovaný 4E-BP nemůže vázat eukaryotický iniciační faktor eIF4E a tak ho inhibovat. Knockdown 4E-BP1 společně s RHEB mutantem vložený pomocí *in utero* elektroporace do kortikálních neuronů pomáhá téměř úplně zvrátit neúplnou migraci neuronů normálně se vyskytující u FCD a v případě vložení pouze 4E-BP mutanta dochází i za normální funkce mTOR signální kaskády k narušení migrace neuronů (Lin et al., 2016). Podávání inhibitoru eIF4E metforminu u myši pomáhá v případě včasného zahájení léčby zvrátit patologické změny způsobené hyperaktivací mTOR kaskády i výskyt spontánních epileptických záchvatů (J. K. Kim et al., 2019).

Adenosin kináza (AK) katalyzující přeměnu ATP na adenosin je pod kontrolou 4E-BP, a tedy mTOR signální kaskády a v případě její hyperaktivace je exprese AK zvýšená (J. K. Kim et al., 2019; Koh et al., 2021). Zvýšené množství AK se vyskytuje v mozcích pacientů trpících epilepsií (Masino et al., 2011) a může způsobovat hyperexcitabilitu i u neuronů nezasazených mutacemi v mTOR signální kaskádě (Koh et al., 2021). Podávání inhibitoru AK u myši pomáhá snížit frekvenci a trvání epileptických záchvatů (J. K. Kim et al., 2019). Stejně působí i aktivace adenosinového receptoru A1 (Gouder et al., 2003). Aktivovat tento receptor je možné podáváním ketogenní diety, což vede k redukci množství AK. Tento tlumivý efekt na výskyt epileptických záchvatů je možné opět zvrátit podáním glukózy (Masino et al., 2011).

2.3.2.3. Změny v konektivitě a distribuci

U pacientů trpících FCDIIB bylo zjištěno větší množství perisomatických terminálů PV+ interneuronů kontaktujících pyramidové neurony a výrazné zvýšení těchto synapsí u cytomegalických neuronů (Szekeres-Paraczky et al., 2022). Zdá se, že neobvyklá konektivita se neobjevuje pouze v oblasti léze, ale i excitační projekce do kontralaterální hemisféry jsou posílené a mohou být příčinou hyperexcitability i v nezasazených oblastech mozku (Proietti Onori et al., 2021).

Často diskutovaným tématem jsou změny distribuce a počtu interneuronů, a to primárně těch pozitivních na parvalbumin. Výsledky však nejsou konzistentní a buď se jedná o ztrátu pouze PV+ interneuronů (Liang et al., 2020; Nakagawa et al., 2017; T. Yang et al., 2022), změnu distribuce PV+ interneuronů (Calcagnotto et al., 2005; Medici et al., 2016), ztrátu všech neuronů bez rozdílu (Zhong et al., 2021) nebo některé studie neprokázaly žádnou z možností či je netestovaly všechny (Hsieh et al., 2016; Koh et al., 2021).

Rozdíly se objevují i mezi vzorky lidských a zvířecích mozků (viz. tabulka č. 2), což by mohlo být způsobeno i rozdíly v původu PV+ interneuronů. Zatímco u myši pocházejí pouze z mediální ganglionické eminence (Fogarty et al., 2007), u lidí tato frakce tvoří pouze 35 % a zbytek má původ ve ventrikulární či subventrikulární zóně stejně jako kortikální neurony a glie (Letinic et al., 2002). Dále se také liší výsledky v závislosti na konkrétním podtypu FCDII, tedy FCDIIa nebo FCDIIb (viz. tabulka č. 2). Některé studie také nespecifikují, který podtyp byl zkoumán (Calcagnotto et al., 2005; Medici et al., 2016) a v myších modelech je často těžké toto rozlišit a udává se pouze FCDII (Hsieh et al., 2016). Některé studie také pracují se vzorky nacházejícími se v celém spektru FCDII/HME (Koh et al., 2021; T. Yang et al., 2022).

Nejenom PV+ interneurony ale vykazují změny v počtu či distribuci. Například u lidských pacientů trpících FCDIIb bylo pozorováno zvýšení počtu disynaptických VIP+ interneuronů (Liang et al., 2020).

Tabulka č. 2: Tabulka znázorňující variabilitu výsledků ze studií zabývajících se změnou počtu PV+ interneuronů u pacientů nebo v animálních modelech fokální kortikální dysplázie. Autor: Jana Populová.

	Snížení počtu PV+	Změny v distribuci PV+	Ztráta všech neuronů	Neprůkazné výsledky
Lidské vzorky	(Liang et al., 2020; Nakagawa	(Calcagnotto et al., 2005; Medici		

	et al., 2017)	et al., 2016)		
Zvířecí vzorky	(T. Yang et al., 2022)		(Zhong et al., 2021)	(Hsieh et al., 2016; Koh et al., 2021)
FCDII		(Calcagnotto et al., 2005; Medici et al., 2016)		(Hsieh et al., 2016)
FCDIIa			(Zhong et al., 2021)	
FCDIIb	(Liang et al., 2020; Nakagawa et al., 2017)			
FCD/HME	(T. Yang et al., 2022)			(Koh et al., 2021)

2.4. Akutní model epilepsie: pentylentetrazol

Akutní modely epilepsie umožňují i v normální mozkové tkáni vyvolat epileptickou aktivitu, což dovoluje studovat například jak záchvat probíhá a které mozkové oblasti jsou během něj aktivní (Van Camp et al., 2003), dále jaké má záchvat následky v neuronálních sítích (Giachello et al., 2013; Ueno et al., 2019) a v neposlední řadě umožňují testování léků proti epilepsii (Barton et al., 2001). Na rozdíl od chronických modelů ovšem nedochází k indukci spontánních záchvatů.

Akutních modelů je celá řada a jsou založené na různých principech. Velice často používané jsou například modely založené na blokaci inhibice: pentylentetrazol (R Ramanjaneyulu & Ticku, 1984); posílení excitace: kainát (Friedman et al., 1994); či elektrické stimulaci (Wláz et al., 1998). Pentylentetrazol (dále jako PTZ) je organická látka vázající se na pikrotoxinové místo na GABA_A receptorech, kde blokuje iontový kanál (R Ramanjaneyulu & Ticku, 1984) a nedovoluje chloridovým iontům vstoupit do buňky (Pellmar & Wilson, 1977b).

Je využíváno několik způsobů podání; intravenózní (i.v.), subkutánní (s.c.), intraperitoneální (i.p.), intracerebroventrikulární (i.c.v.), přičemž mezi nimi existují rozdíly především v rychlosti nástupu záchvatů a dávce nutné k jejich vyvolání. Při i.v. a i.c.v. podání záchvaty nastupují velice rychle, zatímco při s.c. a i.p. je třeba počítat se zpožděním až několika desítek minut a dávka potřebná k vyvolání záchvatu může být vyšší (Brevard et al., 2006; Mandhane et al., 2007; H. Yang et al., 2019).

Co se způsobu podání týče, další rozdíl je i v účinku antiepileptických léčiv testovaných ve stejném modelu například při s.c. a i.v. podání (Mandhane et al., 2007). Tato studie

porovnávala i účinnost různých léčiv mezi akutním modelem epilepsie indukovaným PTZ a elektrickou stimulací a výsledky se mezi modely lišily. Při testování nových léčiv je tedy nutné brát v potaz, jakým mechanismem akutní model záchvatu indukuje a jak potenciální léčivo tuto aktivitu blokuje. Při indukci epileptické aktivity pomocí PTZ jsou tedy pravděpodobně nejúčinnější léčiva indukující GABA aktivitu (Mandhane et al., 2007).

Jaké oblasti mozku jsou během PTZ záchvatu aktivní se dá sledovat například pomocí magnetické rezonance, nahrávání EEG či exprese c-fos (Brevard et al., 2006; Morgan et al., 1987; Van Camp et al., 2003; H. Yang et al., 2019). Z těchto studií je patrné, že nejaktivnější v průběhu záchvatu jsou hippocampus, amygdala, kortex a thalamus, ale aktivní jsou i další struktury: hypothalamus či mozkový kmen. Úlohu v iniciaci záchvatu mají podkorové struktury, ze kterých se epileptická aktivita rozšiřuje do korových oblastí.

Zajímavé je, že ve studiích s c-fos geny dochází po několika hodinách k silnému překryvu exprese c-fos s imunoreaktivitou pro parvalbumin, což podle (H. Yang et al., 2019) naznačuje, že PV+ interneurony se podílí na post-excitační inhibici. U ostatních neuronů přitom ve stejném časovém okamžiku došlo k inhibici exprese c-fos pod normální hladiny, což koreluje i s potlačením elektrické aktivity viditelné na EEG záznamu (H. Yang et al., 2019).

3. Cíle práce

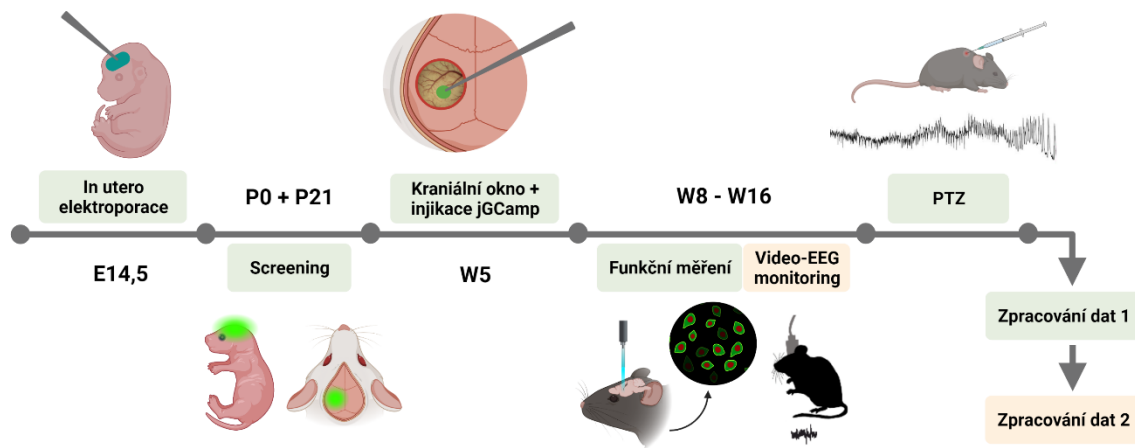
- 1) Osvojení a optimalizace metod potřebných pro vytvoření myšího modelu FCDII
- 2) Vytvoření myšího modelu FCDII s označenými parvalbuminovými interneurony
- 3) Vyhodnocení aktivity neuronů během epileptického záchvatu v FCD modelu

4. Materiál a metody

Všechny metody byly provedeny v souladu se směrnicemi Evropské rady z 22. září 2010 (2010/63/EU) a zároveň podle protokolů schválených odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat na 2. lékařské fakultě.

4.1. Experimentální zvířata

V tomto experimentu byly používány transgenní myši vytvořené křížením PV-IRES-Cre (#012358) a linií flex-tdTomato (#007909). Díky tomu byl červený fluorescenční protein tdTomato u potomků těchto myši exprimován v PV+ interneuronech. Využíváno bylo samic i samců. Všechna zvířata byla ustájena ve zvěřinci při teplotě 21-23°C. Byl dodržován režim 12 hodin světla/12 hodin tmy. Zvířatům byla podávána voda a potrava *ad libitum*.



Obrázek č. 10: Časové rozvržení pokusu. Zeleně znázorněny úkony prováděné mnou, žlutě úkony prováděné někým jiným. Vytvořeno v programu BioRender.

4.2. *In utero* elektroporace

Plazmidy (pCAG-iRFP a pCAG-MUTmTOR (mutace p.Leu2427Pro)) byly ze zásobních roztoků naředěny pomocí 0,03% Fast Green (Sigma, katalogové č. F7252) tak, aby finální koncentrace pCAG-iRFP byla 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a pCAG-MUTmTOR 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Fast green vyjma naředění pomáhá zviditelnit plazmidy během elektroporace.

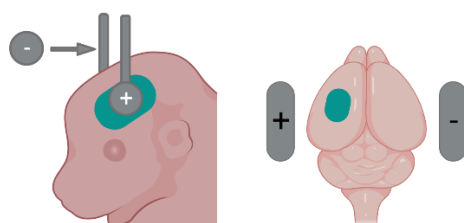
Skleněné kapiláry (Harvard apparatus, 30-0037) byly připraveny pomocí tahače Pipette Puller (KOPF, California, USA) a následně manuálně dobroušeny na požadovaný průměr (40 – 60 μm).

Těhotná samice (elektroporace provedená 14. den těhotenství zajišťuje cílení mutované oblasti do 2/3 vrstvy kortexu) byla na vyhřívací destičce (37°C) uvedena do anestezie pomocí

směsi isofluoranu s kyslíkem (Baxter, 4-5 % pro navození anestezie, 1-2 % pro její udržení, průtok 0,5 l/min) a na oči jí byl nanesen ophthalmic septonex za účelem zabránění vysychání. Subkutánně byl samici podán carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg) pro zmírnění pooperační bolesti. Pomocí holicího strojku byla z břicha odstraněna srst a bylo ve středu nastříženo tak, aby z něj bylo na dobu operace možno bezpečně vyjmout embryo.

Mix plazmidů byl manuálně injikován do levé komory mozkové každého z embryí. Plazmidy byly doručeny do buněk pomocí elektroporačních kleští (Nepagene, 3mm, CUY650P3) zapojených do elektroporátoru (výroba: Ing. Ondřej Novák, Ph.D., do embryí doručí 5 pulzů (35 V, 50 ms) s 950ms intervalem mezi pulzy) přiložených laterálně na hlavu každého z embryí (viz. obrázek č. 11). Před elektroporací jsou embrya vždy polévána 2x koncentrovaným PBS (teplota 40°C) pro zvýšení úspěšnosti elektroporace, mimo to jsou průběžně polévána 1x koncentrovaným PBS (teplota 40°C), aby se zabránilo jejich vysušení a pro udržení optimální teploty.

Po dokončení byla embryo vrácena zpět do břišní dutiny a podkoží i kůže zašity (Chirurgické šití, Chirmax). Na ránu byl nanesen novikov a samice byla probuzena ukončením anestezie. V rámci pooperační péče byl samicím po dobu tří dnů podáván carprofen (5 mg/kg, s.c.) nebo rimadyl (50 µg/ml) do napájecí vody.



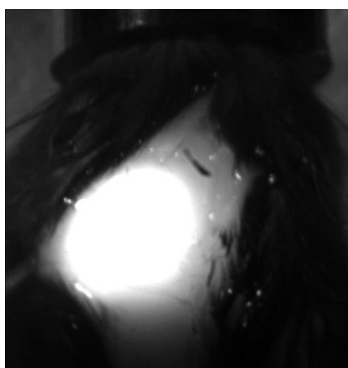
Obrázek č. 11: Schéma přiložení elektrod při elektroporaci. Nalevo laterální pohled na embryo z levé strany. Napravo dorzální pohled na myši mozek. Zeleně je označena levá komora s obsahem plazmidu, šedě elektrody. Vytvořeno v programu BioRender.

4.3. Screening P0

Pro určení úspěšnosti elektroporace byl po narození u mláďat ve věku 1-2 dny prováděn screening pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Intraco micro, STM 823 N) po excitaci iRFP laserem (690 nm). V tomto věku se dá exprese iRFP sledovat neinvazivně i přes lebku a kůži a mláďata s dostatečnou expresí byla určena pro další fázi projektu.

4.4. Screening P21

Další screening se prováděl během 21. postnatálního dne pro určení velikosti a umístění léze. Mláďata byla uvedena do anestézie pomocí směsi isofluoranu s kyslíkem (Baxter, 4-5 % pro navození anestezie, 1-2 % pro její udržení, průtok 0,5 l/min) a na oči jim byl nanesen ophthalmol septonex za účelem zabránění vysychání. Subkutánně byl myši podán carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg) pro zmírnění pooperační bolesti. Kůže na hlavě byla pomocí depilačního krému zbavena srsti a na holé místo byl nanesen betadine (Egis Pharmaceuticals, PLC). Toto místo bylo nastříženo za účelem odhalení měkkých tkání na lebce. Opět byla pomocí epifluorescenčního mikroskopu (Intraco micro, STM 823 N) a iRFP laseru (690 nm) sledována exprese iRFP (viz. obrázek č. 12). Kůže byla po dokončení screeningu opět sešita (Chirurgické šití, Chirmax), na ránu byl nanesen novikov a myš byla probrána z anestézie. Pouze myši s dostatečně velkou unilaterální lézí byly vybrány pro implantaci kraniálního okna.



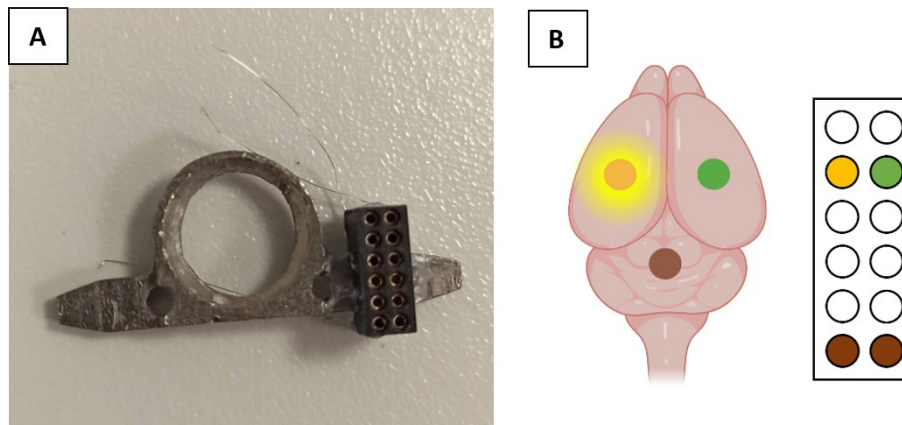
Obrázek č. 12: Fluorescence iRFP přes při P21 screeningu.

4.5. Implantace kraniálního okna

Vybraným zvířatům bylo kraniální okno implantováno ve věku 5-6 týdnů. Po celou dobu operace byly myši umístěny na vyhřívací destičce (37°C). Pro anestezii byl použit isofluoran ve směsi s kyslíkem (Baxter, 4-5 % pro navození anestezie, 1-2 % pro její udržení, průtok 0,5 l/min). Na oči byl nanesen ophthalmol septonex, aby se zabránilo jejich vysychání. Za účelem zajištění lepších výsledků operace a zmírnění bolesti, byla zvířata premedikována dexamethasonem (Sigma-Tec Pharmaceuticals Industries, 2 mg/kg) pro snížení pravděpodobnosti vzniku edému mozku, atropinem (Biotika, 0,025 mg, s.c.) pro zlepšení průchodnosti dýchacích cest a lidokainem (Egis Pharmaceuticals, PLC, 2%, 50 – 100 µl, s.c.) za účelem navození analgésie v místě rány.

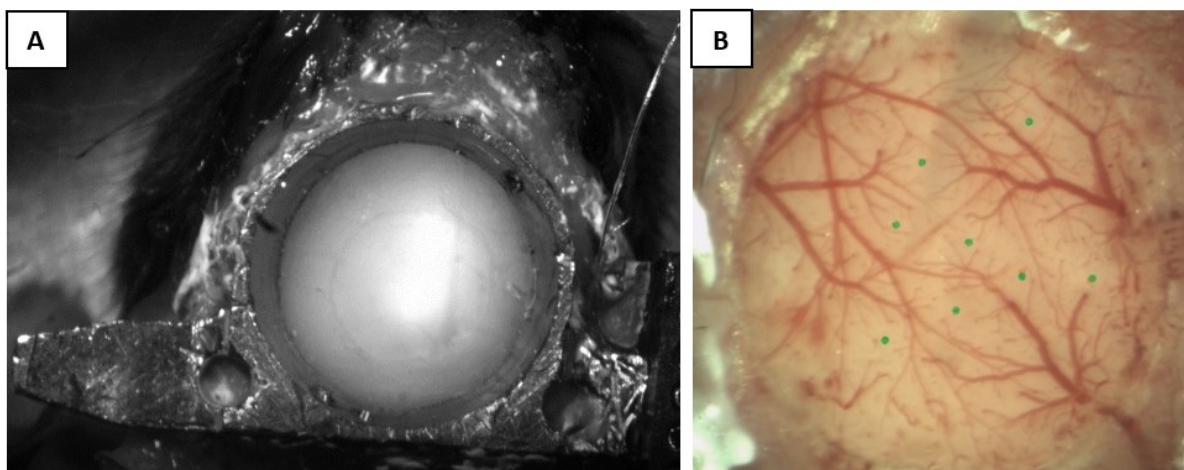
Pomocí depilačního krému byla z hlavy odstraněna srst a do kůže byl vystřížen kruhový otvor. Parietální kosti byly odhaleny a důkladně očištěny od měkkých tkání. Nad mozečkem

byl vyvrtán otvor pomocí vysokorychlostní chirurgické vrtačky (Osada Succes 40) pro zemnicí elektrodu (Science Products, Pt/Ir, obalen PFA, vnitřní průměr 20 μm , vnější průměr 40 μm) a nad pravou hemisférou pro kontralaterální elektrodu a obě byly pod lebku zasunuty a upevněny na místě pomocí tkáňového lepidla. Na lebku byla nanесena tenká vrstva lepidla, ke které byla přilepena kruhová titanová konstrukce (headbar, výroba: Ing. Ondřej Novák, Ph.D.) tak, aby uprostřed byla umístěna léze. Na pravou stranu tohoto headbaru byl již předem připraven konektor (Precidip, 2řadý, RM 1,27 mm, SMD) s elektrodami (viz. obrázek č. 13).



Obrázek č. 13: (A) Headbar s konektorem a elektrodami. (B) Rozložení elektrod na konektoru: žlutá (léze, měřicí elektroda), zelená (kontralaterální hemisféra, měřicí elektroda), hnědá (mozeček, zemnicí elektroda).

Následně byla nad lézí manuálně provedena kraniotomie (průměr 4 mm) pomocí vysokorychlostní chirurgické vrtačky a tato část lebky byla opatrně odstraněna tak, aby nedošlo k porušení dury mater. Během vrtání byla lebka opakovaně zalévána fyziologickým roztokem uloženým na ledu za účelem ochlazení a očištění lebky. Do odhaleného mozku bylo do 6-10ti vybraných míst do hloubky 250 μm (2-3 vrstva kortexu) injikováno dvakrát 30 nl kalciového indikátoru pGP-AVV-syn-jGCamp8m-WPRE (Addgene, katalogové č. 162375) o koncentraci $5 \cdot 10^{11}$ GC/ml rychlostí 0,1 nl/s za použití skleněné kapiláry (Drummond Scientific, 3-000-203-G/X, 30° úhel, manuálně dobroušené na vnější průměr 10-15 μm) držené na místě po dobu 5 minut pro umožnění rozšíření viru. Injikace probíhaly pomocí injektoru Nanoject III (Drummond Scientific). Místa pro injikace byla vybrána tak, aby byla zasažena místa v lézi i mimo ní (viz. obrázek č. 14).



Obrázek č. 14: (A) Ověření umístění léze pro injekci. (B) Kraniální okno s naznačením míst vpichů kalciového indikátoru.

Kraniotomie byla uzavřena pomocí 4mm sklíčka (Warner Instruments, No. 1 Glass Coverslip 4 mm Round (100)). Pod něj byla do mozkové kůry pod duru mater v oblasti léze zasunuta měřicí elektroda a spolu se sklíčkem upevněná tkáňovým lepidlem k lebce.

Následující tři dny po operaci byl zvířatům každý den podáván carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg) za účelem zmírnění pooperačních bolestí.

4.6. Video-EEG monitoring

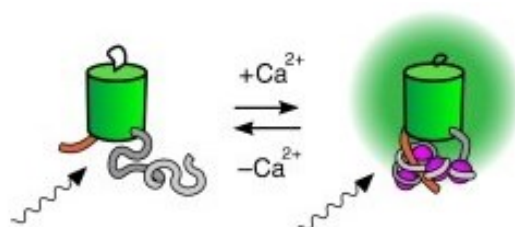
Přibližně dva týdny po operaci byla zvířata připojena na video-EEG monitoring, kde byla po zbývajícím času experimentu kontinuálně nahrávána elektrická aktivita mozku z obou elektrod, synchronizovaná s videozáznamem. Teplota v místnosti byla udržována při $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a byl zajištěn světelný režim 12h světla/12 h tmy. Experiment probíhal v otevřených klecích, což umožňovalo veškerou interakci kromě fyzického kontaktu. Během experimentu bylo použito motorizovaných komutátorů a vyrovnávacích ramen, aby se zvířata mohla volně pohybovat v kleci během experimentu. Průběžné sledování zvířat bylo prováděno po celou dobu studie, kromě víkendů. Voda a potrava byla zvířatům podávána *ad libitum*.

Spontánní elektrografická aktivita byla zesílena a filtrována v propustném pásmu 0,1 Hz - 1,6 kHz pomocí headstage (Intan Technologies, USA, RHD2132) a vzorkována s frekvencí 5 kHz AD převodníkem RHD2000 USB Interface Evaluation Board (Intan Technologies, USA). EEG bylo nakonec uloženo do počítače pomocí programu Spike2 v.10 (Spike2 software, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) a dále analyzováno pomocí vlastních skriptů v prostředí Matlab 2019b-2021b (Mathworks Inc., USA).

Video bylo nahráváno pomocí kamery acA1280-60gm (Basler AG, Ahren, Germany) a zaznamenáno programem Pylon Viewer (Basler AG, Ahren, Germany), při min. 15 snímcích za sekundu v černobílé kvalitě s rozlišením HD.

4.7. Calcium imaging

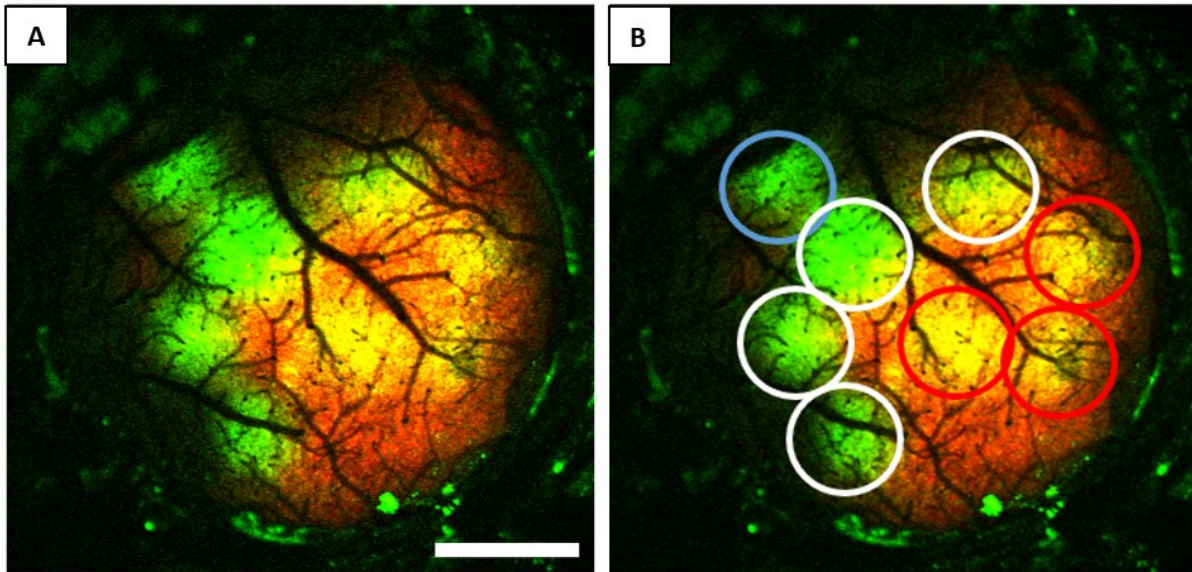
Kalciový indikátor jRCaMP1a je vložen do genu pro synapsin a spolu s ním je exprimován a následně transportován do cytoplazmy. Depolarizace neuronu vede k vtoku vápenatých iontů do cytoplazmy, kde dojde k jejich vazbě na protein indikátoru, konkrétně na kalmodulin, jež je součástí této molekuly. Tato vazba následně spustí změny ve struktuře indikátoru a dojde k deprotonaci chromoforu (zde zelený fluorescenční protein GFP), což vede k zahájení fluorescence (viz. obrázek č. 15, (Pérez Koldenkova & Nagai, 2013)).



Obrázek č. 15: Schématické znázornění funkce kalciového indikátoru (Pérez Koldenkova & Nagai, 2013).

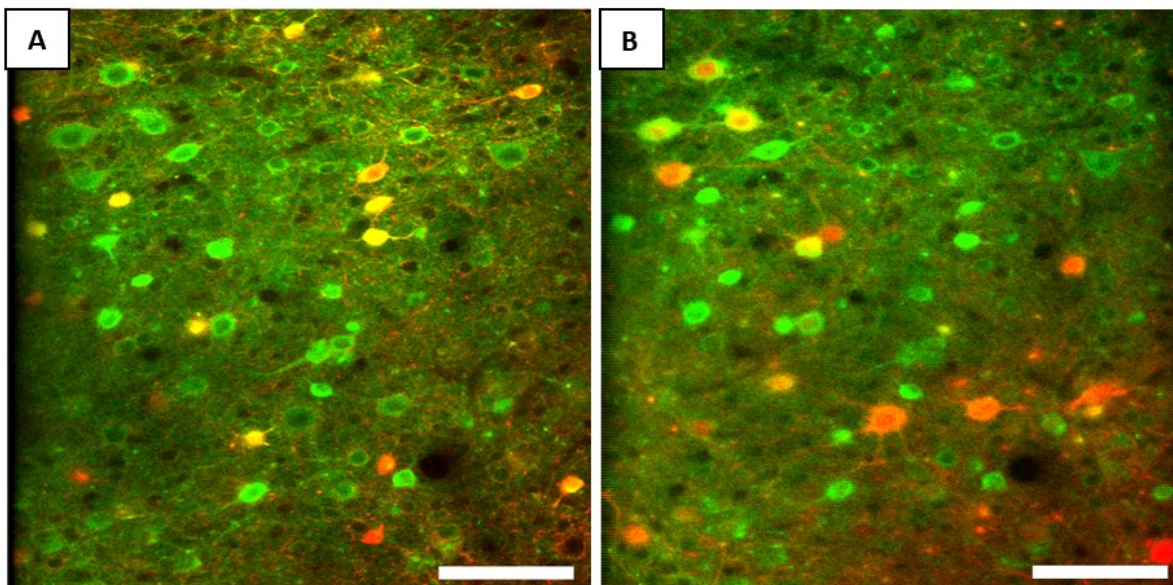
Třetí týden po injikování kalciového indikátoru byla jeho exprese dostatečná pro sledování fluorescenčního signálu znázorňujícího aktivitu neuronů. Použitý dvoufotonový mikroskop byl sestaven Ing. Ondřejem Novákem Ph.D. na základě dostupných informací z (Rosenegger et al., 2014) pro tvorbu excitační dráhy a (Kazemipour et al., 2019) pro tvorbu emisní dráhy. Za účelem sledování aktivity neuronů byla myš upevněna za headbar do stojanu tak, aby hlava byla pevně zafixována v jedné poloze. Pomocí laseru byla pozice hlavy ve stojanu vyrovnána tak, aby sklíčko zakrývající kraniální okno bylo vodorovně a každý týden se tedy snímalo ze stejné roviny.

Nejprve bylo třeba provést zmapování operované oblasti a vybrání oblastí pro další měření. Tato místa (fields of view, FOV) byla vybírána tak, aby pokud možno byla některá v lézi (a obsahovala dysmorfní neurony a PV+ interneurony) a jiná mimo lézi (PV+ interneurony). Počet těchto FOV se lišil v závislosti na myši, velikosti léze a jejím zachycení do kraniálního okna. Běžně bylo vybíráno 5 – 10 FOV (viz. obrázek č. 16).



Obrázek č. 16: (A) Mapování léze pod dvoufotonovým mikroskopem. Červená oblast je dána expresí iRFP, zelená znázorňuje expresi kalciového indikátoru, žlutá překryv iRFP a kalciového indikátoru. (B) Vybraná FOV v lézi (červená kolečka), na okraji léze (bílá kolečka) a mimo lézi (modrá kolečka). Měřítko = 1 mm.

Tato FOV byla poté měřena jednou týdně po dobu osmi týdnů. Pro každé FOV bylo naměřeno dvakrát pětiminutové EEG zároveň s nahráním záznamu kalciového signálu pomocí laditelného femtosekundového laseru. Data byla nahrávána v kombinaci parametrů: rozlišení 512 x 512; 30 fps; 920 nm; výkon < 100 mW pod objektivem (Olympus XLUMPFLN 20x NA1.0 WD2.0). Spolu s tím byly pořízeny fotky při rozdílných vlnových délkách, což umožňuje při zpracování dat lépe rozeznat typy neuronů: 920 nm (signál z jRCaMP1a - zelená), 980 nm (PV+ interneurony - žlutá) a 870 nm (dysmorfní neurony – červená). Ze stejného důvodu byly také fotky pořizovány za použití dvou rozdílných emisních filtrů, a to na iRFP a tdTomato (viz. obrázek č. 17). Po každém měření byla zvířata ponechána jeden den bez napojení na EEG-monitoring kvůli odpočinku a následně bylo opět zahájeno monitorování.



Obrázek č. 17: (A) Obrázek FOV za použití filtru tdTomato (920 nm). Zeleně jsou označeny neurony exprimující kalciový indikátor, červeně PV+ interneurony exprimující tdTomato, žlutě PV+ interneurony exprimující zároveň kalciový indikátor a tdTomato. Obří zelené neurony jsou dysmorfní. (B) Stejně FOV za použití filtru iRFP (920 nm). Zeleně označené neurony exprimují kalciový indikátor, červeně dysmorfní neurony exprimující iRFP, žlutě dysmorfní neurony exprimující kalciový indikátor a iRFP. Signál z tdTomato je při použití iRFP filtru slabý a nelze je při tomto nastavení rozeznat. Měřítko = 100 μ m.

4.8. PTZ

Po dokončení všech osmi měření na dvoufotonovém mikroskopu byl proveden závěrečný experiment za účelem uměle navodit epileptický záchvat. Během nahrávání kalciového a EEG signálu na dvoufotonovém mikroskopu byl myším subkutánně podáván pentylenetetrazol (Sigma-Aldrich, 2 mg/ml) až do vyvolání záchvatu. Za tímto účelem bylo třeba podat 55 ± 25 mg/kg.

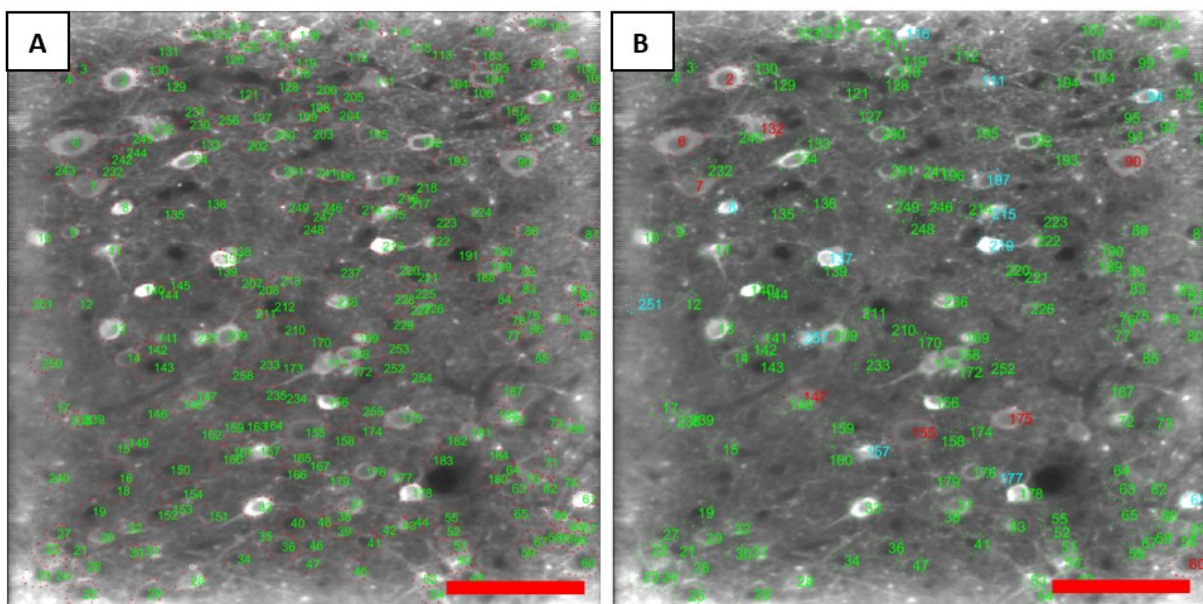
4.9. Perfúze

Pro provedení transkardiální perfúze byla zvířata uspána pomocí intraperitoneální injekce se směsí ketamin (Calypsol, 150 mg/kg)/xylazin (Xylapan, 12,5 mg/kg). Byla nastřížena hrudní dutina a prostřížena bránice. Do levé komory srdeční byla zavedena jehla a pravá srdeční síň byla prostřížena. Následně byla myš promyta roztokem PBS (50 ml) a dále 4% roztokem paraformaldehydu (50 ml) podávaným skrze jehlu do srdeční komory. Mozek byl opatrně vyjmut z lebky a přes noc ponechán v roztoku PFA a následně skladovaný v PBS s azidem (Sigma).

4.10. Zpracování dat

4.10.1. Kalciový signál

Veškeré zpracování probíhalo pomocí skriptů v programu Matlab 2019b-2021b (Mathworks Inc. USA). Po každém měření byl záznam kalciového signálu zprůměrován a výsledný obrázek byl použit pro další zpracování. Obrázky byly kompenzovány na pohybové artefakty metodou NoRMCorr (Pnevmatikakis & Giovannucci, 2017). Fluorescenční záznamy pro jednotlivé neurony byly počítány jako průměry jejich světelné intenzity v rámci ROI pro každý časový bod. Měření z druhého nebo třetího týdne bylo použito pro manuální výběr (kroužkování, viz. obrázek č. 18) všech sledovaných neuronů (regions of interest, ROIs). Toto měření s vybranými ROI bylo použito pro označení (labelování, viz. obrázek č. 18) neuronálních typů (dysmorfní neuron, pyramidový neuron, PV+ interneuron). Pro ostatní měření bylo nutné vybrané ROIs transformovat a upravit tak, aby označené neurony odpovídaly referenčnímu měření z kroužkování (warpování).



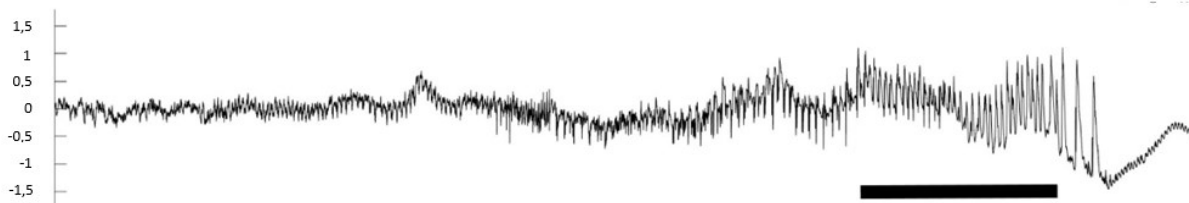
Obrázek č. 18: (A) Výstup z procesu kroužkování. (B) Výstup z označení neuronálních typů. Dysmorfní neurony (červeně), PV+ (modře), pyramidové neurony (zeleně). Měřítko = 100 μ m.

4.10.2. EEG data

EEG data byla zpracována a analyzována pomocí skriptů v prostředí Matlab 2019b-2021b (Mathworks Inc. USA). Na záznamech z video-EEG monitoringu a dvoufotonového mikroskopu byly označeny záchvaty podle následujících kritérií (viz. obrázek č. 19):

- 1) Záchvat se rozvíjí pomalu a postupně graduje.
- 2) Obsahuje výboje s vysokou amplitudou a frekvencí.

- 3) Na konci záchvatu se frekvence zpomaluje a amplituda zvyšuje.
- 4) Po ukončení záchvatu obvykle dochází k ztenčení křivky EEG (menší amplituda než před začátkem záchvatu).



Obrázek č. 19: Spontánní epileptický záchvat. Jednotky na ose y jsou v mV. Měřítka = 10 s.

4.10.3. Statistická analýza

Všechna data byla zpracována v programu Matlab 2019b-2021b (Mathworks Inc., USA). Analýzu počtu a velikosti neuronů i analýza PTZ záchvatů byla realizována ověřenou metodou (Rehorova et al., n.d.).

Pro vyhodnocení velikosti a počtu neuronů byl použit referenční záznam z funkčního měření, na kterém bylo provedeno kroužkování a označení neuronálních typů. Použit byl neparametrický Wilcoxon rank sum test. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, pokud p -hodnota $< 0,05$. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM).

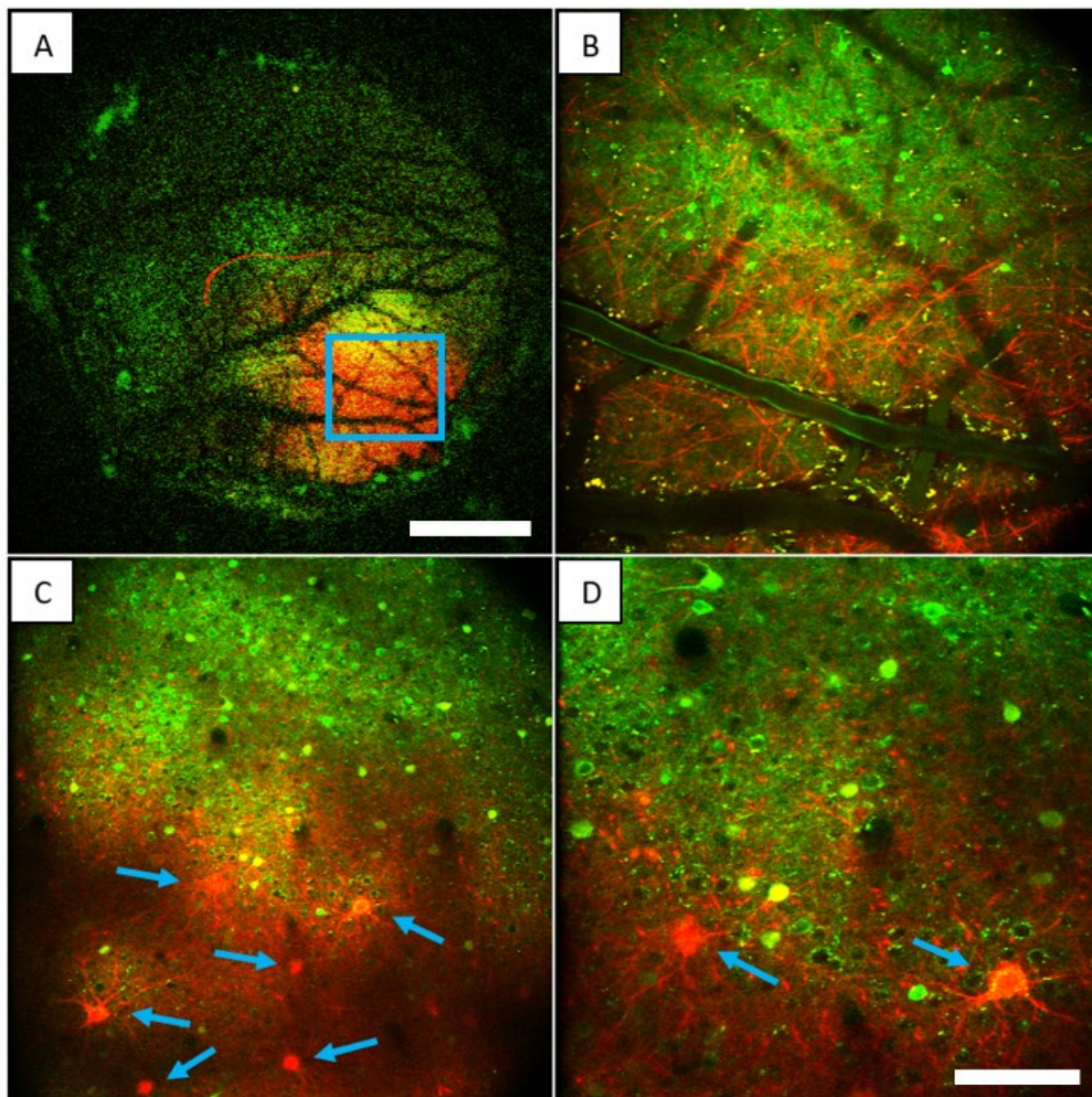
Pro vyhodnocení poklesu fluorescence po terminaci epileptického záchvatu byl použit neparametrický Mann Whitney Wilcoxonův test. Statistický test byl proveden v každém časovém bodě ($n = 600$). Nebyla provedena korekce pro mnohočetná srovnání. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, pokud p -hodnota $< 0,05$.

5. Výsledky

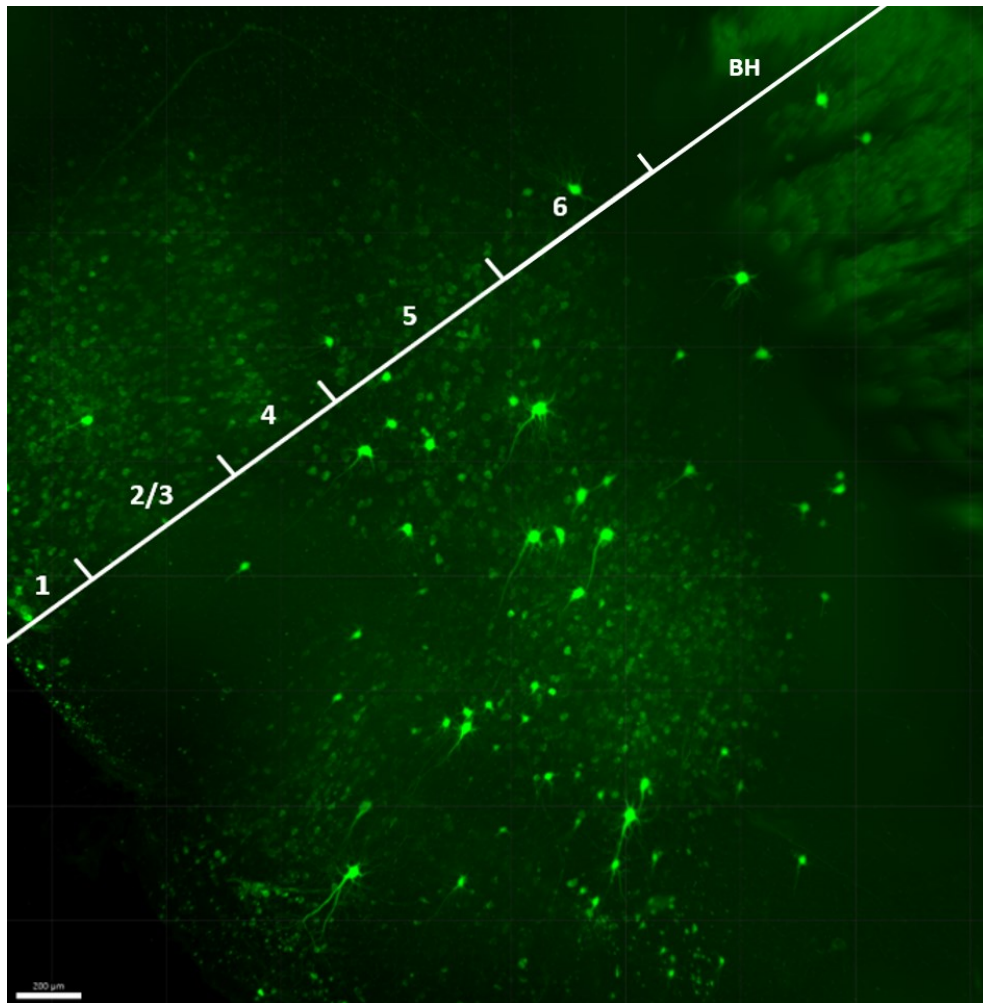
5.1. Charakterizace myšního modelu fokální kortikální dysplázie II

Myšší model FCDII byl vytvořen *in utero* elektroporací plazmidu s mutovaným mTOR genem (mutace pLeu2427Pro) a plazmidu iRFP pro detekci léze. Všechny myši (n = 8) měli unilaterální lézi v levé hemisféře v temporálním laloku (n = 5) nebo zasahující temporální a frontální lalok (n = 3).

Tkáň v oblasti léze vykazovala morfologické vlastnosti podobné jiným modelům (Lim et al., 2015). Přítomnost cytomegalických dysmorfních neuronů s velkými jádry a mohutnou arborizací (viz, obrázek č. 20) byla patrná u všech myší stejně jako kortikální dyslaminace (viz. obrázek č. 21). Neurony byly rozptýleny napříč kortikálními vrstvami a i v bílé hmotě.



Obrázek č. 20: Přítomnost dysmorfních neuronů charakterizující fokální kortikální dysplázií. (A) Expresse iRFP (červená) a jGCamp8 (zelená). Žlutá značí překryv iRFP a jGCamp8. Modrý obdélník zobrazuje FOV následně zvětšené v obrázcích B-D. Měřítko = 1 mm. (B) Vyznačené FOV na povrchu mozku. Měřítko = 100 μ m. (C) Stejné FOV v hloubce 155 μ m. Šipky označují dysmorfní neurony. Měřítko = 100 μ m. (D) Stejné FOV v hloubce 155 μ m při větším přiblížení než obrázek C. Měřítko = 100 μ m.

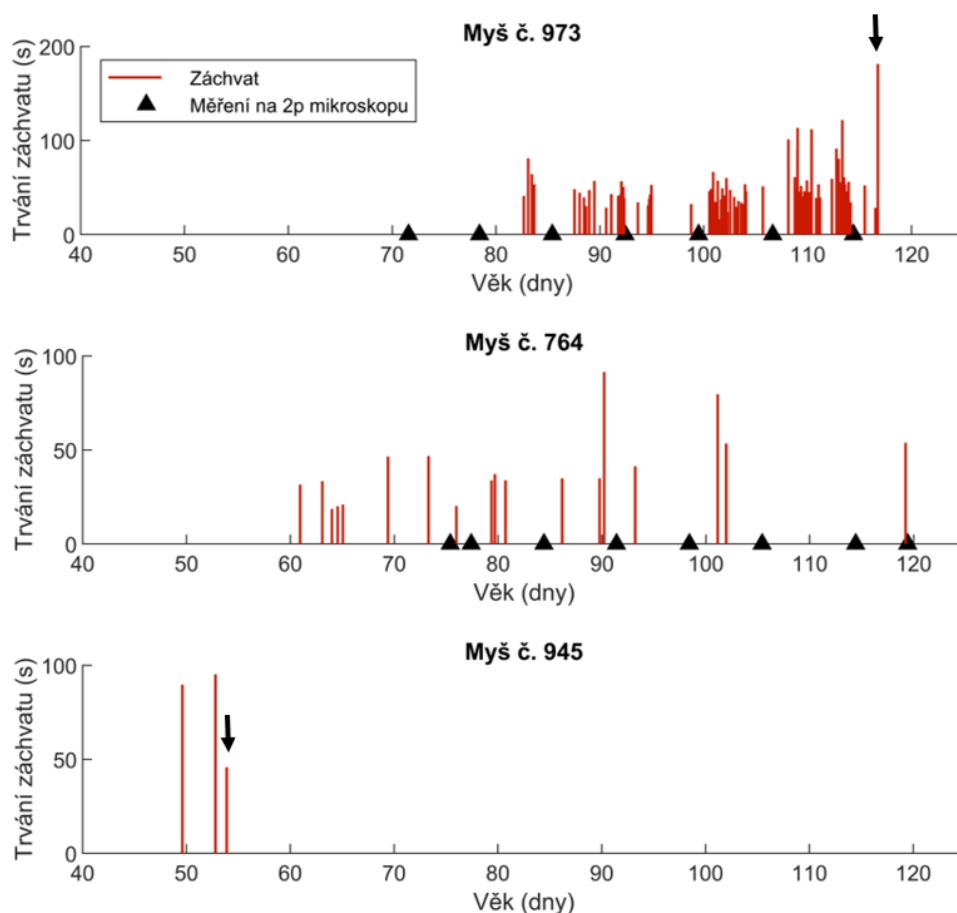


Obrázek č. 21: Poruchy migrace doprovázející změny v kortexu postiženém fokální kortikální dysplázií. Na obrázku je vyznačeno přibližné umístění kortikálních vrstev (1-6) a bílé hmoty (BH). Zeleně jsou označeny neurony exprimující kalciový indikátor jGCamp8. Mezi neurony lze rozeznat obří dysmorfní neurony nacházející se i v bílé hmotě pod kortexem. Obrázek byl pořízen oskenováním mozku po perfúzi na lighsheet mikroskopu a zpracováním v programu Imaris. Měřítko = 200 μ m.

Přibližně dva týdny po operaci byla zvířata napojena na video-EEG monitoring a další dva měsíce nahrávána pro vyhodnocení četnosti spontánních záchvatů. Ty byly pozorovány u 3/8 myši (označené jako 973, 764 a 945, viz. obrázek č. 22). Dvě z nich (973, 945) zemřeli předčasně na SUDEP. První záchvaty se objevily ve věku 12 (973), 9 (764) a 7 (945) týdnů.

Podle grafu rozložení záchvatů na obrázku č. 22 se zdá, že u myši č. 973 a č. 764 dochází k shlukování jednotlivých záchvatů do klastrů a především u myši č. 973 k postupnému zkracování délky záchvatu v rámci klastru. U myši č. 973 se délka záchvatu postupem času prodlužuje, přičemž záchvat, který je příčinou smrti je výrazně delší. Myš č. 945 umírá po pouhých třech záchvatech, ty jsou ovšem v porovnání s č. 973 a č. 764 výrazně delší.

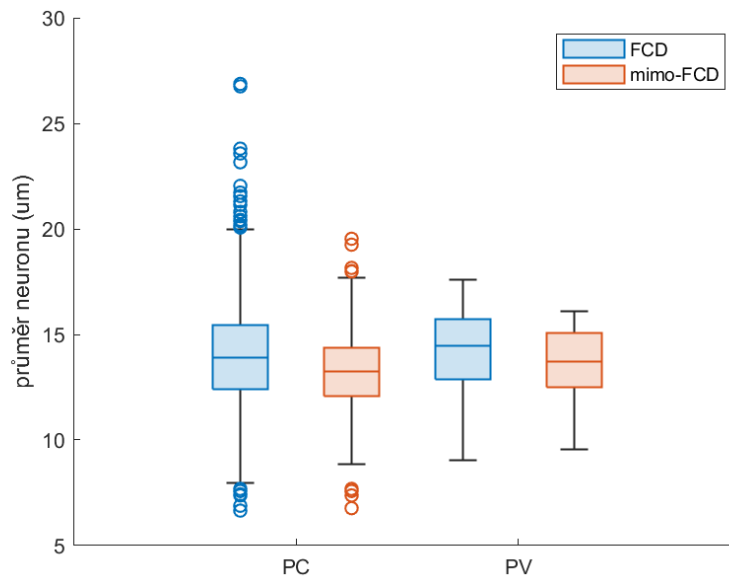
U záchvatujících myší (n = 3) byla léze v jednom případě umístěna pouze v temporálním laloku a ve dvou zasahovala do oblasti frontálního laloku. U nezáchvatujících (n = 5) byla převážně v temporálním laloku (n = 4) a pouze u jedné myši byla umístěna částečně ve frontálním laloku.



Obrázek č. 22: Rozložení záchvatů u tří záchvatujících myší spolu se zobrazením funkčních měření na dvoufotonovém mikroskopu. Černá šipka označuje u myši s předčasnou smrtí záchvat, který byl příčinou úmrtí (SUDEP).

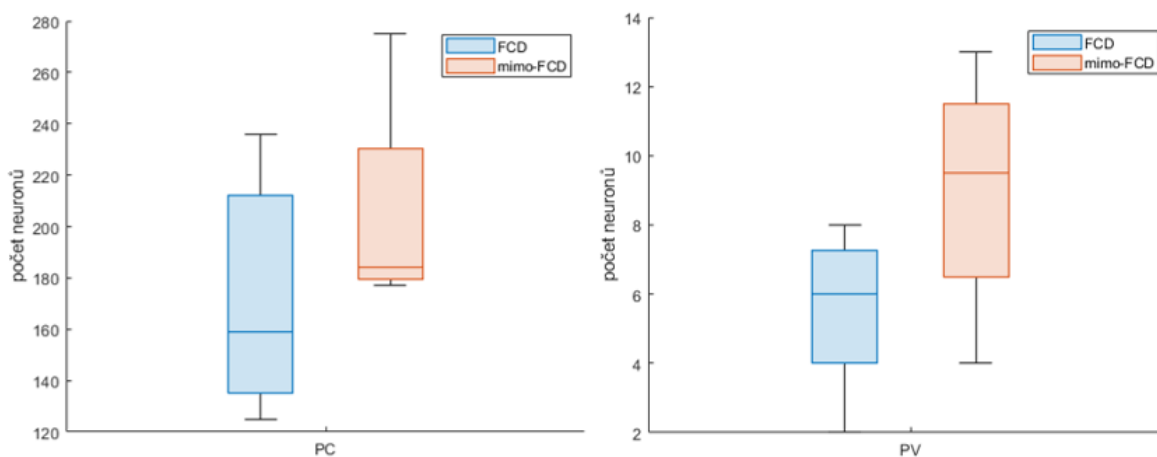
Na základě dat z měření na dvoufotonovém mikroskopu byly určeny rozdíly ve velikosti u pyramidových neuronů a PV+ interneuronů v oblasti léze a mimo lézi (viz. obrázek č. 23). Velikost pyramidových neuronů v lézi byla $13,25 \pm 0,058 \mu\text{m}$, mimo lézi $12,88 \pm 0,0638 \mu\text{m}$.

Velikost PV+ interneuronů v lézi byla $13,20 \pm 0,278 \mu\text{m}$ a mimo lézi $13,31 \pm 0,272 \mu\text{m}$. Pro vyhodnocení bylo použito 9 FOV v lézi (1543 pyramidových neuronů, 50 PV+) a 3 FOV mimo lézi (820 pyramidových neuronů, 36 PV+). Za pomoci neparametrického Wilcoxon rank sum testu byl zjištěn signifikantní rozdíl pro pyramidové neurony ($p = 4,7585 \cdot 10^{-4}$), zatímco rozdíl ve velikosti PV+ interneuronů signifikantní nebyl ($p = 0,9895$). Pro pyramidové neurony byla také zjištěna vysoká variabilita ve velikostech.



Obrázek č. 23: Velikost pyramidových neuronů (PC) a PV+ interneuronů (PV) v lézi (FCD) a mimo lézi (mimo-FCD) určená na základě dat z kalciového signálu.

Stejná data byla použita i pro vyhodnocení počtu pyramidových neuronů a PV+ interneuronů v lézi a mimo lézi (viz. obrázek č. 24). Počet pyramidových neuronů v lézi byl $171,44 \pm 14,44$, mimo lézi $205 \pm 23,41$. Počet PV+ interneuronů v lézi byl $5,55 \pm 0,67$, mimo lézi $9 \pm 1,87$. Pro vyhodnocení bylo použito 9 FOV v lézi (1543 pyramidových neuronů, 50 PV+ interneuronů) a 3 FOV mimo lézi (820 pyramidových neuronů, 36 PV+ interneuronů). Ačkoliv se zdá, že u pyramidových neuronů i PV+ interneuronů dochází ke snížení počtu v lézi oproti okolní tkáni, není tento výsledek za použití neparametrického Wilcoxon rank sum statistického testu signifikantní (PC: p-hodnota = 0,2769; PV: p-hodnota = 0,1007).



Obrázek č. 24: Počet pyramidových neuronů (PC) a PV+ interneuronů (PV) v lézi (FCD) a mimo lézi (mimo-FCD) určená na základě dat z kalciového signálu.

5.2. Vyhodnocení dat z funkčního měření

Do fáze funkčního měření se dostalo 8 myší, 5 nezáchvatujících, 3 záchvatujících. Jedna ze tří záchvatujících myší zemřela předčasně v důsledku epileptického záchvatu a pro jednu nebylo možné označit dostatečné množství PV+ interneuronů. Důvody pro absence záchvatů, smrt záchvatujících myší i problémy s označením interneuronů budou probrány v diskuzi. S ohledem na výše uvedené skutečnosti ale není dostatečné množství dat pro vyhodnocení epileptogeneze a spontánních záchvatů a výsledková část tak obsahuje pouze data z indukovaní epileptického záchvatu pomocí PTZ u nezáchvatujících myší.

5.3. Vyhodnocení záchvatů indukovaných pomocí PTZ

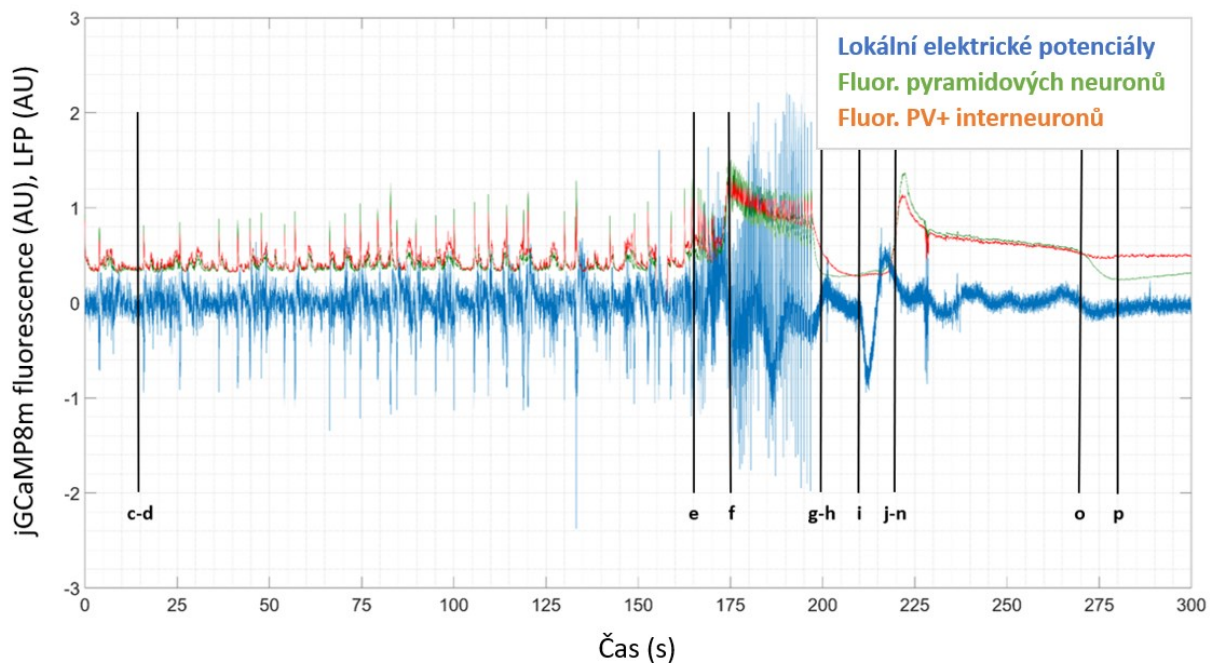
Vzhledem k faktu, že se během funkčních měření nepovedlo zachytit spontánní epileptický záchvat, přistoupili jsme k jeho indukovaní pomocí subkutánního podání PTZ. To bylo postupně podáváno v menších dávkách, dokud nebylo dosaženo záchvatu. Z pěti takto indukovaných byly kompletně nahrány tři. Během jejich nahrávání bylo sledováno 647 pyramidových neuronů a 50 PV+ interneuronů. Tyto neurony byly použity pro statistické vyhodnocení v obrázku č. 30. Jeden ze záchvatů byl použit jako reprezentativní záznam znázorňující průběh EEG a kalciového signálu (viz. obrázek č. 25 a 26).

Jako statisticky signifikantní vychází rozdíl poklesu fluorescence PV+ interneuronů oproti pyramidovým neuronům do postiktálního stavu (viz. obrázek č. 30). Jako čas „0“ pro toto vyhodnocení byl použit poslední kalciový pík v záchvatu korespondující s posledním velkým výbojem v EEG (viz. obrázek č. 29). Od tohoto bodu fluorescence PV+ interneuronů

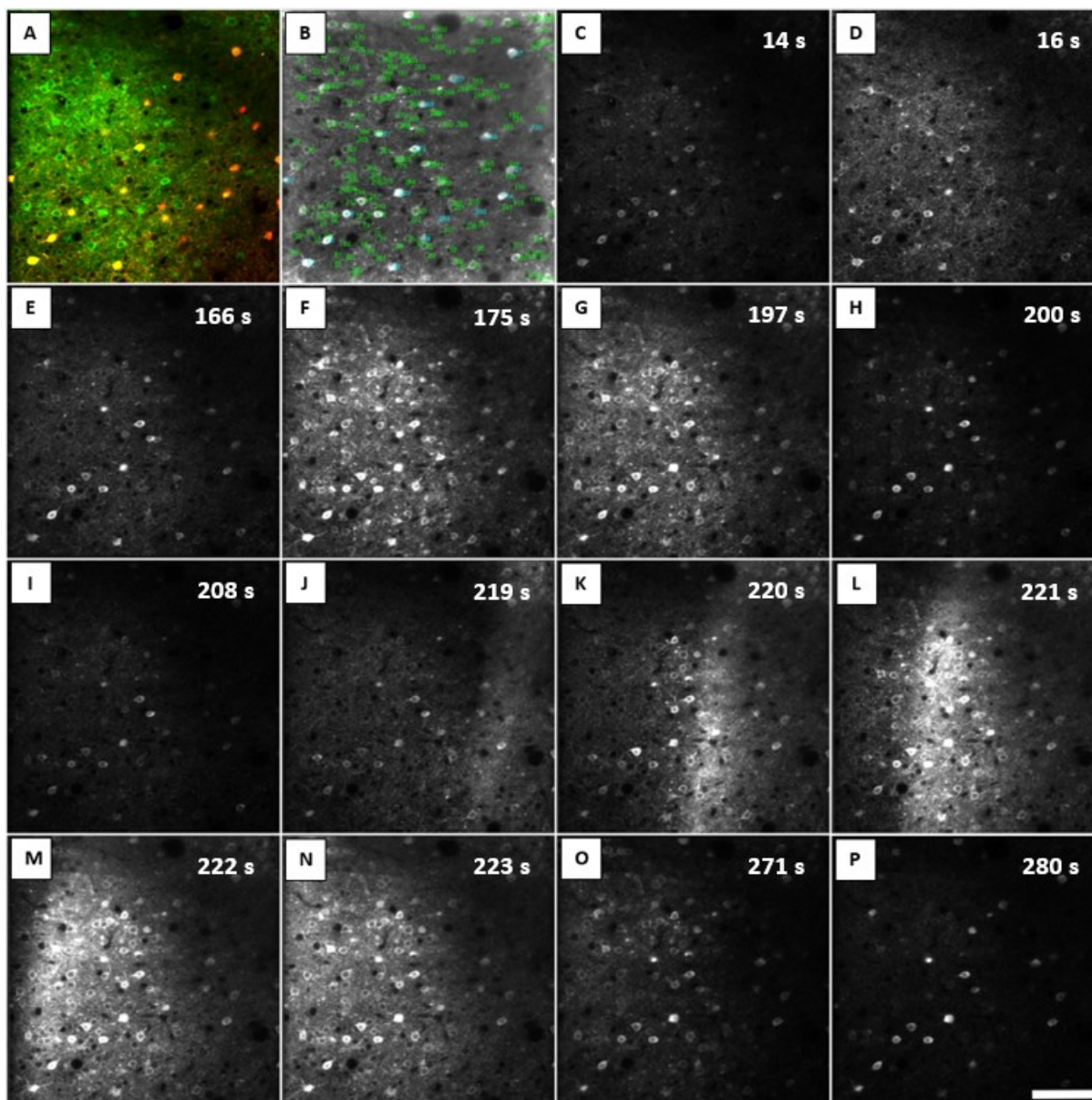
klesne na stejnou hodnotu normalizované fluorescence o 5,5 s později než u pyramidových neuronů.

Pro další zjištění z tohoto experimentu nebylo provedeno dostatečné množství pokusů a budou tedy primárně probírány v diskuzi. Mezi taková patří mírná aktivace PV+ interneuronů před začátkem epileptického záchvatu u jednoho z případů (viz. obrázek č. 32), výskyt depolarizační vlny po terminaci záchvatu ve dvou ze tří případů (viz. obrázek č. 33), aktivace některých neuronů před postupující depolarizační vlnou u jednoho ze dvou případů (viz. obrázek č. 34) a smrt během depolarizační vlny u jednoho ze dvou případů (viz. diskuze).

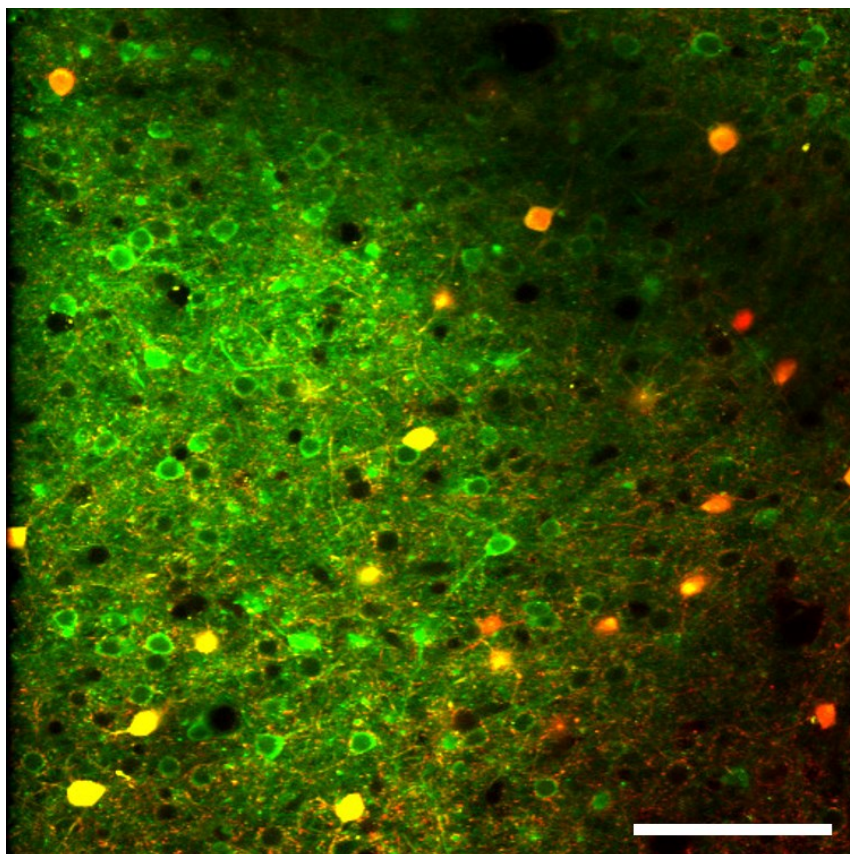
5.3.1. Reprezentativní záznam epileptického záchvatu indukovaného pomocí PTZ



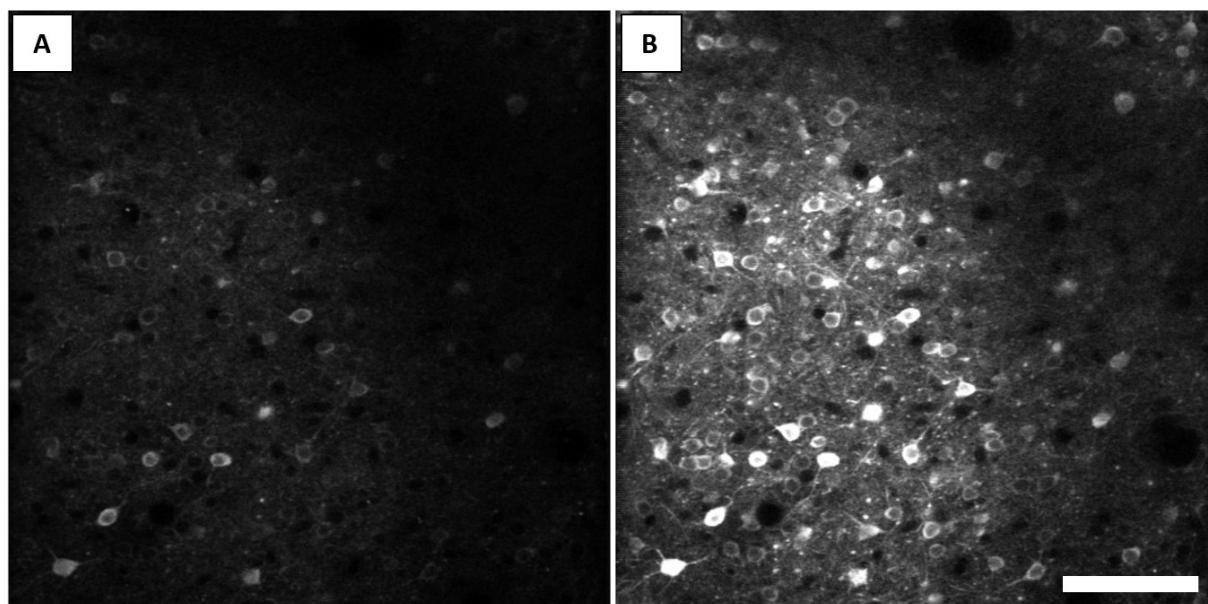
Obrázek č. 25: Reprezentativní záznam jednoho epileptického záchvatu vyvolaného pomocí PTZ znázorňující lokální elektrické potenciály (modře) a normalizovanou fluorescenci kalciového signálu pro pyramidové neurony (zeleně) a PV+ interneurony (oranžově). Svislé čáry označené písmeny zobrazují časové body korelující se stejně označenými časovými úseky na obrázku č. 26.



Obrázek č. 26: Průběh epileptického záchvatu indukovaného pomocí PTZ. (A) Fotografie vybraného FOV pořízená před indukcí epileptického záchvatu. Jednotlivé typy neuronů byly určeny na základě fluorescence. (B) Stejně FOV zpracované v programu Matlab (viz. kapitola 4.10.1.) znázorňující označené typy neuronů. (C – P) Fotografie ze záznamu kalciového signálu epileptického záchvatu z obrázku č. 25. zachycující důležité vybrané časové body. Měřítko = 100 μm . Obrázky byly vytvořeny zprůměrováním fluorescence kalciového signálu ± 100 ms (D, G); ± 200 ms (C, E, F, H, I, J, K, L, M, N); ± 500 ms (O, P) kolem události.

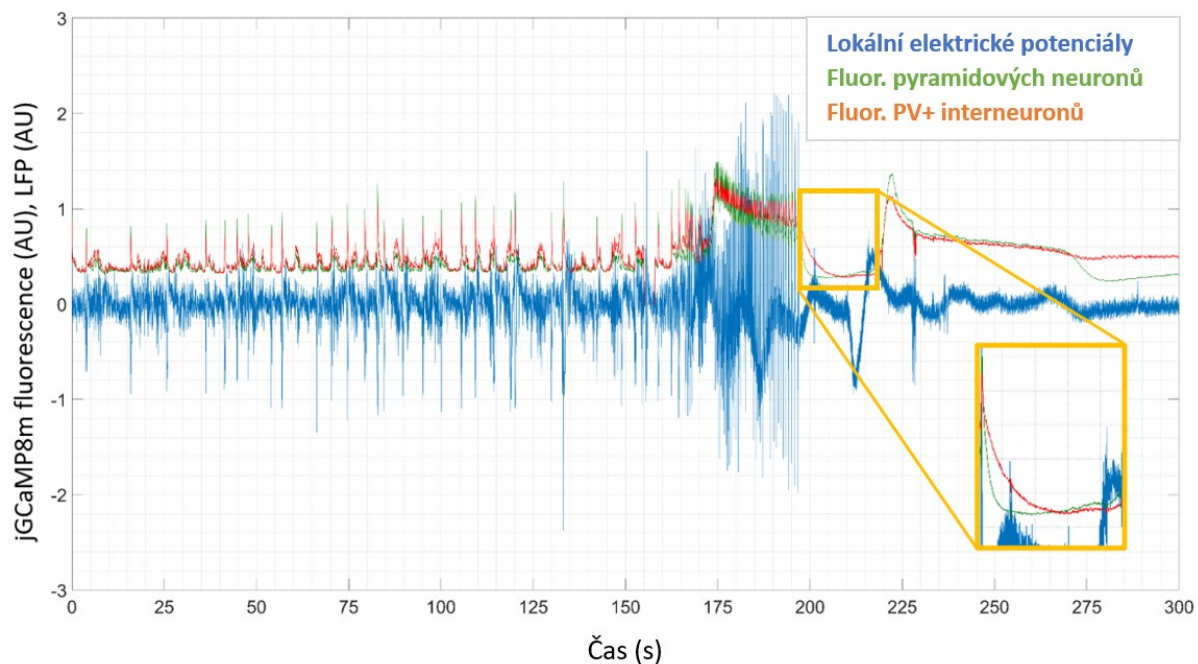


Obrázek č. 27: FOV nahrávané v reprezentativním záznamu. Žlutě jsou označené PV+ interneurony, zeleně ostatní neurony exprimující kalciový indikátor. Měřítko = 100 μ m.

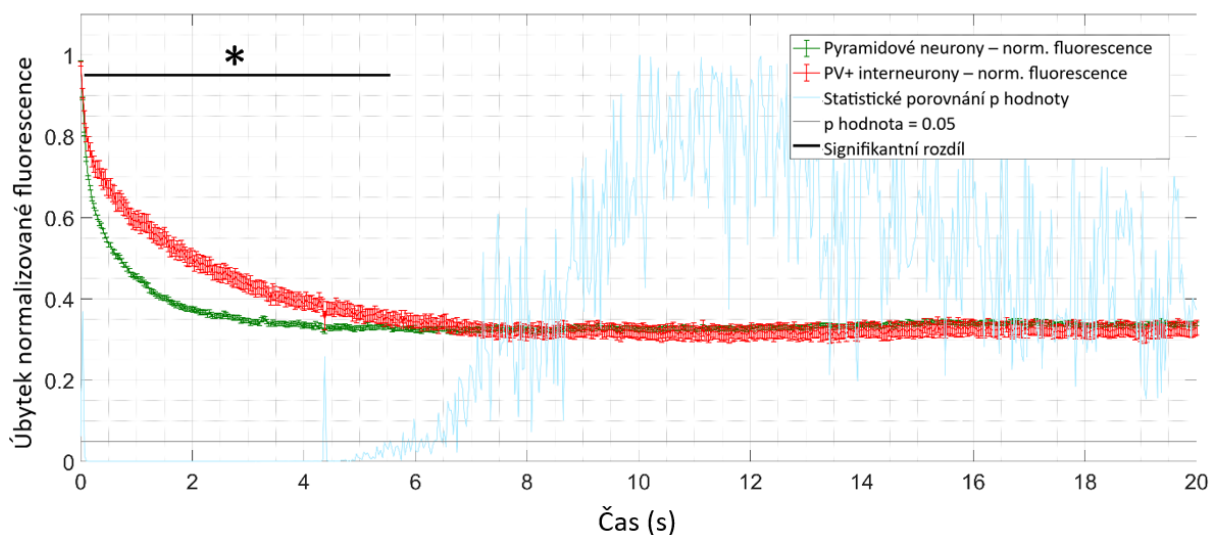


Obrázek č. 28: Porovnání fluorescence neuronů před záchvatem (A, viz. obrázek č. 26C) a během záchvatu (B, viz. obrázek č. 26F). Měřítko = 100 μ m.

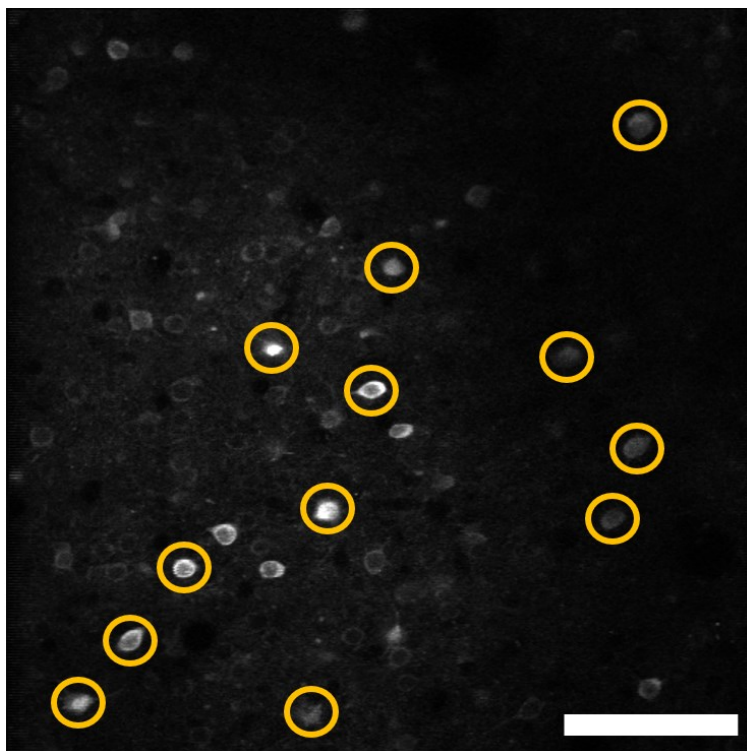
5.3.2. Úbytek fluorescence PV+ interneuronů a pyramidových neuronů po záchvatu



Obrázek č. 29: Úsek EEG a fluorescence kalciového signálu vybraný pro statistickou analýzu (žlutý obdélník) dohasínání fluorescence v obrázku č. 30.

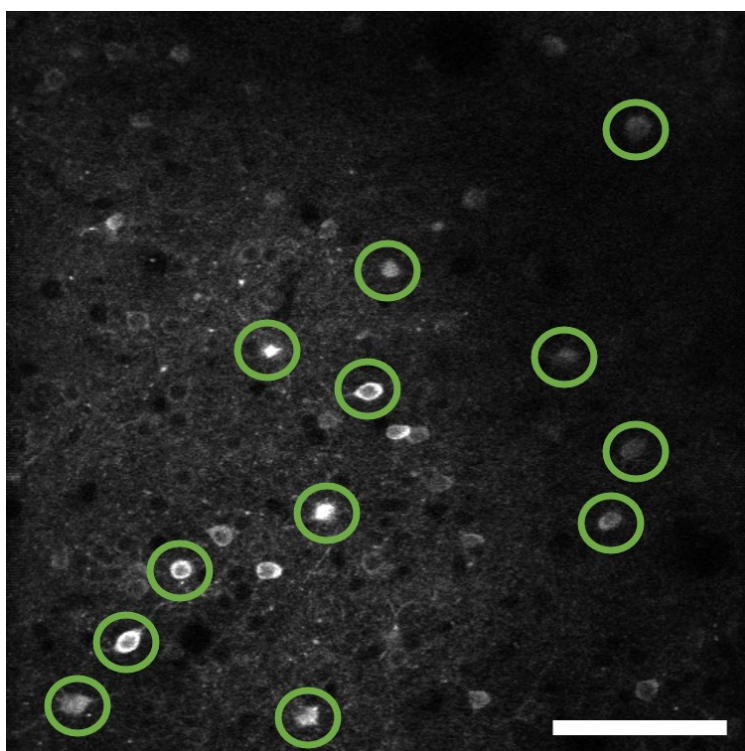


Obrázek č. 30: Graf znázorňující dohasínání fluorescence PV+ interneuronů a pyramidových neuronů po ukončení záchvatu. Pro statistické zpracování byl použit neparametrický Mann Whitney Wilcoxonův test. Od počátku (poslední pík v záchvatu korespondující s posledním velkým výbojem EEG) klesne fluorescence PV+ interneuronů na normalizovanou hodnotu o 5,5 sekundy později.



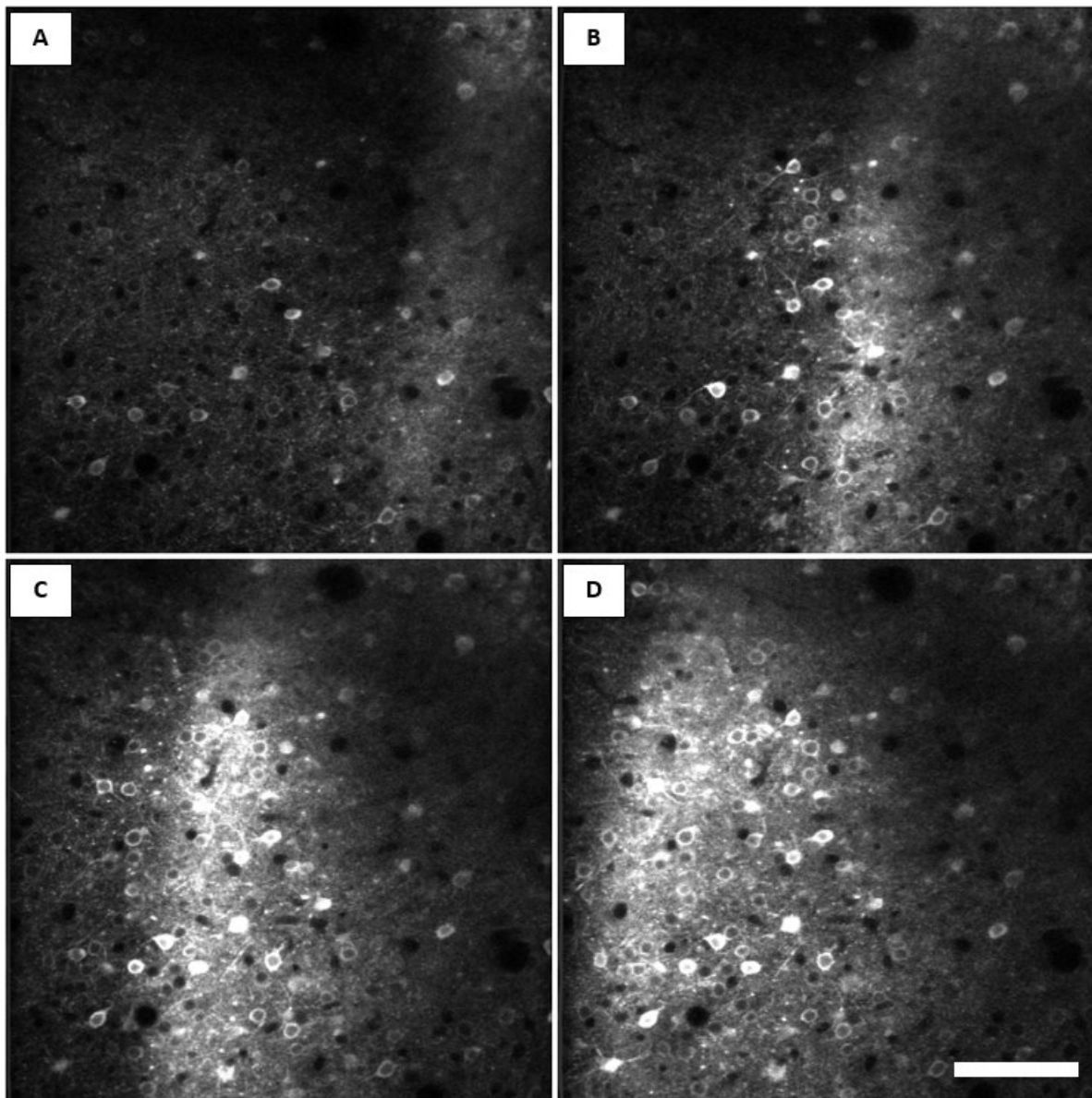
Obrázek č. 31: Pomalejší vyhasínání fluorescence PV+ interneuronů po ukončení záchvatu. Obrázek byl pořízen v čase 200 s záznamu (viz. obrázek č. 25 a 26). PV+ interneurony jsou označeny žlutým kolečkem. Měřítko = 100 μ m.

5.3.3. Mírná aktivace PV+ interneuronů před počátkem záchvatu

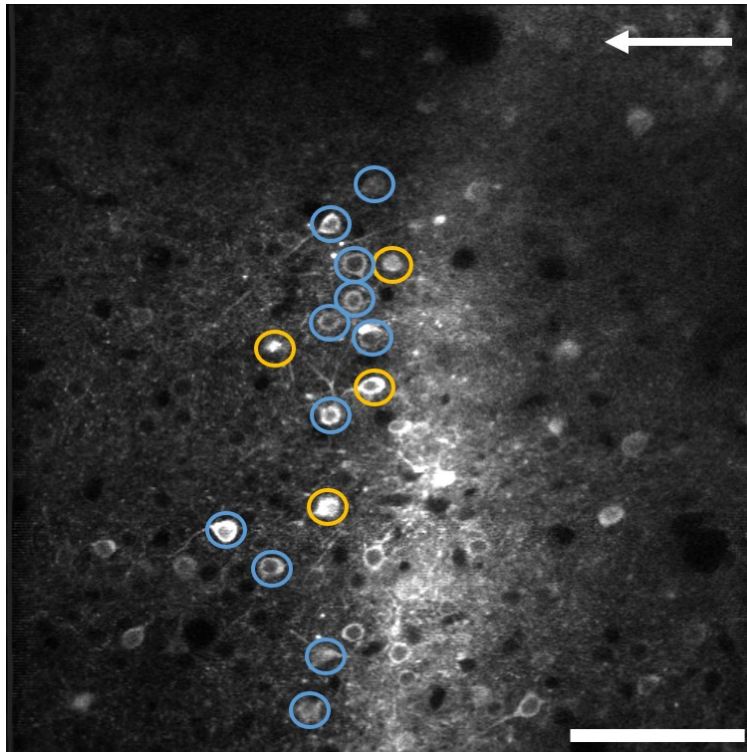


Obrázek č. 32: Mírná aktivace PV+ interneuronů před začátkem záchvatu. Obrázek byl pořízen v čase 166 s záznamu (viz. obrázek č. 25 a 26). PV+ interneurony jsou označeny zeleným kolečkem. Měřítko 100 μm .

5.3.4. Průběh depolarizační vlny



Obrázek č. 33: Postup depolarizační vlny přes sledované FOV v různých časových bodech. Odpovídá obrázkům a časovým bodům J-M na obrázku č. 25 a 26. (A) = 219 s. (B) = 220 s. (C) = 221 s. (D) = 222 s. Měřítko = 100 μm .



Obrázek č. 34: Aktivace některých neuronů před postupující depolarizační vlnou v čase 220 s záznamu (viz. obrázek č. 25 a 26K). Žlutým kolečkem jsou označeny PV+ interneurony, modrým kolečkem buď pyramidové neurony nebo jiná skupina interneuronů. Bílá šipka udává směr šíření depolarizační vlny. Měřítko 100 μm .

6. Diskuze

Pomocí *in utero* elektroporace byl úspěšně vytvořen model fokální kortikální dysplázie typu II spolu s označenými PV+ interneurony. Těchto 8 myší vykazovalo charakteristické morfologické znaky s touto malformací spojené, a to přítomnost dysmorfních neuronů, narušenou migraci a s tím související ektopické umístění neuronů i v bílé hmotě mozkové (viz. obrázky č. 20, 21). Charakteristické je také typické umístění v temporálním a frontálním laloku. Zároveň u tří z těchto myší byly zaznamenány spontánní epileptické záchvaty (viz. obrázek č. 22).

Ačkoliv se může zdát, že výskyt spontánních záchvatů pouze u tří z osmi myší není plně dostačující, pokud vezmeme v úvahu fakt, že modely využívající *in utero* elektroporaci mutovaného mTOR genu dosahují úspěšnosti až 90 % (Lim et al., 2015), je nutné brát v potaz velké množství omezení vyplývajících z použité metodiky. Zatímco jiné studie (Baek et al., 2015; Feliciano et al., 2011; Lim et al., 2015, 2017; Reijnders et al., 2017; Ribierre et al., 2018; Zhong et al., 2021) byly konstruovány především za účelem histologických analýz či implantace elektrod a mohla tak být použita všechna pokusná zvířata, zde náročná metodika nutná pro vytvoření funkčního modelu neumožňuje produkci velkého počtu myší v krátkém čase a zároveň je nutné vyřadit neoperovatelná zvířata, což výrazně snižuje výtěžek z experimentu.

Zásadní pro implantaci kraniálního okna je umístění dostatečně velké léze, dané rozsahem oblasti zasažené mutací v mTOR genu, primárně do oblasti temporálního a částečně frontálního laloku. Vzhledem k tomu, že mutovaný mTOR gen se po narození exprimuje pouze v dysmorfních neuronech, nelze ho neinvazivním způsobem použít při P21 screeningu pro zjištění velikosti a umístění léze. Z toho důvodu je spolu s ním elektroporován iRFP plazmid, který je inkorporován do všech neuronů v elektroporované oblasti a jeho fluorescenci lze sledovat i přes lebku za pomoci pouhého nástřihu kůže. Fluorescence iRFP plazmidu ale nemusí nutně označovat přesnou pozici či rozsah léze hlavně v případech, kdy se sledovaná oblast nachází ve větší hloubce. Studie využívající podobné metody také hlásí problém s nepřesným překryvem elektroporovaných plazmidů (Vomund et al., 2013). Je tedy možné, že potenciálně záchvatující myši jsou vyřazeny z projektu a naopak myši s lézí v oblastech, které běžně nevykazují spontánní záchvaty (Hsieh et al., 2016; Wagstyl et al., 2022) jsou dále operovány. Vzhledem k výše zmíněným omezením je pravděpodobnost vzniku spontánních záchvatů u naoperovaných myší nižší než v jiných studiích a činí tak přibližně 50 – 60 %.

Avšak i data získaná z těchto tří záchvatujících myší poskytují zajímavé informace o rozložení spontánních epileptických záchvatů v čase. Jejich shlukování do klastrů, či výskyt v závislosti na určité periodě (viz. obrázek č. 22), je často dokumentovaným fenoménem u lidí s epilepsií (Baud et al., 2018; Taubøll et al., 1991), ve zvířecích modelech epilepsie (Kudlacek et al., 2021) a dokonce i u psů (Gregg et al., 2020). Podle (Baud et al., 2018) interiktální výboje oscilují s cirkadiánní a několikadenní/týdenní periodou, přičemž záchvaty se s vyšší pravděpodobností objevují při vzestupné fázi těchto delších rytmů. Dále bylo zjištěno, že v rámci klastrů dochází k postupnému snižování délky záchvatů (Kudlacek et al., 2021), což je patrné i z našich výsledků. Úmrtí v průběhu epileptického záchvatu (viz. obrázek č. 22) je bohužel častý fenomén označovaný jako SUDEP (sudden unexpected death in epilepsy, (Holst et al., 2013)). Pravděpodobnou příčinou jsou poruchy dýchání (Lear-Kaul et al., 2005) a srdečního rytmu (Nei et al., 2004). Stejně jako v tomto projektu, i další studie prováděné na myších modelech fokální kortikální dysplázie dokumentují problémy s předčasným úmrtím pokusných subjektů (Baek et al., 2015; Kassai et al., 2014; Ribierre et al., 2018; Zeng et al., 2011).

Na základě dat získaných z funkčních měření na dvoufotonovém mikroskopu byla provedena analýza velikosti (viz. obrázek č. 23) a počtu (viz. obrázek č. 24) pyramidových neuronů a PV+ interneuronů v závislosti na umístění v lézi a mimo lézi. Jako signifikantní se ukázal rozdíl ve velikostech pyramidových neuronů doprovázený vysokou variabilitou výsledných hodnot. Různá velikost neuronů v lézi může být zapříčiněna cytomegalii, či přítomností menších nezralých neuronů (Cepeda et al., 2003, 2005; Hanai et al., 2010; Nguyen et al., 2019) vycházející z aktivity mTOR signální kaskády. Variabilita ve velikostech také může být způsobena snímáním cílového FOV z určité roviny, ve které ovšem neurony nemusí být vždy zobrazené ve svém největším průměru. Ve velikosti PV+ interneuronů v závislosti na umístění nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly a dosud ani nebyla zaznamenána studie zabývající se tímto tématem. Z grafu znázorňujícího rozdíly v počtu pyramidových neuronů a PV+ interneuronů v lézi a mimo lézi lze vidět trend směřující ke snížení počtu obou typů neuronů v lézi v porovnání s okolní tkání, avšak na základě statistického vyhodnocení tento rozdíl není signifikantní. Tento trend ovšem odpovídá další studii (Zhong et al., 2021) prováděné na myším modelu FCDII, podle které nedochází k selektivnímu snížení počtu PV+ interneuronů, které je tolik diskutováno u lidských pacientů (Liang et al., 2020; Nakagawa et al., 2017) s fokální kortikální dysplázi. Ačkoliv selektivní snížení počtu PV+ interneuronů bylo

zjištěno u jednoho myšího modelu (T. Yang et al., 2022), v této studii se jedná o kontinuum FCD/HME.

Jedním z cílů diplomové práce a funkčního měření bylo studovat aktivitu neuronů během spontánního záchvatu. Ovšem vzhledem k nízkému počtu záchvatujících zvířat spolu s předčasným úmrtím jedné z myší bylo obtížné spontánní záchvat zachytit při měření na dvoufotonovém mikroskopu jednou týdně. Zároveň v průběhu optimalizace metod nebylo možné pro jednu ze záchvatujících myší PV+ interneurony označit. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k indukci epileptických záchvatů použitím chemokonvulzantu pentylenetetrazolu na nezáchvatujících zvířatech. Z důvodu rychlého propuknutí záchvatu od prvních známek na EEG však nelze vždy dostatečně rychle nastavit software ovládající dvoufotonový mikroskop tak, aby bylo možné nahrát dostatečně dlouhý časový úsek před propuknutím epileptického záchvatu. Z tohoto důvodu pouze tři z pěti takto indukovaných záchvatů jsou kompletní a dále zpracovávány.

Z tohoto experimentu je nejdůležitějším a statisticky signifikantním výsledkem efekt opožděného vyhasínání fluorescence kalciového indikátoru u PV+ interneuronů v porovnání s pyramidovými neurony na konci epileptického záchvatu (viz. obrázky č. 29, 30, 31). V úvahu připadají dvě vysvětlení. Buď jsou tyto neurony vysoce aktivní, či došlo k jejich vstupu do stavu depolarizačního bloku.

V případě stimulace neuronu za fyziologických podmínek dochází k aktivaci sodných napěťově řízených kanálů, vzniku akčního potenciálu šířícího se po axonu k synaptickému terminálu, kde dojde k aktivaci napěťově řízených vápenatých kanálů a ve výsledku ke vstupu vápenatých iontů dovnitř buňky skrze membránu a k jejich vazbě na kalciový indikátor. Pokud ale dojde k iniciaci epileptického záchvatu, tato stimulace je mnohonásobně vyšší a neuron se ocitne ve stavu permanentní depolarizace, kdy sodné napěťově řízené kanály jsou inaktivovány. Tento stav je označován jako depolarizační blok a neuron není schopen vytvářet akční potenciály (Călin et al., 2021; Cammarota et al., 2013; Fleidervish et al., 1996). Depolarizace ovšem umožňuje vstup vápenatým iontům skrze vápenaté napěťově řízené kanály a NMDA receptory. PV+ interneurony navíc díky složení AMPA receptorů (Catania et al., 1998; Matta et al., 2013; Moga et al., 2002) umožňují průchod vápenatých iontů i skrze tyto receptory. Opětovná aktivace je možná až po poklesu membránového napětí (repolarizaci), přičemž dojde nejprve k uzavření vápenatých kanálů a NMDA a AMPA receptorů. Jejich uzavření také zastaví vtok vápenatých iontů do neuronu.

Studie (Parrish et al., 2019) poukázala u PV+ interneuronů na výrazné zesílení kalciového signálu, které se během průběhu záchvatu už nijak nezvyšovalo po vstupu těchto interneuronů do stavu depolarizačního bloku, což odpovídá i našim výsledkům. Toto se pravděpodobně děje, protože kalciový indikátor je plně saturován. Tato masivní akumulace intracelulárního vápníku musí být následně odstraněna. To, že u PV+ interneuronů toto trvá déle může být způsobeno vyšší intracelulární koncentrací vápenatých iontů a zároveň, na rozdíl od pyramidových neuronů, přítomností kalcium-vazebného proteinu parvalbuminu. Ten je označován jako „pomalý“ z toho důvodu, že před tím, než může začít vázat vápenaté ionty a snižovat tak jejich intracelulární koncentraci, musí nejprve dojít k disociaci hořčnatých iontů z vazebného místa parvalbuminu (Chard et al., 1993; Eggermann & Jonas, 2011; Beat Schwaller, 2010).

Následující zmíněné výsledky nebylo možné z důvodu malého počtu pozorování statisticky vyhodnotit, jedná se však o zajímavé poznatky a budou tedy probrány dále v textu. Již v kapitole 5.3. byla zmíněna mírná aktivace PV+ interneuronů před počátkem záchvatu (viz. obrázek č. 32), výskyt depolarizační vlny (viz. obrázek č. 33) a aktivace některých neuronů před postupující depolarizační vlnou (viz. obrázek č. 34).

Co se týče aktivace PV+ interneuronů před počátkem záchvatu (viz. obrázek č. 32), nejedná se o tak překvapivé zjištění vzhledem k faktu, že něco podobného bylo už pozorováno (Cammarota et al., 2013) na akutním myším modelu epilepsie, kdy tyto interneurony byly aktivovány o téměř dvacet vteřin dříve, než byly do záchvatu rekrutovány sousedící pyramidové neurony. Ačkoliv toto bylo pozorováno pouze u jednoho ze záchvatů a nelze tedy říci, zda se jedná o jev pravidelně doprovázející záchvaty, je možné, že jde o způsob, kterým se PV+ interneurony snaží zabránit iniciaci a propagaci epileptických záchvatů.

Dalším zajímavým objevem je přítomnost vlny šířící se depolarizace u dvou ze tří případů (viz. obrázek č. 33). Ta bývá mimo jiné spojena právě i s epileptickými záchvaty (Bahari et al., 2018) a objevuje se přibližně v třetině (Bahari et al., 2018) až v polovině (Zakharov et al., 2019) případů v závislosti na okolnostech vyvolání záchvatu a může sloužit jako mechanismus působící proti generalizaci epileptických záchvatů (Tamim et al., 2021). Faktorem, který se pravděpodobně podílí na vzniku depolarizační vlny, je zvýšená extracelulární koncentrace draslíku (Andrew et al., 2017), což odpovídá stavu mozku během záchvatu (Gentiletti et al., 2022; Librizzi et al., 2017). Také objem tkáně, do které se záchvat rozšíří souvisí s výskytem depolarizační vlny, a tedy čím větší je zasažená oblast, tím pravděpodobněji se šířící vlna depolarizace objeví (Tamim et al., 2021). Propagace

depolarizační vlny je silně závislá na elektrickém propojení neuronů, jinak známém jako gap junctions (Nedergaard et al., 1995). Jejich inhibice je možná skrze acidózu (pokles pH), která se objevuje v průběhu záchvatu a trvá i po jeho ukončení (R. I. Wang & Sonnenschein, 1955) a způsobuje obecně útlum excitability (Nedergaard et al., 1995; Sinning & Hübner, 2013). Je tedy možné, že závažnost iontové nerovnováhy ustanovené během záchvatu a rychlost návratu do původního stavu také určuje, zda depolarizační vlna vznikne či ne. Navíc, šíření depolarizační vlny, zvláště do mozkového kmene, může způsobit zástavu srdce a následnou smrt (Aiba & Noebels, 2015), tedy SUDEP (Holst et al., 2013).

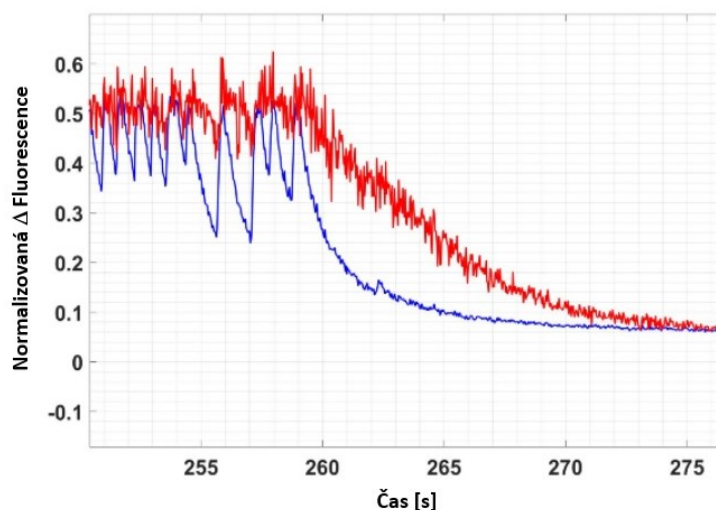
Na reprezentativním záznamu indukovaného záchvatu (viz. obrázek č. 34) si lze povšimnout, že před postupující depolarizační vlnou jsou u jednoho ze dvou případů aktivovány některé neurony. Podle (Herreras et al., 1994) by se mohlo jednat o aktivaci zprostředkovanou právě pomocí elektrických synapsí. Některé neurony jsou označeny jako PV+, zbylé jsou na základě velikosti a morfologie určeny jako pyramidové neurony či jiné interneurony. Právě interneurony jsou vysoce propojeny pomocí gap junctions (M Galarreta & Hestrin, 1999; Mario Galarreta & Hestrin, 2002; Mario Galarreta et al., 2004; Hang Hu & Agmon, 2015). Vzhledem k malému počtu pozorování, stejně jako ve výše zmíněných odstavcích, ovšem nelze říci, zda byl sledován jev náhodný či související s epileptickou aktivitou mozku.

Po shrnutí získaných výsledků z indukované epileptické aktivity je třeba také prodiskutovat, zda tato data mohla být nějak ovlivněna a znehodnocena. Mezi faktory schopné toto způsobit patří užití PTZ jako chemokonvulzantu a samotný model FCDII.

Co se FCDII týče, zda dochází ke změnám ovlivňujícím interneurony je předmětem diskuzí. Zatímco u lidí vzniká větší část PV+ interneuronů ve stejné oblasti jako kortikální neurony a glie (Letinic et al., 2002), u myši veškeré tyto interneurony vznikají pouze v mediální ganglionické eminenci odděleně od kortikálních prekurzorů (Fogarty et al., 2007) a je tedy nepravděpodobné, že by v našem modelu byly mutací zasaženy. Změny v počtech PV+ interneuronů a konektivitě už byly zmíněny v kapitole 2.3.2.3. a tabulce č. 2. Vzhledem k tomu, že u myši pravděpodobně nedochází k selektivní ztrátě PV+ interneuronů, zdá se, že větší efekt by mohly mít změny exprese různých receptorů a transportérů popsané v kapitole č. 2.3.2.1.. Navíc fakt, že myši použité pro PTZ experiment nevyvinuly spontánní záchvaty, umožňuje vyloučit poškození PV+ interneuronů, ke kterému v takových případech dochází (McRae et al., 2012; Rankin-Gee et al., 2015; Wilczynski et al., 2008; Yuan et al., 2002) a ke kterému jsou konkrétně tyto interneurony vysoce náchylné (Moga et al., 2002; Okamoto et al., 1994).

Pentylentetrazol se váže na $GABA_A$ receptory a uzavírá kanál pro chloridové ionty (Pellmar & Wilson, 1977a; Rebbapragada Ramanjaneyulu & Ticku, 1984). Jelikož použití PTZ pro vyvolání epileptického záchvatu způsobí aktivaci postupně všech mozkových oblastí (Brevard et al., 2006; Morgan et al., 1987; Van Camp et al., 2003; H. Yang et al., 2019), dochází k vyřazení inhibice ve všech neuronech mozku.

Data týkající se pozdního poklesu fluorescence PV+ interneuronů po terminaci záchvatu získaná v této práci však nejsou první svého druhu a máme tedy možnost je porovnat. Ze zatím nepublikovaných dat z naší laboratoře (viz. obrázek č. 35) je tento efekt patrný i na akutním myším modelu na kmenu C57 za použití 4-aminopyridinu (4-AP) blokujícího napěťově řízené draselné kanály (Fedor et al., 2020; Remillard & Leblanc, 1996).



Obrázek č. 35: Graf znázorňující fluorescenci kalciového signálu po terminaci epileptického záchvatu v modelu 4-AP akutního modelu epilepsie. Červená = fluorescence PV+ interneuronů, modrá = fluorescence pyramidových neuronů.

Zároveň na několika nepublikovaných záznamech spontánního záchvatu z naší laboratoře je po jeho ukončení vidět skupina neuronů s déletrvající fluorescencí stejně jako ve zde prezentovaných výsledcích a dat z 4-AP (viz. obrázek č. 35). Ačkoliv byla pomocí tdTomato označena jiná skupina interneuronů (VIP+), u kterých nebyl tento efekt během našich experimentů pozorován, je vysoce pravděpodobné, že neurony s přetrvávající fluorescencí jsou právě PV+ interneurony. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem jsem tedy přesvědčena, že tento efekt je univerzální napříč různými modely a lze tedy předpokládat, že výsledky nejsou zkresleny použitím PTZ jako chemokonvulzantu.

Dále je nutné zmínit, že ačkoliv výsledky naznačují přechod PV+ interneuronů do stavu depolarizačního bloku, kalciový indikátor jRCaMP1a stále není dostatečně citlivý (Looger et al.,

2021) na rozeznání jednotlivých akčních potenciálů, což by nám umožnilo určit, zda dochází k inaktivaci napěťově řízených sodných kanálů. Bude tedy nutné použít jiné metody pro objasnění tohoto jevu. Výhodou kombinace jGCamp8 s dvoufotonovým mikroskopem ovšem je, že nám umožňuje sledovat velké množství neuronů najednou a na rozdíl od jiných mikroskopických metod umožňuje proniknout do větší hloubky s výhodou nižší fototoxicity (Denk et al., 1990; Helmchen & Denk, 2005). Metodou, která by nám ale mohla pomoci objasnit, zda se depolarizační blok u PV+ interneuronů skutečně objevuje, je voltage imaging, který za cenu nižšího rozlišení a sledování pouze jednotlivých neuronů umožňuje sledovat aktivitu na úrovni jednotlivých akčních potenciálů i v případě fast-spiking PV+ interneuronů (Abdelfattah et al., 2019).

7. Závěr

Tato práce se zabývala vytvořením a charakterizací myšího modelu fokální kortikální dysplázie typu II s označenými parvalbuminovými interneurony a následným sledováním aktivity pyramidových neuronů a parvalbuminových interneuronů v průběhu epileptického záchvatu. Vytvořený model vykazoval charakteristické morfologické znaky popsané i v jiných studiích, stejně jako spontánní epileptické záchvaty. V rámci analýz byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ve velikosti pyramidových neuronů v FCD lézi a mimo lézi, zatímco u parvalbuminových interneuronů rozdíl prokázán nebyl. Také byl zjišťován počet těchto neuronů v rámci léze a mimo ní a ačkoliv byl pozorován trend snížení počtu pyramidových neuronů i parvalbuminových interneuronů v lézi oproti okolní tkáni, nebyl tento rozdíl statisticky signifikantní. Jedním z cílů bylo sledovat aktivitu těchto neuronů během spontánního epileptického záchvatu pod dvoufotonovým mikroskopem, ovšem vzhledem k obtížím při zachycení spontánních záchvatů bylo přistoupeno k jejich indukci pomocí pentylentetrazolu. Tento experiment přinesl statisticky signifikantní data ohledně pozdního poklesu fluorescence kalciového signálu z parvalbuminových interneuronů po terminaci záchvatu v porovnání s pyramidovými neurony naznačující přechod parvalbuminových interneuronů do stavu depolarizačního bloku. Další data byla z důvodu malého počtu pozorování pouze diskutována a zahrnují mírnou aktivaci parvalbuminových interneuronů před počátkem epileptického záchvatu, výskyt vlny šířící se depolarizace po terminaci záchvatu a aktivaci neuronů před postupující depolarizační vlnou. Tato práce pomůže nasměrovat další výzkum týkající se úlohy interneuronů v mechanismech epilepsie. I když existuje spousta modelů FCDII, žádné prozatím nebyly přímo zaměřené na studium interneuronů, natož na sledování jejich aktivity. Zde užitá metodika představuje velice komplexní možnost dalšího získávání cenných dat. Výsledky ze změn fluorescence po terminaci epileptického záchvatu jsou aktuálně cílem dalšího výzkumu a lze říci, že parvalbuminové interneurony by mohly být zajímavým cílem dalšího bádání.

8. Seznam použité literatury

- Abdelfattah, A. S., Kawashima, T., Singh, A., Novak, O., Liu, H., Shuai, Y., Huang, Y.-C., Campagnola, L., Seeman, S. C., Yu, J., Zheng, J., Grimm, J. B., Patel, R., Friedrich, J., Mensh, B. D., Paninski, L., Macklin, J. J., Murphy, G. J., Podgorski, K., ... Schreier, E. R. (2019). Bright and photostable chemigenetic indicators for extended in vivo voltage imaging. *Science*, *365*(6454), 699–704. <https://doi.org/10.1126/science.aav6416>
- Aiba, I., & Noebels, J. L. (2015). Spreading depolarization in the brainstem mediates sudden cardiorespiratory arrest in mouse SUDEP models. *Science Translational Medicine*, *7*(282), 282ra46. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4050>
- Alfonsa, H., Merricks, E. M., Codadu, N. K., Cunningham, M. O., Deisseroth, K., Racca, C., & Trevelyan, A. J. (2015). The contribution of raised intraneuronal chloride to epileptic network activity. *The Journal of Neuroscience*, *35*(20), 7715–7726. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4105-14.2015>
- Alonso-Nanclares, L., Garbelli, R., Sola, R. G., Pastor, J., Tassi, L., Spreafico, R., & DeFelipe, J. (2005). Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain: A Journal of Neurology*, *128*(Pt 1), 158–173. <https://doi.org/10.1093/brain/awh331>
- André, V. M., Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Starling, A. J., Nguyen, S., Lobo, M. K., Vinters, H. V., Levine, M. S., & Mathern, G. W. (2004). NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cerebral Cortex*, *14*(6), 634–646. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh024>
- Andrew, R. D., Hsieh, Y.-T., & Brisson, C. D. (2017). Spreading depolarization triggered by elevated potassium is weak or absent in the rodent lower brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *37*(5), 1735–1747. <https://doi.org/10.1177/0271678X16657344>
- Assaf, F., & Schiller, Y. (2016). The antiepileptic and ictogenic effects of optogenetic neurostimulation of PV-expressing interneurons. *Journal of Neurophysiology*, *116*(4), 1694–1704. <https://doi.org/10.1152/jn.00744.2015>

- Baek, S. T., Copeland, B., Yun, E.-J., Kwon, S.-K., Guemez-Gamboa, A., Schaffer, A. E., Kim, S., Kang, H.-C., Song, S., Mathern, G. W., & Gleeson, J. G. (2015). An AKT3-FOXP1-reelin network underlies defective migration in human focal malformations of cortical development. *Nature Medicine*, *21*(12), 1445–1454. <https://doi.org/10.1038/nm.3982>
- Bahari, F., Ssentongo, P., Liu, J., Kimbugwe, J., Schiff, S. J., & Gluckman, B. J. (2018). Seizure-associated spreading depression is a major feature of ictal events in two animal models of chronic epilepsy. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/455519>
- Baldassari, S., Ribierre, T., Marsan, E., Adle-Biassette, H., Ferrand-Sorbets, S., Bulteau, C., Dorison, N., Fohlen, M., Polivka, M., Weckhuysen, S., Dorfmueller, G., Chipaux, M., & Baulac, S. (2019). Dissecting the genetic basis of focal cortical dysplasia: a large cohort study. *Acta Neuropathologica*, *138*(6), 885–900. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02061-5>
- Balmer, T. S. (2016). Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons. *ENeuro*, *3*(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0112-16.2016>
- Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A. D., Chen, W. W., Ottina, K. A., Grabiner, B. C., Spear, E. D., Carter, S. L., Meyerson, M., & Sabatini, D. M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*, *340*(6136), 1100–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1232044>
- Baron, G., Demaille, J., & Dutruge, E. (1975). The distribution of parvalbumins in muscle and in other tissues. *FEBS Letters*, *56*(1), 156–160. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80131-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80131-1)
- Barton, M. E., Klein, B. D., Wolf, H. H., & White, H. S. (2001). Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*, *47*(3), 217–227. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(01\)00302-3](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(01)00302-3)
- Baud, M. O., Kleen, J. K., Mirro, E. A., Andrechak, J. C., King-Stephens, D., Chang, E. F., & Rao, V. R. (2018). Multi-day rhythms modulate seizure risk in epilepsy. *Nature Communications*, *9*(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02577-y>

- Ben-Sahra, I., Howell, J. J., Asara, J. M., & Manning, B. D. (2013). Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*, *339*(6125), 1323–1328.
<https://doi.org/10.1126/science.1228792>
- Boer, K., Troost, D., Spliet, W. G. M., van Rijen, P. C., Gorter, J. A., & Aronica, E. (2008). Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB. *Acta Neuropathologica*, *115*(6), 683–696.
<https://doi.org/10.1007/s00401-008-0354-6>
- Brevard, M. E., Kulkarni, P., King, J. A., & Ferris, C. F. (2006). Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia*, *47*(4), 745–754.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00502.x>
- Bucurenciu, I., Bischofberger, J., & Jonas, P. (2010). A small number of open Ca²⁺ channels trigger transmitter release at a central GABAergic synapse. *Nature Neuroscience*, *13*(1), 19–21.
<https://doi.org/10.1038/nn.2461>
- Bucurenciu, I., Kulik, A., Schwaller, B., Frotscher, M., & Jonas, P. (2008). Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and Ca²⁺ sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron*, *57*(4), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.026>
- Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 9130–9135.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>
- Calcagnotto, M. E., Paredes, M. F., Tihan, T., Barbaro, N. M., & Baraban, S. C. (2005). Dysfunction of synaptic inhibition in epilepsy associated with focal cortical dysplasia. *The Journal of Neuroscience*, *25*(42), 9649–9657. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2687-05.2005>
- Călin, A., Ilie, A. S., & Akerman, C. J. (2021). Disrupting epileptiform activity by preventing parvalbumin interneuron depolarization block. *The Journal of Neuroscience*, *41*(45), 9452–9465.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1002-20.2021>

- Cammarota, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M., & Carmignoto, G. (2013). Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *The Journal of Physiology*, *591*(4), 807–822. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238154>
- Catania, M. V., Bellomo, M., Giuffrida, R., Giuffrida, R., Stella, A. M., & Albanese, V. (1998). AMPA receptor subunits are differentially expressed in parvalbumin- and calretinin-positive neurons of the rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, *10*(11), 3479–3490. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00356.x>
- Cepeda, C., André, V. M., Vinters, H. V., Levine, M. S., & Mathern, G. W. (2005). Are cytomegalic neurons and balloon cells generators of epileptic activity in pediatric cortical dysplasia? *Epilepsia*, *46 Suppl 5*, 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01013.x>
- Cepeda, C., Hurst, R. S., Flores-Hernández, J., Hernández-Echeagaray, E., Klapstein, G. J., Boylan, M. K., Calvert, C. R., Jocoy, E. L., Nguyen, O. K., André, V. M., Vinters, H. V., Ariano, M. A., Levine, M. S., & Mathern, G. W. (2003). Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. *Journal of Neuroscience Research*, *72*(4), 472–486. <https://doi.org/10.1002/jnr.10604>
- Crino, P. B., Duhaime, A. C., Baltuch, G., & White, R. (2001). Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology*, *56*(7), 906–913. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.7.906>
- D’Gama, A. M., Woodworth, M. B., Hossain, A. A., Bizzotto, S., Hatem, N. E., LaCoursiere, C. M., Najm, I., Ying, Z., Yang, E., Barkovich, A. J., Kwiatkowski, D. J., Vinters, H. V., Madsen, J. R., Mathern, G. W., Blümcke, I., Poduri, A., & Walsh, C. A. (2017). Somatic Mutations Activating the mTOR Pathway in Dorsal Telencephalic Progenitors Cause a Continuum of Cortical Dysplasias. *Cell Reports*, *21*(13), 3754–3766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.106>
- de Lecea, L., del Río, J. A., & Soriano, E. (1995). Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *32*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00056-X](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00056-X)

- Chang, M., Dian, J. A., Dufour, S., Wang, L., Moradi Chameh, H., Ramani, M., Zhang, L., Carlen, P. L., Womelsdorf, T., & Valiante, T. A. (2018). Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. *Neurobiology of Disease*, *109*(Pt A), 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.007>
- DeFelipe, J., Hendry, S. H. C., & Jones, E. G. (1988). Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin. *Neurobiology*.
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, *39*(2), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- Fausser, S., Essang, C., Altenmüller, D.-M., Staack, A. M., Steinhoff, B. J., Strobl, K., Bast, T., Schubert-Bast, S., Stephani, U., Wiegand, G., Prinz, M., Brandt, A., Zentner, J., & Schulze-Bonhage, A. (2015). Long-term seizure outcome in 211 patients with focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, *56*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1111/epi.12876>
- Fedor, F. Z., Paraczký, C., Ravasz, L., Tóth, K., Borhegyi, Z., Somogyvári, Z., Juhász, G., & Fekete, Z. (2020). Electrophysiological and behavioral properties of 4-aminopyridine-induced epileptic activity in mice. *Biologia Futura*, *71*(4), 427–434. <https://doi.org/10.1007/s42977-020-00047-z>
- García-Martínez, J. M., & Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *The Biochemical Journal*, *416*(3), 375–385. <https://doi.org/10.1042/BJ20081668>
- Chard, P. S., Bleakman, D., Christakos, S., Fullmer, C. S., & Miller, R. J. (1993). Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *The Journal of Physiology*, *472*, 341–357. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019950>
- Cheah, C. S., Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Kalume, F. K., Oakley, J. C., Potter, G. B., Rubenstein, J. L., & Catterall, W. A. (2012). Specific deletion of NaV1.1 sodium channels in inhibitory

interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(36), 14646–14651. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211591109>

Chenal, J., Pierre, K., & Pellerin, L. (2008). Insulin and IGF-1 enhance the expression of the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 by translational activation via stimulation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *The European Journal of Neuroscience*, 27(1), 53–65. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05981.x>

Cheng, L., Xing, Y., Zhang, H., Liu, R., Lai, H., Piao, Y., Wang, W., Yan, X., Li, X., Wang, J., Li, D., Loh, H. H., Yu, T., Zhang, G., & Yang, X. (2022). Mechanistic Analysis of Micro-Neurocircuits Underlying the Epileptogenic Zone in Focal Cortical Dysplasia Patients. *Cerebral Cortex*, 32(10), 2216–2230. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab350>

Chen, F., Rosiene, J., Che, A., Becker, A., & LoTurco, J. (2015). Tracking and transforming neocortical progenitors by CRISPR/Cas9 gene targeting and piggyBac transposase lineage labeling. *Development*, 142(20), 3601–3611. <https://doi.org/10.1242/dev.118836>

Chodraui, F. I., Garcia, C. A. B., Mendes, N. D., Santos, M. V., Beggiora, P. S., Silva, S. C., Teixeira, T. L., da Silva Lopes, L., Saggiaro, F. P., Neder, L., & Machado, H. R. (2020). Phosphorylation of S6 protein as a potential biomarker in surgically treated refractory epilepsy. *Developmental Neuroscience*, 42(5–6), 230–236. <https://doi.org/10.1159/000514006>

Chow, A., Erisir, A., Farb, C., Nadal, M. S., Ozaita, A., Lau, D., Welker, E., & Rudy, B. (1999). K⁺ Channel Expression Distinguishes Subpopulations of Parvalbumin- and Somatostatin-Containing Neocortical Interneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), 9332–9345. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09332.1999>

Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>

- Doischer, D., Hosp, J. A., Yanagawa, Y., Obata, K., Jonas, P., Vida, I., & Bartos, M. (2008). Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *The Journal of Neuroscience*, *28*(48), 12956–12968. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2890-08.2008>
- Du, J., Zhang, L., Weiser, M., Rudy, B., & McBain, C. J. (1996). Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *16*(2), 506–518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-02-00506.1996>
- Eggermann, E., & Jonas, P. (2011). How the “slow” Ca(2+) buffer parvalbumin affects transmitter release in nanodomain-coupling regimes. *Nature Neuroscience*, *15*(1), 20–22. <https://doi.org/10.1038/nn.3002>
- Erisir, A., Lau, D., Rudy, B., & Leonard, C. S. (1999). Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons. *Journal of Neurophysiology*, *82*(5), 2476–2489. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.5.2476>
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., & Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO Journal*, *27*(14), 1932–1943. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.120>
- Feliciano, D. M., Su, T., Lopez, J., Platel, J.-C., & Bordey, A. (2011). Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1596–1607. <https://doi.org/10.1172/JCI44909>
- Finardi, A., Gardoni, F., Bassanini, S., Lasio, G., Cossu, M., Tassi, L., Caccia, C., Taroni, F., LoRusso, G., Di Luca, M., & Battaglia, G. (2006). NMDA receptor composition differs among anatomically diverse malformations of cortical development. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *65*(9), 883–893. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000235117.67558.6d>
- Fino, E., Packer, A. M., & Yuste, R. (2013). The logic of inhibitory connectivity in the neocortex. *The Neuroscientist*, *19*(3), 228–237. <https://doi.org/10.1177/1073858412456743>

- Fleidervish, I. A., Friedman, A., & Gutnick, M. J. (1996). Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *The Journal of Physiology*, *493 (Pt 1)*(Pt 1), 83–97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021366>
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marín, O., Pachnis, V., & Kessaris, N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *The Journal of Neuroscience*, *27*(41), 10935–10946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007>
- Friedman, L. K., Pellegrini-Giampietro, D. E., Sperber, E. F., Bennett, M. V., Moshé, S. L., & Zukin, R. S. (1994). Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABA_A receptor gene expression in adult rat hippocampus: an in situ hybridization study. *The Journal of Neuroscience*, *14*(5 Pt 1), 2697–2707. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02697.1994>
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *12*(7), 897–904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>
- Galarreta, M., & Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, *402*(6757), 72–75. <https://doi.org/10.1038/47029>
- Galarreta, Mario, Erdélyi, F., Szabó, G., & Hestrin, S. (2004). Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *The Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9770–9778. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3027-04.2004>
- Galarreta, Mario, & Hestrin, S. (2002). Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(19), 12438–12443. <https://doi.org/10.1073/pnas.192159599>
- Garbelli, R., Munari, C., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Galli, C., Bramerio, M., Mai, R., Battaglia, G., & Spreafico, R. (1999). Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural

- immunohistochemical study. *Brain Pathology*, 9(3), 445–461. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00534.x>
- Gentiletti, D., de Curtis, M., Gnatkovsky, V., & Suffczynski, P. (2022). Focal seizures are organized by feedback between neural activity and ion concentration changes. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.68541>
- Giachello, C. N. G., Premoselli, F., Montarolo, P. G., & Ghirardi, M. (2013). Pentylenetetrazol-induced epileptiform activity affects basal synaptic transmission and short-term plasticity in monosynaptic connections. *Plos One*, 8(2), e56968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056968>
- Goldberg, E. M., Clark, B. D., Zagha, E., Nahmani, M., Erisir, A., & Rudy, B. (2008). K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron*, 58(3), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.003>
- Gonchar, Y., Wang, Q., & Burkhalter, A. (2007). Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Frontiers in Neuroanatomy*, 1, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.003.2007>
- Gouder, N., Fritschy, J.-M., & Boison, D. (2003). Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia*, 44(7), 877–885. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.03603.x>
- Gregg, N. M., Nasser, M., Kremen, V., Patterson, E. E., Sturges, B. K., Denison, T. J., Brinkmann, B. H., & Worrell, G. A. (2020). Circadian and multiday seizure periodicities, and seizure clusters in canine epilepsy. *Brain Communications*, 2(1), fcaa008. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa008>
- Gundelfinger, E. D., Frischknecht, R., Choquet, D., & Heine, M. (2010). Converting juvenile into adult plasticity: a role for the brain's extracellular matrix. *The European Journal of Neuroscience*, 31(12), 2156–2165. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07253.x>

- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Hanai, S., Saito, T., Nakagawa, E., Arai, A., Otsuki, T., Sasaki, M., Goto, Y., & Itoh, M. (2010). Abnormal maturation of non-dysmorphic neurons in focal cortical dysplasia: immunohistochemical considerations. *Seizure*, *19*(5), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.04.003>
- Härtig, W., Brauer, K., & Brückner, G. (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*, *3*(10), 869–872. <https://doi.org/10.1097/00001756-199210000-00012>
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Mäkelä, T. P., Alessi, D. R., & Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, *2*(4), 28. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-2-28>
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, *2*(12), 932–940. <https://doi.org/10.1038/nmeth818>
- Herrerias, O., Largo, C., Ibarz, J. M., Somjen, G. G., & Martín del Río, R. (1994). Role of neuronal synchronizing mechanisms in the propagation of spreading depression in the in vivo hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *14*(11 Pt 2), 7087–7098. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-07087.1994>
- Hioki, H., Okamoto, S., Konno, M., Kameda, H., Sohn, J., Kuramoto, E., Fujiyama, F., & Kaneko, T. (2013). Cell type-specific inhibitory inputs to dendritic and somatic compartments of parvalbumin-expressing neocortical interneuron. *The Journal of Neuroscience*, *33*(2), 544–555. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2255-12.2013>
- Hockfield, S., Kalb, R. G., Zaremba, S., & Fryer, H. (1990). Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring*

Harbor Symposia on Quantitative Biology, 55, 505–514.

<https://doi.org/10.1101/sqb.1990.055.01.049>

Ho, C. S., Grange, R. W., & Joho, R. H. (1997). Pleiotropic effects of a disrupted K⁺ channel gene: reduced body weight, impaired motor skill and muscle contraction, but no seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1533–1538.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1533>

Holst, A. G., Winkel, B. G., Risgaard, B., Nielsen, J. B., Rasmussen, P. V., Haunsø, S., Sabers, A., Uldall, P., & Tfelt-Hansen, J. (2013). Epilepsy and risk of death and sudden unexpected death in the young: a nationwide study. *Epilepsia*, 54(9), 1613–1620. <https://doi.org/10.1111/epi.12328>

Hrabetová, S., Masri, D., Tao, L., Xiao, F., & Nicholson, C. (2009). Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 16), 4029–4049. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.170092>

Hsieh, L. S., Wen, J. H., Claycomb, K., Huang, Y., Harrsch, F. A., Naegele, J. R., Hyder, F., Buchanan, G. F., & Bordey, A. (2016). Convulsive seizures from experimental focal cortical dysplasia occur independently of cell misplacement. *Nature Communications*, 7, 11753.

<https://doi.org/10.1038/ncomms11753>

Huberfeld, G., Menendez de la Prida, L., Pallud, J., Cohen, I., Le Van Quyen, M., Adam, C., Clemenceau, S., Baulac, M., & Miles, R. (2011). Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nature Neuroscience*, 14(5), 627–634.

<https://doi.org/10.1038/nn.2790>

Hulshof, H. M., Benova, B., Krsek, P., Kyncl, M., Lequin, M. H., Belohlavkova, A., Jezdik, P., Braun, K. P. J., & Jansen, F. E. (2021). The epileptogenic zone in children with tuberous sclerosis complex is characterized by prominent features of focal cortical dysplasia. *Epilepsia Open*, 6(4), 663–671.

<https://doi.org/10.1002/epi4.12529>

- Hu, Hang, & Agmon, A. (2015). Properties of precise firing synchrony between synaptically coupled cortical interneurons depend on their mode of coupling. *Journal of Neurophysiology*, *114*(1), 624–637. <https://doi.org/10.1152/jn.00304.2015>
- Hu, Hua, & Jonas, P. (2014). A supercritical density of Na⁽⁺⁾ channels ensures fast signaling in GABAergic interneuron axons. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 686–693. <https://doi.org/10.1038/nn.3678>
- Hu, Hua, Roth, F. C., Vandael, D., & Jonas, P. (2018). Complementary Tuning of Na⁺ and K⁺ Channel Gating Underlies Fast and Energy-Efficient Action Potentials in GABAergic Interneuron Axons. *Neuron*, *98*(1), 156-165.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.024>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K.-L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, *4*(9), 648–657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rueegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, *6*(11), 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>
- Jun, K., Piedras-Rentería, E. S., Smith, S. M., Wheeler, D. B., Lee, S. B., Lee, T. G., Chin, H., Adams, M. E., Scheller, R. H., Tsien, R. W., & Shin, H. S. (1999). Ablation of P/Q-type Ca⁽²⁺⁾ channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15245–15250. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15245>
- Juric-Sekhar, G., & Hevner, R. F. (2019). Malformations of cerebral cortex development: molecules and mechanisms. *Annual Review of Pathology*, *14*, 293–318. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012927>
- Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., & Aiba, A. (2014). Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and

- neurodegenerative diseases. *Cell Reports*, 7(5), 1626–1639.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.048>
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, 7(6), 476–486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>
- Kawaguchi, Yasuo, & Kubota, Y. (1993). Correlation of Physiological Subgroupings of Nonpyramidal Cells With Parvalbumin- and Calbindin_{D28k}-Immunoreactive Neurons in Layer V of Rat Frontal Cortex. *The American Physiological Society*.
- Kawaguchi, Yasuo. (1995). Physiological Subgroups of Nonpyramidal Cells with Specific Morphological Characteristics in Layer II/III of Rat Frontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*.
- Kazemipour, A., Novak, O., Flickinger, D., Marvin, J. S., Abdelfattah, A. S., King, J., Borden, P. M., Kim, J. J., Al-Abdullatif, S. H., Deal, P. E., Miller, E. W., Schreiter, E. R., Druckmann, S., Svoboda, K., Looger, L. L., & Podgorski, K. (2019). Kilohertz frame-rate two-photon tomography. *Nature Methods*, 16(8), 778–786. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0493-9>
- Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00808-5)
- Kim, J. K., Cho, J., Kim, S. H., Kang, H.-C., Kim, D.-S., Kim, V. N., & Lee, J. H. (2019). Brain somatic mutations in MTOR reveal translational dysregulations underlying intractable focal epilepsy. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4207–4223.
<https://doi.org/10.1172/JCI127032>
- Kim, S.-H., Speirs, C. K., Solnica-Krezel, L., & Ess, K. C. (2011). Zebrafish model of tuberous sclerosis complex reveals cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of mutant tuberin. *Disease Models & Mechanisms*, 4(2), 255–267. <https://doi.org/10.1242/dmm.005587>

- Koh, H. Y., Jang, J., Ju, S. H., Kim, R., Cho, G.-B., Kim, D. S., Sohn, J.-W., Paik, S.-B., & Lee, J. H. (2021). Non-Cell Autonomous Epileptogenesis in Focal Cortical Dysplasia. *Annals of Neurology*, *90*(2), 285–299. <https://doi.org/10.1002/ana.26149>
- Komatsu, Y. (1983). Development of cortical inhibition in kitten striate cortex investigated by a slice preparation. *Developmental Brain Research*, *8*(1), 136–139. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(83\)90165-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(83)90165-7)
- Kooijmans, R. N., Sierhuis, W., Self, M. W., & Roelfsema, P. R. (2020). A Quantitative Comparison of Inhibitory Interneuron Size and Distribution between Mouse and Macaque V1, Using Calcium-Binding Proteins. *Cerebral Cortex Communications*, *1*(1), tgaa068. <https://doi.org/10.1093/texcom/tgaa068>
- Kudlacek, J., Chvojka, J., Kumpost, V., Hermanovska, B., Posusta, A., Jefferys, J. G. R., Maturana, M. I., Novak, O., Cook, M. J., Otahal, J., Hlinka, J., & Jiruska, P. (2021). Long-term seizure dynamics are determined by the nature of seizures and the mutual interactions between them. *Neurobiology of Disease*, *154*, 105347. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105347>
- Lear-Kaul, K. C., Coughlin, L., & Dobersen, M. J. (2005). Sudden unexpected death in epilepsy: a retrospective study. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, *26*(1), 11–17. <https://doi.org/10.1097/01.paf.0000154453.58795.18>
- Letinic, K., Zoncu, R., & Rakic, P. (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature*, *417*(6889), 645–649. <https://doi.org/10.1038/nature00779>
- Liang, C., Zhang, C.-Q., Chen, X., Wang, L.-K., Yue, J., An, N., Zhang, L., Liu, S.-Y., & Yang, H. (2020). Differential expression hallmarks of interneurons in different types of focal cortical dysplasia. *Journal of Molecular Neuroscience*, *70*(5), 796–805. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01492-0>
- Librizzi, L., Losi, G., Marcon, I., Sessolo, M., Scalmani, P., Carmignoto, G., & de Curtis, M. (2017). Interneuronal Network Activity at the Onset of Seizure-Like Events in Entorhinal Cortex Slices.

The Journal of Neuroscience, 37(43), 10398–10407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3906-16.2017>

Lillis, K. P., Kramer, M. A., Mertz, J., Staley, K. J., & White, J. A. (2012). Pyramidal cells accumulate chloride at seizure onset. *Neurobiology of Disease*, 47(3), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.016>

Lim, J. S., Gopalappa, R., Kim, S. H., Ramakrishna, S., Lee, M., Kim, W.-I., Kim, J., Park, S. M., Lee, J., Oh, J.-H., Kim, H. D., Park, C.-H., Lee, J. S., Kim, S., Kim, D. S., Han, J. M., Kang, H.-C., Kim, H. H., & Lee, J. H. (2017). Somatic mutations in TSC1 and TSC2 cause focal cortical dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, 100(3), 454–472. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.030>

Lim, J. S., Kim, W., Kang, H.-C., Kim, S. H., Park, A. H., Park, E. K., Cho, Y.-W., Kim, S., Kim, H. M., Kim, J. A., Kim, J., Rhee, H., Kang, S.-G., Kim, H. D., Kim, D., Kim, D.-S., & Lee, J. H. (2015). Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nature Medicine*, 21(4), 395–400. <https://doi.org/10.1038/nm.3824>

Lin, T. V., Hsieh, L., Kimura, T., Malone, T. J., & Bordey, A. (2016). Normalizing translation through 4E-BP prevents mTOR-driven cortical mislamination and ameliorates aberrant neuron integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), 11330–11335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605740113>

Li, T., Tian, C., Scalmani, P., Frassoni, C., Mantegazza, M., Wang, Y., Yang, M., Wu, S., & Shu, Y. (2014). Action potential initiation in neocortical inhibitory interneurons. *PLoS Biology*, 12(9), e1001944. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001944>

Li, X., Zheng, Y., Li, S., Nair, U., Sun, C., Zhao, C., Lu, J., Zhang, V. W., Maljevic, S., Petrou, S., & Lin, J. (2021). Kv3.1 channelopathy: a novel loss-of-function variant and the mechanistic basis of its clinical phenotypes. *Annals of Translational Medicine*, 9(18), 1397. <https://doi.org/10.21037/atm-21-1885>

Looger, L., Zhang, Y., Rózsa, M., Liang, Y., Bushey, D., Wei, Z., Zheng, J., Reep, D., Broussard, G. J., Tsang, A., Tsegaye, G., Narayan, S., Obara, C. J., Lim, J.-X., Patel, R., Zhang, R., Ahrens, M.

- B., Turner, G. C., Wang, S. S., ... Kolb, I. (2021). Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.08.467793>
- Luhmann, H. J., & Prince, D. A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology*, *65*(2), 247–263. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.2.247>
- Mandhane, S. N., Aavula, K., & Rajamannar, T. (2007). Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, *16*(7), 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.05.005>
- Marco, M., Schultz, J. H., Ehmke, H., Monyer, H., & Jonas, P. (1998). Functional and Molecular Differences between Voltage-Gated K⁺ Channels of Fast-Spiking Interneurons and Pyramidal Neurons of Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*.
- Masino, S. A., Li, T., Theofilas, P., Sandau, U. S., Ruskin, D. N., Fredholm, B. B., Geiger, J. D., Aronica, E., & Boison, D. (2011). A ketogenic diet suppresses seizures in mice through adenosine A₁ receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(7), 2679–2683. <https://doi.org/10.1172/JCI57813>
- Matta, J. A., Pelkey, K. A., Craig, M. T., Chittajallu, R., Jeffries, B. W., & McBain, C. J. (2013). Developmental origin dictates interneuron AMPA and NMDA receptor subunit composition and plasticity. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1032–1041. <https://doi.org/10.1038/nn.3459>
- Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., & Hockfield, S. (2002). Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *The Journal of Neuroscience*, *22*(17), 7536–7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-17-07536.2002>
- McRae, P. A., Baranov, E., Rogers, S. L., & Porter, B. E. (2012). Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus. *The European Journal of Neuroscience*, *36*(11), 3471–3482. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08268.x>
- McRae, P. A., Baranov, E., Sarode, S., Brooks-Kayal, A. R., & Porter, B. E. (2010). Aggrecan expression, a component of the inhibitory interneuron perineuronal net, is altered following an

early-life seizure. *Neurobiology of Disease*, 39(3), 439–448.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.015>

Medici, V., Rossini, L., Deleo, F., Tringali, G., Tassi, L., Cardinale, F., Bramerio, M., de Curtis, M., Garbelli, R., & Spreafico, R. (2016). Different parvalbumin and GABA expression in human epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 57(7), 1109–1119.

<https://doi.org/10.1111/epi.13405>

Meikle, L., Talos, D. M., Onda, H., Pollizzi, K., Rotenberg, A., Sahin, M., Jensen, F. E., & Kwiatkowski, D. J. (2007). A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *The Journal of Neuroscience*, 27(21), 5546–5558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007>

Moga, D., Hof, P. R., Vissavajhala, P., Moran, T. M., & Morrison, J. H. (2002). Parvalbumin-containing interneurons in rat hippocampus have an AMPA receptor profile suggestive of vulnerability to excitotoxicity. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 23(4), 249–253.

[https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(02\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00012-1)

Møller, R. S., Weckhuysen, S., Chipaux, M., Marsan, E., Taly, V., Bebin, E. M., Hiatt, S. M., Prokop, J. W., Bowling, K. M., Mei, D., Conti, V., de la Grange, P., Ferrand-Sorbets, S., Dorfmueller, G., Lambrecq, V., Larsen, L. H. G., Leguern, E., Guerrini, R., Rubboli, G., ... Baulac, S. (2016). Germline and somatic mutations in the MTOR gene in focal cortical dysplasia and epilepsy.

Neurology. Genetics, 2(6), e118. <https://doi.org/10.1212/NXG.000000000000118>

Morawski, M., Reinert, T., Meyer-Klaucke, W., Wagner, F. E., Tröger, W., Reinert, A., Jäger, C., Brückner, G., & Arendt, T. (2015). Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties.

Scientific Reports, 5, 16471. <https://doi.org/10.1038/srep16471>

Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192–197.

<https://doi.org/10.1126/science.3037702>

- Najm, I., Lal, D., Alonso Vanegas, M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., Palmi, A., Paglioli, E., Sarnat, H. B., Walsh, C. A., Wiebe, S., Aronica, E., Baulac, S., Coras, R., Kobow, K., Cross, J. H., Garbelli, R., Holthausen, H., Rössler, K., Thom, M., ... Blümcke, I. (2022). The ILAE consensus classification of focal cortical dysplasia: An update proposed by an ad hoc task force of the ILAE diagnostic methods commission. *Epilepsia*, *63*(8), 1899–1919. <https://doi.org/10.1111/epi.17301>
- Nakagawa, J. M., Donkels, C., Fauser, S., Schulze-Bonhage, A., Prinz, M., Zentner, J., & Haas, C. A. (2017). Characterization of focal cortical dysplasia with balloon cells by layer-specific markers: Evidence for differential vulnerability of interneurons. *Epilepsia*, *58*(4), 635–645. <https://doi.org/10.1111/epi.13690>
- Nakashima, A., Yoshino, K., Miyamoto, T., Eguchi, S., Oshiro, N., Kikkawa, U., & Yonezawa, K. (2007). Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *361*(1), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.011>
- Neal, E. G., Chaffe, H., Schwartz, R. H., Lawson, M. S., Edwards, N., Fitzsimmons, G., Whitney, A., & Cross, J. H. (2008). The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurology*, *7*(6), 500–506. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70092-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70092-9)
- Nedergaard, M., Cooper, A. J., & Goldman, S. A. (1995). Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *Journal of Neurobiology*, *28*(4), 433–444. <https://doi.org/10.1002/neu.480280404>
- Nei, M., Ho, R. T., Abou-Khalil, B. W., Drislane, F. W., Liporace, J., Romeo, A., & Sperling, M. R. (2004). EEG and ECG in sudden unexplained death in epilepsy. *Epilepsia*, *45*(4), 338–345. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.05503.x>
- Nguyen, L. H., Mahadeo, T., & Bordey, A. (2019). mTOR Hyperactivity Levels Influence the Severity of Epilepsy and Associated Neuropathology in an Experimental Model of Tuberous Sclerosis Complex and Focal Cortical Dysplasia. *The Journal of Neuroscience*, *39*(14), 2762–2773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2260-18.2019>

- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15461–15464.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200665200>
- Ohshima, T., Endo, T., & Onaya, T. (1991). Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the human brain. *Journal of Neurology*, 238(6), 320–322. <https://doi.org/10.1007/BF00315329>
- Okamoto, M., Mori, S., & Endo, H. (1994). A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Research*, 637(1–2), 57–67.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91217-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91217-3)
- Ozaita, A., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Rudy, B. (2002). Differential subcellular localization of the two alternatively spliced isoforms of the Kv3.1 potassium channel subunit in brain. *Journal of Neurophysiology*, 88(1), 394–408. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.1.394>
- Packer, A. M., & Yuste, R. (2011). Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *The Journal of Neuroscience*, 31(37), 13260–13271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3131-11.2011>
- Panuccio, G., Curia, G., Colosimo, A., Cruccu, G., & Avoli, M. (2009). Epileptiform synchronization in the cingulate cortex. *Epilepsia*, 50(3), 521–536. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01779.x>
- Parrish, R. R., Codadu, N. K., Mackenzie-Gray Scott, C., & Trevelyan, A. J. (2019). Feedforward inhibition ahead of ictal wavefronts is provided by both parvalbumin- and somatostatin-expressing interneurons. *The Journal of Physiology*, 597(8), 2297–2314. <https://doi.org/10.1113/JP277749>
- Pellmar, T. C., & Wilson, W. A. (1977a). Synaptic Mechanism of Pentylene-tetrazole: Selectivity for Chloride Conductance. *Science*.

- Pellmar, T. C., & Wilson, W. A. (1977b). Synaptic mechanism of pentylentetrazole: selectivity for chloride conductance. *Science*, *197*(4306), 912–914. <https://doi.org/10.1126/science.887932>
- Pérez Koldenkova, V., & Nagai, T. (2013). Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1833*(7), 1787–1797. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.011>
- Permyakov, E. A. (Evgeniĭ A. (2006). *Parvalbumin*. Nova Science Publishers.
- Pfeffer, C. K., Xue, M., He, M., Huang, Z. J., & Scanziani, M. (2013). Inhibition of inhibition in visual cortex: the logic of connections between molecularly distinct interneurons. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1068–1076. <https://doi.org/10.1038/nn.3446>
- Pnevmatikakis, E. A., & Giovannucci, A. (2017). NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. *Journal of Neuroscience Methods*, *291*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>
- Pollock, E., Everest, M., Brown, A., & Poulter, M. O. (2014). Metalloproteinase inhibition prevents inhibitory synapse reorganization and seizure genesis. *Neurobiology of Disease*, *70*, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.003>
- Povysheva, N. V., Zaitsev, A. V., Gonzalez-Burgos, G., & Lewis, D. A. (2013). Electrophysiological heterogeneity of fast-spiking interneurons: chandelier versus basket cells. *Plos One*, *8*(8), e70553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070553>
- Prabhakar, S., Goto, J., Zhang, X., Sena-Esteves, M., Bronson, R., Brockmann, J., Gianni, D., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Stemmer-Rachamimov, A., Kwiatkowski, D. J., & Breakefield, X. O. (2013). Stochastic model of Tsc1 lesions in mouse brain. *Plos One*, *8*(5), e64224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064224>
- Proietti Onori, M., Koene, L. M. C., Schäfer, C. B., Nellist, M., de Brito van Velze, M., Gao, Z., Elgersma, Y., & van Woerden, G. M. (2021). RHEB/mTOR hyperactivity causes cortical

- malformations and epileptic seizures through increased axonal connectivity. *PLoS Biology*, *19*(5), e3001279. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001279>
- Ramanjaneyulu, R., & Ticku, M. K. (1984). Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *European Journal of Pharmacology*, *98*(3–4), 337–345. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90282-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90282-6)
- Ramanjaneyulu, Rebbapragada, & Ticku, M. (1984). Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *European Journal of Pharmacology*.
- Rankin-Gee, E. K., McRae, P. A., Baranov, E., Rogers, S., Wandrey, L., & Porter, B. E. (2015). Perineuronal net degradation in epilepsy. *Epilepsia*, *56*(7), 1124–1133. <https://doi.org/10.1111/epi.13026>
- Rehorova, M., Nguyen, M. T., Populova, J., Kudlacek, J., Chvojka, J., Weissova, R., Balastik, M., Jiruska, P., & Novak, O. (n.d.). *Abrupt changes in firing patterns of dysmorphic neurons closely correlate with the onset of epilepsy in FCD mouse model*.
- Reijnders, M. R. F., Kousi, M., van Woerden, G. M., Klein, M., Bralten, J., Mancini, G. M. S., van Essen, T., Proietti-Onori, M., Smeets, E. E. J., van Gastel, M., Stegmann, A. P. A., Stevens, S. J. C., Lelieveld, S. H., Gilissen, C., Pfundt, R., Tan, P. L., Kleefstra, T., Franke, B., Elgersma, Y., ... Brunner, H. G. (2017). Variation in a range of mTOR-related genes associates with intracranial volume and intellectual disability. *Nature Communications*, *8*(1), 1052. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00933-6>
- Remillard, C. V., & Leblanc, N. (1996). Mechanism of inhibition of delayed rectifier K⁺ current by 4-aminopyridine in rabbit coronary myocytes. *The Journal of Physiology*, *491* (Pt 2)(Pt 2), 383–400. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021223>
- Ribierre, T., Deleuze, C., Bacq, A., Baldassari, S., Marsan, E., Chipaux, M., Muraca, G., Roussel, D., Navarro, V., Leguern, E., Miles, R., & Baulac, S. (2018). Second-hit mosaic mutation in mTORC1

- repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(6), 2452–2458. <https://doi.org/10.1172/JCI99384>
- Rosenegger, D. G., Tran, C. H. T., LeDue, J., Zhou, N., & Gordon, G. R. (2014). A high performance, cost-effective, open-source microscope for scanning two-photon microscopy that is modular and readily adaptable. *Plos One*, 9(10), e110475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110475>
- Rossignol, E., Kruglikov, I., van den Maagdenberg, A. M. J. M., Rudy, B., & Fishell, G. (2013). CaV 2.1 ablation in cortical interneurons selectively impairs fast-spiking basket cells and causes generalized seizures. *Annals of Neurology*, 74(2), 209–222. <https://doi.org/10.1002/ana.23913>
- Roy, A., Skibo, J., Kalume, F., Ni, J., Rankin, S., Lu, Y., Dobyns, W. B., Mills, G. B., Zhao, J. J., Baker, S. J., & Millen, K. J. (2015). Mouse models of human PIK3CA-related brain overgrowth have acutely treatable epilepsy. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.12703>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D.-H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology*, 14(14), 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Schalm, S. S., & Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Current Biology*, 12(8), 632–639. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00762-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00762-5)
- Schevon, C. A., Weiss, S. A., McKhann, G., Goodman, R. R., Yuste, R., Emerson, R. G., & Trevelyan, A. J. (2012). Evidence of an inhibitory restraint of seizure activity in humans. *Nature Communications*, 3, 1060. <https://doi.org/10.1038/ncomms2056>
- Schwaller, B., Tetko, I. V., Tandon, P., Silveira, D. C., Vreugdenhil, M., Henzi, T., Potier, M. C., Celio, M. R., & Villa, A. E. P. (2004). Parvalbumin deficiency affects network properties resulting

- in increased susceptibility to epileptic seizures. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 25(4), 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.12.006>
- Schwaller, Beat. (2010). Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a004051. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004051>
- Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G. M., Fellin, T., & Carmignoto, G. (2015). Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity. *The Journal of Neuroscience*, 35(26), 9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>
- Seto-Ohshima, A., Emson, P. C., Berchtold, M. W., & Heizmann, C. W. (1989). Localization of parvalbumin mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Experimental Brain Research*, 75(3), 653–658. <https://doi.org/10.1007/BF00249917>
- Shao, Y., Ge, Q., Yang, J., Wang, M., Zhou, Y., Guo, J.-X., Zhu, M., Shi, J., Hu, Y., Shen, L., Chen, Z., Li, X.-M., Zhu, J.-M., Zhang, J., Duan, S., & Chen, J. (2022). Pathological networks involving dysmorphic neurons in type II focal cortical dysplasia. *Neuroscience Bulletin*, 38(9), 1007–1024. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00828-7>
- Sharma, D., Dixit, A. B., Dey, S., Tripathi, M., Doddamani, R., Sharma, M. C., Lalwani, S., Gurjar, H. K., Chandra, P. S., & Banerjee, J. (2021). Increased levels of α 4-containing GABAA receptors in focal cortical dysplasia: A possible cause of benzodiazepine resistance. *Neurochemistry International*, 148, 105084. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105084>
- Sharma, D., Tripathi, M., Doddamani, R., Sharma, M. C., Lalwani, S., Sarat Chandra, P., Banerjee, Dixit, A., & Banerjee, J. (2023). Correlation of age at seizure onset with GABAA receptor subunit and chloride Co-transporter configuration in Focal cortical dysplasia (FCD). *Neuroscience Letters*, 796, 137065. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137065>
- Sinning, A., & Hübner, C. A. (2013). Minireview: pH and synaptic transmission. *FEBS Letters*, 587(13), 1923–1928. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.045>

- Subramanian, L., Calcagnotto, M. E., & Paredes, M. F. (2019). Cortical malformations: lessons in human brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 576.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00576>
- Szekeres-Paraczky, C., Szocsics, P., Eröss, L., Fabó, D., Mód, L., & Maglóczy, Z. (2022). Reorganization of parvalbumin immunopositive perisomatic innervation of principal cells in focal cortical dysplasia type IIB in human epileptic patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094746>
- Talos, D. M., Sun, H., Kosaras, B., Joseph, A., Folkerth, R. D., Poduri, A., Madsen, J. R., Black, P. M., & Jensen, F. E. (2012). Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIB cortical dysplasia. *Annals of Neurology*, *71*(4), 539–551. <https://doi.org/10.1002/ana.22696>
- Tamim, I., Chung, D. Y., de Moraes, A. L., Loonen, I. C. M., Qin, T., Misra, A., Schlunk, F., Endres, M., Schiff, S. J., & Ayata, C. (2021). Spreading depression as an innate antiseizure mechanism. *Nature Communications*, *12*(1), 2206. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22464-x>
- Tansey, E. P., Chow, A., Rudy, B., & McBain, C. J. (2002). Developmental expression of potassium-channel subunit Kv3.2 within subpopulations of mouse hippocampal inhibitory interneurons. *Hippocampus*, *12*(2), 137–148. <https://doi.org/10.1002/hipo.1104>
- Taubøll, E., Lundervold, A., & Gjerstad, L. (1991). Temporal distribution of seizures in epilepsy. *Epilepsy Research*, *8*(2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(91\)90084-s](https://doi.org/10.1016/0920-1211(91)90084-s)
- Taylor, D. C., Falconer, M. A., Bruton, C. J., & Corsellis, J. A. (1971). Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *34*(4), 369–387.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.34.4.369>
- Tee, A. R., Fingar, D. C., Manning, B. D., Kwiatkowski, D. J., Cantley, L. C., & Blenis, J. (2002). Tuberous Sclerosis Complex-1 and -2 Gene Products Function Together to Inhibit Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Mediated Downstream Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- Trevelyan, A. J., Sussillo, D., Watson, B. O., & Yuste, R. (2006). Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *The Journal of Neuroscience*, *26*(48), 12447–12455. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2787-06.2006>
- Trevelyan, A. J., Sussillo, D., & Yuste, R. (2007). Feedforward inhibition contributes to the control of epileptiform propagation speed. *The Journal of Neuroscience*, *27*(13), 3383–3387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0145-07.2007>
- Tryba, A. K., Merricks, E. M., Lee, S., Pham, T., Cho, S., Nordli, D. R., Eissa, T. L., Goodman, R. R., McKhann, G. M., Emerson, R. G., Schevon, C. A., & van Drongelen, W. (2019). Role of paroxysmal depolarization in focal seizure activity. *Journal of Neurophysiology*, *122*(5), 1861–1873. <https://doi.org/10.1152/jn.00392.2019>
- Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Takahashi, Y., Matsumoto, Y., Okamoto, M., & Ishihara, T. (2019). Alteration of Extracellular Matrix Molecules and Perineuronal Nets in the Hippocampus of Pentylentetrazol-Kindled Mice. *Neural Plasticity*, *2019*, 8924634. <https://doi.org/10.1155/2019/8924634>
- Van Camp, N., D’Hooge, R., Verhoye, M., Peeters, R. R., De Deyn, P. P., & Van der Linden, A. (2003). Simultaneous electroencephalographic recording and functional magnetic resonance imaging during pentylentetrazol-induced seizures in rat. *Neuroimage*, *19*(3), 627–636. [https://doi.org/10.1016/s1053-8119\(03\)00138-1](https://doi.org/10.1016/s1053-8119(03)00138-1)
- Vomund, S., Sapir, T., Reiner, O., Silva, M. A. de S., & Korth, C. (2013). Generation of topically transgenic rats by in utero electroporation and in vivo bioluminescence screening. *Journal of Visualized Experiments*, *79*, e50146. <https://doi.org/10.3791/50146>
- Wagstyl, K., Whitaker, K., Raznahan, A., Seidlitz, J., Vértes, P. E., Foldes, S., Humphreys, Z., Hu, W., Mo, J., Likeman, M., Davies, S., Lenge, M., Cohen, N. T., Tang, Y., Wang, S., Ripart, M., Chari, A., Tisdall, M., Bargallo, N., ... Adler, S. (2022). Atlas of lesion locations and postsurgical seizure freedom in focal cortical dysplasia: A MELD study. *Epilepsia*, *63*(1), 61–74. <https://doi.org/10.1111/epi.17130>

- Wang, R. I., & Sonnenschein, R. R. (1955). PH of cerebral cortex during induced convulsions. *Journal of Neurophysiology*, *18*(2), 130–137. <https://doi.org/10.1152/jn.1955.18.2.130>
- Wang, Y., Barbaro, M. F., & Baraban, S. C. (2006). A role for the mTOR pathway in surface expression of AMPA receptors. *Neuroscience Letters*, *401*(1–2), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.011>
- Whitaker, W. R., Faull, R. L., Waldvogel, H. J., Plumpton, C. J., Emson, P. C., & Clare, J. J. (2001). Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *88*(1–2), 37–53. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00289-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00289-8)
- Wilczynski, G. M., Konopacki, F. A., Wilczek, E., Lasiecka, Z., Gorlewicz, A., Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Malinowska, M., Okulski, P., Kolodziej, L. R., Konopka, W., Duniec, K., Mioduszewska, B., Nikolaev, E., Walczak, A., Owczarek, D., Gorecki, D. C., Zuschratter, W., Ottersen, O. P., & Kaczmarek, L. (2008). Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *180*(5), 1021–1035. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708213>
- Wláz, P., Potschka, H., & Löscher, W. (1998). Frontal versus transcorneal stimulation to induce maximal electroshock seizures or kindling in mice and rats. *Epilepsy Research*, *30*(3), 219–229. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(98\)00008-4](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(98)00008-4)
- Wu, L. G., Westenbroek, R. E., Borst, J. G., Catterall, W. A., & Sakmann, B. (1999). Calcium channel types with distinct presynaptic localization couple differentially to transmitter release in single calyx-type synapses. *The Journal of Neuroscience*, *19*(2), 726–736. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00726.1999>
- Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., Li, F., Yang, X., & Wang, Q. (2019). C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylenetetrazol-induced seizure mice model. *Neurological Research*, *41*(8), 749–761. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1610839>

- Yang, T., Hu, S., Chang, W.-C., Kao, H.-Y., & Wang, Y. (2022). Perineuronal Nets Degradation and Parvalbumin Interneuron Loss in a Mouse Model of DEPDC5-Related Epilepsy. *Developmental Neuroscience*, *44*(6), 671–677. <https://doi.org/10.1159/000525039>
- Yuan, W., Matthews, R. T., Sandy, J. D., & Gottschall, P. E. (2002). Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevicin and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience*, *114*(4), 1091–1101. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00347-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00347-0)
- Yuskaitis, C. J., Jones, B. M., Wolfson, R. L., Super, C. E., Dhamne, S. C., Rotenberg, A., Sabatini, D. M., Sahin, M., & Poduri, A. (2018). A mouse model of DEPDC5-related epilepsy: Neuronal loss of Depdc5 causes dysplastic and ectopic neurons, increased mTOR signaling, and seizure susceptibility. *Neurobiology of Disease*, *111*, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.010>
- Zaitsev, A. V., Povysheva, N. V., Lewis, D. A., & Krimer, L. S. (2007). P/Q-type, but not N-type, calcium channels mediate GABA release from fast-spiking interneurons to pyramidal cells in rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, *97*(5), 3567–3573. <https://doi.org/10.1152/jn.01293.2006>
- Zakharov, A., Chernova, K., Burkhanova, G., Holmes, G. L., & Khazipov, R. (2019). Segregation of seizures and spreading depolarization across cortical layers. *Epilepsia*, *60*(12), 2386–2397. <https://doi.org/10.1111/epi.16390>
- Zeng, L.-H., Rensing, N. R., Zhang, B., Gutmann, D. H., Gambello, M. J., & Wong, M. (2011). Tsc2 gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than Tsc1 inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Human Molecular Genetics*, *20*(3), 445–454. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq491>
- Zhang, L., Huang, T., Teaw, S., & Bordey, A. (2019). Hypervascularization in mTOR-dependent focal and global cortical malformations displays differential rapamycin sensitivity. *Epilepsia*, *60*(6), 1255–1265. <https://doi.org/10.1111/epi.15969>
- Zhang, Z. J., Koifman, J., Shin, D. S., Ye, H., Florez, C. M., Zhang, L., Valiante, T. A., & Carlen, P. L. (2012). Transition to seizure: ictal discharge is preceded by exhausted presynaptic GABA release

in the hippocampal CA3 region. *The Journal of Neuroscience*, 32(7), 2499–2512.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4247-11.2012>

Zhong, S., Zhao, Z., Xie, W., Cai, Y., Zhang, Y., Ding, J., & Wang, X. (2021). GABAergic Interneuron and Neurotransmission Are mTOR-Dependently Disturbed in Experimental Focal Cortical Dysplasia. *Molecular Neurobiology*, 58(1), 156–169. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02086-y>

Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C.-H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C. M., & Parada, L. F. (2009). Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, 29(6), 1773–1783. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009>