

Фенотипическая характеристика новой ENU-мутантной линии мышей с аудиогенной эпилепсией – Сократ

Кулдаева В.П.^{1*}, Гавриш М.С.¹, Бабаев А.А.¹, Кондакова Е.В.¹, Борисова Е.В.², Тарабыкин В.С.²

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin, Берлин, Германия

* verunya.rubackova@mail.ru

Ключевые слова: эпилепсия; ENU-индуцированный мутагенез; развитие коры головного мозга

Мотивация и цель: Эпилепсия – неврологическое заболевание с многопрофильным и сложным патогенезом, характеризующееся повторяющимися спонтанными припадками, вызванными аберрантным синхронизированным возбуждением нейронов из-за дисбаланса между возбуждающими и тормозными компонентами центральной нервной системы (ЦНС) [1, 2]. Важная роль в развитии эпилептогенеза отведена генетическим факторам, что подтверждается проведением множества исследований по изучению генетической детерминированности эпилепсий [3]. Для исследования нейрофизиологических, патофизиологических и генетических основ развития эпилептогенеза, а также для создания принципиально новых методов коррекции эпилептической активности широко используются животные модели заболевания. Выявление и характеристика новых мутантных мышей с последующей идентификацией и характеристикой генов, отвечающих за мутации, позволят значительно улучшить наше понимание генетической регуляции развития и последующих нарушений в работе коры головного мозга.

Методы и алгоритмы: Для создания принципиально новых линий мышей был использован химический ENU-направленный мутагенез. Отбор мышей, проявляющих склонность к эпилептиформной активности, проводился при помощи моделирования аудиогенных судорог. За основу классического фенотипического описания новой мышинной модели эпилепсии было взято поведенческое тестирование – тест «открытое поле», тест на условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) и протокол измерения акустической реакции вздрагивания. Было проведено SNP-картирование для выявления генов-мишеней, изменяющих свою экспрессию в мышах, проявляющих эпилептическую активность; *in situ* гибридизация проводилась для выявления локализации мРНК, отобранных по результатам секвенирования генов-кандидатов в коронарных срезах головного мозга; иммуногистохимическое окрашивание применялось для характеристики цитоархитектуры коры и гиппокампа мутантных мышей.

Результаты: С помощью ENU-направленного мутагенеза была создана новая мутантная линия мышей, обладающая эпилептиформной активностью. Используя метод моделирования аудиогенных судорог (методика Крушинского [4]), был произведен отбор мышей со склонностью к эпилептическим припадкам, в результате чего была выведена принципиально новая линия мышей – Socrates. Проведенные исследования с применением поведенческих тестов для описания

фенотипа этих мутантных мышей показали, что особи линии Soc обладают пониженной двигательной активностью и способностью к обучению и при этом повышенной ориентировочно-исследовательской активностью, что коррелирует с их повышенной возбудимостью. Применение молекулярно-генетических методов по разработке панели SNP позволило провести картирование участков ДНК для выявления генов-мишеней, участвующих в формировании эпилепсии. Реализованный в дальнейшем транскриптомный анализ генов-мишеней показал изменения экспрессии этих генов. Изучение паттернов экспрессии генов, кодирующих протеинкиназы, ГАМК- и глутаматных рецепторов и мембранных ионных путей показало снижение экспрессии, что способствует нарушению нейротрансмиссии в коре головного мозга мышей Soc, в конечном итоге являясь одной из причин формирования эпилептической активности. При изучении цитоархитектуры коры и гиппокампа было обнаружено увеличение количества интернейронов в коре и увеличение количества астроцитов в гиппокампе, что свидетельствует о нарушении состояния баланса возбуждения/торможения у мутантных особей линии Soc, что также является одной из причин, формирующих эпилептиформное состояние.

Выводы: В этом исследовании нам удалось не только создать и охарактеризовать новую линию мышей с повышенной склонностью к эпилептиформной активности, но и выявить некоторые молекулярно-генетические и морфофизиологические, а также цитоархитектурные изменения, приводящие к изменению баланса между возбуждением и торможением в нейрональной сети мутантных мышей.

Финансирование: Исследование проводилось в рамках государственного задания Минобрнауки России (FSWR-2023-0029).

Phenotypic characterization of novel ENU-induced mouse mutant with audiogenic epilepsy – Socrates

Kuldaeva V.P.^{1*}, Gavrish M.S.¹, Babaev A.A.¹, Kondakova E.V.¹, Borisova E.V.², Tarabykin V.S.²

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

² Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Germany

* verunya.rubackova@mail.ru

Key words: epilepsy; ENU-induced mutagenesis; development of the cerebral cortex

Motivation and Aim: Epilepsy is a neurological disease with a multidisciplinary and complex pathogenesis, characterized by recurrent spontaneous seizures caused by aberrant synchronized neuronal firing due to an imbalance between excitatory and inhibitory components of the central nervous system (CNS) [1, 2]. An important role in epileptogenesis is assigned to genetic factors, which are confirmed by many studies on the genetic determination of epilepsy [3]. Animal models of the disease are widely used to study the neurophysiological, pathophysiological, and genetic basis of epileptogenesis, as well as to create fundamentally new methods for correcting epileptic activity. Identification and characterization of new mutations in mice, followed by identification and characterization of the genes responsible for the mutations, will

significantly improve our understanding of the genetic regulation of corticogenesis and subsequent developmental disorders of the cerebral cortex.

Methods and algorithms: To create fundamentally new mouse strains, chemical ENU-directed mutagenesis was used. The selection of mice prone to epileptiform activity was carried out by modeling audiogenic seizures. The classical phenotypic description of the new mouse model of epilepsy was based on behavioral testing, including the “Open Field” test, the conditioned passive avoidance response test (CPAT), and the protocol for measuring the acoustic startle response. SNP mapping was performed to identify target genes that change their expression in mice exhibiting epileptic activity. In situ hybridization was conducted to identify the localization of mRNAs selected from candidate gene sequencing results in coronal brain sections. Immunohistochemical staining was utilized to characterize the cytoarchitecture of the cortex and hippocampus of mutant mice.

Results: Using ENU-directed mutagenesis, a new mutant mouse strain with epileptiform activity was generated. Through the modeling of audiogenic seizures (utilizing Krushinsky's method [4]), mice with a predisposition to epileptic seizures were identified, resulting in the development of a novel strain of mice named Socrates. Behavioral tests revealed that individuals of the Soc line exhibited reduced motor activity and learning ability, alongside increased orientation-exploratory activity, correlating with their heightened excitability. The development of a SNP panel using molecular genetic methods enabled the mapping of DNA regions to identify target genes involved in epilepsy formation. Subsequent transcriptomic analysis of these target genes demonstrated changes in their expression. Investigation into the expression patterns of genes encoding protein kinases, GABA and glutamate receptors, and membrane ion pathways revealed a decrease in expression, contributing to impaired neurotransmission in the cerebral cortex of Soc mice, ultimately being one of the factors behind the emergence of epileptic activity. Examination of the cytoarchitecture of the cortex and hippocampus revealed an increase in the number of interneurons in the cortex and an increase in the number of astrocytes in the hippocampus, indicating an imbalance in the excitation/inhibition balance in mutant individuals of the Soc line, which is also a contributing factor to the development of epileptiform states.

Conclusions: This study not only succeeded in creating and characterizing a new line of mice with an increased predisposition to epileptiform activity but also identified molecular genetic, morphophysiological, and cytoarchitectural changes leading to an altered balance between excitation and inhibition in the neuronal network of mutant mice.

Funding: This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FSWR-2023-0029).

Список литературы/References

1. Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):185-191
2. Patel D.C. et al. Neuron – glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(5):282-297
3. Scheffer I.E. et al. Genetics of the epilepsies: Genetic twists in the channels and other tales. *Epilepsia*. 2010;51(S1):33-36
4. Vinogradova L.V. Neurophysiological mechanisms of reflex audiogenic epilepsy. Abstract of the dissertation of a doctor of biological sciences. Moscow, 2014