

The evaluation of the presence of epilepsy risk exon 8 variant in the Ca v 1.2 calcium channel gene in rats with different propensity for epilepsy

Mariam Dzigrashvili

Master's thesis submitted to the Faculty of Natural Science and Medicine of the Ilia State University, according to the requirements for the Degree of Master of Science in Applied Genetics

Program: Applied Genetics

Supervisors: Georgi Gamkrelidze, PhD

Mari Murtskvaladze, PhD

Ilia State University

Tbilisi, 2023

1.2 Declaration

This thesis describes the work I undertook between 2022 and 2023 at the Faculty of Natural Sciences and Medicine of Ilia State University in Tbilisi, Georgia. The supervision and mentorship for this work were provided by Professor Georgi Gamkrelidze and Professor Mari Murtskvaladze. I declare that the results presented in this thesis are from original experimental work carried out by me for the purpose of this Master's thesis. The results generated for this thesis have not been submitted for a degree, diploma, or any other qualification at any other institution.

Mariam Dzigrashvili

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Dzigrashvili', with a large, stylized flourish at the end.

21.12.2023

1.3 Acknowledgement

First and foremost, I want to express my sincere gratitude to my primary supervisor, Prof. Georgi Gamkrelidze. He not only granted me the incredible opportunity to be a part of this project but also provided unwavering guidance and support over the past two years, making this journey both fulfilling and captivating.

I would like to express my gratitude for the invaluable contribution of my secondary supervisor, Prof. Mari Murtskvaladze. Her insightful teachings in the lab and expert guidance in the captivating field of applied genetics have significantly enriched my academic journey.

I am deeply thankful to both of my supervisors without whom the completion of this study would not have been possible.

Lastly, I want to express my thanks to everyone at Ilia State University for their unwavering support, not just in our experiments but also in forming lasting friendships over the past years.

1.4 Abstract

Epilepsy, a prevalent neurological disorder affecting approximately 1% of the global population, is characterized by spontaneous, recurrent seizures resulting from abnormal hypersynchronous discharge of forebrain neurons. Despite its widespread impact, the understanding of epileptogenesis, the process leading to epilepsy, remains incomplete, posing a significant challenge to modern neuroscience. Currently, there are no approved drugs specifically designed to prevent or modify epileptogenesis. This research focuses on the role of the *CACNA1C* gene, which encodes the voltage-gated L-type calcium channel pore-forming α subunit Ca_v 1.2, in the context of epilepsy. Recent studies have linked specific variants of exon 8 of the *CACNA1C* gene to Timothy syndrome, a complex epilepsy phenotype. Notably, these variants slow down Ca_v 1.2 channel voltage-dependent inactivation, potentially influencing the excitability, synaptic transmission, and network activity of pyramidal neurons in the cerebral cortex. In this study, I hypothesize that different exon 8 variants of the *CACNA1C* gene may act as susceptibility factors, modulating epileptogenesis leading to acquired temporal lobe epilepsy (TLE). To address this hypothesis, using personalized medicine strategy, I have sequenced and analyzed the exon 8 in three kainic acid-treated male Wistar rats, 2.5–3 months of age, exhibiting varying susceptibility to acquired temporal lobe epilepsy and epileptogenesis. I have found that despite different proclivity to acquired TLE, the analyzed rats had identical exons 8 in the *CACNA1C* gene and the sequences were not different from rat NCBI Reference sequence. The data strongly suggest that the exon 8 of the *CACNA1C* gene does not contribute to the propensity of the analyzed individual rats to acquired TLE. The findings hold both theoretical and practical significance, paving the way for a more precise and effective personalized therapeutic approach to epilepsy.

1.4 აბსტრაქტი

ეპილეფსია გავრცელებული ნევროლოგიური დაავადებაა, რომლითაც დაავადებულია მსოფლიოს მოსახლეობის დაახლოებით 1%. იგი ხასიათდება სპონტანური, განმეორებადი კრუნჩხვებით, რომლებიც გამოწვეულია წინა ტვინის ნეირონების პათოლოგიური ჰიპერსინქრონული განმუხტვით. მიუხედავად დაავადების ფართომასშტაბიანი გავლენისა, ეპილეპტოგენეზი, პროცესი, რომელიც იწვევს ეპილეფსიის განვითარებას არ არის სრულყოფილად შესწავლილი. ეს მნიშვნელოვან გამოწვევას წარმოადგენს თანამედროვე ნეირომეცნიერებაში. ამჟამად, არ არსებობს მედიკამენტები, რომლებიც ეპილეპტოგენეზის პრევენციას ან მოდიფიცირებას უზრუნველყოფენ. ჩემი კვლევა ფოკუსირებულია ეპილეფსიის ჭრილში CACNA1C გენის როლზე, რომელიც აკოდირებს ვოლტაჟ დაჭიმვრულ L-ტიპის კალციუმის არხის ღრუს წარმომქმნელ $Ca_v 1.2 \alpha$ სუბერთეულს. დღესდღეობით, ახალმა კვლევებმა დააკავშირა CACNA1C გენის ეგზონ 8-ის სპეციფიკური ვარიანტები ტიმოთის სინდრომთან, ეპილეფსიის კომპლექსურ ფენოტიპთან. აღსანიშნავია, რომ ამ ეგზონის ვარიანტები აქვეითებენ $Ca_v 1.2$ არხის ვოლტაჟ-დამოკიდებულ ინაქტივაციას, რაც მოქმედებს თავის ტვინის ქერქში პირამიდული ნეირონების აგზნებადობაზე, სინაპსურ გადაცემაზე და ქერქის წრედების აქტივობაზე. ამ კვლევაში, ჩემს ჰიპოთეზას წარმოადგენს ის, რომ CACNA1C გენის ეგზონი 8-ის სხვადასხვა ვარიანტი შეიძლება მოქმედებდეს როგორც შეძენილი საფეთქლის წილის ეპილეფსიის (სწე) მიმართ მიდრეკილების ფაქტორი. ამ ჰიპოთეზის შესწავლის მიზნით, გამოვიყენე რა პერსონალიზებული მედიცინის სტრატეგია, ჩავატარე CACNA1C გენის ეგზონ 8-ის სექვენირება და სიქვენსის ანალიზი კანინის მჟავით დამუშავებულ, 2,5-3 თვის ასაკის, 3 მამრ Wistar ვირთაგვაში, რომელთაც ერთმანეთისგან განსხვავებული მიდრეკილება ჰქონდათ შეძენილი სწე-დმი. მიღებული შედეგების თანახმად, მიუხედავად სხვადასხვა მიდრეკილებისა სწდ-მი, შესწავლილ ვირთაგვებში CACNA1C გენის ეგზონი 8 იდენტური იყო და მიღებული სიქვენსები არ განსხვავდებოდა ვირთაგვის NCBI რეფერენსულ თანმიმდევრობისგან.

ამრიგად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ CACNA1C გენის ეგზონი 8 არ წარმოადგენს სწე-სადმი მიდრეკილების ფაქტორს შესწავლილ ვირთაგვებში. კვლევის შედეგებს, აქვს როგორც თეორიული, ასევე პრაქტიკული მნიშვნელობა, რაც გზას უხსნის ეპილეფსიის უფრო ზუსტი და ეფექტური პერსონალიზებული თერაპიული მიდგომის დანერგვას.