

## Poster P.06.37

### A NOVEL COMPREHENSIVE STRATEGY FOR THE STUDY OF THE MOLECULAR BASIS OF FAMILIAL HEMIPLEGIC MIGRAINE 3

Barbieri R.<sup>[1]</sup>, Bertelli S.<sup>[2]</sup>, Pusch M.<sup>[1]</sup>, Gavazzo P.<sup>\*(1)</sup>

<sup>[1]</sup>Biophysics Institute-CNR ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>SISSA ~ Trieste ~ Italy

Familial hemiplegic migraine 3 (FHM3) is a severe form of migraine associated with aura and transient hemiparesis, caused by mutations in the Nav1.1 channel encoding SCN1A gene, known as a major epilepsy gene as well. So far conflicting results have been obtained from the investigation of functional consequences of FHM3-related mutations in heterologous expression systems. The purpose of our project is to investigate the mechanisms underlying migraine in FHM3 with the idea to get a univocal picture of FHM3 pathomechanisms. The research takes advantage of two complementary models: HEK cells transfected with a SCN1A plasmid carrying FHM3-related mutations and a FHM3 knock-in mouse model (Scn1AL1649Q). A novel optimized SCN1A containing-plasmid was designed in silico and synthesized, and migraine mutations were inserted in this background. Whole-cell patch clamp was performed to investigate the functional properties of mutant Nav1.1 transiently expressed in HEK cells in terms of activation, inactivation, and persistent Na<sup>+</sup> current. The investigation was extended to all 12 so far known FHM3-related mutations in search of a unifying phenotype; most mutants exhibited the same current density as WT and showed a shift of the steady state inactivation to more positive voltages, accelerated recovery from inactivation, and an increase of the persistent current, confirming that most FHM3 mutations induced a gain of function effect. The application of GS967, a late Na<sup>+</sup> current blocker, inhibited persistent currents of all FHM3 mutated channels, thereby stabilizing their inactivated state. To get as close as possible to the situation found in patients we took advantage of a knock-in mouse model carrying the L1649Q FHM3 mutation and focused on the investigation of electrophysiological properties of acutely dissociated cerebellar Purkinje cells from WT, heterozygous and homozygous knock-in phenotype between P16-P27. The results confirmed that the L1649Q-SCN1A mutation directly interferes with the inactivation process of the channel in dissociated Purkinje neurons slowing down of the inactivation of the current and an increasing the persistent current. The physiological effect of the mutation would consist in a "gain of function" of the Na currents in GABAergic inhibitory neurons; result that fits well with the onset of "cortical spreading depression" associated with the painful event of migraine.

We expect to extend our ex vivo investigation to a new mouse model now available in our laboratory carrying the mutation F383S in SCN1A that renders Nav1.1 channel insensitive to tetrodotoxin (TTX). This will permit to distinguish the contribute of Nav1.1 current from that of the other TTX- sensitive Na channels (Nav1.2, 1.3, 1.6) usually expressed in neurons.

In conclusion our results confirm that FHM3 defects produce a gain of function effect of Nav1.1 channel and indicate the blocker GS967 as a promising specific pharmacological treatment of FHM3.

Una nuova strategia integrata per lo studio delle basi molecolari dell'Emicrania Emiplegica Familiare 3 (GGP17178)

L'emicrania emiplegica familiare 3 (FHM3), forma di emicrania grave associata ad emiparesi transitoria ed aura, è causata da mutazioni nel gene SCN1A che codifica per il canale ionico del Na(+) Nav1.1, responsabile della generazione e trasmissione dei segnali elettrici veloci utilizzati dalle cellule nervose per comunicare su lunghe distanze. Il nostro progetto è focalizzato sullo studio dei

meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza della FHM3, con l'idea di ottenere un quadro finalmente univoco dei meccanismi patologici responsabili della malattia, visto che i risultati finora disponibili in letteratura sui cambiamenti funzionali di Nav1.1 mutati nella FHM3 sono talvolta in contrasto tra di loro.

La nostra ricerca si avvale di due strategie elettrofisiologiche parallele: studio delle cellule in coltura (HEK293) che esprimono in modo transitorio canali Nav1.1 mutati e studio di un modello di topo geneticamente modificato con l'introduzione della mutazione L1649Q responsabile di FHM3. Abbiamo progettato e sintetizzato una sequenza "ottimizzata" del gene SCN1A che ha facilitato lo studio delle correnti ioniche prodotte dalle 12 mutazioni FHM3 finora note; è risultato che la maggior parte dei mutanti FHM3 induce un "guadagno di funzione" del canale Nav1.1. L'applicazione di GS967, un bloccante della corrente cosiddetta "tardiva" di Na(+), ha ridotto l'effetto dovuto ai mutanti, stabilizzando i canali mutati nel loro stato inattivato. Per avvicinarci il più possibile alla situazione riscontrata nei pazienti, abbiamo a disposizione un modello di topo che porta la mutazione L1649Q di FHM3; ci siamo concentrati sull'analisi delle proprietà elettrofisiologiche delle cellule Purkinje del cervelletto dissociate da topi WT, eterozigote o omozigote per la mutazione. I risultati hanno confermato che la mutazione L1649Q-SCN1A interferisce direttamente con l'attività dei canali Nav1.1 incrementandola. Anche in questo modello quindi l'effetto fisiologico della mutazione FHM3 consiste in un "guadagno di funzione"; risultato che si adatta bene all'insorgenza della "depressione corticale propagata" (cortical spreading depression, CSD) associata all'evento doloroso dell'emicrania.

Ci aspettiamo di estendere la nostra indagine ex vivo ad un nuovo modello di topo ora disponibile nel nostro laboratorio che trasporta la mutazione F383S in SCN1A e che rende il canale Nav1.1 insensibile alla tetrodotossina (TTX). Ciò consentirà di distinguere il contributo della corrente Nav1.1 da quello degli altri canali Na(+) sensibili al TTX (Nav1.2, 1.3, 1.6) normalmente espressi nei neuroni. In conclusione, i nostri risultati confermano che i difetti dell' FHM3 producono un guadagno dell'effetto funzionale del canale Nav1.1 e quindi una sua iperattività ed indicano il bloccante GS967 come promettente trattamento farmacologico specifico dell'FHM3.

Anderson LL, Hawkins NA, Thompson CH, Kearney JA, George AL, Jr. Unexpected Efficacy of a Novel Sodium Channel Modulator in Dravet Syndrome. *Sci Rep.* 2017;7(1):1682. Epub 2017/05/12.

Bertelli S, Barbieri R, Pusch M, Gavazzo P. Gain of function of sporadic/familial hemiplegic migraine-causing SCN1A mutations: Use of an optimized cDNA. *Cephalalgia.* 2019;39(4):477-88. Epub 2018/07/11.

Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet.* 2005;366(9483):371-7.

Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:365-91. Epub 2012/11/30.

Emicrania Emiplegica Familiare di tipo 3

Coordinator: Paola Gavazzo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP17178

**Disease Name:**

Familial Hemiplegic Migraine 3

**Keywords:**

Nav1.1, Patch clamp, GS967