

- **Caratterizzazione di una nuova risposta omeostatica dei neuroni GABAergici colecistochinina positivi (CCK+) nei topi modello di sindrome di Dravet e suo utilizzo come approccio terapeutico.**

- **Responsabile**

Silvana Franceschetti

- **Nome del Garante Scientifico**

Pasquale Striano

- **Centri partecipanti**

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta (Silvana Franceschetti, Paolo Scalmani and Laura Canafoglia).

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS UMR7275 & Université Côte d'Azur (Massimo Mantegazza, Fabrice Duprat e Sandrine Cestele).

## **Sinossi**

Abbiamo già contribuito ad identificare l'effetto delle mutazioni a carico del canale del sodio Nav1.1 nella sindrome di Dravet (DS): l'ipoeccitabilità degli interneuroni GABAergici porta a una riduzione dell'inibizione GABAergica e quindi all'ipereccitabilità delle reti neuronali (1-3). Sorprendentemente i nostri dati preliminari rivelano che, nel nostro modello di DS (eterozigoti Nav1.1 knock-out: *Scn1a*<sup>+/-</sup>), gli interneuroni colecistochinina positivi (CCK+) sono ipereccitabili, diversamente da altri sottotipi di neuroni GABAergici. Questo effetto inatteso implementa una risposta omeostatica che può migliorare la gravità del fenotipo ed in cui l'aumento del rilascio del neuropeptide CCK gioca un ruolo chiave, probabilmente riducendo l'ipoeccitabilità di altri interneuroni (4, 5). Infatti, i nostri dati preliminari, ottenuti incrociando topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> con topi knockout per la CCK in eterozigosi, mostrano che l'aploinsufficienza di CCK rende il fenotipo dei topi DS più grave, aumentando la frequenza, la gravità delle convulsioni ed il tasso di mortalità degli animali.

Questa risposta omeostatica, che abbiamo identificato negli interneuroni CCK+, è una caratteristica nuova di questo sottotipo neuronale, un ruolo inedito, precedentemente sconosciuto, che stiamo caratterizzando in dettaglio. Inoltre, proponiamo qui un nuovo concetto terapeutico per la DS, che potrebbe essere applicato anche ad altre interneuronopatie (6). Lo

scopo è aumentare la risposta omeostatica endogena mediata dalla CCK che abbiamo scoperto per sfruttarla come trattamento terapeutico sicuro e poco invasivo.

Miriamo a completare la caratterizzazione della risposta omeostatica degli interneuroni CCK+ nei topi DS per scoprire se il blocco dei recettori CCK ha un effetto maggiore sull'eccitabilità degli interneuroni paralbumina positivi (PV+) nei topi DS rispetto ai controlli a causa dell'aumentato rilascio di CCK dai neuroni CCK+ nei topi DS.

Misureremo anche, tramite microdialisi, la concentrazione extracellulare cerebrale del peptide CCK endogeno rilasciato confrontando i topi DS con i topi di controllo. Caratterizzeremo inoltre la risposta trascrizionale coinvolta nell'ipereccitabilità degli interneuroni CCK+: effettueremo esperimenti qRT-PCR su singola cellula utilizzando il citoplasma degli interneuroni CCK+ estratto con la pipetta da patch-clamp.

Sfrutteremo poi questa risposta omeostatica come un nuovo concetto terapeutico per i topi DS trattandoli con un peptide CCK modificato resistente alla degradazione che verrà applicato mediante somministrazione intranasale, via diretta per la somministrazione cerebrale. Questi esperimenti apriranno la strada allo sviluppo di una terapia CCK nei pazienti DS.

Il finanziamento stanziato dalla Fondazione LICE consentirà di eseguire esperimenti chiave necessari per completare il progetto e ciò rafforzerà notevolmente le nostre conclusioni.

## **Razionale**

Le mutazioni del gene *SCN1A* (canale del sodio  $Na_v1.1$ ) sono la causa della DS, una delle più gravi encefalopatie epilettiche, che sono state anche implicate come fattori di rischio in altre epilessie più comuni. La DS è caratterizzata da crisi epilettiche farmacoresistenti, con esordio nel primo anno di vita con convulsioni febbrili e comparsa successiva di convulsioni afebrili, grave ritardo mentale, disturbi comportamentali e aumento della mortalità (7). I test genetici consentono una diagnosi precoce in modo che un trattamento efficace, se fosse disponibile, potrebbe essere applicato prima che la malattia si sviluppi completamente. Studiando l'effetto delle mutazioni in vitro e modelli murini, che portano le mutazioni DS trovate nei pazienti, abbiamo identificato il meccanismo patologico delle mutazioni nel canale del sodio  $Na_v1.1$ : esse causano la perdita di funzione della proteina e l'ipoeccitabilità degli interneuroni GABAergici, inducendo una riduzione

dell'inibizione GABAergica e una ipereccitabilità della rete neuronale (2, 3, 8-10). Questo effetto è stato finora studiato in alcuni sottotipi di neuroni GABAergici, principalmente negli interneuroni parvalbumina positivi (PV+). Abbiamo anche contribuito a proporre che le risposte omeostatiche potessero modulare l'effetto delle mutazioni DS (11). Abbiamo quindi ipotizzato che l'identificazione dettagliata delle risposte omeostatiche potesse meglio rivelare i meccanismi patologici coinvolti nell'epilessia e aprire nuovi approcci per il trattamento terapeutico. Con questo obiettivo ci siamo concentrati su alcuni neuroni GABAergici positivi alla colecistochinina (CCK+) ("basket cells" CCK+). Questi neuroni sono considerati effettori plastici che ricevono numerosi input neuromodulatori e li traducono in una fine regolazione delle funzioni delle reti neuronali. In modo diverso, invece, quelli PV+ sono considerati attuatori di meccanismi rigidi di inibizione per i circuiti, producono ritmi regolari, e la loro attività è molto meno modulata (12). Pertanto, poiché le cellule basket cells CCK+ sono molto più plastiche e modulabili dei neuroni PV+, abbiamo ipotizzato che potessero rispondere in modo diverso alla perdita di funzione di  $Na_v1.1$  indotta dalle mutazioni epiletogene. Sorprendentemente, i nostri risultati preliminari (vedere metodi) rivelano che nei topi DS le cellule CCK+ sono ipereccitabili, al contrario di quelle PV+ e di altri sottotipi di interneuroni. Abbiamo interpretato la sorprendente ipereccitabilità dei neuroni CCK+ come una risposta omeostatica che non viene indotta in altri sottotipi di interneuroni, le cui funzioni sono meno plastiche. In particolare, i neuroni CCK+ co-rilasciano insieme al GABA il neuropeptide CCK, questo è un neuromodulatore che può aumentare l'eccitabilità di altri interneuroni (incluse le cellule basket cells PV+, gravemente aploinsufficienti nel modello DS a causa della mutazione) interagendo con recettori accoppiati a G proteine e modulando canali ionici diversi (4, 5, 13). Abbiamo scoperto (vedere metodi) che l'aumento del rilascio di CCK gioca un ruolo importante nella risposta omeostatica indotta dall'ipereccitabilità delle cellule CCK+. Proponiamo di completare la caratterizzazione della risposta omeostatica dei neuroni CCK+ che abbiamo identificato nel modello murino di DS. Proponiamo inoltre un nuovo concetto terapeutico per la DS che potrebbe essere applicato anche ad altre patologie: aumentare la risposta omeostatica endogena di CCK che abbiamo scoperto per sfruttarla come trattamento sicuro e poco invasivo.

## **Obiettivi**

### **Obiettivo 1) Completare la caratterizzazione della risposta omeostatica implementata dagli interneuroni CCK+ nei topi DS.**

1a) Verificheremo l'ipotesi che il blocco dei recettori CCK abbia un effetto maggiore sull'eccitabilità degli interneuroni PV+ nei topi DS rispetto agli animali di controllo della stessa nidiata, a causa dell'aumentato rilascio di CCK dai neuroni CCK+ nei topi DS.

1b) Studieremo l'effetto della CCK *in vitro* sull'ipereccitabilità circuitale che abbiamo osservato in topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> applicando in fettine di ippocampo stimolazioni tetaniche ai collaterali di Schaffer (scariche post-stimolazione più lunghe ed ampie) (1) (Collaborazione con M. Mantegazza).

1c) Misureremo la concentrazione extracellulare del peptide CCK endogeno che prevediamo sia maggiore nei topi DS (Collaborazione con M. Mantegazza).

1d) Identificheremo la risposta trascrizionale coinvolta nell'ipereccitabilità degli interneuroni CCK+ eseguendo esperimenti qRT-PCR di singola cellula.

### **Obiettivo 2) Utilizzare la somministrazione intranasale di CCK come terapia per i modelli di topo DS.**

Tratteremo i topi DS con un peptide CCK modificato che lo rende resistente alla degradazione il quale verrà applicato mediante somministrazione intranasale. L'avvenuta localizzazione di CCK nel cervello sarà verificata mediante spettrometria di massa (Collaborazione con M. Mantegazza). Questi esperimenti apriranno la strada allo sviluppo di una terapia mediante CCK nei pazienti con DS.

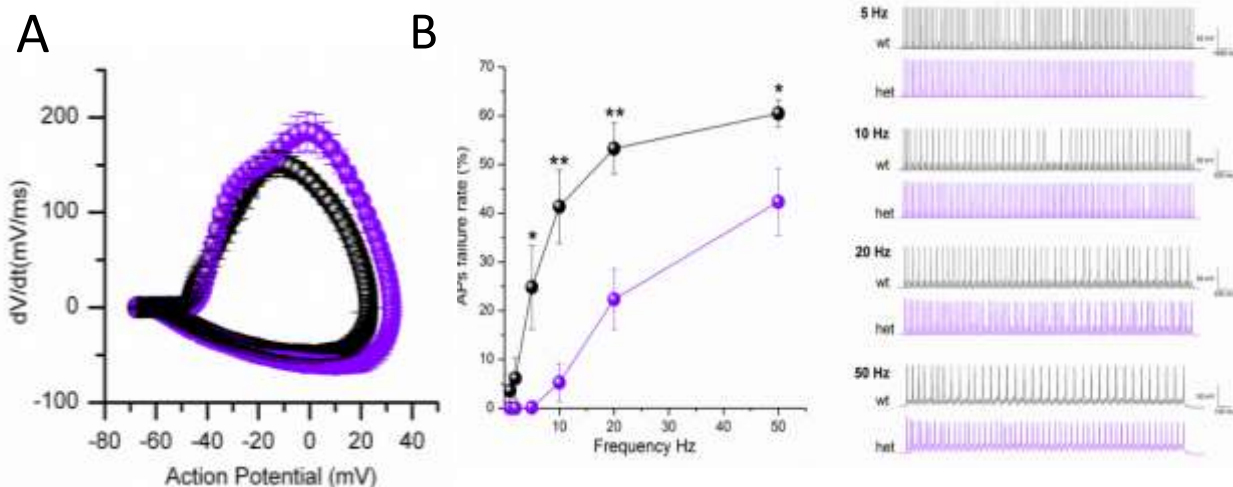
## **Parole chiave**

Sindrome di Dravet, interneuroni GABAergici, risposta omeostatica, colecistochinina, somministrazione intranasale

## **Metodi**

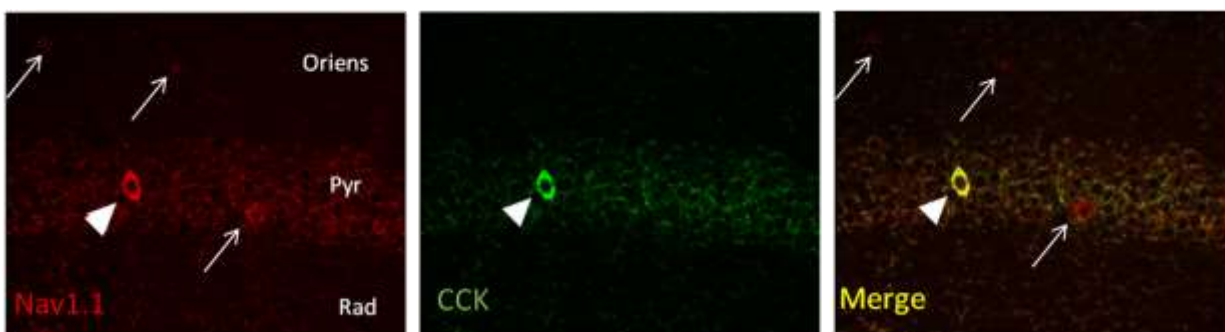
Abbiamo effettuato registrazioni elettrofisiologiche in fettine di cervello di topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> e controlli della stessa nidiata, focalizzandoci sull'ippocampo (in particolare CA1, ben caratterizzato in letteratura), in quanto abbiamo mostrato che l'ippocampo è particolarmente ipereccitabile in

topi DS (1). Abbiamo osservato una diminuita eccitabilità negli interneuroni PV+ e O-LM coerentemente con i risultati già pubblicati (dati non mostrati). Cercando una risposta omeostatica, abbiamo registrato da cellule CCK+ che, come menzionato sopra, mostrano numerose modulazioni (12), identificandole incrociando topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> con topi transgenici GAD65 che le marcano selettivamente con la proteina fluorescente GFP (14). Abbiamo osservato un aumento dell'ampiezza e della pendenza dei potenziali d'azione (PA), indicante aumentata eccitabilità (phase-plot, Fig.1A). Abbiamo quindi esaminato la generazione di PA in risposta ad un treno di 100 puls di corrente (10 ms, alla soglia) tra 1 e 50Hz. Gli interneuroni CCK+ mostrano una diminuzione del tasso di fallimento di PA nei topi *Scn1a*<sup>+/-</sup>, mostrando aumentata eccitabilità (Fig.1B).



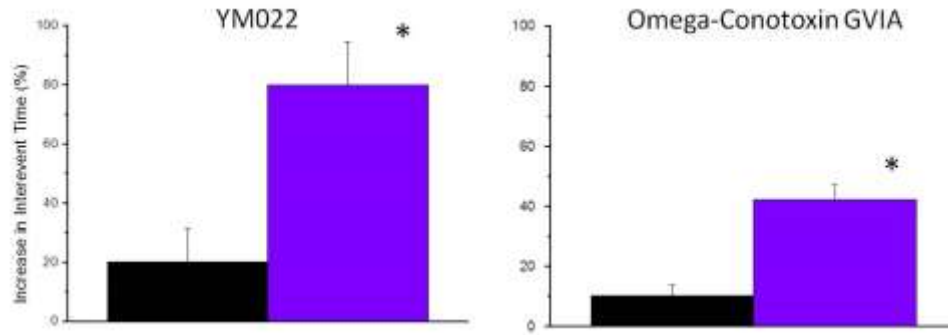
**Fig.1: A)** Phase-plot del primo PA alla reobase nelle cellule CCK+ da topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> (violetto) e dai controlli WT (nero); il grafico mostra una maggiore pendenza e ampiezza nel modello DS. **B)** Sinistra; Quantificazione della capacità degli interneuroni CCK+ a sostenere PA ripetuti in seguito ad un treno di stimolazione a diverse frequenze. In *Scn1a*<sup>+/-</sup> si osserva un minor tasso di fallimento a frequenze superiori ai 5Hz. Destra; Tracce esemplificative della scarica di AP a diverse frequenze di stimolazione, \*\* p <0,01, \* p <0,05. Test di Mann Whitney.

Abbiamo inoltre eseguito esperimenti di ibridazione *in situ* per scoprire se le cellule CCK+ esprimessero i canali Nav 1.1 come nel caso di numerosi altri interneuroni GABAergici. Fig.2 mostra che le cellule CCK+ nello strato piramidale CA1 dell'ippocampo sono positive sia per Nav 1.1 che per CCK.



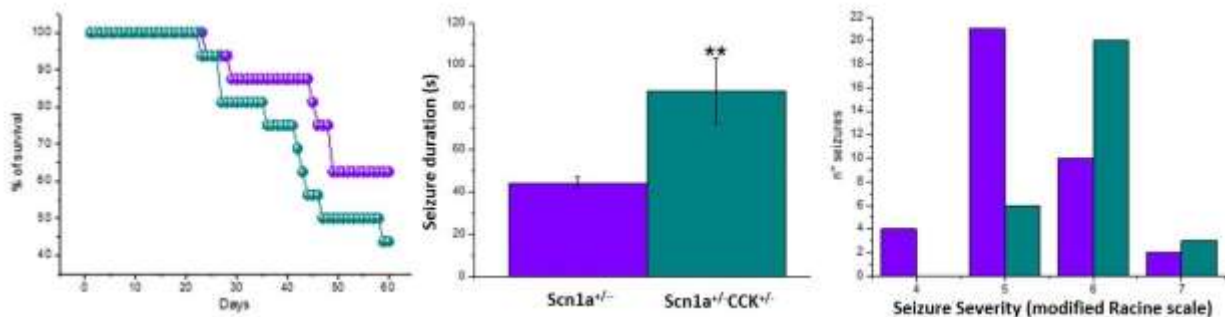
**Fig.2:** Doppia ibridazione in situ nella regione CA1 dell'ippocampo che dimostra l'espressione di Nav 1.1 nelle cellule CCK+ (frecche grosse).

Il co-rilascio di GABA e CCK potrebbe avere un ruolo nella risposta omeostatica implementata dalle cellule CCK+ nel modello DS. Secondo la nostra ipotesi, senza l'aumentato rilascio di CCK da parte delle cellule CCK+, che aumenta l'eccitabilità di altri sottotipi di interneuroni agendo sul recettore CCK2 (4), si avrebbe una riduzione ancora maggiore dell'inibizione nel modello DS. Per testare questa ipotesi, abbiamo studiato l'effetto del blocco del recettore CCK2 sulle correnti spontanee postsinaptiche inibitorie (IPSCs: generate dall'eccitabilità spontanea e dal rilascio sinaptico dai neuroni GABAergici) registrate dai neuroni piramidali nell'area CA1 dell'ippocampo. Con l'antagonista specifico del recettore CCK2 (YM022) abbiamo osservato un aumento maggiore del tempo tra un evento e l'altro, cioè una riduzione della frequenza, nel modello DS rispetto al controllo (Fig.3, sinistra). Questo dimostra, coerentemente con la nostra ipotesi, che il neuropeptide CCK ha un effetto maggiore nell'aumentare le IPSCs nel modello *Scn1a*<sup>+/-</sup>. Per studiare le modifiche del contributo delle sinapsi CCK+ alle IPSCs totali, abbiamo confrontato le proprietà delle IPSCs registrate prima e durante la perfusione con Omega-Conotossina-GVIA (un bloccante dei canali del calcio di tipo N/Cav2.2 che, in modo selettivo, blocca la trasmissione sinaptica dalle sinapsi CCK+). La tossina induce un aumento maggiore del tempo tra un evento e l'altro (diminuzione della frequenza delle IPSCs) nei topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> (Fig.3, destra), dimostrando che la trasmissione sinaptica CCK+ è incrementata negli animali DS.



**Fig.3.** Sinistra, percentuale di incremento del tempo tra due eventi nelle IPSCs registrate da neuroni piramidali nella zona CA1 dell'ippocampo con l'antagonista del recettore CCK2, YM022. Destra, percentuale di incremento del tempo due eventi nelle IPSCs con l'antagonista (Omega-Conotoxin-GVIA) del canale del calcio N-type/Cav2.2 \*  $p < 0.05$ , Wt (nero), *Scn1a*<sup>+/-</sup> (violetto).

Per studiare meglio il ruolo omeostatico del peptide CCK in vivo, abbiamo incrociato topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> con topi che mancano del peptide CCK (knock-out del gene CCK; <https://www.jax.org/strain/017710>) in modo da creare un doppio knock-out eterozigote che porta, oltre alla mutazione DS, anche l'aploinsufficienza per la CCK. Abbiamo osservato un peggioramento del fenotipo nei topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> CCK<sup>+/-</sup>, che mostrano un più alto tasso di mortalità, un aumento del numero, della gravità e della durata totale delle crisi epilettiche rispetto ai controlli *Scn1a*<sup>+/-</sup> (Fig.4). Quindi, l'aumento del rilascio del neuropeptide CCK è importante per contrastare la perdita di funzione causata dalle mutazioni Nav1.1 nei topi DS e questa risposta omeostatica, svolta dagli interneuroni CCK+, può avere un effetto significativo sul fenotipo epilettico.



**Fig.4:** Sinistra, curve di sopravvivenza per *Scn1a*<sup>+/-</sup> (viola) e *Scn1a*<sup>+/-</sup> CCK<sup>+/-</sup> (verde acqua). Centro, quantificazione della durata totale delle crisi. Destra, quantificazione della gravità delle crisi: i topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> CCK<sup>+/-</sup> mostrano una mortalità più elevata, convulsioni più lunghe e crisi più gravi rispetto a *Scn1a*<sup>+/-</sup>.

## Esperimenti proposti

### **Obiettivo 1. Completare la caratterizzazione della risposta omeostatica degli interneuroni CCK+.**

**1a)** Misureremo l'effetto del bloccante de recettore CCK2, YM022, sull'eccitabilità dei neuroni PV+ con registrazioni di patch-clamp in sezioni ippocampali da topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> e WT.,

**1b)** Testeremo l'effetto dell'applicazione esogena di CCK (100 nM) su fettine ippocampali nelle quali le scariche post-tetaniche risultano incrementate nel modello *Scn1a*<sup>+/-</sup>.(1).

**1c)** Misureremo la concentrazione di CCK extracellulare endogena rilasciata nell'ippocampo e nella neocorteccia mediante microdialisi e dosaggio radioimmunologico come in (15).

**1d)** Eseguiremo esperimenti di qRT-PCR su singola cellula, come in (16) sugli interneuroni CCK+ aspirando il citoplasma con la pipetta da patch-clamp, per quantificare le modifiche nell'espressione genica dei canali ionici (in particolar modo le isoforme di Nav) che rendono queste cellule ipereccitabili nel modello *Scn1a*<sup>+/-</sup>.

### **Obiettivo 2. Somministrazione intranasale di CCK come terapia per i topi DS.**

Il peptide CCK modificato resistente alla degradazione (sequenza: [pE]QDYM[dA]WMDF, vedere (17)), sintetizzato da [www.genscript.com](http://www.genscript.com), sarà somministrato per via intranasale (18), metodo già utilizzato con successo per la somministrare cerebrale di CCK senza effetti collaterali (19, 20). La presenza cerebrale del peptide sarà verificata tramite spettrometria di massa (21). L'effetto del trattamento sarà testato in acuto sulle convulsioni indotte da ipertermia come in (1): un'applicazione quattro ore ed una successiva trenta minuti prima dell'induzione delle crisi. Nel caso in cui non si osservassero effetti significativi, valuteremo l'effetto sulle crisi spontanee registrate con video-EEG , tramite trattamento in cronico (una volta al giorno, per un periodo variabile in funzione dei risultati ottenuti).

## **Risultati attesi**

Abbiamo già dimostrato che i neuroni GABAergici CCK+ sono ipereccitabili in fettine di cervello da topi *Scn1a*<sup>+/-</sup>, anche se questi neuroni esprimono canali Nav 1.1 come altri interneuroni GABAergici, che sono invece ipoecitabili in questo modello di DS. L'ipereccitabilità di questi neuroni aumenta l'effetto potenziante del neuropeptide CCK sulla trasmissione GABAergica, il peptide è co-rilasciato con GABA dai neuroni CCK+, probabilmente a causa dell'aumento del



rilascio di CCK e del conseguente ruolo modulatorio positivo sull'eccitabilità di altri interneuroni. Infatti, abbiamo dimostrato che l'aploinsufficienza di CCK rende il fenotipo dei topi *Scn1a*<sup>+/-</sup> più grave. Questo effetto inedito e inatteso implementa una delle risposte omeostatiche che possono essere coinvolte nella sindrome di Dravet e possibilmente in altre patologie caratterizzate da ipoeccitabilità dei neuroni GABAergici. Si tratta di una nuova forma di plasticità modulatoria dei neuroni CCK+, che è diversa da quella indotta dai neuromodulatori: è una risposta plastica alle modificazioni patologiche indotte da mutazioni genetiche.

Con il finanziamento della Fondazione LICE, prevediamo di:

- 1) Ottenere migliori evidenze che la risposta omeostatica implementata dai neuroni CCK+ sia effettivamente indotta dall'aumento del rilascio di CCK che agisce aumentando l'eccitabilità cellulare di altri interneuroni e quindi riducendo l'ipereccitabilità delle reti neuronali osservate nei topi DS.
- 2) Caratterizzare le modificazioni trascrizionali alla base della plasticità modulatoria dei neuroni CCK+.
- 3) Sviluppare un nuovo concetto terapeutico: potenziare la risposta omeostatica endogena mediante la somministrazione intranasale di CCK resistente alla degradazione.

Questi esperimenti chiave consentiranno di rafforzare la caratterizzazione di questo nuovo ruolo dei neuroni CCK+ e di ottenere una pubblicazione di alto livello. Inoltre, il trattamento del modello murino aprirà la strada ad un'applicazione clinica della CCK nei pazienti DS e che potrebbe essere utilizzata anche per altre patologie caratterizzate da ipoeccitabilità dei neuroni GABAergici.

### **Budget**

#### **Attrezzature: 3000 euro:**

- Per l'acquisto di torri di registrazione e componentistica da integrare al set-up già esistente per gli esperimenti di patch-clamp e di una camera per induzione di crisi con ipertermia.
- Software per l'analisi dei dati e relativi upgrade.

Il materiale è necessario per gli esperimenti proposti.

**Personale: 7500 euro:**

- Come integrazione allo stipendio di Paolo Scalmani (da contratto di ricercatore a contratto di ricercatore senior, livello adeguato per l'esperienza e le capacità del ricercatore, ma per cui l'Istituto Besta non dispone di un budget sufficiente)

**Materiale di consumo: 2000 euro:**

- Kit per la preamplificazione necessario agli esperimenti di quantificazione dell'espressione genica (qRT-PCR) e relativi chip.
- Consumabili per elettrofisiologia.
- Spese per il mantenimento delle colonie di topi transgenici.

**Altre spese gestionali: 1500 euro**

- Per spese di pubblicazione (1000 euro) e missioni (500 euro).

**Spese correnti: 1000 euro****Specificare in modo dettagliato le eventuali collaborazioni e cofinanziamenti**

I risultati preliminari sono stati ottenuti nell'ambito del progetto Europeo DESIRE in collaborazione con il laboratorio di Massimo Mantegazza (IPMC, CNRS, Valbonne-Sophia Antipolis, Francia; [www.ipmc.cnrs.fr/?page=mantegazza&lang=uk](http://www.ipmc.cnrs.fr/?page=mantegazza&lang=uk)). I finanziamenti DESIRE sono terminati nell'ottobre 2018 e abbiamo bisogno di supporto per l'esecuzione di esperimenti chiave necessari per la finalizzazione del progetto.

Altri finanziamenti che verranno utilizzati per integrare la sovvenzione LICE sono:

- Finanziamento interno all'Istituto Besta (ricerca corrente): Contratto per ricercatore di 30000 euro (per Paolo Scalmani, che lavorerà al 100% al progetto per esecuzione degli esperimenti e analisi dati), consumabili 10000 euro, co-finanziamento di viaggi/conferenze e spese di pubblicazione. Silvana Franceschetti sarà implicata al 15% (coordinazione e redazione manoscritto), Laura Canafoglia (neurologo strutturato) al 10% (redazione manoscritto).
- Laboratory of Excellence in Ion Channel Science and Therapeutics (ICST) (<http://www.labex-icst.fr/en>) di Massimo Mantegazza: I fondi stanziati per questo progetto sono di 5000 euro per materiale di consumo e 8000 euro per 4 mesi di stipendio (al 50%) per un tecnico di laboratorio (gestione topi transgenici, estrazione peptide CCK modificato dal cervello, mass spectrometry in collaborazione con la platform dell'Istituto). Massimo Mantegazza sarà implicato al 15% (coordinazione, analisi dati e redazione del manoscritto), Fabrice Duprat (ricercatore strutturato)

al 15% (registrazioni elettrofisiologiche extracellulari) e Sandrine Cestele (ricercatore strutturato)  
al 15% (microdialisi e quantificazione radioimmunologica CCK endogena cerebrale).

- **Title**

**A novel homeostatic response implemented by CCK positive GABAergic neurons in Dravet syndrome mice: characterization and use as therapeutic target.**

- **Main center**

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

- **Principal Investigator**

Silvana Franceschetti

- **Scientific Guarantor (Responsabile di Commissione o Gruppo di Studio)**

Pasquale Striano

- **Participating centers**

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta (Silvana Franceschetti, Paolo Scalmani and Laura Canafoglia).

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS UMR7275 & Université Côte d'Azur (Massimo Mantegazza, Fabrice Duprat e Sandrine Cestele).

### **Abstract**

We previously identified the effect of Dravet syndrome (DS) Nav<sub>v</sub>1.1 mutations: hypoexcitability of GABAergic interneurons leading to reduced GABAergic inhibition and hyperexcitability of neuronal networks (1-3). Surprisingly, our more recent preliminary data disclose that, in DS mice (heterozygous Nav<sub>v</sub>1.1 knock-out: *Scn1a*<sup>+/-</sup>), cholecystokinin positive (CCK+) interneurons are hyperexcitable, differently than other subtypes of GABAergic neurons. This unexpected effect implements a homeostatic response that can ameliorate phenotype severity and in which the increased release of the neuropeptide CCK plays a major role, probably by reducing the hypoexcitability of other interneurons (4, 5). In fact, our data, obtained crossing *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice with heterozygous CCK knock-out mice, shows that CCK haploinsufficiency worsen the phenotype of DS mice, increasing frequency and severity of seizures and mortality rate.

This homeostatic response, which we have identified, is a novel and previously undisclosed role of CCK+ interneurons and of CCK that we are characterizing in detail. Moreover, we propose here a new therapeutic concept for DS, which could be applied also to other interneuronopathies (6): boost the endogenous homeostatic CCK response that we have discovered to exploit it as a safe treatment.

We aim to complete the characterization of the homeostatic response of CCK+ interneurons in DS mice. We will find out if the block of CCK receptors has a larger effect on excitability of other subtypes of interneurons in DS mice compared to controls, because of increased CCK release from CCK+ neurons in mutant mice. We will test the effect of exogenously applied CCK in decreasing the network hyperexcitability that we have observed in hippocampal slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice. Also, we will measure by microdialysis the extracellular brain concentration of the endogenous released CCK peptide *in vivo*, comparing DS mice and wild type littermates. Moreover, we will characterize the transcriptional response involved in the hyperexcitability of CCK+ interneurons, performing single cell qRT-PCR experiments from the cytoplasm of CCK+ interneurons collected with the patch-clamp pipette.

We will exploit this homeostatic response as a novel therapeutic concept for DS mouse models, treating DS mice with a modified degradation-resistant CCK peptide applied by intranasal delivery. These experiments will pave the way for the development of a CCK therapy in DS patients, which could complement current treatments that are not sufficient.

Overall, we will characterize a novel, previously undisclosed, homeostatic response implemented by CCK neurons in DS mice. Moreover, we will develop a novel therapeutic concept: boost the homeostatic response by intranasal-delivered degradation-resistant CCK.

The LICE grant will allow to perform key experiments that are needed to complete the project and that will greatly strengthen our conclusions.

### **Rationale**

Mutations of the *SCN1A* gene (Na<sub>v</sub>1.1 sodium channel), are the cause of Dravet syndrome (DS), one of the most severe drug-resistant epileptic encephalopathies, and have been also implicated as risk factors in other common epilepsies. DS is characterized by severe epilepsy with onset in the first year of life as febrile seizures, with later appearance of afebrile seizures, severe mental retardation, behavioural disturbances and increased mortality (7). Genetic tests allow early diagnosis, so that an effective treatment, if it were available, could be applied before that the disease fully develops. Investigating the effect of the mutations *in vitro* and studying gene-targeted mouse models, we have identified the pathological mechanism of Na<sub>v</sub>1.1 DS mutations:

they cause loss of function of Nav1.1 and hypoexcitability of GABAergic interneurons, leading to reduced GABAergic inhibition and network hyperexcitability (2, 3, 8-10). This effect has been thus far studied in some subtypes of GABAergic neurons: mainly fast spiking parvalbumin positive (PV+) basket cells.

We also contributed to propose that homeostatic responses could modulate the effect of DS Nav1.1 mutations (11). Thus, we reasoned that the detailed identification of homeostatic responses may better disclose pathological mechanisms and open new ways for therapy. With this goal, we targeted in our study some cholecystinin positive (CCK+) GABAergic neurons (CCK+ basket cells). These GABAergic neurons are considered plastic effectors that receive numerous neuromodulatory inputs and translate them into a fine tuning of neuronal networks' functions, whereas PV+ ones are considered rigid clockworks for neuronal circuits and their activity is much less modulated (12). Thus, because CCK+ basket cells are much more plastic than PV+ neurons, we hypothesized that could they respond differently to the loss of function of Nav1.1 induced by epileptogenic mutations. Strikingly, our preliminary results (see methods) disclose that in heterozygous Nav1.1 knock-out mice (*Scn1a*<sup>+/-</sup>, model of DS), CCK+ basket cells are hyperexcitable, contrary to PV+ and other subtypes. We interpreted the hyperexcitability of CCK+ neurons as a plastic homeostatic response that is not induced in other interneurons, whose functions are less plastic. Notably, CCK+ neurons co-release with GABA the neuropeptide CCK, which is a neuromodulator that can increase the excitability of other interneurons (including PV basket cells) by interacting with G-protein coupled receptors (CCK2R) and modulating different ion channels (4, 5, 13). We have found (see preliminary data in methods) that the increased release of CCK plays a major role in the homeostatic response induced by the hyperexcitability of CCK+ basket cells.

This homeostatic response, which we have identified, is a novel and previously undisclosed role of CCK+ interneurons and of CCK that we are characterizing in detail. Moreover, we propose here a new therapeutic concept for DS, which could be applied also to other pathologies involving hypoexcitability of GABAergic neurons: boost the endogenous homeostatic CCK response that we have discovered to exploit it as a safe treatment.

## **Objectives**

**Aim 1) Complete the characterization of the homeostatic response implemented by CCK+ interneurons in DS mice.**

1a) We will test the hypothesis that the block of CCK receptors has a larger effect on excitability of PV+ interneurons in DS mice compared to controls, because of increased CCK release from CCK+ neurons in DS mice.

1b) We will test the effect of exogenously applied CCK in decreasing the hyperexcitability that we have observed in hippocampal slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice (longer afterdischarges induced by a tetanic stimulation of the Schaffer collaterals) (Collab. M. Mantegazza).

1c) We will measure the extracellular concentration of the endogenous CCK peptide, which we expect to be increased in DS mice (Collab. M. Mantegazza).

1d) We will identify the transcriptional response involved in the hyperexcitability of CCK+ interneurons by performing single cell qRT-PCR experiments.

**Aim 2) Exploit CCK as a therapy for DS mouse models.**

We will treat DS mice with a modified degradation-resistant CCK peptide applied by intranasal delivery. Brain delivery of CCK will be verified by mass-spectrometry (Collaboration with M. Mantegazza). These experiments will pave the way for the development of a CCK therapy in DS patients.

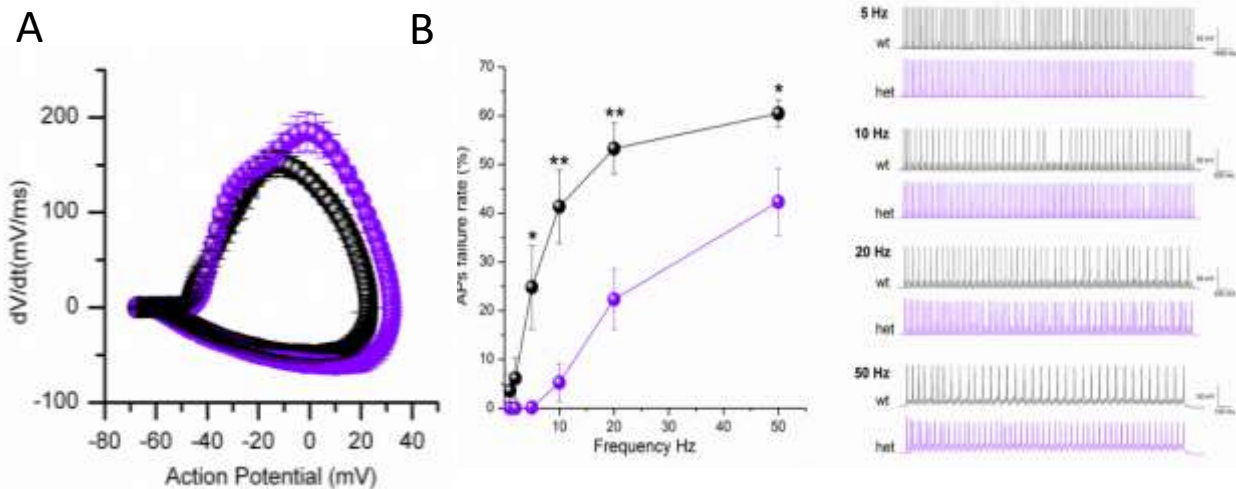
**Keywords** (max 5)

Dravet syndrome; GABAergic neurons; homeostatic response; cholecystokinin; intranasal delivery.

**Methods**

We performed current-clamp whole-cell patch-clamp recordings in hippocampal slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice, because we found that the hippocampus is particularly hyperexcitable in this model (1). We observed decreased excitability (decreased action potential (AP), amplitude and firing frequency) in parvalbumin-positive (PV+) and O-LM interneurons of the CA1 area, consistently with already published results (data not shown). Searching for homeostatic

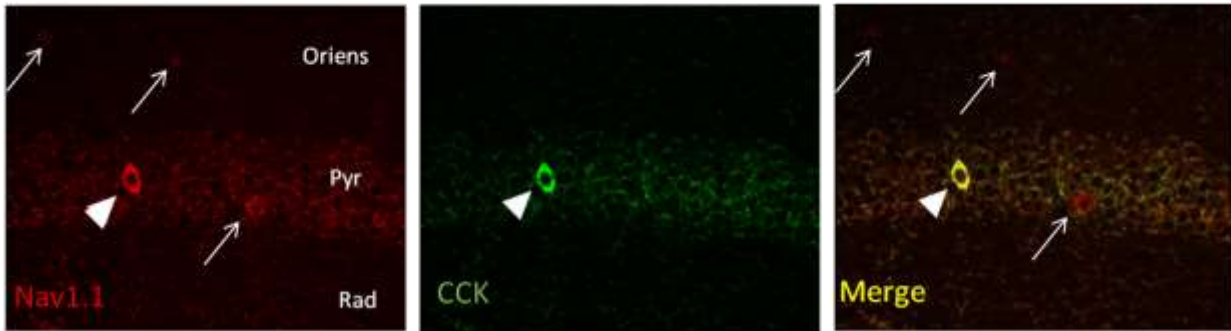
responses, we recorded from cholecystinin positive (CCK+) basket cells, which are GABAergic interneurons that undergo numerous modulations (12), identifying them by crossing *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice with GAD65 transgenic mice (14). We found increased AP amplitude with no modifications of the input-output (number of AP vs injected current) relationship. We performed phase plot analyses of the action potential of these neurons (Fig.1A), confirming the increased amplitude and disclosing a larger maximal rising slope. We then examined the reliability of AP firing in response to a train of 100 brief injected current steps (10ms long) at threshold level and with increasing frequency (Fig.1B); *Scn1a*<sup>+/-</sup> CCK+ interneurons showed decreased AP failure rate at stimulation frequencies between 5–50Hz (Fig.1B), compared with WT littermates, disclosing hyperexcitability of these neurons.



**Fig.1.** A. Phase plot analysis of the first action potential generated at the rheobase in CCK+ basket cells from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice (violet) and WT littermates (black), showing larger maximal rising slope and amplitude. B. Ability of CCK+ interneurons to sustain repetitive firing. Left; action potential failure during trains of stimulations with depolarizing current steps at different frequencies Right; representative traces of action potential discharges at different frequencies. \*\* p<0.01, \* p<0.05. Mann Whitney test.

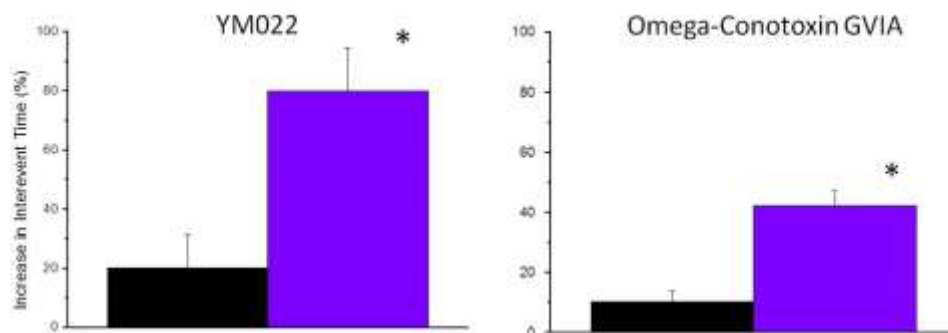
Next, we performed double in situ hybridization experiments showing that CCK+ cells in the pyramidal layer of the CA1 area of the hippocampus express Nav1.1 channels, as numerous other GABAergic interneurons (Fig.2).





**Fig.2.** Double in situ hybridization showing that in the CA1 region of the hippocampus CCK+ basket cells (thick arrowhead), among other interneurons (thin arrowhead), express Nav1.1 channels.

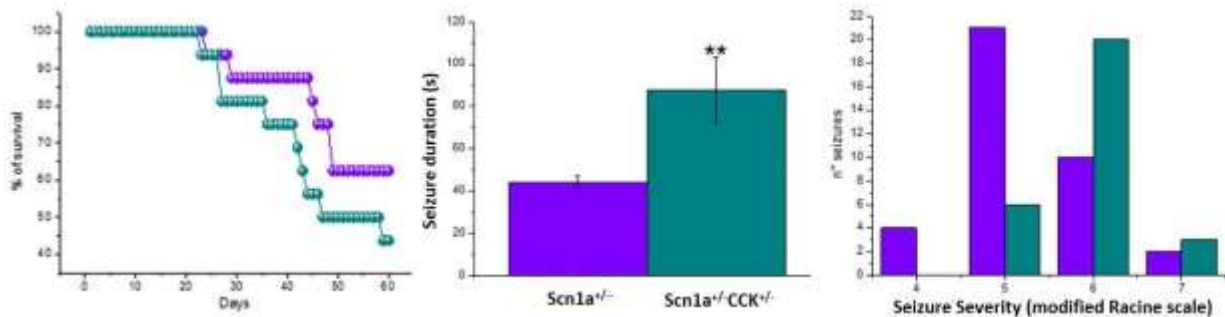
CCK co-released with GABA, acting on the CCK2 receptor, could have a role in the homeostatic response implemented by CCK+ basket cells, limiting the reduction of GABAergic inhibition, which could be even more reduced in the Dravet syndrome mouse model without this homeostatic action. To experimentally disclose this role, we studied the effect of the specific CCK2 receptor blocker YM022 on spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSCs: the currents generated by the spontaneous excitability and synaptic release of GABAergic neurons) recorded in pyramidal neurons of the CA1 area of the hippocampus. Comparing the properties of IPSCs before and during perfusion with YM022, we observed a larger increase of the interevent time of IPSCs (a reduction of their frequency) in slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice (Fig.3, left), showing that the neuropeptide CCK has a larger effect in boosting IPSCs in *Scn1a*<sup>+/-</sup> than in WT mice, consistently with our hypothesis.



**Fig.3.** Left, percentage of increase of IPSCs interevent time in CA1 pyramidal neurons after perfusion of the CCK2 receptor antagonist YM022. Right, percentage of increase of IPSCs interevent time with perfusion of the N-type/Cav2.2 calcium channels blocker Omega-Conotoxin GVIA. \*  $p < 0.05$ , Mann Whitney test; Wt (black), *Scn1a*<sup>+/-</sup> (violet)

To investigate the modifications in the contribution of synaptic transmission from CCK+ synapses to the total IPSCs, we compared the properties of IPSCs recorded before and during perfusion with Omega-Conotoxin GVIA (a blocker of N-type/Cav2.2 calcium channels, which selectively blocks synaptic transmission at CCK+ synapses). Consistently with the data presented above, we found that the toxin induced a larger increase of interevent time (decrease of IPSC frequency) in *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice (Fig.3, right), indicating that there is increased synaptic transmission from CCK+ terminals in brain slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice.

To better disclose the homeostatic role of CCK in vivo, we crossed *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice with CCK knock-out mice (deletion of the CCK gene; <https://www.jax.org/strain/O17710>), studying in this way the effect of CCK haploinsufficiency on the phenotype of *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice. We observed a worsening of the phenotype in *Scn1a*<sup>+/-</sup>CCK<sup>+/-</sup> mice: they display higher mortality rate, increased severity and duration of seizures when compared to *Scn1a*<sup>+/-</sup> littermates (Fig.4). Thus, this experiment shows that the increased release of the neuropeptide CCK is important to counteract the loss of function effect of Na<sub>v</sub>1.1 mutations in DS mice, and this homeostatic response played by CCK+ GABAergic interneurons can have a significant effect on the phenotype.



**Fig.4.** Left; survival curves for *Scn1a*<sup>+/-</sup> (violet) and *Scn1a*<sup>+/-</sup>CCK<sup>+/-</sup> KO (dark cyan). Center; quantification of total duration of seizures for *Scn1a*<sup>+/-</sup> and *Scn1a*<sup>+/-</sup>CCK<sup>+/-</sup>. Right; quantification of severity of seizures for *Scn1a*<sup>+/-</sup> and *Scn1a*<sup>+/-</sup>CCK<sup>+/-</sup> KO. *Scn1a*<sup>+/-</sup>CCK<sup>+/-</sup> mice show higher mortality, longer seizures and more severe seizures than *Scn1a*<sup>+/-</sup> littermates.

### Proposed experiments

**Aim1a.** We will measure the effect of the CCK2 receptor blocker YM022 on the excitability of PV+ neurons with patch-clamp recordings in hippocampal slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and WT littermates, as illustrated above.

**Aim1b.** We will test the effect of exogenously applied CCK (100nM, as in in decreasing amplitude and duration of CA1 post-tetanic afterdischarges in hippocampal slices, which we found increased in *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice (1).

**Aim1c.** We will measure the concentration of released endogenous extracellular CCK in the hippocampus and the neocortex by microdialysis and radioimmunoassay as in (15).

**Aim1d.** We will perform single cell qRT-PCR experiments as in (16) collecting CCK+ interneurons cytoplasm with the patch-clamp pipette, in order to quantify modifications in expression of key ion channels, in particular Nav isoforms.

**Aim 2.** A degradation resistant CCK peptide (sequence [pE]QDYM[dA]WMDF; see (17)) will be synthesized by [www.genscript.com](http://www.genscript.com); we will apply it by intranasal delivery (18), method that has already been successfully used to deliver CCK to the brain of both rodents and humans (19, 20), without side effects. Delivery will be monitored by mass spectrometry extracting the peptide from different brain areas, as in (21). The effect of acute treatment will be tested on seizures induced by hyperthermia as in (1): one application 4h and one 30min before the induction. In case no significant effect will be observed, we will evaluate the effect of chronic treatment (once day) on spontaneous seizures recorded by video-EEG.

### **Expected results**

We have already shown that CCK+ GABAergic neurons are hyperexcitable in brain slices from *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice, even if they express Nav1.1 channels as other GABAergic interneurons that are instead hypoexcitable in this model of DS. The hyperexcitability of these neurons increases the potentiating effect on GABAergic transmission of the neuropeptide CCK, which is co-released with GABA by CCK+ neurons, probably because of augmented CCK release and consequent positive modulatory role on excitability of other interneurons. Indeed, we have shown that haploinsufficiency of CCK can worsen the phenotype of *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice. This novel and unexpected

effect implements one of the homeostatic responses that can be involved in Dravet syndrome and possibly in other pathologies characterized by hypoexcitability of GABAergic neurons (6).

With the support of the Fondazione LICE, we expect to:

- 1) characterize the transcriptional modifications underlying this novel previously undisclosed form of modulatory plasticity of CCK+ neurons, which is different than that induced by neuromodulators, because it is a plastic response to pathologic modifications induced by genetic mutations;
- 2) obtain better evidences that the homeostatic response implemented by CCK+ neurons is actually induced by the increased release of CCK that acts boosting the cellular excitability of other interneurons (in particular PV+), and that can decrease the hyperexcitability of neuronal networks observed in DS mice;
- 3) develop a novel therapeutic concept: boost the endogenous homeostatic response by intranasal-delivered degradation-resistant CCK peptide.

These key experiments will allow to strengthen the characterization of this novel role of CCK neurons and obtain a publication in a high ranking journal. Moreover, the treatment of the mouse model will pave the way for a clinical application of CCK in DS and possibly in other pathologies characterized by hypoexcitability of GABAergic neurons.

### **Budget**

-Equipment (material for updating the patch clamp and seizure induction setups and the analysis software at the Besta Institute: the updating is necessary for the proposed experiments),

**3000€**

-Consumables for electrophysiological recordings and molecular biology, maintenance of mouse colonies,

**2000€**

(other consumables will be purchased with intramural funding from the Besta Neurological Institute and LabEx, France; see co-funding).

-Personnel (to complement the salary of Paolo Scalmani to senior researcher level)

**7500€**

-Partecipation to conferences

**500€**

-Publication costs.

**1000€**

-Overheads

**1000€**

### **Co-funding**

The preliminary results have been obtained within the EU project DESIRE in collaboration with the laboratory of Massimo Mantegazza (IPMC, CNRS, Valbonne - Sophia Antipolis, France; [www.ipmc.cnrs.fr/?page=mantegazza&lang=uk](http://www.ipmc.cnrs.fr/?page=mantegazza&lang=uk)). The DESIRE funding ended in October 2018 and we need support for performing key experiments that are necessary for the finalization of our project.

Other funding that will be used to complement the LICE grant are:

- Besta Institute's intramural funding (ricerca corrente): 10k€ consumables, 30k€ researcher contract (for Paolo Scalmani, who will work at 100% on this project, performing experiments, data analysis and manuscript preparation), co-funding for participation to conferences (for Paolo Scalmani) and for publication costs. Silvana Franceschetti will be implicated at 15% (coordination and manuscript preparation) and Laura Canafoglia (permanent neurologist) at 10% (manuscript preparation).
- Laboratory of Excellence in Ion Channel Science and Therapeutics (ICST) (<http://www.labex-icst.fr/en>) to Massimo Mantegazza: funding allocated to this project are 5k€ of consumables and 8k€ for 5 months of laboratory technician salary at 50% (managing of transgenic mice, extraction of the modified CCK peptide from the brain, mass spectrometry in collaboration with the IPMC platform). Massimo Mantegazza (Lab head) will work at 15% on this project (coordination, data analysis and manuscript preparation), Fabrice Duprat (permanent researcher) at 15% (extracellular field potential recordings in brain slices) and Sandrine Cestele (permanent researcher) at 15% (microdialysis and radioimmunoassay quantification of cerebral endogenous CCK).

## References

1. C. Liautard *et al.*, Hippocampal hyperexcitability and specific epileptiform activity in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* **54**, 1251-1261 (2013).
2. F. H. Yu *et al.*, Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* **9**, 1142-1149 (2006).
3. U. B. Hedrich *et al.*, Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation. *J Neurosci* **34**, 14874-14889 (2014).
4. S. Y. Lee, C. Foldy, J. Szabadics, I. Soltesz, Cell-type-specific CCK2 receptor signaling underlies the cholecystinin-mediated selective excitation of hippocampal parvalbumin-positive fast-spiking basket cells. *J Neurosci* **31**, 10993-11002 (2011).
5. C. Foldy, S. Y. Lee, J. Szabadics, A. Neu, I. Soltesz, Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystinin. *Nat Neurosci* **10**, 1128-1130 (2007).
6. A. M. Katsarou, S. L. Moshe, A. S. Galanopoulou, Interneuronopathies and Their Role in Early Life Epilepsies and Neurodevelopmental Disorders. *Epilepsia Open* **2**, 284-306 (2017).
7. C. Dravet, M. Bureau, H. Oguni, Y. Fukuyama, O. Cokar, Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv. Neurol.* **95**, 71-102 (2005).
8. G. Bechi *et al.*, Rescuable folding defective Na1.1 (SCN1A) mutants in epilepsy: Properties, occurrence, and novel rescuing strategy with peptides targeted to the endoplasmic reticulum. *Neurobiol Dis* **75C**, 100-114 (2015).
9. R. Guerrini, C. Marini, M. Mantegazza, Genetic Epilepsy Syndromes Without Structural Brain Abnormalities: Clinical Features and Experimental Models. *Neurotherapeutics* **11**, 269-285 (2014).
10. S. Cestele, E. Schiavon, R. Rusconi, S. Franceschetti, M. Mantegazza, Nonfunctional NaV1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17546-17551 (2013).
11. A. M. De Stasi *et al.*, Unaltered Network Activity and Interneuronal Firing During Spontaneous Cortical Dynamics In Vivo in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Cereb Cortex* **26**, 1778-1794 (2016).
12. T. F. Freund, I. Katona, Perisomatic inhibition. *Neuron* **56**, 33-42 (2007).
13. K. K. Miller, A. Hoffer, K. R. Svoboda, C. R. Lupica, Cholecystinin increases GABA release by inhibiting a resting K<sup>+</sup> conductance in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **17**, 4994-5003 (1997).
14. C. A. Cea-del Rio *et al.*, M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *J Neurosci* **30**, 6011-6024 (2010).
15. M. M. Nieto, J. Wilson, A. Cupo, B. P. Roques, F. Noble, Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: a microdialysis study. *J Neurosci* **22**, 1034-1041 (2002).
16. P. A. Pousinha *et al.*, Physiological and pathophysiological control of synaptic GluN2B-NMDA receptors by the C-terminal domain of amyloid precursor protein. *Elife* **6**, (2017).
17. M. Knight, P. Barone, C. A. Tamminga, L. Steardo, T. N. Chase, Cholecystinin octapeptide analogues stable to brain proteolysis. *Peptides* **6**, 631-634 (1985).
18. L. R. Hanson, J. M. Fine, A. L. Svitak, K. A. Faltese, Intranasal administration of CNS therapeutics to awake mice. *J Vis Exp*, (2013).

19. R. Schneider, J. Osterburg, A. Buchner, R. Pietrowsky, Effect of intranasally administered cholecystinin on encoding of controlled and automatic memory processes. *Psychopharmacology (Berl)* **202**, 559-567 (2009).
20. J. J. Lochhead, R. G. Thorne, Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 614-628 (2012).
21. F. Y. Che *et al.*, Optimization of neuropeptide extraction from the mouse hypothalamus. *J Proteome Res* **6**, 4667-4676 (2007).