



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transgenic mouse models in migraine

Ven, R.C.G. van de

Citation

Ven, R. C. G. van de. (2007, November 6). *Transgenic mouse models in migraine*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12473>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12473>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary

S
U
M
M
A
R
Y

Summary

Migraine is a disabling neurological paroxysmal disorder, affecting up to 6% of males and 15% of females in the general population. Patients suffer from throbbing, often unilateral, headaches lasting 4 to 72 hours that are accompanied by nausea, vomiting and/or photo- and phonophobia. The aim of the studies described in this thesis was to generate and analyse novel genetically predisposed mouse models of migraine. This was accomplished by gene targeting the *Cacna1a* gene that encodes the α_1 -subunit of $\text{Ca}_v2.1$ voltage-gated calcium channels. $\text{Ca}_v2.1$ channels, upon Ca^{2+} influx, control neurotransmitter release. Mutations in *CACNA1A* result in familial hemiplegic migraine type-1 (FHM1), episodic ataxia type-2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type-6 (SCA6). We generated two FHM1 knockin (KI) models, a conventional $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 knockout (KO) and a conditional $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 model. These models will help to elucidate the pathophysiological mechanisms of migraine and will be instrumental for development of novel strategies for treatment of migraine.

In **chapter 2**, the generation of the first transgenic mouse model of FHM1 is described. The human R192Q mutation that is associated with ‘pure’ FHM was introduced into the highly conserved corresponding region of the orthologous mouse *Cacna1a* gene. R192Q KI mice express mutant $\text{Ca}_v2.1$ channels and do not show an obvious behavioral phenotype. Histology showed normal overall brain anatomy, but *in vivo* MRI analysis revealed a dorsal shift and increase in volume of the cerebellum. In cerebellar granule neurons of R192Q KI mice the mutation causes a *gain-of-function* effect in terms of Ca^{2+} influx: mutant $\text{Ca}_v2.1$ channels open more readily and at lower voltages. In contrast to results from heterologous expression systems the membrane density of functional mutant channels remained unchanged. Analysis of the neuromuscular junction (NMJ) showed an increased evoked and spontaneous neurotransmitter release under conditions of low extracellular Ca^{2+} or high K^+ levels. Importantly, the R192Q KI mouse displayed a reduced threshold and an increased propagation velocity of cortical spreading depression (CSD) – the underlying mechanism of migraine aura - supporting the importance of $\text{Ca}_v2.1$ in CSD and migraine. Taken together, the R192Q KI mouse is a promising animal model to study migraine mechanisms and treatments.

In **chapter 3** the synaptic consequences of the R192Q mutation at the NMJ were studied in detail. Increased (spontaneous) neurotransmitter release was not accompanied by morphological abnormalities of the endplate. Gene dosage effects were observed as heterozygous mice had an intermediate phenotype at least for evoked and spontaneous

neurotransmitter release. High-rate evoked acetylcholine (ACh) release altered the initial phase of the rundown profile (e.g. decreased endplate potential (EPP) amplitude), indicating that high intensity use of Ca_v2.1 channels may alter neurotransmission properties. Neuromuscular transmission was assessed with *in vivo* repetitive nerve stimulation electromyography (RNS-EMG), muscle strength measurements and *ex vivo* muscle contraction experiments. No changes in muscle strength or NMJ morphology were observed. Our findings support that increased probability of neurotransmitter release is important in migraine pathophysiology.

Patients carrying the S218L mutation can have FHM with additional symptoms such as cerebellar ataxia, epilepsy and delayed, sometimes fatal, cerebral edema after mild head trauma. **Chapter 4** describes the generation of a second mouse model of migraine by introducing the FHM1 S218L mutation in the mouse *Cacna1a* gene. In S218L KI mice, rotarod and muscle strength analyses show ataxia without muscle weakness. Although gross cerebellar anatomy appeared normal, S218L KI mice show Purkinje cell dendrite abnormalities, supporting data from patients of cerebellar pathology. We show that S218L KI mice have a decreased survival rate, associated with seizures and abnormal EEGs. In cerebellar granule neurons from S218L KI mice the mutation induces increased current density over a broad voltage range, which was gene-dosage dependent. In line with the prolonged Ca_v2.1 channel opening in transfected cells, we found an increase in neurotransmitter release at the NMJ: a large increase in spontaneous neurotransmitter release, evoked release at low extracellular Ca²⁺ and high K⁺ concentrations and broadened endplate potentials were observed. FHM1 S218L KI mice have a reduced threshold and an increased propagation velocity of CSD. In contrast to wild-type controls, S218L KI mice had an increased mortality upon moderate head injury. In conclusion, the phenotype of the S218L KI mouse closely resembles that of human patients with the same mutation. The S218L KI mouse will help to elucidate mechanisms underlying migraine, ataxia, epilepsy and brain trauma.

In **chapter 5**, synaptic consequences were investigated in conventional Ca_v2.1- α_1 KO mice, which were generated by insertion of a neomycin cassette in exon 4 of the mouse *Cacna1a* gene, and natural Ca_v2.1 mutant *leaner* mice that carry a truncation mutation in the C-terminal part of the same gene. Both mutants have a similar phenotype of ataxia and dystonia. At the NMJ both mutants have a reduction of 50% in evoked and spontaneous neurotransmitter release. As dysfunction of Ca_v2.1 channels may be compensated for by other voltage-gated calcium channels, we analysed the contribution of Ca_v1 (L-type), Ca_v2.2 (N-type) or Ca_v2.3 (R-type) channels to ACh release at Ca_v2.1-

Summary

α_1 KO and *leaner* NMJs using selective Ca_v channel blocking compounds. We observed different compensatory profiles of Ca_v channels. Absence of $\text{Ca}_v2.1$ channels in $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ KO mice resulted in compensation mainly by $\text{Ca}_v2.3$ and, to a minor degree, Ca_v1 and $\text{Ca}_v2.2$ channels. In contrast, at *leaner* NMJs mutated $\text{Ca}_v2.1$ channels are present, but have a residual function. We could show that only $\text{Ca}_v2.3$ channels, but not Ca_v1 and $\text{Ca}_v2.2$ channels, compensate for the loss of $\text{Ca}_v2.1$ function. A reduction of evoked and spontaneous neurotransmitter release with compensatory contribution of $\text{Ca}_v2.2$, but not Ca_v1 channels, was found in EA2 patients. Given the similarity with respect to the type of mutation (i.e. loss-of-function), *leaner* and $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ KO might serve as a model for human EA2.

Total ablation of $\text{Ca}_v2.1$ channels in mice results in early postnatal lethality (see chapter 5). In **chapter 6** we generated a mouse model harbouring a conditional allele that allows ablation of $\text{Ca}_v2.1$ in a spatio-temporal manner. By gene targeting, loxP sites flanking exon 4 were introduced into the orthologous mouse *Cacnala* gene, enabling deletion of the intermediate sequence upon action of Cre-recombinase. We show that mice homozygous for the conditional allele appear normal with respect to phenotype, gross brain cytoarchitecture, expression of $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ protein, and neurotransmitter release at the NMJ. Moreover, we could show functionality of the floxed loxP sites by completely ablating $\text{Ca}_v2.1$ channels by crossing conditional $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ mice with EIIA-Cre deleter mice, resulting in conditional $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ KO mice. As expected, the observed phenotype was identical to that of conventional $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ KO mice with progressively severe ataxia and dystonia starting around P10-12, and lethality around P20-22 if left unaided. Our results indicate that the conditional allele had efficiently recombined. With the generation of the conditional $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ mouse, studies aimed at investigating the cell-type and/or time-window of expression of $\text{Ca}_v2.1$ that is most relevant for disease have become feasible.

MRI is a promising technique to analyze migraine pathophysiology in mouse models of migraine because of its multimodal character, the opportunity to perform *in vivo* studies in a non-invasive manner and the possibility to visualize neurovascular events. Knowledge of relaxation times is necessary to implement optimal protocols for (functional) brain-imaging. In **chapter 7** we provide T_1 relaxation times of the mouse brain at high magnetic field strengths of 9.4 and - for the first time - 17.6 Tesla. In accordance with theory, T_1 times at 17.6 Tesla are longer than at 9.4 Tesla. The signal-to-noise ratio increases proportionally with field strength, which is a major advantage of the use of high field, because it allows for shorter acquisition times and increased resolution.

With these T_1 relaxation times, protocols for future MRI analysis of migraine models will be implemented.

Chapters 8 and 9 provide an overview of available genetic models of migraine and a general discussion of the data from chapters 2 to 7. The functional effects of FHM1, FHM2 and FHM3 mutations in cellular and mouse models are reviewed and their relevance to neuroscience and neurology is discussed. We generated and analysed four transgenic mouse models: the R192Q and S218L FHM1 KI, $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ KO and conditional $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ lines. In addition, we discuss their importance to study the pathogenesis of migraine and development of specific preventative anti-migraine therapies.

Samenvatting

S
A
M
E
N
V
A
T
T
I
N
G

Samenvatting

Migraine is een invaliderende, neurologische, paroxysmale aandoening, waaraan tot 6% van mannen en 15% van vrouwen in de bevolking leidt. Patienten hebben kloppende, vaak unilaterale hoofdpijnen, die 4 tot 72 uur duren en vergezeld worden door misselijkheid, braken en/of foto- en fonofobie. Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om nieuwe, genetisch gepredisponeerde muismodellen voor migraine te genereren en te analyseren. Dit werd gerealiseerd met behulp van gerichte modificatie van het muizen *Cacn1a* gen, dat codeert voor het α_1 -subunit van $\text{Ca}_v2.1$ voltage-geactiveerde calcium kanalen. $\text{Ca}_v2.1$ kanalen zijn verantwoordelijk voor neurotransmitter afgifte na Ca^{2+} influx. Mutaties in *CACNA1A* resulteren in familiale hemiplegische migraine type-1 (FHM1), episodische ataxie type-2 (EA2) en spinocerebellaire ataxie type-6 (SCA6). Wij hebben twee FHM1 knockin (KI) modellen, een conventionele $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ knockout (KO) en een conditioneel $\text{Ca}_v2.1\text{-}\alpha_1$ model gegenereerd. Deze modellen zullen helpen de pathofysiologische mechanismen van migraine op te helderen en zullen bruikbaar zijn voor de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën van migraine.

In **hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling van het eerste transgene muismodel van FHM1 beschreven. De humane R192Q mutatie die is geassocieerd met 'pure' FHM werd geïntroduceerd in de geconserveerde, corresponderende regio van het ortologe muizen *Cacn1a* gen. R192Q KI muizen brengen mutante $\text{Ca}_v2.1$ kanalen tot expressie en vertonen geen duidelijk afwijkend gedragsfenotype. Histologische analyse toonde normale algemene hersen anatomie, maar *in vivo* MRI analyse onthulde een dorsale verplaatsing en groter volume van het cerebellum. In cerebellaire korrelcellen van R192Q KI muizen veroorzaakte de mutatie een *toename-van-functie* effect van Ca^{2+} instroom: mutante $\text{Ca}_v2.1$ kanalen openen gemakkelijker en bij lagere voltages. In tegenstelling tot resultaten verkregen in heterologe expressie systemen bleef de membraan dichtheid van functionele mutante kanalen onveranderd. Analyse van de neuromusculaire junctie (NMJ) liet een toename zien van geïnduceerde en spontane neurotransmitter afgifte onder condities van lage extracellulaire Ca^{2+} of hoge K^+ spiegels. Belangrijk is dat de R192Q KI muis een verlaagde drempel en een verhoogde voortgangssnelheid van 'cortical spreading depression' (CSD) – het onderliggende mechanisme van de migraine aura – heeft. Dit geeft het belang aan van $\text{Ca}_v2.1$ in CSD en migraine. Samengevat is de R192Q KI muis een veelbelovend diermodel om migraine mechanismen en behandelingen te bestuderen.

In **hoofdstuk 3** werden de synaptische consequenties van de R192Q mutatie in de NMJ uitvoerig bestudeerd. Er werd een toegenomen (spontane) neurotransmitter afgifte gevonden, maar geen morfologische afwijkingen van de eindplaat. Gen-doserings effecten waren aanwezig, aangezien heterozygote muizen een tussenliggend fenotype hadden voor geïnduceerde en spontane neurotransmitter afgifte. Hoog-frequent geïnduceerde acetylcholine (ACh) afgifte veranderde de initiële fase van het rundown profiel (verlaagde eindplaat potentiaal (EPP) amplitude), wat aangeeft dat hoog-intensief gebruik van $Ca_v2.1$ kanalen aspecten van neurotransmissie kan veranderen. Neuromusculaire transmissie werd bestudeerd met behulp van *in vivo* repetitieve zenuw stimulatie electromyografie (RNS-EMG), spierkracht metingen en *ex vivo* spiercontractie experimenten. Geen veranderingen in spierkracht en NMJ morfologie werden gevonden. Onze bevindingen duiden erop dat verhoogde neurotransmitter afgifte belangrijk is in migraine pathofysiologie.

Patiënten die de S218L mutatie dragen kunnen aan FHM met bijkomende symptomen als cerebellaire ataxie, epilepsie en soms fataal, cerebraal oedeem na mild hoofd trauma lijden. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van een tweede muismodel voor migraine door de FHM1 S218L mutatie in het muizen *Cacn1a* gen te introduceren. Rotarod en spierkracht analyse tonen aan dat S218L KI muizen ataxie zonder spierzwakte ontwikkelen. Ondanks dat de algemene cerebellaire anatomie normaal leek, waren afwijkingen van Purkinje cel dendrieten zichtbaar in S218L KI muizen, wat de data van cerebellaire pathologie in patiënten steunt. Wij tonen aan dat S218L KI muizen een verlaagde overleving hebben, geassocieerd met convulsies en afwijkende EEGs. In cerebellaire korrelcellen van S218L KI muizen veroorzaakte de mutatie een toename in stroomdichtheid over een breed voltage bereik, wat gen-doserings afhankelijk was. In lijn met de verlengde $Ca_v2.1$ kanaal opening in getransfecteerde cellen, vonden we een toename in neurotransmitter afgifte in de NMJ: een grote toename in spontane neurotransmitter afgifte, geïnduceerde afgifte bij lage extracellulaire Ca^{2+} en hoge K^+ concentraties en verbrede eindplaat potentialen werden geobserveerd. FHM1 S218L KI muizen hebben een afname in drempel en voortgangssnelheid van CSD. In tegenstelling tot wild-type controles hadden S218L KI muizen een toegenomen mortaliteit na mild hoofd trauma. Deze resultaten wijzen erop dat het fenotype van de S218L KI muis sterk overeen komt met dat van menselijke patiënten met dezelfde mutatie. De S218L KI muis zal helpen de onderliggende mechanismen van migraine, ataxie, epilepsie en hersen trauma op te helderen.

In **hoofdstuk 5** worden de synaptische consequenties in conventionele $\text{Ca}_v2.1$ KO- α_1 muizen, die gegenereerd zijn door insertie van een neomycine cassette in exon 4 van het muizen *Cacnala* gen, en de natuurlijke $\text{Ca}_v2.1$ mutant *leaner*, die een truncatie mutatie in het C-terminale deel van hetzelfde gen draagt, bestudeerd. Beide mutanten hebben een vergelijkbaar fenotype van ataxie en dystonie. Tevens hebben beide mutanten een afname van 50% in geïnduceerde en spontane neurotransmitter afgifte in de NMJ. Dysfunctie van $\text{Ca}_v2.1$ kanalen kan gecompenseerd worden door andere voltage-geactiveerde calcium kanalen. Daarom analyseerden we de bijdrage van Ca_v1 (L-type), $\text{Ca}_v2.2$ (N-type) en $\text{Ca}_v2.3$ (R-type) kanalen aan ACh afgifte in $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO en *leaner* NMJs, gebruikmakend van selectieve Ca_v kanaal remmers. Het compensatoir profiel van Ca_v kanalen bleek verschillend tussen mutanten. Afwezigheid van $\text{Ca}_v2.1$ kanalen in $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO muizen resulteerde in compensatie door voornamelijk $\text{Ca}_v2.3$ en in mindere mate Ca_v1 en $\text{Ca}_v2.2$ kanalen. In tegenstelling tot $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO muizen waren in *leaner* NMJs wel gemuteerde $\text{Ca}_v2.1$ kanalen aanwezig met een residuele functie. We konden aantonen dat alleen $\text{Ca}_v2.3$ kanalen, maar niet Ca_v1 en $\text{Ca}_v2.2$ kanalen, compenseren voor verlies van $\text{Ca}_v2.1$ functie. Door de overeenkomst met betrekking tot het type mutatie (verlies-van-functie), zouden *leaner* en $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO als model kunnen dienen voor humane EA2.

Totale afwezigheid van $\text{Ca}_v2.1$ kanalen bij muizen resulteert in vroege postnatale letaliteit (zie hoofdstuk 5). In **hoofdstuk 6** hebben we een muismodel gegenereerd met een conditioneel allel, zodat spatio-temporale uitschakeling van het *Cacnala* gen kan worden bewerkstelligd. Met behulp van gen-targeting werden exon 4 flankerende loxP sequenties in het orthologe muizen *Cacnala* gen geïntroduceerd. Hierdoor wordt deletie van de tussenliggende sequentie door Cre-recombinase mogelijk. We laten zien dat homozygote muizen voor het conditionele allel normaal zijn met betrekking tot fenotype, cytoarchitectuur van de hersenen, expressie van $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 eiwit, en neurotransmitter afgifte in de NMJ. Bovendien konden we functionaliteit van de loxP sequenties aantonen door conditionele $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 muizen met EIIA-Cre deleter muizen te kruisen. Deze kruising resulteert namelijk in conditionele $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO muizen, in welke $\text{Ca}_v2.1$ kanalen volledig afwezig waren. Zoals verwacht was het fenotype van deze muizen identiek aan dat van conventionele $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 KO muizen, met progressief ernstiger wordende ataxie en dystonie, startend rond P10-12, en letaliteit rond P20-22. Onze resultaten laten zien dat het conditionele allel efficiënt gerecombineerd had. De generatie van de conditionele $\text{Ca}_v2.1$ - α_1 muis maakt studies gericht op onderzoek naar de relevante cel- en tijdspecifieke expressie van $\text{Ca}_v2.1$ in ziekte mogelijk.

MRI is een veelbelovende techniek voor de analyse van migraine pathofysiologie in muismodellen van migraine vanwege het multimodale karakter, de mogelijkheid *in vivo* studies op een non-invasieve wijze uit te voeren en de mogelijkheid neurovasculaire veranderingen te visualiseren. Kennis van relaxatie tijden is noodzakelijk voor de implementatie van optimale protocollen voor (functionele) hersen-imaging. In **hoofdstuk 7** publiceren we T_1 relaxatie tijden van muizenhersen bij hoog-magnetische velden van 9.4 en - voor de eerste keer - 17.6 Tesla. In overeenstemming met de theorie zijn T_1 tijden bij 17.6 Tesla langer dan bij 9.4 Tesla. De signaal-ruis verhouding neemt proportioneel toe met veld sterkte. Dit is een enorm voordeel van het gebruik van hoog veld, omdat daardoor kortere experimentele tijden en hogere resolutie mogelijk zijn. Aan de hand van deze T_1 relaxatie tijden zullen protocollen voor toekomstige MRI analyse van migraine modellen geïmplementeerd worden.

Hoofdstukken 8 en 9 geven een overzicht van beschikbare genetische modellen voor migraine en een algemene discussie van de data uit hoofdstukken 2 tot en met 7. De functionele effecten van FHM1, FHM2 en FHM3 mutaties in cellulaire en muis modellen en hun relevantie voor de neurowetenschap en neurologie worden besproken. Wij hebben vier transgene muismodellen gegenereerd en geanalyseerd: de R192Q en S218L FHM1 KI, $Ca_v2.1-\alpha_1$ KO en conditionele $Ca_v2.1-\alpha_1$ lijnen. We bespreken hun belang voor de studie naar de pathogenese van migraine en de ontwikkeling van specifieke preventieve anti-migraine therapieën.

