

Targeted demethylation of the Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Beta-1 Subunit gene using CRISPR-dCas9-TET to restore Gamma-Aminobutyric Acid type A receptor function in epilepsy

Déméthylation ciblée du gène de la sous-unité bêta-1 du récepteur gamma-aminobutyrique type A à l'aide de CRISPR-dCas9-TET pour restaurer la fonction du récepteur gamma-aminobutyrique type A dans l'épilepsie

Kyle Han¹, Jerry Ni¹, Adrian Tang^{1*}

1. Colonel By Secondary School, Ottawa, ON, Canada

*Corresponding author. Email: ajtang_42@gmail.com

Abstract | Résumé

Epilepsy is a neurodevelopmental disorder characterized by recurring, unprovoked seizures due to abnormal imbalances between excitatory and inhibitory neurotransmission (1). Affecting nearly 1 in 100 Canadians (2), epilepsy significantly reduces quality of life through physical risks, cognitive impairment, and clinically significant anxiety and depression (3). Gamma-Aminobutyric Acid type A Receptor (GABAAR) is an ionotropic receptor that mediates inhibitory neurotransmission by binding to the GABA neurotransmitter (4). The methylation of the GABAAR Beta-1 Subunit (GABRB1) gene has been shown to reduce GABAAR function in individuals with epilepsy, thereby contributing to neuronal hyperexcitability and highlighting a potential epigenetic target for therapeutic intervention aimed at restoring inhibitory signaling (5). This study proposes administering CRISPR-dCas9-TET to selectively demethylate cytosines in GABRB1 promoter regions of mice using the GABRB1 sgRNA sequence (5' to 3') CACCg GCCGCGAGGGCTTCGGGCGT and its complementary 3' to 5' sequence to reactivate GABRB1 expression (6). FVB/N mouse models with kainic acid-induced epilepsy are used due to neurological sensitivity and similarities to homo sapiens (7). Calcium ion imaging of genetically encoded fluorescent indicators using two-photon microscopy through a surgically implanted cranial window will be conducted alongside qualitative analysis of seizure frequency to determine the treatment effects on neuronal inhibition. Limitations to this approach include potential cerebral trauma due to cranial windowing or CRISPR-dCas9-TET administration, potentially resulting in a systematic decrease in inhibitory signaling (8). This proposed epigenetic approach is important because of its potential as an alternative to anti-seizure medications (ASMs). Notably, ASMs require frequent dosing and are often ineffective in treating patients with drug-resistant epilepsy (DRE) (9). The proposed treatment could reduce seizure susceptibility, offering a long-term, single-intervention treatment for both epileptic and DRE epileptic patients. Overall, this study will provide insight into the effectiveness of targeted demethylation in restoring inhibitory neurotransmission.

L'épilepsie est un trouble neurodéveloppemental caractérisé par des crises récurrentes non provoquées dues à des déséquilibres anormaux entre la neurotransmission excitatrice et inhibitrice (1). Touchant près d'un Canadien sur 100 (2), l'épilepsie réduit significativement la qualité de vie par des risques physiques, des troubles cognitifs et une anxiété et dépression cliniquement significatives (3). Le récepteur gamma-aminobutyrique de type A (GABAAR) est un récepteur ionotrope qui médie la neurotransmission inhibitrice en se liant au neurotransmetteur GABA (4). La méthylation du gène de la sous-unité GABAAR Bêta-1 (GABRB1) a démontré réduire la fonction du GABAAR chez les personnes épileptiques, contribuant ainsi à l'hyperexcitabilité neuronale et mettant en lumière une cible épigénétique potentielle pour une intervention thérapeutique visant à restaurer la signalisation inhibitrice (5). Cette étude propose d'administrer CRISPR-dCas9-TET pour déméthyliser sélectivement les cytosines dans les régions promoteurs GABRB1 chez la souris en utilisant la séquence d'ARNg GABRB1 (5' à 3') CACCg GCCGCGAGGGCTTCGGGCGT et sa séquence complémentaire 3' à 5' afin de réactiver l'expression de GABRB1 (6). Des modèles murins FVB/N avec épilepsie induite par l'acide kainique sont utilisés en raison de leur sensibilité neurologique et de similitudes avec l'homo sapiens (7). L'imagerie des ions calcium d'indicateurs fluorescents codés génétiquement à l'aide d'une microscopie à deux photons via une fenêtre crânienne implantée chirurgicalement sera réalisée parallèlement à une analyse qualitative de la fréquence des crises afin de déterminer les effets du traitement sur l'inhibition neuronale. Les limites de cette approche incluent un traumatisme cérébral potentiel dû à un fenêtrage crânien ou à l'administration de CRISPR-dCas9-TET, pouvant entraîner une diminution systématique de la signalisation inhibitrice (8). Cette approche épigénétique proposée est importante en raison de son potentiel en tant qu'alternative aux médicaments antiépileptiques (ASM). Notamment, les ASM nécessitent des doses fréquentes et sont souvent inefficaces pour traiter les patients atteints d'épilepsie pharmaco-résistante (DRE) (9). Le traitement proposé pourrait réduire la susceptibilité aux crises, offrant un traitement à long terme à intervention unique pour les patients épileptiques et DRE. Dans l'ensemble, cette étude apportera un éclairage sur l'efficacité de la déméthylation ciblée pour restaurer la neurotransmission inhibitrice.

References

1. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2025, April 7). Epilepsy and Seizures. <https://www.ninds.nih.gov>
2. Public Health Agency of Canada. (2018, March 23). Epilepsy in Canada. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/diseases-conditions/epilepsy.html>
3. Pugh, R., Vaughan, D. N., Jackson, G. D., Ponsford, J., & Tailby, C. (2024). Cognitive and psychological dysfunction is present after a first seizure, prior to epilepsy diagnosis and treatment at a First Seizure Clinic. *Epilepsia Open*.
4. Jewett, B., & Sharma, S. (2021). Physiology, GABA. StatPearls. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513311/>
5. Tao, H., Chen, Z., Wu, J., Chen, J., Chen, Y., Fu, J., Sun, C., Zhou, H., Zhong, W., Zhou, X., & Li, K. (2021). DNA methylation signature of epileptic encephalopathy-related pathogenic genes encoding ion channels in temporal lobe epilepsy. *Front. Neurol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.692412>
6. Duan, J., Pandey, S., Li, T., Castellano, D., Gu, X., Li, J., Tian, Q., Lu, W. (2019). Genetic deletion of GABA_A receptors reveals distinct requirements of neurotransmitter receptors for GABAergic and glutamatergic synapse development. *Front. Cell. Neurosci.* 13. <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2019.00217/full>
7. Kohnken, R. A., & Schwahn, D. J. (2016). Lack of chronic histologic lesions supportive of sublethal spontaneous seizures in FVB/N mice. *Comp. Med.* 66(2), 105–111. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4825959/>
8. Parga Becerra, A., Logsdon, A. F., Banks, W. A., & Ransom, C. B. (2021). Traumatic brain injury broadly affects GABAergic signaling in dentate gyrus granule cells. *eNeuro* 8(3), ENEURO.0055-20.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0055-20.2021>
9. Fattorusso, A., Matricardi, S., Mencaroni, E., Dell'Isola, G. B., Di Cara, G., Striano, P., & Verrotti, A. (2021). The pharmaco-resistant epilepsy: An overview on existent and new emerging therapies. *Front. Neurol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.674483>