

Poster P.08.49

DISSECTING THE ARISTALESS-RELATED HOMEBOX EPILEPSY PATH TO FIND DRUGGABLE TARGET MOLECULES

Poeta L.^[1], Verrillo L.^[1], Drongitis D.^[1], Tuccillo M.^[1], Filosa S.^[3], Zucchelli S.^[2], Collombat P.^[4], Gez J.^[5], Gustincich S.^[6], Acampora D.^[1], Di Schiavi E.^[3], Altucci L.^[7], Miano M.G.*^[1]

^[1]Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati Traverso", CNR, Naples, Italy ~ Naples ~ Italy, ^[2]Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy ~ Novara ~ Italy, ^[3]Institute of Biosciences and BioResources, CNR, Naples, Italy ~ Naples ~ Italy, ^[4]Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, iBV, Nice, France ~ Nice ~ France, ^[5]Faculty of Health and Medical Sciences, The University of Adelaide, Adelaide, Australia ~ Adelaide ~ Australia, ^[6]Italian Institute of Technology – IIT, Genova, Italy ~ Genova ~ Italy, ^[7]University of Campania Luigi Vanvitelli, Caserta, Italy ~ Caserta ~ Italy

Aristaless-related homeobox (ARX) is a crucial transcription factor involved in several interneuronopathies, including infantile spasms and West Syndrome. Its polyAlanine motifs are hot spots for elongations, frequently found in kids affected by malignant Epilepsy with limited therapeutic options. Although in the last years several medical therapies have been tested to prevent epilepsy in these patients, an effective treatment is still needed. Noteworthy, the early onset of infantile spasms followed by developmental delay and poor seizure control make these patients at high risk for suddenly unexpected death (SUDEP).

The overall objectives of our project were to study Aristaless-related Homeobox Epilepsy models with the final goal of identifying druggable target molecules. Thus, we have applied for the first time complementary strategies to correct ARX-dependent molecular defects and ameliorate disease evolution. As regards the functional impact of ARX epilepsy mutations, we have previously found a spectrum of molecular damages altering the KDM5C functioning. We have applied SINEB2 long non-coding RNAs (SINEUPs) technology to specifically correct KDM5C protein insufficiency and downstream effectors. By applying this "scalable" RNA-based method, KDM5C-H3K4me3 axis and neuronal morphology were rescued in primary neurons isolated from Arx-disease mouse models. Since KDM5C is a chromatin regulator with a fine-tunable activity during neuronal maturation, we have generated knock-in mouse model RS26Kdm5C/+ to finely modulate Kdm5C expression in Arx disease mice. The impact of KDM5C dosage sensitivity on the brain development remains to be determined. However, no evidence of gross behavioral impairment and structural malformations were observed.

We studied the effect of the FDA-approved histone deacetylase inhibitor suberanilohydroxamic acid (SAHA) in two evolutionary distant ARX disease-models - mouse and *C. elegans* - both defective in conserved functional pathways and neuronal homeostasis. We found that this HDACi drug has an efficacious impact to rescue KDM5C-H3K4me3 axis, abnormal behaviour and neuronal maturation. Furthermore, SAHA exposure of Arx(GCG)7/Y and Arx(KO)Y embryos confirm the role of KDM5C as druggable disease-biomarker. In addition, a rectification of synaptic and ion-channel proteins involved in epileptogenic processes has been observed. Noteworthy, in Arx(GCG)7/Y young animals, i.p. administration of SAHA and bioactive natural small-molecules has shown to ameliorate seizure severity. Although there are still a number of unanswered questions on SAHA applicability as anti-epileptic drug (monotherapy or polytherapy), these results may open a new field of investigation for a drug repositioning process. Collectively, our findings represent a big step forward in molecular targeted drug discovery to treat West syndrome and may also promote pre-clinical studies for neurodevelopmental disorders with associated co-morbidities.

Analisi della funzione del gene *Aristaless-related Homeobox* nell'Epilessia e identificazione di bersagli molecolari a scopo terapeutico

La sindrome di West associata a espansione da polialanine nel gene *Aristaless-related Homeobox* (ARX) è una rara e devastante forma di epilessia maligna con spasmi infantili ed ereditarietà X-linked, che si manifesta nel primo mese di vita del bambino.

È caratterizzata da una disorganizzazione generale e caotica di scariche elettriche il cui susseguirsi provoca danni gravi a carico della maturazione del cervello. Generalmente i neonati con questi difetti genetici non rispondono alla terapia antiepilettica convenzionale. Ne deriva un bisogno impellente di sviluppare nuove terapie antiepilettiche che forniscano tempestivamente un rimedio terapeutico prima che si completi lo sviluppo cognitivo.

Obiettivo principale del nostro progetto è stato stabilire le funzioni neuronali controllate dal fattore trascrizionale ARX e dei suoi effettori allo scopo di identificare bersagli molecolari a scopo terapeutico. Risultati: In questo progetto abbiamo applicato per la prima volta strategie con azione complementare dimostrando la loro efficacia nel correggere, a livello molecolare, sia marcatori epi-genetici che epilettogeni associati ad alterazioni a carico del gene ARX. In particolare abbiamo ottenuto dati interessanti nell'applicazione di: 1. una tecnologia innovativa "RNA-based" che apre a nuove strategie applicative mediante l'impiego di sonde ad acidi nucleici. A partire dai dati ottenuti è ipotizzabile la realizzazione di progetti in collaborazioni con industrie dedicate allo sviluppo di terapie RNA-based per malattie rare "orfane" con fenotipi neurologici simili; 2. un trattamento in vivo con una epi-molecola in due animali-modello "distanti", topo e nematode. Ciò ha consentito di analizzare l'impatto su specifici processi neuronali conservati durante l'evoluzione e di identificare nuovi marcatori-malattia. In particolare mediante l'impiego di questa epi-molecola, abbiamo dimostrato la correzione farmacologica di difetti nel comportamento e dello sviluppo neuronale, sia nei mutanti di nematode per il gene ortologo di ARX e sia in topi con mutazioni da espansioni di polialanine in ARX. Ciò ha permesso di identificare una serie di marcatori- malattia da monitorare durante il processo di epilettogenesi e di evoluzione delle convulsioni. Nell'insieme i dati prodotti rappresentano un grande passo in avanti nella ricerca di base applicata allo studio della Sindrome di West e alla identificazione di terapie innovative per il trattamento delle epilessie farmaco-resistenti. Inoltre, va sottolineato che i risultati ottenuti possono dare grande impulso allo sviluppo di studi pre-clinici per un'ampia classe di patologie genetiche neurologiche con sintomi sovrapponibili.

Poeta et al. Histone demethylase KDM5C is a SAHA-sensitive central hub at the crossroads of transcriptional axes involved in multiple neurodevelopmental disorders. Submitted.

Gustincich et al. The Yin and Yang of nucleic acid-based therapy in the brain. *Prog Neurobiol.* 2017 Aug;155:194-211.

Mattiske et al. Embryonic forebrain transcriptome of mice with polyalanine expansion mutations in the ARX homeobox gene. *Hum Mol Genet.* 2016 25(24):5433-5443.

Benedetti et al. Epigenetic-based therapy: From single- to multi-target approaches. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Dec;69:121-31.

Poeta et al. A regulatory path associated with X-linked intellectual disability and epilepsy links KDM5C to the polyalanine expansions in ARX. *Am J Hum Genet.* 2013;92(1):114-25.

Spasmi infantili; Sindrome di West

Coordinator: Maria Giuseppina Miano

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

Telethon Project (nr):

GGP14198

Disease Name:

Infantile Spasms (ISSX1); West Syndrome

Keywords:

Aristaless-related homeobox (ARX), pharmaco-resistant epilepsy, disease animal models