

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
NAPOLI "FEDERICO II"

**DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA E
MEDICINA MOLECOLARE**

TESI

“Il ruolo svolto da *Tbx1*, un gene candidato
per la sindrome di DiGeorge, nello sviluppo
dell’orecchio interno del topo ”

Coordinatore
Prof. C. B. Bruni

Candidato
Dott.ssa Antonietta Viola

ANNO

2006

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
NAPOLI "FEDERICO II"**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E PATOLOGIA
CELLULARE E MOLECOLARE "L. CALIFANO"**

TESI DI DOTTORATO IN GENETICA E MEDICINA
MOLECOLARE

“Il ruolo svolto da *Tbx1*, un gene
candidato per la sindrome di DiGeorge,
nello sviluppo dell'orecchio interno del
topo ”

RELATORE

Prof. F. Salvatore

CORRELATORE

Prof. A. Baldini

CANDIDATO

Dott.ssa Antonietta Viola

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E
PATOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
"L. CALIFANO"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA E
MEDICINA MOLECOLARE**

**COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO
PROF. CARMELO BRUNO BRUNI**

Sede Amministrativa:

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Dipartimenti concorrenti:

Biochimica e Biotecnologie Mediche

Collegio dei Docenti

**Prof. Carmelo Bruno Bruni: Coordinatore del dottorato
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano", Università di Napoli**

**Prof. Stefano Bonatti
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli**

**Prof. Cecilia Bucci
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed
Ambientali, Università di Lecce**

**Prof. Maria Stella Carlomagno
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli**

**Prof. Roberto Di Lauro
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli**

**Prof. Paola Di Natale
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli**

**Prof. Pier Paolo Di Nocera
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli**

**Prof. Maria Furia
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e
Molecolare, Università di Napoli**

**Prof. Girolama La Mantia
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e
Molecolare, Università di Napoli**

Prof. Luigi Lania
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e
Molecolare, Università di Napoli

Prof. Lucio Nitsch
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli

Prof. Lucio Pastore
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli

Prof. John Pulitzer Finali
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e
Molecolare, Università di Napoli

Prof. Tommaso Russo
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli

Prof. Lucia Sacchetti
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli

Prof. Francesco Salvatore
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli

Dott. Guglielmo R.D. Villani
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche,
Università di Napoli

Dott. Maria Stella Zannini
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli

Prof. Raffaele Zarrilli
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano" Università di Napoli

Prof. Chiara Zurzolo
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano"
Università di Napoli

*“A chi mi ha detto che dietro ogni linea di arrivo c'è sempre una
linea di partenza,*

*A chi pur essendo scienziato è sempre pronto a mettersi in
discussione,*

A chi ha sempre un sorriso pur essendo sofferente,

A chi mi ha donato serenità e affetto,

A chi mi ha sempre sostenuto..... ”

A Rosella Di Noto

A Paolo Franceschetti

Alla mia famiglia

Antonella

.....Desidero ringraziare tutti coloro che in qualche modo hanno contribuito alla stesura della mia tesi. In particolare vorrei ringraziare il Prof.re Francesco Salvatore, mio docente guida, che mi ha dato la possibilità di lavorare presso il CEINGE contribuendo ad aumentare la mia crescita professionale. Ringrazio il Prof.re Antonio Baldini che per tutto il tempo è stato “Antonio” e senza di lui questa tesi non sarebbe stata possibile. In particolare lo ringrazio per avermi dato la possibilità di lavorare presso il Department of Pediatric Cardiology del Baylor College of Medicine di Houston (TX). Ringrazio la Prof.ssa Elizabeth Illingworth che con i suoi preziosi e continui suggerimenti ha contribuito ad arricchire la mia formazione scientifica. Desidero ringraziare i colleghi del laboratorio di Napoli per la disponibilità e l'affetto che sempre hanno avuto nei miei riguardi. In particolare ringrazio la Dott.ssa Annalisa Mupo per la preziosa amicizia dimostratami in sei mesi di convivenza a Houston. Ringrazio ancora il mio fidanzato Paolo Franceschetti per la pazienza dimostratami in questo periodo. Ringrazio infine la mia famiglia perchè senza di loro non sarei quel che sono....

INDICE

CAPITOLO 1: Microdelezioni cromosomiche: analisi della sindrome da *DEL22Q11* e ruolo svolto da *Tbx1* pag. 1

- 1.1 Le sindromi da microdelezioni cromosomiche. pag. 2
- 1.2 I meccanismi della delezione sul cromosoma 22. pag. 6
- 1.3 Studi sulla del22q11 nel topo. pag. 9
- 1.4 *Tbx1* e lo sviluppo dell'apparato faringeo. pag. 13
- 1.5 Il gene *TBX1*. pag. 15

CAPITOLO 2: Introduzione allo sviluppo dell'orecchio nei vertebrati e formazione dell'orecchio interno pag. 19

- 2.1 I foglietti embrionali e la formazione dell'orecchio interno. pag. 20
- 2.2 Sviluppo e funzione dell'orecchio interno dei vertebrati. pag. 22
- 2.3 Studi classici sull'induzione otica. pag. 25
- 2.4 Identificazione di induttori otici e potenziali markers. pag. 27

CAPITOLO 3: Il topo come modello per lo studio relativo alla "sordità" pag. 29

- 3.1 Il topo nella ricerca biomedica dell'orecchio interno. pag. 30
- 3.2 Il genoma del topo. pag. 33
- 3.3 Mutazioni che colpiscono l'apparato uditivo del topo. pag. 34
- 3.4 Geni responsabili del fenotipo uditivo. pag. 35

CAPITOLO 4: Scopo della tesi	pag. 37
4.1 Utilizzo dei modelli animali per lo studio dell'orecchio.	pag. 38
CAPITOLO 5: Materiali e Metodi	pag. 44
5.1 Preparazione delle linee di topi.	pag. 45
5.2 Colorazione con X-gal, istologia ed immunohistochimica.	pag. 46
5.3 Chimere.	pag. 48
5.4 Strategia per la generazione degli alleli <i>Tbx1^{lox}</i> , <i>Tbx1^{ΔE5}</i> , <i>Tbx1^{mcm}</i> , <i>Tbx1^{lacZ}</i> .	pag. 49
5.5 Preparazione della linea transgenica <i>TgCAGG-CreERTM</i> .	pag. 52
5.6 Preparazione della linea transgenica <i>TgFgf15Cre</i> .	pag. 54
5.7 Ibridazione <i>in situ</i> .	pag. 55
CAPITOLO 6: Risultati	pag. 56
6.1 L'espressione di <i>Tbx1</i> è regolata durante lo sviluppo e la morfogenesi dell'orecchio interno.	pag. 57
6.2 <i>Tbx1</i> è richiesto per la morfogenesi dell'otocisti.	pag. 61
6.3 La ridotta proliferazione e l'aumento dell'apoptosi non giustifica il fenotipo dell'orecchio interno dei mutanti <i>Tbx1^{-/-}</i> .	pag. 65
6.4 Le cellule <i>Tbx1^{-/-}</i> non popolano l'otocisti in embrioni chimerici.	pag. 66
6.5 <i>Tbx1</i> fornisce un contributo cellulare all'otocisti.	pag. 69
6.6 L'eliminazione di <i>Tbx1</i> dopo E8.5 è sufficiente a bloccare la morfogenesi dell'orecchio interno.	pag. 71

- 6.7 *Tbx1* regola la proliferazione cellulare nell'epitelio otico in modo indipendente. pag. 73
- 6.8 *Tbx1* è un soppressore del fato neurale nell'epitelio otico. pag. 75
- 6.8.1 Notch1 è espanso nell'otocisti dei mutanti di *Tbx1*. pag. 77
- 6.9 *Tbx1* delinea un limite ventrale-posteriore alla regione neurogenica dell'otocisti. pag. 78
- 6.9.1 L'espressione di *Tbx1* è fondamentale per una corretta morfogenesi dell'orecchio interno. pag. 83

CAPITOLO 7: Conclusioni e

Prospettive future

pag. 88

- 7.1 *Tbx1* regola l'espansione e la proliferazione di una popolazione di cellule nella regione epiteliale dell'otocisti. pag. 89
- 7.2 *Tbx1* delinea i bordi delle regioni neurogeniche nell'otocisti. pag. 90
- 7.3 I modelli animali nello sviluppo dell'orecchio interno e le relative patologie. pag. 96

CAPITOLO 8: Bibliografia

pag. 97

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.	Rappresentazione dell'apparato faringeo.	pag. 5
Figura 2.	Rappresentazione del cromosoma umano 22.	pag. 8
Figura 3.	Rappresentazione del cromosoma 16 di topo.	pag. 9
Figura 4.	Rappresentazione dei difetti cardiovascolari.	pag. 12
Figura 5.	Espressione di <i>Tbx1</i> nell'embriogenesi di topo.	pag. 14
Figura 6.	Rappresentazione dell'orecchio interno nei vertebrati.	pag. 21
Figura 7.	Rappresentazione dell'orecchio nei vertebrati.	pag. 23
Figura 8.	Immagine al microscopio elettronico dell'orecchio interno nei vertebrati.	pag. 32
Figura 9A-B.	Strategia per la generazione degli alleli <i>Tbx1^{fllox}</i> e <i>Tbx1^{ΔE5}</i> .	pag. 50
Figura 9C-D.	Strategia per la generazione degli alleli <i>Tbx1^{mcm}</i> e <i>Tbx1^{lacZ}</i> .	pag. 51
Figura 9E.	Vettore di clonaggio che contiene la sequenza Cre-ER TM .	pag. 53
Figura 9F.	Costrutto per la generazione della linea transgenica stabile <i>TgFgf15Cre</i> .	pag. 55
Figura 10.	Sezioni saggittali di embrioni <i>Tbx1</i> .	pag. 59
Figura 11.	Sezioni di otocisti di embrioni <i>Tbx1</i> .	pag. 60
Figura 12.	Espressione di markers molecolari.	pag. 64
Figura 13.	Espressione di cellule <i>Tbx</i> -positive, apoptosi in embrioni <i>Tbx1</i> e strategia per la generazione degli alleli <i>Tbx1^{-/-}</i> .	pag. 68
Figura 14.	Sezioni saggittali di embrioni <i>Tbx1^{mcm/+};R26R</i> e <i>Tbx1^{mcm/ΔE5};R26R</i> .	pag. 70
Figura 15.	Delezione di <i>Tbx1</i> a E8.5.	pag. 72

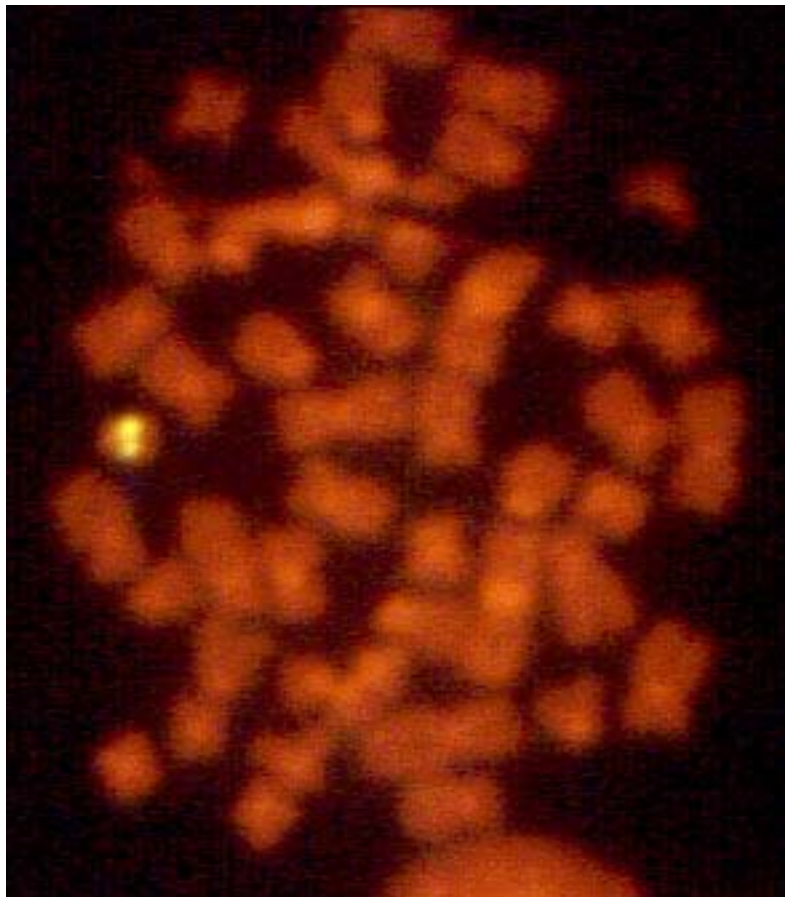
Figura 16.	Immunoistochimica con antifosfo-H3.	pag. 74
Figura 17.	Espressione in embrioni <i>Tbx1</i> ^{mcm/+} ;R26R e <i>Tbx1</i> ^{mcm/flox} ;R26R.	pag. 79
Figura 18.	Immunoistochimica con anti Notch1 attivato.	pag. 81
Figura 19.	Rna ibridazione <i>in situ</i> con <i>Dlx5</i> e <i>Wnt2b</i> .	pag. 82
Figura 20.	Espressione in embrioni <i>TgFgf15Cre</i> ; R26R.	pag. 85
Figura 21.	Immunoistochimica su embrioni <i>TgFgf15Cre</i> ; <i>Tbx1</i> ^{flox/lacZ} .	pag. 87
Figura 22.	Rappresentazione dell'azione di Notch1.	pag. 94
Figura 23.	Modello di funzione di <i>Tbx1</i> .	pag. 95

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1.	Segni clinici di pazienti con <i>del22q11DS</i> .	pag. 4
TABELLA 2.	Difetti cardiaci in pazienti con <i>del22q11DS</i> .	pag. 4
TABELLA 3.	Geni compresi nella <i>del22q11</i> .	pag. 7
TABELLA 4.	Linee di topi utilizzati in questo progetto.	pag. 42
DIAGRAMMA 1.	Schema degli incroci.	pag. 43

CAPITOLO 1

Microdelezioni cromosomiche:
analisi della sindrome da
DEL22Q11 e ruolo svolto da Tbx1.



Geni deleti nella sindrome di DiGeorge possono essere visualizzati mediante un segnale fluorescente su una sola delle due copie del cromosoma 22.

1.1 Le sindromi da microdelezioni cromosomiche.

I riarrangiamenti cromosomici sono una considerevole causa di difetti alla nascita o morte embrionale. Nel 1998, Brewer e colleghi hanno identificato 283 bande cromosomiche dove le delezioni di queste bande sono associate a malformazioni, suggerendo che i loci aploinsufficienti non sono rari nel genoma umano. Alcune trisomie, come la sindrome di Down, possono coinvolgere centinaia di geni, e solo una frazione di questi geni sarà cruciale nel determinare la patologia genetica (Shprintzen *et al.*, 1981) (Jerome *et al.*, 2001).

Le sindromi da microdelezione (Lindsay *et al.*, 2001) (Yagi *et al.*, 2003) sono dei disordini genetici causati dalla mancanza di piccoli segmenti cromosomici che comprendono 10-30 geni e non sono visibili con le normali tecniche citogenetiche. Mutazioni nei singoli geni sono responsabili di diverse sindromi da microdelezione come la sindrome di Angelman, Alagille ed altre che coinvolgono più di un gene. La delezione sul braccio lungo del cromosoma 22 o *del22q11* è considerata essere la più comune sindrome da microdelezione. Ha una frequenza di 1/4000 nati e comprende la sindrome di DiGeorge (DGS) (Baldini A. 2002) (Xu *et al.*, 2004), sindrome velocardiofacciale (VCFS) e anomalie conotruncali. Gli individui affetti portano la delezione su una sola copia del cromosoma 22, così si presume essere una sindrome da geni aploinsufficienti. Nella maggior parte dei casi, la mutazione avviene *de novo*, ma nel 10% è ereditata da un familiare affetto, comportandosi come un'autosomica dominante. La delezione comprende circa 30 geni, una regione di 3Mbp, ma non è noto con precisione quali

sono i geni o il gene responsabile della patologia. I sintomi della *del22q11* sono molti e diversi e possono essere classificati in tre categorie (Tabella1). Un fenotipo associato all'apparato faringeo correlato ai difetti di sviluppo di questo apparato, un fenotipo neurocomportamentale associato a disordini psichiatrici, e di apprendimento ed infine un gruppo eterogeneo di segni clinici come anomalie nello sviluppo vascolare, del rene e difetti scheletrici non cranio-facciali (Driscoll *et al.*, 1992).

Il fenotipo faringeo comprende segni clinici derivati da anomalie di sviluppo di archi e tasche faringee: in modo specifico anomalie cranio-facciali, ipoplasia o aplasia del timo e paratiroidi ed anomalie del tratto aortico e cardiaco. I più comuni difetti cardiaci trovati nei pazienti sono elencati in Tabella 2 (Taddei *et al.*, 2001).

Le anomalie che più interessano sono a carico dell'apparato faringeo nel riquadro nella Figura 1 è riportato uno schema di come si sviluppa l'apparato faringeo nei vertebrati.

Tabella 1. Segni clinici di pazienti con *del22q11DS*.

Fenotipo	Esempi
1. Faringeo	Anomalie cranio-facciali o cardiache. Ipoplasia o aplasia del timo e paratiroidi. Difetti dell'orecchio e problemi dell'udito.
2. Neurocomportamento	Problemi psichiatrici e nell'apprendimento.
3. Altri	Anomalie scheletriche non cranio-facciali, anomalie di sviluppo del rene e vascolari.

Tabella 2. Difetti cardiaci in pazienti con *del22q11DS*.

Difetti cardiovascolari	<i>del22q11DS</i> (N=652)
Tetralogia di Fallot	25.5%
Interruzione dell'arco aortico di tipo B	17.2%
Difetti del setto ventricolare	17.0%
Atrasia polmonare	14.4%

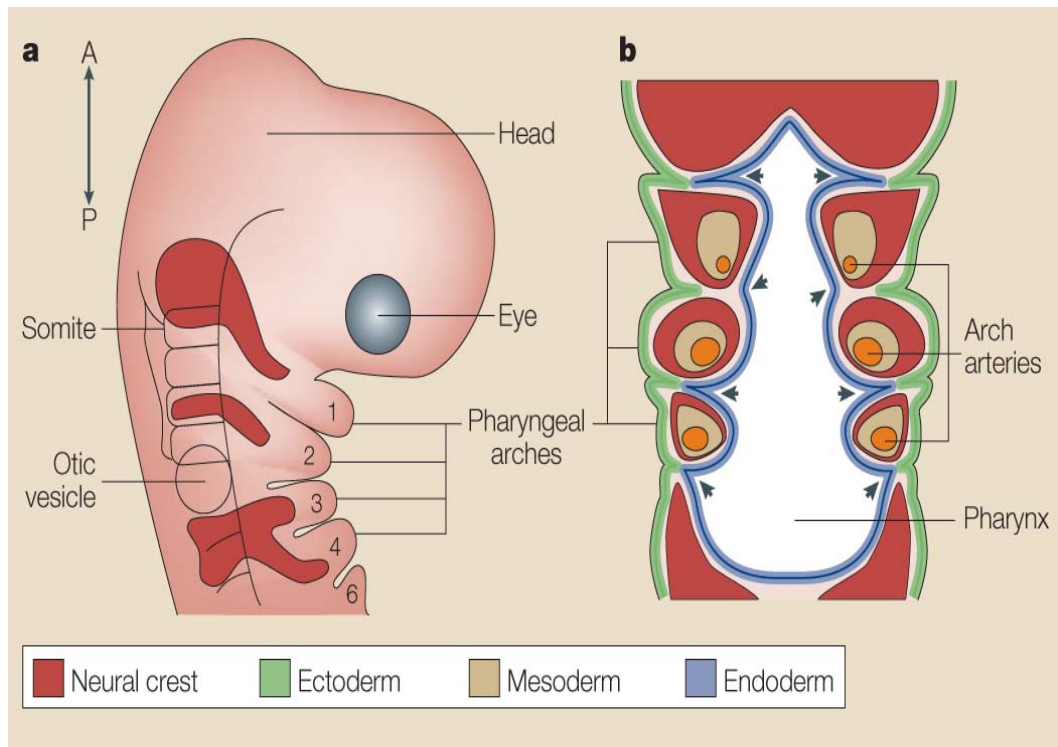


Figura 1. L'apparato faringeo è un sistema specifico dei vertebrati che si sviluppa come una serie di rigonfiamenti partendo dalla regione laterale del capo (pannello **a**). I tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma e endoderma) contribuiscono alla formazione dell'apparato faringeo, dando origine a diversi tessuti come mostrato nel (pannello **b**). Ogni arco faringeo ha uno strato ectodermico più esterno (verde) che da cui si origina l'epidermide e i tessuti neuronali di gangli associati agli archi. Dallo strato endodermico più interno (blu) si originano i rivestimenti epiteliali del faringe. L'endoderma faringeo in direzione dell'ectoderma forma una serie di tasche (freccie) che contengono i tessuti endocrini delle ghiandole faringee (timo, tiroide, paratiroide). Tra ectoderma ed endoderma c'è una regione ectomesenchimale della cresta neurale (rosso) da cui si originano tessuto connettivale, scheletrico e cellule endoteliali che circondano le arterie degli archi.

1.2 I meccanismi della delezione sul cromosoma 22.

Il 90% dei pazienti presenta una regione deleta di 3 Mb sul cromosoma 22 (Baldini A., 2002) che comprende 30 geni (Tabella 3) e solo l'8% dei pazienti ha una delezione più piccola di 1.5 Mb, che comprende 24 geni (Figura 2). La mancanza di variabilità nell'estensione della delezione è dovuto alla presenza di LCR (low-copy repeats) che fiancheggiano le regioni colpite dalla delezione. Le LCR (Digilio et al.,1999) potrebbero conferire instabilità alla regione cromosomica attraverso eventi di crossing-over non uguali e mediante ricombinazioni omologhe aberranti. Le LCR sono state trovate in tutti i cromosomi umani e sono implicate in un gran numero di riarrangiamenti cromosomici, come delezioni, duplicazioni e traslocazioni che producono diverse patologie.

Tabella 3. Geni compresi nella *del22q11*.

Gene (synonym)	Gene product	Product function
<i>DGCR6</i>	γ -laminin 1-like protein	Putative adhesion protein
<i>PRODH</i>	Proline dehydrogenase	Enzyme involved in proline catabolism
<i>DGCR2 (IDD/LAN)</i>	Integral membrane protein; C-type lectin	Putative adhesion receptor
<i>TSK (STK)</i>	Serine/threonine kinase	Signal transduction
<i>DGSI (ES2el)</i>	Nuclear protein	Essential for early embryonic development
<i>GSCL</i>	Goosecoid-like protein	Putative transcription factor
<i>SLC25A1 (CTP)</i>	Citrate transporter protein	Catalyses citrate transport across the inner mitochondrial membrane
<i>CLTCL1* (CLTD)</i>	Clathrin heavy chain-like protein	Vesicle-mediated intracellular transport
<i>HIRA (DGCR1)</i>	Protein with WD40 domains	Putative transcriptional regulator
<i>NLVCF</i>	Nuclear protein	Unknown
<i>UFD1L</i>	Ubiquitin degradation 1-like protein	Putative role in ubiquitin-dependent protein degradation
<i>CDC45L</i>	Cell-cycle initiator protein	Putative role in initiation of DNA replication
<i>CLDN5 (TMVCF)</i>	Claudin 5	Component of tight junctions
<i>PNUTL1 (CDCREL1)</i>	Septin-like protein	Putative role in cytokinesis
<i>GP1BB</i>	Platelet glycoprotein β -subunit	Component of transmembrane protein
<i>TBX1</i>	T-box 1	Putative transcription factor
<i>GNB1L (WDR14)</i>	G protein β -subunit	Component of signal-transducing G proteins
<i>TR (TRXR2)</i>	Thioredoxin reductase	Regulation of the redox protein thioredoxin
<i>COMT</i>	Catechol-O-methyltransferase	Catecholamine metabolism
<i>ARVCF</i>	Catenin-like protein	Putative role in adherens junctions
<i>T10</i>	Serine/threonine-rich protein	Unknown
<i>RANBP1</i>	RAN-binding protein 1	Intracellular transport
<i>ZNF74</i>	Protein with 12 zinc-finger domains	Putative transcription regulator
<i>CRKL</i>	Adaptor protein with SH2/SH3/SH3 domains	Protein binding
<i>LZTR1 (TCFL2)</i>	Putative DNA-binding protein	Putative transcription factor

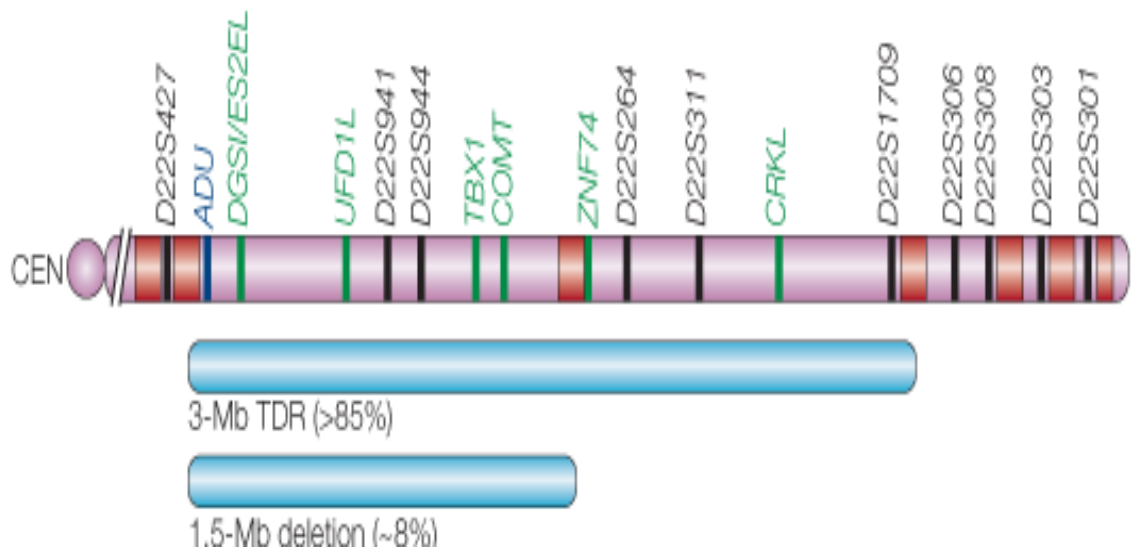


Figura 2. Cromosoma 22 umano.

La delezione sul cromosoma umano 22, dove in verde sono selezionati alcuni geni implicati ed in nero i markers molecolari usati per caratterizzare i pazienti con la delezione. In rosso, le LCR ed in blu Adu che è un paziente con la sindrome di DiGeorge ed una traslocazione cromosomica bilanciata. Le regione delete rispettivamente di 3 Mb e 1.5 Mb sono rappresentate in turchese.

1.3 Studi sulla *del22q11* nel topo.

Diversi ricercatori hanno utilizzato il topo come modello per studiare la *del22q11* poiché c'è una forte omologia tra una regione sul cromosoma 16 del topo ed una regione sul cromosoma 22 nell'uomo (Figura 3) (Moraes *et al.*, 2005) (Scambler P., 2000).

Il primo modello di topo è stato chiamato *Dfl* che comprende 18 dei 24 geni deleti nella regione di 1.5 Mb. I topi che portano in eterozigoti una copia del gene *Dfl* presentano difetti dell'arco aortico, timo, paratiroidi ed anomalie comportamentali che ricordano molto quelle umane.

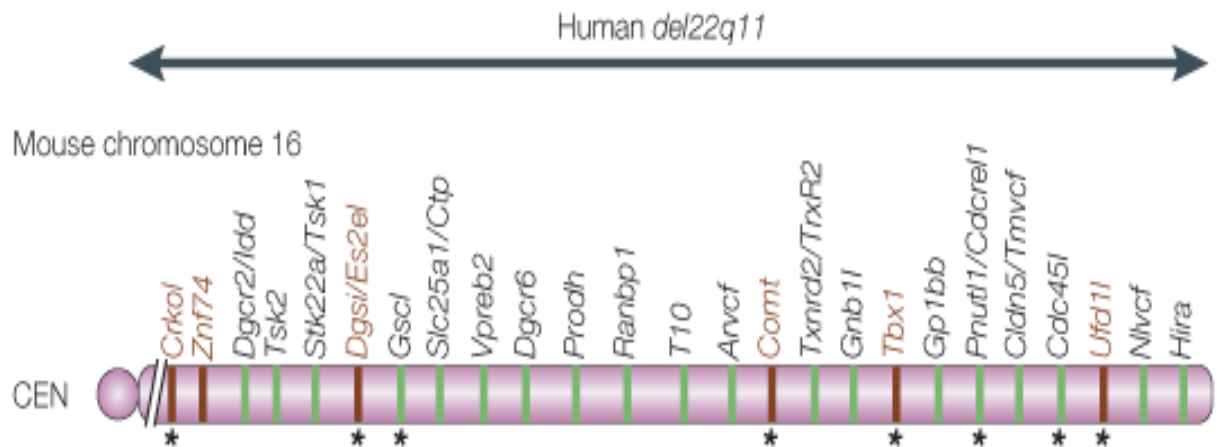


Figura 3. Regione del cromosoma 16 di topo.

La regione del cromosoma 16 di topo fortemente omologa a quella 22 dell'uomo. L'asterisco indica i geni opportunamente mutagenizzati per generare topi mutanti.

Inoltre, i difetti cardiovascolari potevano essere corretti (Baldini., 2004) incrociando topi *Dfl/+* con topi che avevano una reciproca duplicazione sull'altro cromosoma *Dp1/+*, poiché era ripristinato il normale dosaggio genico. Questo esperimento di recupero genetico mostrava che i geni all'interno della regione *Dfl* sono coinvolti nello sviluppo cardiaco e sono aploinsufficienti. Altre due delezioni nel topo erano successivamente riportate che parzialmente si sovrapponevano con la delezione *Dfl*: la prima comprende 7 geni e la seconda 12 geni. Topi eterozigoti o per una delezione o per l'altra presentavano un normale sviluppo cardiaco, indicando che i geni responsabili per i difetti cardiovascolari erano compresi nella regione tra *Arvcf* e *Ufdll*, che contengono 8 geni. All'interno di quest'intervallo topi mutati per i geni *Comt* e *Pnut11* presentavano un fenotipo cardiaco normale. Per discernere quali tra i rimanenti sei geni era responsabile del fenotipo cardiaco, molti gruppi di ricercatori si sono serviti di tecniche di ingegneria genetica in cui hanno identificato un frammento di DNA che contiene quattro geni: *Gnb11*, *Tbx1*, *Gp1bb* e *Pnut11*. Ciò indica che almeno uno di questi geni deve essere responsabile per il fenotipo cardiaco. Inoltre, molto probabilmente il motivo per il quale c'è un recupero del fenotipo cardiaco nel topo *Dfl/+* è dovuto al fatto che il prodotto del gene umano può non sostituire completamente quello di topo forse perché c'è una differenza tra i due prodotti genici oppure il gene umano è espresso a livello ridotto. I ricercatori, per identificare il gene responsabile del fenotipo cardiovascolare, hanno selezionato per knock-out il gene *Tbx1* nel topo. Questo gene appartiene alla famiglia dei geni T-box, ed è considerato essere un forte candidato perché durante lo

sviluppo embrionale è espresso nell'apparato faringeo che da origine ad una serie di strutture colpite nella sindrome da *del22q11* (Arnold *et al.*, 2006). I topi *Tbx1*^{+/-} hanno gli stessi difetti cardiaci riscontrati nei topi *Df1/+* (Figura 4). Ciò indica che *TBX1* umano potrebbe essere da solo responsabile dei difetti cardiovascolari e neuro-comportamentali (Scambler *et al.*, 1992).

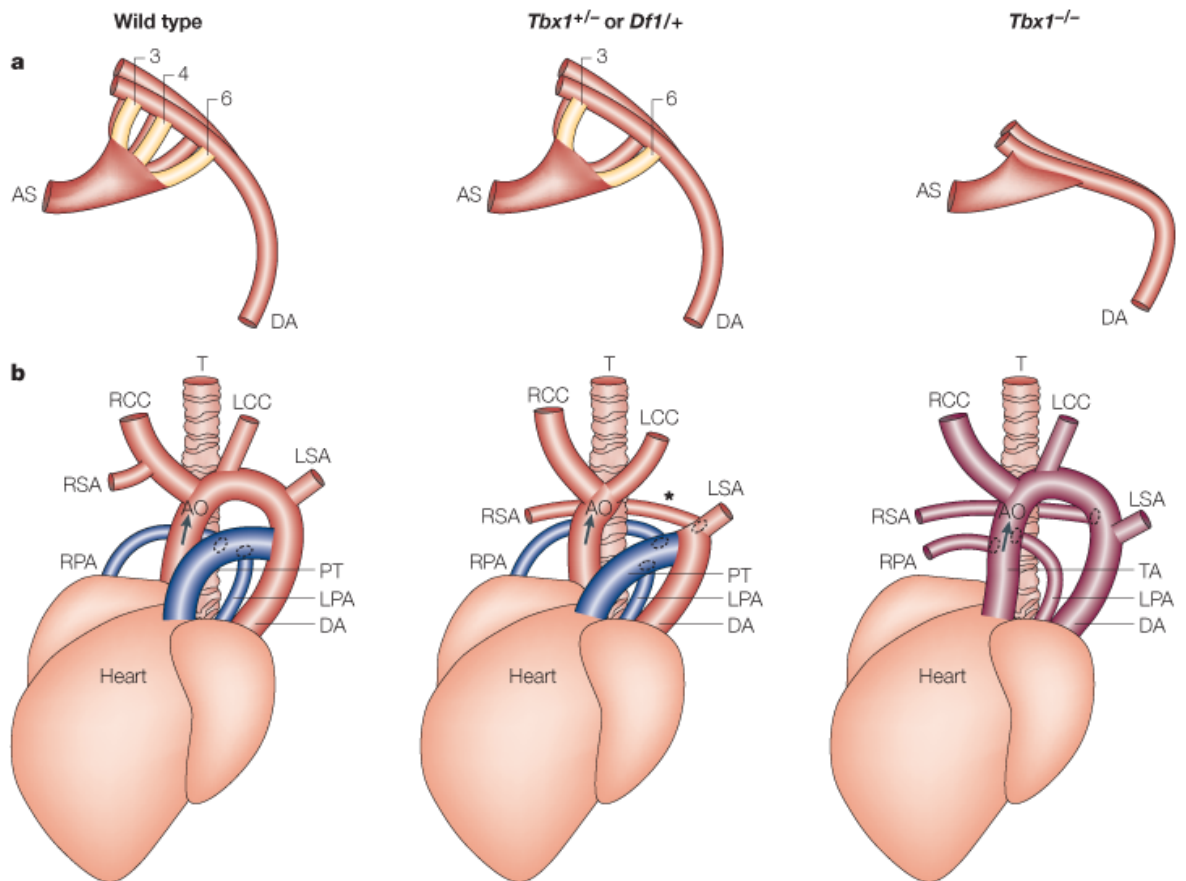


Figura 4. Difetti cardiovascolari negli embrioni di topo mutanti.

Nel pannello **a** è mostrato lo sviluppo dell'apparato faringeo degli embrioni allo stadio di E10.5. Topi *Tbx1*^{+/-} e *Df1*⁺ presentano un quarto arco aortico poco sviluppato o assente mentre nei mutanti *Tbx1*^{-/-} non c'è sviluppo dell'apparato faringeo. Nel pannello **b** è mostrato lo sviluppo di embrioni a 18.5 dove i topi *Tbx1*^{+/-} e *Df1*⁺ hanno difetti nelle strutture che derivano dal quarto arco aortico. I difetti colpiscono l'arteria succlavia di destra (RSA) che origina dall'arco aortico invece che dalla carotide (RCC) ed un arco aortico interrotto. Gli embrioni *Tbx1*^{-/-} hanno persistente tronco arterioso (PTA), per cui c'è un solo vaso che esce dal cuore invece che due (arteria polmonare e aorta).

1.4 *Tbx1* e lo sviluppo dell'apparato faringeo.

Anomalie di sviluppo dell'apparato faringeo inducono difetti di sviluppo alla nascita (Jerome et al., 2001) (Lindsay *et al.*, 2001).

Questi includono difetti delle paratiroidi, del timo, difetti cardiovascolari anomalie cranio-facciali. Non è noto perché questi difetti sono così comuni molto probabilmente alcune anomalie riscontrate sono compatibili con lo sviluppo dei vertebrati in cui intervengono una serie di geni diversi. La sindrome di DiGeorge è chiamata anche sindrome della III-IV tasca faringea. Le tasche faringee e i vasi sanguigni in essa contenuti sono le prime strutture ad essere colpite nella *del22q11* (Burn *et al.*, 1993).

I mutanti *Tbx1* omozigoti, che muoiono alla nascita, hanno persistente tronco arterioso, ipoplasia del timo e paratiroidi, faringe ipoplastica. Tutto ciò è dovuto, durante l'embriogenesi, ad un mancato sviluppo degli archi faringei, della 2-4 tasca faringea e della 2-6 arteria. Molto probabilmente *Tbx1* potrebbe essere richiesto per la segmentazione dell'endoderma faringeo, un evento che inizia lo sviluppo dell'intero apparato faringeo (Cai et al., 2003) (Figura 5). Questo suggerisce che la mancanza di un singolo gene può influenzare lo sviluppo dell'intero apparato faringeo e *Tbx1* è necessario per il corretto sviluppo dell'endoderma faringeo ma se sono richiesti segnali di altri geni non è chiaro. Sicuramente, il fenotipo aploinsufficiente visto nel topo *Tbx1* (Baldini A., 2004) indica che la delezione di una copia di *TBX1* potrebbe essere responsabile del fenotipo cardiovascolare osservato nei pazienti affetti dalla sindrome di DiGeorge. Sono state ritrovate mutazioni nel gene *TBX1* in 5

pazienti, che non presentavano delezione, e tre dei quali provenivano dalla stessa famiglia. Questi pazienti presentavano tutti i sintomi tipici della sindrome di DiGeorge (Mersher *et al.*, 2001) e ciò suggerisce che *TBX1* resta, tuttora, un forte candidato per questo tipo di patologia (Funke *et al.*, 2001).

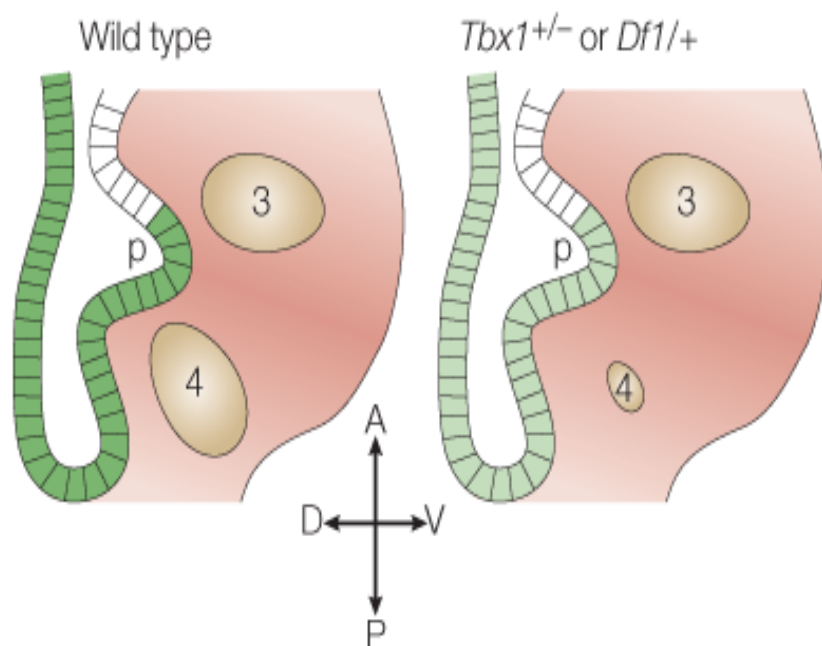


Figura 5. Espressione di *Tbx1* nell'embriogenesi del topo.

Nel wild-type (verde scuro) è riportata l'espressione di *Tbx1* nell'endoderma faringeo. Negli eterozigoti *Tbx1*^{+/-} o *Df1*/⁺ è indicato (verde chiaro) il ridotto dosaggio genico che evidenzia una espressione ridotta del gene *Tbx1*. In questi ultimi la 4ª arteria faringea è piccola o assente.

1.5 Il gene TBX1

Il gene TBX1 è stato identificato, clonato e caratterizzato da Chieffo *et al.* (1997).

Gli autori mediante *screening* di una *library* di cDNA di muscolo scheletrico adulto e caratterizzazione con RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) hanno isolato il cDNA del gene TBX1 ed hanno scoperto che esso può dare origine a due trascritti per *splicing* alternativo.

Il trascritto TBX1A comprende 1462 basi ed è composto di almeno 9 esoni mentre il trascritto TBX1B comprende 1539 basi ed è composto da almeno 10 esoni. Dai dati a disposizione risulta che i trascritti hanno una *open reading frame* di 1194 e 1116 basi e che codificano rispettivamente per polipeptidi di 398 e 372 amminoacidi. Questi ultimi presentano il 93-98% di omologia con i prodotti del gene *Tbx1* del topo, mentre la *T-box* è conservata al 100% (Garg *et al.*, 2001). L'alta omologia riscontrata al di fuori della regione *T-box* dimostra che i geni TBX1 e *Tbx1* sono effettivamente ortologhi. Inoltre, la similitudine tra il gene TBX1 dell'uomo e il gene *Tbx1* del topo si manifesta anche a livello strutturale (conservatività dei confini esoni/introni), a livello della dimensione dei trascritti e del *pattern* di espressione. Il *pattern* di espressione, nell'uomo, è stato determinato mediante *Northern blotting* utilizzando, come sonda, il cDNA del gene TBX1 per rilevare segnali di ibridazione con mRNA di vari tessuti dell'adulto e fetali (18-24 settimane). Con questo metodo è stato identificato un trascritto di 2.1 Kb che mostra ibridazione con l'mRNA del muscolo scheletrico e del

testicolo dell'adulto e due trascritti approssimativamente di 2.1 e 3.1 Kb che mostrano ibridazione con l'mRNA del polmone fetale e, a bassi livelli, del rene. Il *pattern* di espressione fetale sembra confermare l'esistenza dei due trascritti alternativi identificati con la RACEPCR, ritrovati, peraltro, anche nel topo dei quali, comunque, non si conoscono ancora possibili differenze funzionali; il fatto che il più piccolo trascritto rilevato con il *Northern blotting* sia di 2.1 Kb mentre i trascritti definiti con la RACE-PCR hanno dimensioni inferiori alle 1.6 Kb sembra, invece, indicare che questi ultimi non rappresentano i trascritti completi. Maggiori dettagli sul *pattern* di espressione embrionale, ottenuti mediante ibridazione *in situ* si hanno sul topo e sul pollo. Nel topo è stato documentato che il picco massimo di espressione si ha a E9.5, quando si ha la migrazione delle cellule della porzione cranica della cresta neurale. Nell'embrione di topo E7.5 l'espressione di *Tbx1* è limitata al mesoderma anteriore mentre in embrioni di E9.5 si rileva nella regione della testa, all'interno del mesenchima del I, II e III arco faringeo, nell'epitelio della I, II e III tasca faringea, nella vescicola otica (Chapman *et al.*, 1996) e nel mesenchima che circonda il tubo neurale. Nell'embrione a E10.5 l'espressione di *Tbx1* persiste nel mesoderma della testa e degli archi faringei, nelle tasche faringee e si ritrova lungo il III e IV paio di arterie degli archi faringei, intorno alle due aorte dorsali e nella parete dorsale del sacco aortico (Lindsay *et al.*, 2001). Evidenze di espressione sono state riscontrate anche nell'endoderma faringeo ma non nel mesenchima derivato dalla cresta neurale anche se ne riportano tracce a livello del mesenchima faringeo adiacente al III, IV e VI paio di arterie degli archi faringei. A E11.5

l'espressione è localizzata nella testa, nel mesenchima periaortico ed anche nello sclerotomo; a E12.5 nella porzione prossimale degli abbozzi degli arti e a E15.5 nell'epitelio della trachea e del polmone. L'esame della testa in stadi di sviluppo successivi ha messo in evidenza trascritti negli abbozzi dei denti, delle vibrisse e delle orecchie.

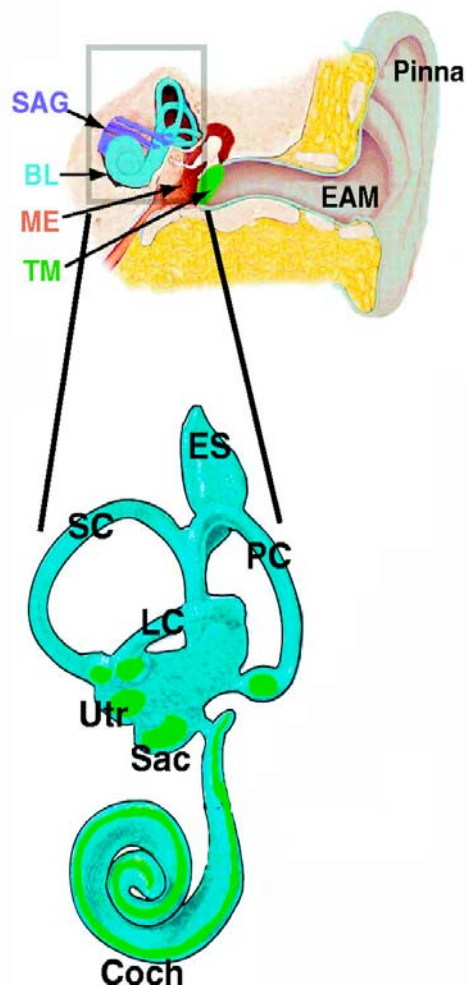
Considerando le strutture che derivano dai tessuti embrionali in cui *Tbx1* viene espresso, si può ipotizzare che esso abbia un ruolo importante nello sviluppo delle strutture facciali e ghiandolari all'interno della testa e della regione del collo, incluse le paratiroidi e il timo ed in quelle del cuore, con particolare riferimento alla regione del polo vascolare. E' stato dimostrato che l'espressione di *Tbx1* è dipendente dal prodotto del gene *Shh* (*sonic hedgehog*) (Yamagishi *et al.*, 2003) e questo concorderebbe con la loro espressione sovrapponibile negli archi faringei. Il gene *Shh* (Riccomagno *et al.*, 2002) ha un'ampia gamma di azioni biologiche: nello sviluppo delle strutture cranio-facciali e del sistema nervoso centrale, nella determinazione della asimmetria sinistra/destra e nel modellamento dei somiti e degli arti. Gli autori hanno dimostrato che, in embrioni di topi *Shh/null* (Hammond *et al.*, 2003), i trascritti di *Tbx1* sono assenti nell'endoderma faringeo e sottoespressi nel mesoderma degli archi faringei; inoltre, nell'embrione di pollo, l'espressione di *Tbx1* può essere indotta nell'epitelio e nel mesoderma degli archi faringei incrementando l'espressione di *Shh*. Questi risultati suggeriscono che *Tbx1* potrebbe funzionare a valle di una cascata di segnali durante lo sviluppo degli archi faringei la quale, comunque, rimane in gran parte sconosciuta. Studi sull'espressione di *Shh*, di proteine BM (*bone morphogenetic*)

(Winnier et al., 1995) e di un fattore di crescita dei fibroblasti durante lo sviluppo degli archi faringei, nel pollo, hanno dimostrato una buona affinità con quanto si osserva nel caso dello sviluppo degli arti di cui sono meglio conosciuti i meccanismi di regolazione, sia nei vertebrati che in *Drosophila*. In base alle similarità osservate si potrebbe ipotizzare che, nello sviluppo degli archi faringei, Shh regola l'espressione di un gene che codifica per una proteina BM la quale, a sua volta, potrebbe influenzare l'espressione di Tbx1.

Non si può escludere, comunque, che i rapporti tra Shh e Tbx1 siano più diretti o che siano implicati altri fattori; per esempio, poiché è stato dimostrato che l'espressione di Shh è inibita da dosi teratogene di acido retinoico, l'espressione di Tbx1 potrebbe essere regolata dall'acido retinoico attraverso Shh. Inoltre, poiché Tbx1 ed il gene ET1 (*endothelin 1*) sono espressi entrambi nell'endoderma e nel mesoderma faringeo e sono implicati nello sviluppo delle stesse strutture, sarebbe interessante appurare se il gene ET1 possa essere un gene *target* di Tbx1.

CAPITOLO 2

Introduzione allo sviluppo dell'orecchio nei vertebrati e formazione dell'orecchio interno.



Anatomia dell'orecchio e magnificazione dell'orecchio interno

2.1 I foglietti embrionali e la formazione dell'orecchio nei vertebrati.

Lo sviluppo dell'orecchio rappresenta un importante evento nell'organogenesi dei vertebrati (Arnold et al., 2006). Da più di cento anni l'orecchio è oggetto di numerosi studi ma le conoscenze relative alla sua struttura e come essa si è evoluta nel tempo, sono limitate. Solo negli ultimi quattro anni sono stati pubblicati numerosi lavori che aiutano a comprendere lo sviluppo morfologico e cellulare di quest'organo ed i diversi geni che ne prendono parte. L'orecchio dei vertebrati (Fekete D. *et al.*, 1999) si sviluppa da una complessa convergenza di tessuti che interessano i tre foglietti germinali e le cellule delle creste neurali. L'orecchio si differenzia in orecchio esterno, medio ed interno (Fig. 6 B). Un maggior contributo all'orecchio esterno è dato dal primo e secondo arco branchiale, che include l'arco dell'ectoderma e mesoderma. L'epitelio che sta sopra agli archi deriva dall'ectoderma del capo. Il tessuto mesenchimale di ogni arco branchiale è costituito da un piccolo gruppo di cellule derivate dal mesoderma parassiale circondato da una grande popolazione di cellule derivate dalle cellule della cresta neurale. L'orecchio medio è formato da cellule, che a loro volta sono originate dalle cellule della cresta neurale o dal mesoderma parassiale, che inizialmente migrano agli archi branchiali e poi si fondono per formare strutture dell'orecchio medio. Inoltre, presenta anche un contributo dall'endoderma ed è innervato dal IX nervo craniale. Il tessuto epiteliale ed i neuroni dell'orecchio interno sono formati quasi esclusivamente dall'ectoderma del placode, la cui invaginazione forma l'otocisti. Una piccola

popolazione di cellule che formano l'orecchio interno da' origine ai melanociti nella coclea, le cellule di Schwann del SAG ed altri tessuti mesenchimali. Una capsula cartilaginea che eventualmente ossifica e circonda l'epitelio dell'orecchio interno. La maggior parte della capsula otica è derivata dal mesoderma parassiale e si forma attraverso le interazioni tra epitelio e mesenchima con la membrana labirintica che essa circonda e protegge (Fig. 6A-B).

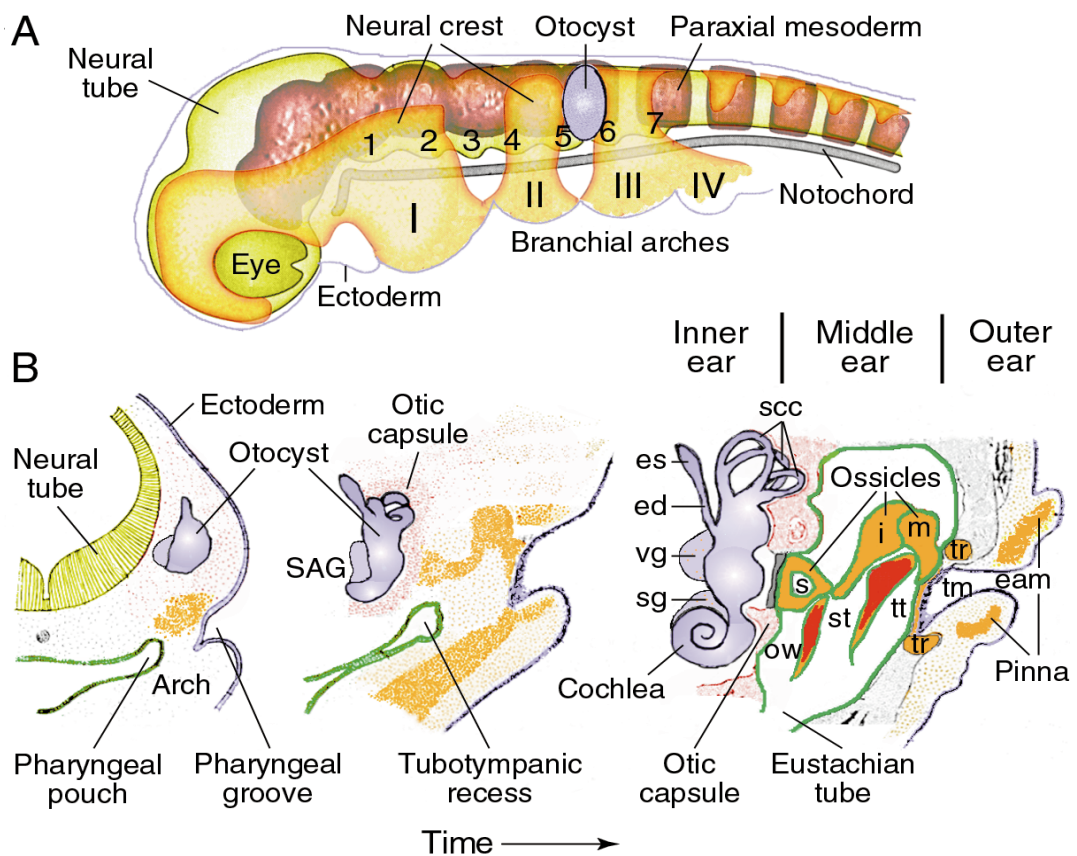


Figura 6 A-B. La figura 6 A mostra una visione laterale dello sviluppo dell'embrione nei vertebrati. La figura 6 B mostra una sezione schematica attraverso l'orecchio e come esso si sviluppa nel tempo.

2.2 Sviluppo e funzione dell'orecchio interno nei vertebrati.

Lo sviluppo dell'orecchio rappresenta un importante evento nell'organogenesi dei vertebrati (Riley et al., 2003). Da più di cento anni l'orecchio è oggetto di numerosi studi ma le conoscenze relative alla sua struttura e come essa si è evoluta nel tempo, sono limitate. Solo negli ultimi quattro anni sono stati pubblicati numerosi lavori che aiutano a comprendere lo sviluppo morfologico e cellulare di quest'organo ed i diversi geni che ne prendono parte (Noramly *et al.*, 2002).

Attualmente, l'interesse scientifico è volto ad identificare non solo i geni ed i relativi pattern che partecipano agli eventi precoci della formazione dell'orecchio interno ma anche i geni che attivano le cellule deputate alla trasmissione del suono o "hair cells" (Bermingham *et al.*, 1999). Lo sviluppo morfologico dell'orecchio interno dei vertebrati inizia con la formazione del placode otico. Nei vertebrati tetrapodi, l'invaginazione del placode otico da' origine alla vescicole otica. In zebrafish, la vescicola otica si forma da una cavità piuttosto che in seguito ad un'invaginazione. Il muro che costituisce l'epitelio otico, nel corso della morfogenesi, va incontro ad una serie di riavvolgimenti e trasformazioni tali da generare una serie di canali interconnessi.

L'utricolo e i canali semicircolari costituiscono l'apparato vestibolare; queste strutture e le loro funzioni sono altamente conservate in tutti i vertebrati a differenza dei canali che hanno subito nel corso dell'evoluzione notevoli cambiamenti (Fig.7).

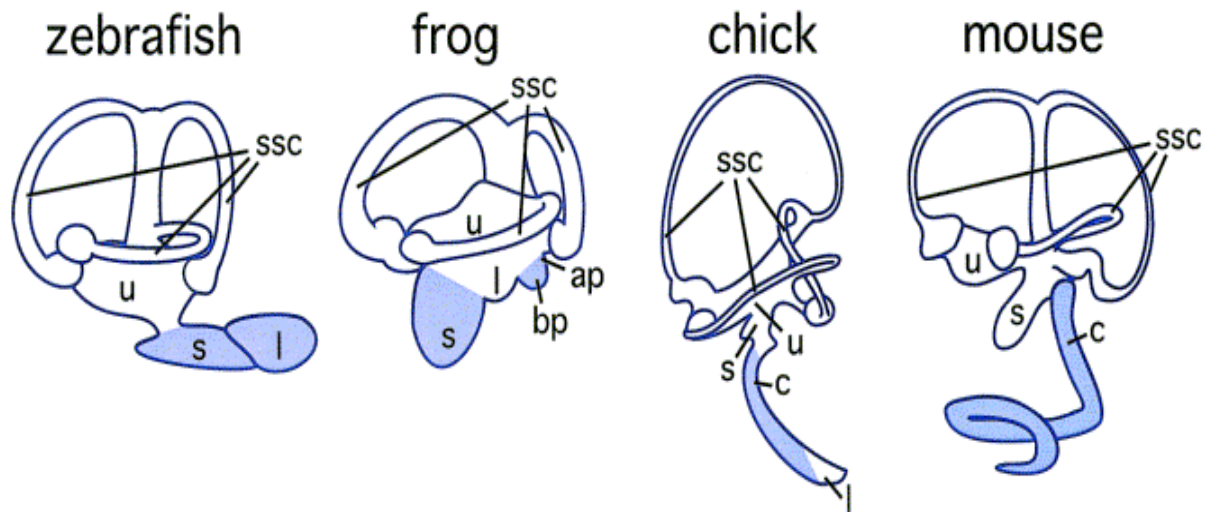


Figura 7. Struttura generale dell'orecchio interno in Zebrafish, Xenopus, Pollo e Topo. In blu sono rappresentate le strutture uditive. Abbreviazioni: **ap**, papilla anfibilae; **bp**, papilla basilare; **c**, coclea; **l**, lagena; **s**, sacculo; **u**, utricolo.

Il sacco e la lagena sono organi uditivi nei pesci ma il sacco riveste un ruolo vestibolare nei mammiferi e negli uccelli mentre la lagena non è presente nei mammiferi ed il suo ruolo non è noto negli uccelli. Il primo organo uditivo negli uccelli e nei mammiferi è la coclea che non ha una controparte nei pesci e negli anfibi. Negli anfibi, il sacco, la papilla anfibiale e uditiva rappresentano un organo uditivo. Ogni canale è associato ad un epitelio sensoriale che contiene cellule cigliate e cellule di supporto la cui funzione non è nota. Molto probabilmente svolgono la funzione di cellule staminali per la rigenerazione ed il mantenimento delle hair-cells. La macula, l'epitelio sensoriale nell'utricolo, il sacco e la lagena, sono associati con gli otoliti. Gli otoliti sono densi cristalli attaccati alle strutture cigliate delle hair cells ed hanno il compito di agevolare la funzione del sistema uditivo e sensoriale trasmettendo vibrazioni del suono alle hair cells (Hawkins., *et al* 2004). Le cristae, l'epitelio sensoriale nei canali semicircolari, mancano di otoliti e le hair cells in esse contenute sono sensibili al moto dei fluidi causati dall'accelerazione angolare. I segnali elettrici provenienti dalle hair-cells sono tradotti dai neuroni del ganglio statoacustico (SAG). I neuroblasti del SAG delaminano dalla superficie antero-ventrale della vescicola otica ed in seguito a differenziazione vanno ad innervare le varie strutture che compongono l'orecchio interno. Il fluido all'interno dell'orecchio interno, definito come endolinfa, ha una caratteristica carica ionica richiesta per il funzionamento delle hair-cells. Il volume è mantenuto a livelli appropriati mediante la fuoriuscita di liquido dal dotto endolinfatico.

2.3 Studi classici sull'induzione otica.

La maggior parte degli studi sull'embriologia classica per capire i meccanismi che regolano l'induzione nel placode otico sono stati condotti a partire dagli anni 80 (Riley et al., 2003).

E' stato assunto che il processo è simile in tutti i vertebrati dove la maggior parte degli studi è stato focalizzato sugli anfibi e sugli uccelli per la facilità con i quali sono stati condotti gli esperimenti di ricombinazione. Si è cercato di capire il tempo e lo spazio di sviluppo dell'induzione otica; a tal proposito sono stati trapiantati in tessuti diversi, regioni ectodermiche che contengono potenziali siti per l'induzione otica e si è valutato il tempo in cui si ha la formazione della vescicola otica.

E' stato visto che si ha l'induzione otica per cui la formazione della vescicola otica non dipende dallo stadio di sviluppo embrionale in cui si fa avvenire il trapianto ectodermico ma invece è completamente persa durante la fase di somitogenesi.

Molti altri studi hanno cercato di individuare delle potenziali sorgenti di induzione otica, una di queste sorgenti è il romboencefalo. La maggior parte dell'attività di induzione otica è localizzata nella regione laterale del romboencefalo e trapiantando tessuti derivati dal romboencefalo in altre regioni, si è osservato la formazione della vescicola otica. Se invece viene eliminato il romboencefalo si ha una perturbazione nella formazione della vescicola otica ma non un arresto, il che suggerisce che anche la regione mesodermica svolge qualche ruolo importante. Molto probabilmente è l'interazione mesoderma-romboencefalo che determina un corretto sviluppo dell'orecchio interno. Complessivamente, si è dimostrato che

l'induzione otica non è un singolare evento ma riflette un graduale processo che coinvolge interazioni che riguardano altri tessuti. Inoltre, è stato importante analizzare i parametri spaziali e temporali che inducono l'ectoderma a rispondere all'induzione otica. Molti studi hanno evidenziato che inizialmente l'induzione otica è molto estesa ma diventa localizzata durante il corso dello sviluppo embrionale. Probabilmente l'ectoderma si differenzia in ectoderma non otico ed ectoderma otico, il primo ricoprirà altre funzioni, nel secondo ci sarà un graduale aumento delle competenze per recepire eventi di induzione.

2.4 Identificazione di induttori otici e potenziali markers.

Un numero di geni espressi a stadi precoci dello sviluppo otico sono stati considerati utili come possibili markers molecolari per seguire il decorso dello sviluppo otico. Molti esperimenti hanno messo in evidenza che lo sviluppo otico precoce non è regolato da una cascata di eventi unificati ma piuttosto da una serie di strade parallele che coinvolgono diversi geni. Tra questi geni ricordiamo i geni appartenenti alla famiglia dei fattori di accrescimento fibroblastico come *fgf3*. Numerosi studi hanno dimostrato che *fgf3* (McKay *et al.*, 1996) svolge il ruolo di induttore otico ed è conservato tra pesci, anfibi, uccelli e mammiferi. In tutte le specie esaminate *fgf3* è espresso nei primordi del romboencefalo a partire dalla fine della gastrulazione fino allo stadio di 8-10 somiti quando si forma il placode otico. Ciò è consistente con gli studi classici che mostrano che il romboencefalo è una sorgente di induttori otici e l'attività persiste fino alla somitogenesi. *Pax2* (Torres *et al.*, 1996), un omologo di *Pax8*, è espresso nelle cellule preotiche a partire dai primi stadi della somitogenesi dopo che l'espressione di *Pax8* è iniziata. In topo e zebrafish, la mancanza di espressione di *Pax8* non previene l'espressione di *Pax2* (Lavoro-Kerali *et al.*, 2002), suggerendo che questi geni pur essendo degli induttori otici non appartengono alla stessa via. *Pax8* è espresso all'inizio della formazione della vescicola otica successivamente l'espressione scompare a differenza di *Pax2* (Nornes *et al.*, 1990) che permane nella regione latero-ventrale dell'otocisti ed è ritenuta nelle hair-cells. Nel topo, l'eliminazione di *Pax2* non altera la formazione e lo sviluppo dell'otocisti ma previene la

formazione della coclea. Anche *Dlx5* (Merlo *et al.*, 2002) può essere considerato un induttore otico e, come *Pax2*, la sua assenza non determina un mancato sviluppo otico. L'espressione di *Dlx5* è confinata nella regione dorsale dell'otocisti, da cui si originano i canali semicircolari anteriore e posteriore. I mutanti *Dlx5* non presentano queste strutture. Complessivamente, esistono numerosi geni che svolgono la duplice funzione di essere marker ed induttori per l'otocisti ma bisogna comprendere i segnali endogeni che ne regolano la differenziazione e la morfogenesi.

CAPITOLO 3

Il topo come modello per lo studio relativo alla “sordità”.



Topo modificato geneticamente (Immagine prodotta nei nostri laboratori).

3.1 Il topo nella ricerca biomedica dell'orecchio interno.

L'utilizzo del topo come modello animale per lo studio delle malattie umane si è rivelato di grande utilità (Kiernan *et al.*, 2002). Infatti, esso ha contribuito al raggiungimento della comprensione di molte malattie nell'uomo come alcune forme di cancro, le malattie cardiache, neurologiche ed ultimamente anche nelle malattie correlate all'udito.

Attualmente, esiste una discreta collezione di topi mutanti per disfunzioni associate all'udito o all'apparato vestibolare e sono stati identificati circa 50 geni le cui mutazioni causano difetti dell'orecchio interno nel topo (Morest *et al.*, 2004).

I vantaggi derivati dall'utilizzo del topo per la ricerca nel campo dell'udito sono numerosi. Infatti, c'è una notevole somiglianza tra la sua coclea e quella dell'uomo (Fekete *et al.*, 1996). Come nell'uomo, le cellule meccanosensoriali nel topo sono responsabili per la captazione del suono nella coclea e della gravità ed accelerazione nel sistema vestibolare. Nel topo l'organo del Corti è costituito da numerose popolazioni cellulari di cui, da un punto di vista funzionale, le più importanti sono le cellule sensoriali i cui processi ciliati, dopo aver attraversato una lamina cribrosa (la lamina reticolare), si portano in vicinanza ed entrano in contatto con la membrana tettoria che li sovrasta. Le cellule ciliate sono poste ai lati di una duplice fila di particolari cellule di sostegno, i pilastri del Corti, a loro volta ancorati sulla membrana basilare. Le cellule ciliate (Chen *et al.*, 2002) sono ordinate su file di cui tre si trovano all'esterno del pilastro del Corti (cellule ciliate esterne; sono circa 20.000) ed una al suo interno (cellule ciliate interne; circa 3-4.000) (Figura 8A-B). Solo

le ciglia delle cellule ciliate esterne (Bermingham *et al.*, 1999), ma non di quelle interne, sono immerse nella membrana tettoria. Le fibre nervose che contattano le cellule ciliate e che trasportano le informazioni acustiche verso SNC, provengono da cellule nervose che, nel loro insieme, costituiscono il ganglio spirale. Nel sistema vestibolare, le cellule sensoriali sono presenti nel sacco, utricolo e canali semicircolari. Difetti nell'apparato vestibolare, spesso associati con sordità, sono molto gravi nel topo, infatti il topo muove il capo vorticosamente e gira su se stesso. Per questa ragione, i topi sordi sono stati facilmente identificati. Un altro vantaggio (Fekete *et al.*, 2002) dell'utilizzo del topo è rappresentato dal tempo di gestazione di circa tre settimane che è relativamente breve e nel laboratorio è un animale che facilmente si adatta e cresce bene. Inoltre, non è da sottovalutare la disponibilità di incrociare ceppi geneticamente identici che forniscono standard di comparazione quando compariamo esperimenti tra vari laboratori annullando anche il problema della variabilità genetica tra i diversi ceppi.

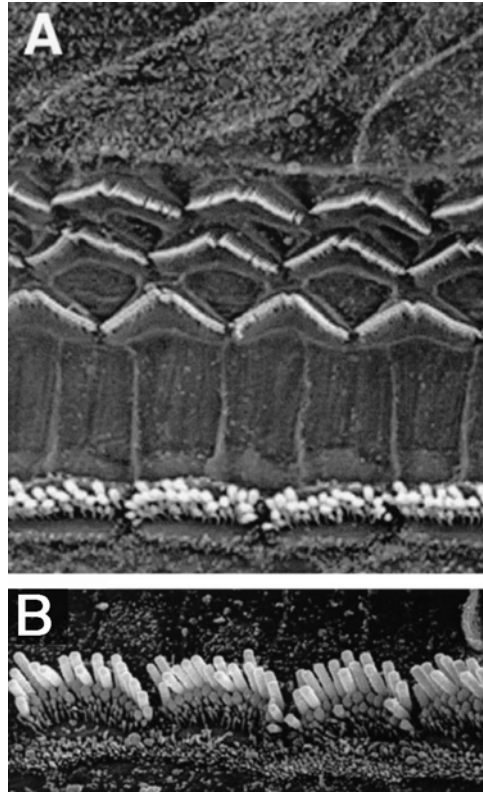


Figura 8A-B. Immagine al microscopio elettronico dell'orecchio interno del topo. In 8A è rappresentata la struttura delle cellule sensoriali mentre in 8B c'è una magnificazione delle ciglia nelle cellule sensoriali.

3.2 Il genoma di topo.

Studi comparativi sui genomi ha rappresentato uno strumento di grande utilità per identificare geni responsabili di malattie nell'uomo. Tratti da 1 a 50 centimorgan di cromosomi sono conservati tra uomo e topo, con geni ortologhi lungo ogni cromosoma. Infatti, esistono 200 parti simili di regioni cromosomiche omologhe tra uomo e topo. I modelli di topo esistenti per alcuni di questi geni hanno consentito predizioni di geni candidati per malattie e disordini nell'uomo.

Uno dei motivi per l'utilizzo del topo come modello per le malattie umane è rappresentato dalla capacità di determinare la localizzazione di un gene di topo e correlarla con la localizzazione sul cromosoma umano e, quando è possibile, sul topo mutante. Attualmente, esistono tabelle in letteratura che correlano geni umani e di topo rispettivamente responsabili della sordità (Fekete *et al.*, 1999).

Infine, il sequenziamento del genoma umano rilasciato nel 2001 e seguito da quello del topo del 2002 ha messo in evidenza che entrambi i genomi contengono 30,000 geni e meno dell' 1% dei geni del topo non hanno corrispondenti nell'uomo. Infatti, le proteine codificate tra uomo e topo hanno un'identità amminoacidica media del 78.5%, suggerendo che ci sono le basi per studi comparativi tra topo e uomo.

3.3 Mutazioni che colpiscono l'apparato uditivo del topo.

Esistono tre forme di mutazioni che possono insorgere nel topo: mutazioni spontanee, mutazioni derivate da agenti chimici o radiazioni e mutazioni generate da modificazioni indotte nel genoma di topo. Tra le prime ricordiamo quelle che hanno colpito l'apparato vestibolare del topo e causano sordità. Un esempio è rappresentato dalla mutazione nella miosina VI che causa sordità nel topo. Questo ha condotto i ricercatori a ricercare in modo specifico mutazioni nel corrispondente gene umano. Mutazioni nel gene della miosina VI umana sono conosciute per essere associate a forme recessive e dominanti di sordità nell'uomo. Le mutazioni derivate da radiazioni o da agenti chimici si sono rivelate particolarmente interessanti per aver generato dei topi mutanti, grazie all'utilizzo di N-etil-N-nitrosourea, che rappresentano un modello di otite media che si ha nei bambini. Le tecniche per la generazione di topi knock-out sono attualmente utili perché si possono alterare i geni in specifici tessuti, come è stato fatto per lo studio sull'assenza di connessina 26 nell'orecchio interno del topo. Il topo knock-out per la connessina 26 muore durante l'embriogenesi a causa di alterazioni gravi che interessano i foglietti placentali. Inattivando la connessina 26 con il sistema di ricombinazione Cre-lox P, si è visto che la sua assenza induce la morte cellulare delle cellule di supporto nelle cellule sensoriali. Quindi la connessina 26 è essenziale nella coclea per un corretto sviluppo dell'udito. In definitiva, i topi transgenici offrono il vantaggio di seguire l'espressione di un gene usando un gene reporter come GFP o LacZ. In questo modo si è studiata l'espressione di *Math1* che è

localizzato nell'epitelio sensoriale della coclea e nell'apparato vestibolare del topo (Fritzsche *et al.*, 2002).

3.4 Geni responsabili del fenotipo uditivo.

Esistono più di 90 loci associati a malattie dell'apparato uditivo mappati sul genoma umano e solo 30 di questi geni sono stati clonati, è chiaro che è necessario scoprire nuovi geni che rientrano nel sistema vestibolare e uditivo.

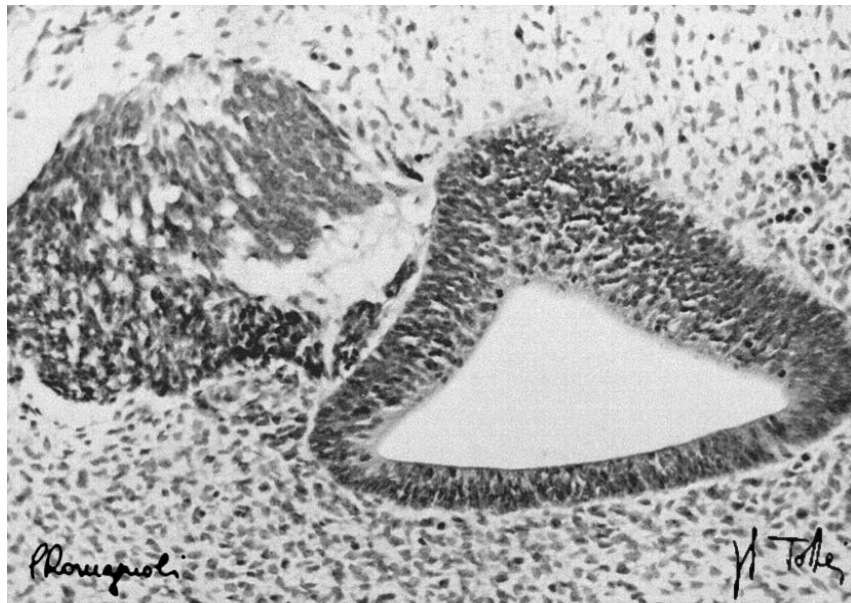
Inoltre, in diversi topi knock-out generati per studiare le malattie dell'apparato uditivo sono stati trovati geni che hanno un ruolo vitale nell'orecchio interno, sebbene queste mutazioni non sono state identificate nell'uomo. Un esempio è rappresentato dal gene *Nkx5.1* espresso nelle strutture vestibolari durante lo sviluppo. Topi in cui questo gene è assente hanno un ridotto o mancato sviluppo dei canali semicircolari che conducono a difetti negli organi di senso. Infatti, questi topi ruotano su se stessi. Anche le neurotrofine sono state implicate nello sviluppo dell'orecchio interno per cui i geni BDNF e NT-3 rivestono un ruolo chiave in questo sviluppo. Gli organi di senso dall'orecchio interno (coclea) al sistema vestibolare sono innervati da fibre afferenti provenienti da neuroni dei gangli spirali e neuroni dei gangli vestibolari. I fattori trofici, includendo le neurotrofine, supportano la sopravvivenza di questi neuroni. Mutazioni in BDNF e NT-3 inducono all'assenza di entrambi i neuroni e quindi ad un non corretto sviluppo dell'orecchio interno.

Mutazioni nel gene NeuroD, un gene coinvolto nello sviluppo del cervello e del pancreas, inducono forme di sordità ed i topi

ruotano su se stessi. Ulteriori ricerche hanno rivelato un mancato sviluppo dei neuroni di senso del ganglio cocleo-vestibolare (CVG) ed anomalie nella differenziazione dell'epitelio sensoriale. In conclusione, i topi knock-outs per le diverse mutazioni dei geni rappresentano un utile strumento per la comprensione dello sviluppo e della funzione dell'orecchio interno.

CAPITOLO 4

Scopo della tesi



Otocisti e relativo ganglio.

4.1 Utilizzo dei modelli animali per lo studio dell'orecchio

In questi quattro anni di dottorato mi sono occupata del ruolo svolto dal gene *Tbx1* nello sviluppo dell'orecchio interno. Il mio progetto di tesi di dottorato è iniziato instaurando un'intensa collaborazione con il Prof.re Antonio Baldini e la Prof.ssa Elizabeth Illingworth al Baylor College of Medicine in Houston (Texas-U.S.A) dove ho imparato a lavorare con i modelli murini ed ho effettuato parte di esperimenti per il mio progetto di tesi.

Tbx1 è essenziale per lo sviluppo dell'otocisti e la formazione del dotto cocleare e dei canali semicircolari. Infatti, topi *Tbx1*^{-/-} presentano gravissimi difetti nello sviluppo dell'orecchio esterno, medio ed interno. I difetti dell'orecchio esterno e medio potrebbero essere attribuiti a gravi difetti nello sviluppo degli archi faringei che caratterizzano il fenotipo dei topi *Tbx1*^{-/-}. Invece, l'origine dei difetti dell'orecchio interno non è nota.

Un'analisi approfondita su embrioni nei primi stadi di sviluppo ha mostrato che *Tbx1* non è richiesto per la formazione dell'otocisti, del ganglio cocleo-vestibolare (CVG) e del dotto endolinfatico ma è richiesto per la morfogenesi dell'otocisti. Infatti, nei topi *Tbx1*^{-/-} gli organi relativi all'apparato vestibolare ed uditivo non si formano e l'orecchio interno resta un'otocisti malformata.

A questo punto, con le mie ricerche mi sono prefissata di:

- 1) Stabilire il meccanismo mediante il quale l'assenza di funzione di *Tbx1* blocca lo sviluppo dell'otocisti.
- 2) Stabilire i "tempi" di espressione di *Tbx1* per un corretto sviluppo dell'orecchio interno.

3) Stabilire il “territorio” di espressione di *Tbx1* che risulta essere critico per una normale morfogenesi dell’orecchio interno.

Per rispondere al **punto 1** ho analizzato il pattern di espressione di *Tbx1* nell’otocisti nello sviluppo embrionale del topo mediante tecniche di RNA ibridazione *in situ* con diversi marcatori dell’otocisti ed analisi di chimere in cui è stato utilizzato l’allele *Tbx1^{lacZ}*. Inoltre, ho anche utilizzato l’allele *Tbx1^{mcm}* che, a differenza dell’allele *Tbx1^{lacZ}*, mi ha consentito di identificare permanentemente le cellule che esprimono *Tbx1*. Gli embrioni utilizzati per questi esperimenti sono di stadio E9-9.5 ed E10.5.

Nel laboratorio del Prof. A. Baldini e della Prof.ssa E. Illingworth a Houston sono stati generati una serie di alleli mutanti di *Tbx1*. Nei miei esperimenti ho utilizzato gli alleli descritti in Tabella 4.

Inoltre, ho riportato uno schema degli esperimenti eseguiti nel Diagramma 1.

Dall’analisi sulle chimere si osserva che le cellule *Tbx1^{-/-}* non sono in grado di contribuire all’epitelio otico.

Per indagare sul perché queste cellule non sono presenti, ho seguito due possibilità:

a) *Tbx1* è richiesto per la sopravvivenza e/o la proliferazione di una particolare popolazione di cellule nell’epitelio dell’otocisti.

b) L’assenza di *Tbx1* cambia il destino di queste cellule.

Ho utilizzato tecniche di istologia per analizzare le chimere e tecniche di immunistochemica per valutare la sopravvivenza e la proliferazione cellulare nell’epitelio dell’otocisti.

Per rispondere al **punto 2** ho cercato di capire qual’è il ruolo di *Tbx1* dopo che le cellule che esprimono *Tbx1* sono localizzate normalmente nell’otocisti.

Anche qui ho seguito due possibilità:

c) *Tbx1* è richiesto “solo” nella fase iniziale dello sviluppo dell’otocisti.

d) *Tbx1* è richiesto “anche” in una fase successiva per la morfogenesi dell’otocisti.

Per distinguere tra queste possibilità, abbiamo eliminato il gene in un determinato tempo. Precisamente, dopo che le cellule che hanno espresso *Tbx1* sono nell’otocisti (circa E9) e prima che ha luogo l’evento morfogenetico (circa E11.5). Per questa analisi ho utilizzato l’allele *Tbx1^{lox}* ed una linea transgenica TgCagg-CreERTM dove l’enzima CRE è inducibile da Tamoxifen.

Osserveremo gli effetti della perdita di funzione di *Tbx1* in termini di analisi morfologica mediante istologia ed espressione di geni in specifiche regioni.

Per rispondere al **punto 3** ho cercato di capire il ruolo che ricopre *Tbx1* nell’epitelio otico e nel mesenchima intorno all’otocisti.

Infatti, *Tbx1* è espresso nell’epitelio otico e nel mesenchima intorno all’otocisti. Entrambi i tessuti sono richiesti per lo sviluppo dell’orecchio interno ma non è descritto in quali dei due tessuti *Tbx1* esercita un ruolo critico per lo sviluppo dell’orecchio interno.

Per supportare questa ipotesi, abbiamo eliminato *Tbx1* nell’epitelio otico ma non nel mesenchima. Ci siamo serviti di un’altra linea transgenica *TgFgf15Cre* che induce ricombinazione nell’ectoderma, endoderma e nell’epitelio otico. Il fenotipo verrà analizzato mediante tecniche di istologia, espressione di geni specifici per immunohistochimica e per RNA ibridazione *in situ*.

In conclusione, non è stato mai definito un fenotipo specifico per l'orecchio interno e con il mio progetto di tesi è stato caratterizzato “per la prima volta” il fenotipo relativo all'orecchio interno nello sviluppo embrionale del topo.

In questo programma di ricerca ho cercato di chiarire i meccanismi molecolari che controllano lo sviluppo iniziale dell'orecchio interno ed il tipo di difetto di sviluppo dell'orecchio interno che ci proponiamo di studiare non può essere analizzato in pazienti perchè si verifica in un periodo precoce dello sviluppo fetale. Per questo abbiamo modificato il gene *Tbx1* nel topo tramite ingegneria genetica e ne abbiamo riprodotto la malattia per capire la funzione del gene durante lo sviluppo dell'orecchio interno. Visto che l'orecchio interno è un organo molto complesso, noi abbiamo utilizzato nuove tecnologie genetiche per alterare il gene solo in certi tipi di cellule dell'orecchio interno, per “dissezionare” la funzione del gene in dettaglio.

Questo modello verrà approfondito successivamente nella discussione.

Con questa ricerca non mi sono riproposta di avere una cura per la malattia nel futuro prossimo ma ci attendiamo di accumulare nuove conoscenze sui meccanismi molecolari di base che regolano lo sviluppo dell'orecchio interno. Queste nuove informazioni potrebbero facilitare la comprensione di diversi tipi di sordità.

Tabella 4. Linee di topi utilizzati in questo progetto.

Nome allele	Descrizione	Referenza
<i>Tbx1</i> ^{+/<i>lacZ</i>} ; <i>Tbx1</i> ^{+/-} ;	<i>Tbx1</i> è inattivato da knocking di un gene reporter LacZ.	Lindsay et al., 2001
<i>Tbx1</i> ^{<i>lacZ/lacZ</i>} ; <i>Tbx1</i> ^{-/-} ;	Entrambi gli alleli sono inattivati dal reporter LacZ.	Lindsay et al., 2001
<i>Tbx1</i> ^{<i>lox</i>}	Allele condizionale di <i>Tbx1</i> dove l'esone 5 è fiancheggiato da due siti loxP.	Xu et al., 2004
<i>Tbx1</i> ^{$\Delta E5$}	Allele in cui è stato deletato l'esone 5. E' derivato dall'allele sopra descritto mediante escissione dell'esone 5.	Xu et al., 2004
<i>Tbx1</i> ^{<i>mcm/+</i>}	Una Cre-inducibile da tamoxifen è stata inserita nel locus di <i>Tbx1</i> in modo che essa è sotto il controllo degli elementi regolatori di <i>Tbx1</i> .	Xu et al., 2004
<i>Rosa26R</i>	E' una linea reporter per l'attività della Cre. Il gene LacZ reporter è attivato dalla ricombinazione della Cre.	Soriano et al., 1999
<i>TgCagg-CreER</i> TM	Linea transgenica dove una Cre-inducibile da tamoxifen è ubiquitariamente espressa.	Hayashi et al., 2002
<i>TgFgf15Cre</i>	Linea transgenica dove la Cre è espressa nell'epitelio otico ma non nel mesenchima intorno all'otocisti.	Zhang et al., 2005

INCROCI

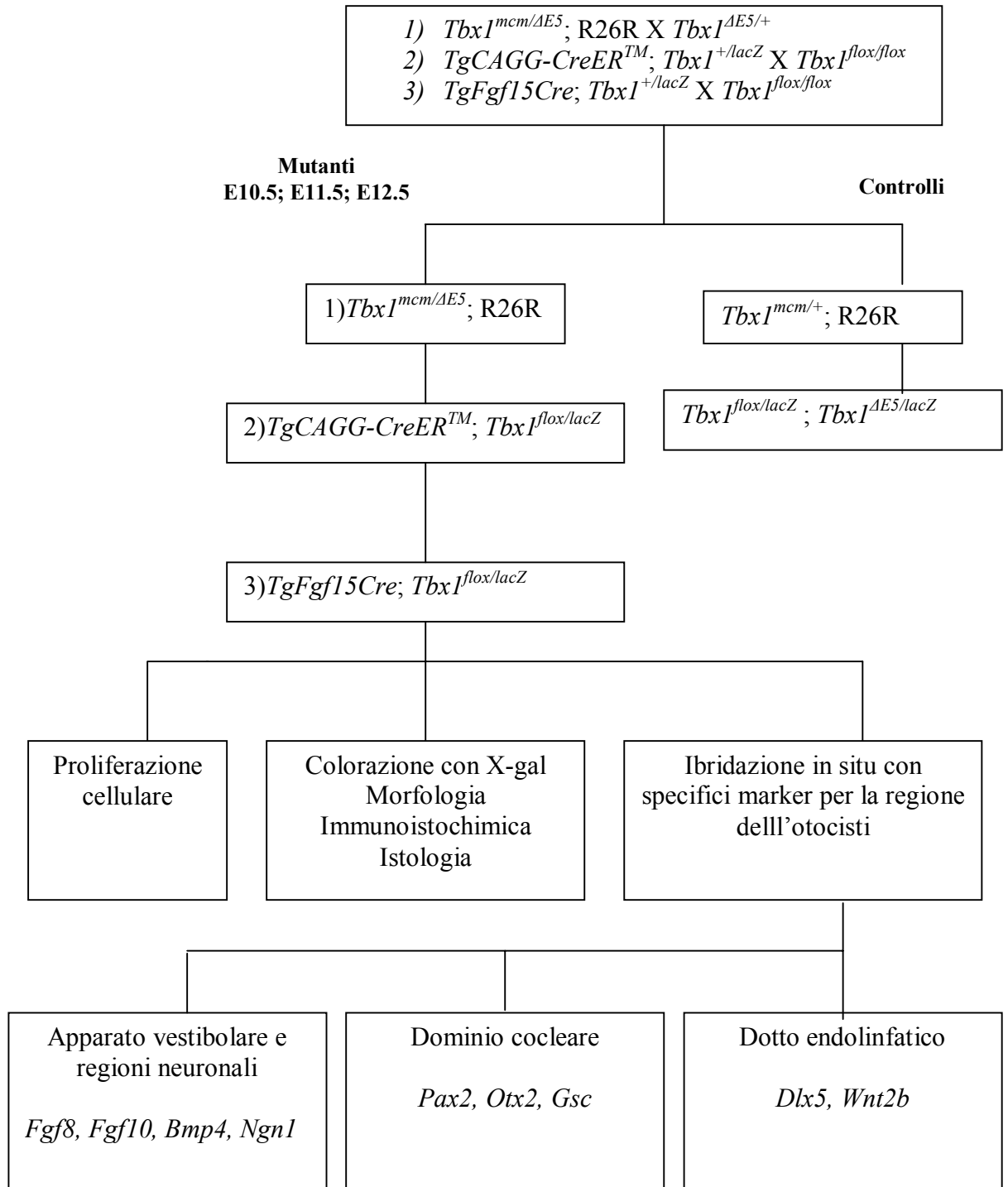
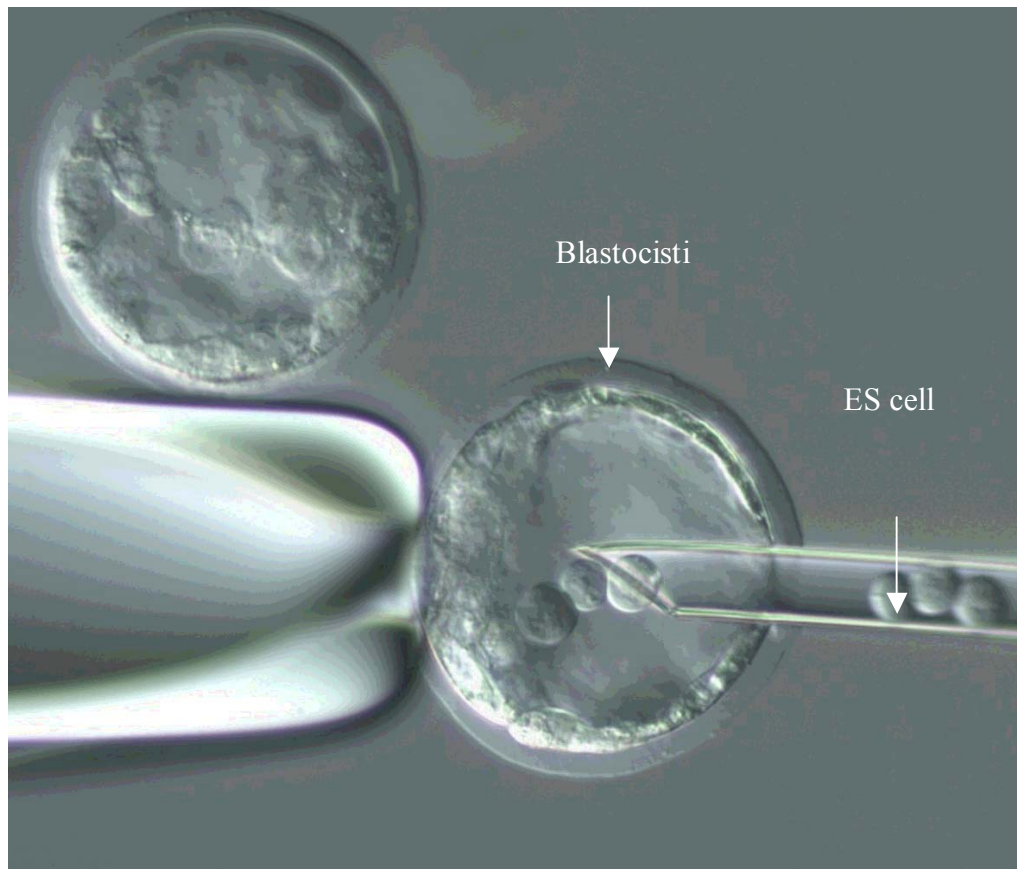


Diagramma 1: Schema degli esperimenti e della caratterizzazione del fenotipo dei diversi mutanti testati a differenti stadi di sviluppo.

CAPITOLO 5

Materiali e Metodi



Iniezione in blastocisti.

5.1 Preparazione delle linee di topi.

La generazione delle linee di topi transgenici e dei mutanti è avvenuta rispettando le regole di un protocollo rivisitato e approvato dall'Institutional Animal Care del Baylor College of Medicine in accordo all'utilizzo di protocolli internazionali per l'utilizzo degli animali di laboratorio.

Le linee mutanti utilizzate sono le seguenti:

Tbx1^{+/*lacZ*} (Lindsay et al., 2001), *Tbx1*^{*lox*}, *Tbx1*^{*AE5*}, *Tbx1*^{*mcm/+*} (Xu et al., 2005; Xu et al., 2004), *Rosa26R* (Soriano, 1999), *TgCagg-CreER*^{*TM*} (Hayashi et al., 2002) e *TgFgf15Cre* (Zhang et al., 2005). In un paragrafo successivo verranno illustrate più in dettaglio le strategie utilizzate per ottenere le seguenti linee.

Tutte le linee sono state incrociate per almeno due generazioni nello stesso background genetico C57Bl6 ed i topi sono stati genotipati mediante PCR. I primer utilizzati per i seguenti genotipi sono:

Tbx1^{*lacZ*}: *Tbx1*WT-F (5'-agtctggggactctggaagg-3')
*Tbx1*WT-R (5'-aagcagatcctgctacacc-3')
Tbx1 Tar2R (5'-tcgactagagcttgcggaac-3')

Tbx1^{*lox*}: *Tbx1* flox-F (5'-cgacccttctctggcttatg-3')
Tbx1 flox-R (5'-aaagactcctgccctttcc-3')

Tbx1^{*AE5*}: *Tbx1*E5-F (5'-ggccctgcctaactcagatt-3')
*Tbx1*E5-R (5'-aaagactcctgccctttcc-3')

Tbx1^{mcm}: Tbx1-mcm-F (5'-gctccacttcagcacattcc-3')
Tbx1-mcm-R (5'-cataagccagagaagggtcg-3')

TgCagg-CreERTM: CaggCRE-F (5'-ctctagagcctctgctaacc-3')
CaggCRE-R (5'-cctggcgatccctgaacatgtcg-3')

TgFgf15Cre: CRE-F (5'-tgatgaggttcgcaagaacc-3')
CRE-R (5'-ccatgagtgaacgaacctgg-3')

I prodotti di PCR erano separati per elettroforesi su di un gel di agarosio 1,5%.

Per indurre la traslocazione nucleare della CRE inducibile nelle linee *Tbx1^{mcm/+}* e *TgCagg-CreERTM*, femmine gravide sono state iniettate con una dose di 75 mg/kg di peso corporeo di Tamoxifen (Sigma) allo stadio di E8.5 e gli embrioni raccolti dopo 48 ore allo stadio di E10.5.

Il tamoxifen era dissolto in etanolo assoluto alla concentrazione di 100 mg/ml e poi diluito 1:10 in olio di sesamo (Sigma) autoclavato per l'iniezione.

5.2 Colorazione con X-gal, istologia ed immunohistochimica

L'attività β -Galattosidasi e' stata determinata utilizzando il substrato X-gal su embrioni fissati con il 4% di paraformaldeide. Gli embrioni sono stati chiarificati, fissati e reidratati in una soluzione di etanolo: acqua: acido acetico: cloroformio (95:3:1:1) e poi trattati con una soluzione di metilsalicilato: benzyl benzoato (50:50) (Sigma).

Gli embrioni sono stati fotografati e successivamente inclusi in paraffina e tagliati ad un microtomo in sezioni di 10 μm .

Per visualizzare la colorazione con X-gal, le sezioni sono state controcolorate con Nuclear Fast Red.

Per valutare la proliferazione cellulare, femmine gravide sono state iniettate intraperitonealmente con 5 mg/100 g per peso corporeo di bromodeossiuridina (BrdU), sacrificate un'ora dopo l'iniezione con 5% di CO₂. Successivamente gli embrioni sono stati raccolti e fissati in 70% etanolo, inclusi in paraffina e tagliati ad un microtomo in sezioni di 7 μm .

L'incorporazione di BrdU è stata determinata usando un anticorpo monoclonale anti-BrdU (Novacastra, Clone no. 85-2C8).

Lo stato di apoptosi è stato valutato con LysoTracker Red-DND-99 (Molecular Probes). Gli embrioni sono stati incubati per 30 minuti a 37 C°, su un agitatore roteante a bassa velocità, in 5 μm LysoTracker Red in HBSS, seguito da tre lavaggi in HBSS e tre lavaggi di PBS 1x, ciascuno di 20 minuti. Successivamente sono stati fissati tutta la notte a 4 C° in agitazione in 4% di paraformaldeide/PBS. Dopo fissazione gli embrioni sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 10 μm . La colorazione con LysoTracker Red è stata visualizzata mediante microscopio a fluorescenza. L'immunoistochimica su sezioni in paraffina è stata effettuata seguendo i protocolli che accompagnavano gli anticorpi. Gli anticorpi utilizzati sono:

rabbit Anti-fosfo-Istone H3 (Ser10) (Upstate Biotechnology, 1:100)

mouse anti-Tubulina-beta III, clone TU-20 (Chemicon International, 1:200)

mouse anti-Islet1, clone 2D6 e mouse anti-neurofilament, clone 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:100)

rabbit anti-cleaved Notch1 (Val1744) (Cell Signaling Technology, 1:100).

5.3 Chimere

Le cellule staminali embrionali di topo $TBX1^{-/-}$ sono state generate introducendo su entrambi gli alleli il gene reporter LacZ.

Queste cellule sono state iniettate in blastocisti di un ceppo wild-type C57BL/6 e trasferite in femmine pseudogravide CD1. Gli embrioni chimerici sono stati raccolti a E9.5 e E10.5 colorati con X-gal prima di fissarli in 70% etanolo e successivamente inclusi in paraffina. Le sezioni tagliate al microtomo (10 μm) sono state controcolorate con Nuclear Fast Red.

5.4 Strategia per la generazione degli alleli *Tbx1^{lox}*, *Tbx1^{AE5}*, *Tbx1^{mcm}*, *Tbx1^{lacZ}*

Per generare l'allele *Tbx1^{lox}* sono stati inseriti due siti loxP che fiancheggiano l'esone 5 di *Tbx1* (essenziale per la funzione di *Tbx1* in quanto codifica parte del dominio T-box) ed una cassetta di selezione PGK-neo che è inserita nell'introne 5. Nessuna sequenza di DNA è stata eliminata dal gene endogeno con questo procedimento. L'allele generato prende il nome di *Tbx1^{neo}*. L'allele *Tbx1^{lox}* è stato generato mediante trasfezione con un vettore di espressione che contiene la ricombinasi CRE in cellule staminali embrionali *Tbx1^{neo/+}*. Queste cellule sono state iniettate nelle blastocisti di topi C57Bl6 ed i topi chimerici erano incrociati con topi C57Bl6 per ottenere la trasmissione a livello germinale dell'allele mutante.

L'enzima CRE induce la ricombinazione nell'allele *Tbx1^{lox}* che causa l'escissione dell'esone 5 e la generazione di un allele *Tbx1^{AE5}* (Figura 9 A-B).

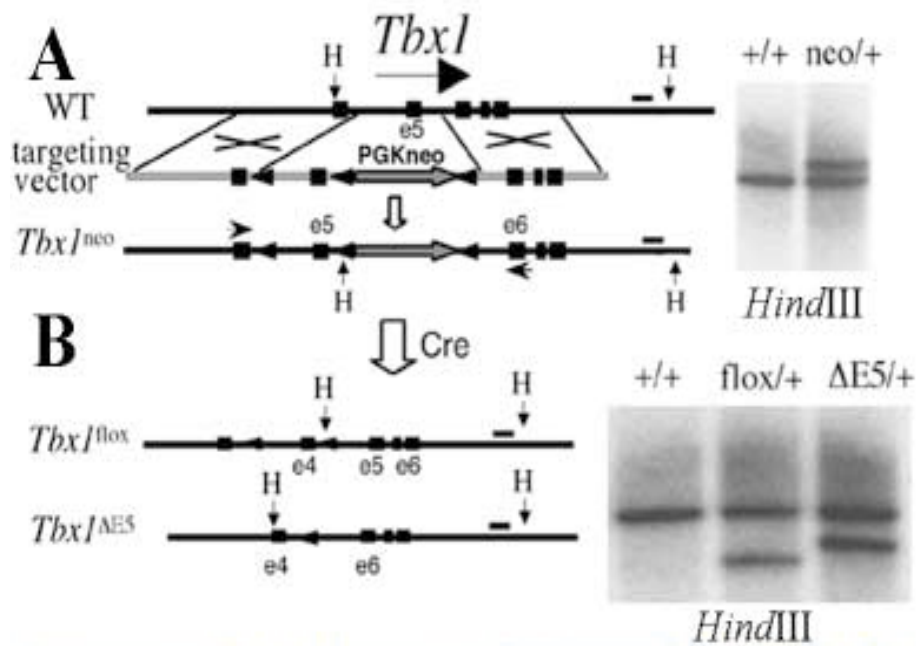


Figura 9 A-B. Strategia per la generazione degli alleli *Tbx1*^{lox} e *Tbx1*^{ΔE5}.

Per generare l'allele *Tbx1*^{mcm} abbiamo inserito nel sito *XcmI* dell'esone 5 di *Tbx1* una cassetta di espressione IRES-PGKneo. Questa cassetta include un cDNA che codifica per una CRE, inducibile da tamoxifen (MerCreMer) (Verou et al., 1999).

L'allele *Tbx1*^{mcm} ci consente di esprimere la CRE in tutti i tessuti embrionali in cui *Tbx1* è espresso, ma si attiverà solo sotto somministrazione di Tamoxifen a femmine gravide. Le cellule staminali embrionali contenente l'allele *Tbx1*^{mcm} sono state iniettate nelle blastocisti di topi C57Bl6 ed i topi chimerici sono stati incrociati con topi C57Bl6 per ottenere la trasmissione a livello germinale dell'allele mutante.

Per generare l'allele *Tbx1*^{lacZ} è stato inserito nel sito *XcmI* dell'esone 5 di *Tbx1* una cassetta di espressione IRES-lacZ-PGKneo. Questo costrutto è stato trasfettato in cellule staminali

embrionali di topo e le cellule positive sono state iniettate in blastocisti di un ceppo wild-type C57BL/6 e trasferite in femmine pseudogravide CD1. Successivamente i topi chimerici sono stati incrociati con topi wild-type per ottenere la trasmissione a livello germinale dell'allele $Tbx1^{lacZ}$ (Figura 9C-D).

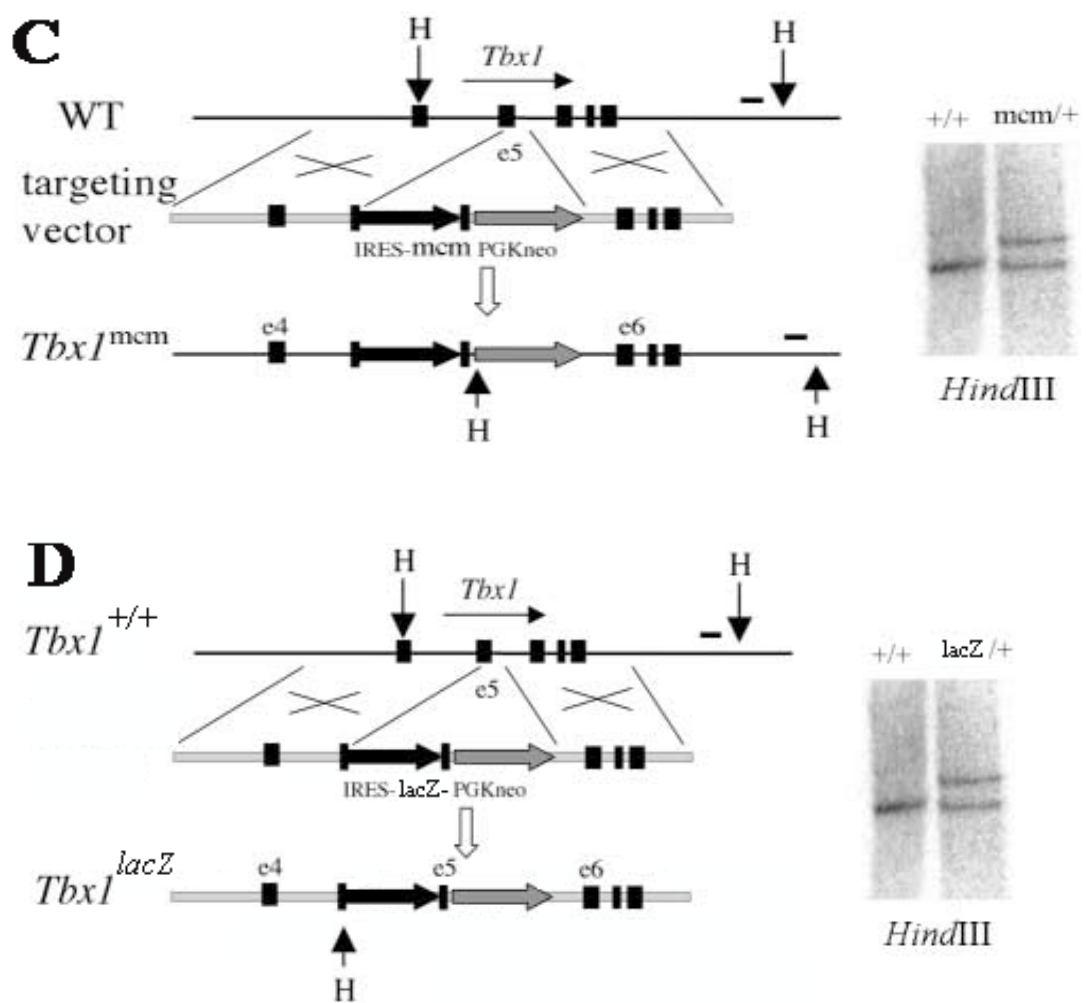


Figura 9 C-D. Strategia per la generazione degli alleli $Tbx1^{mcm}$ e $Tbx1^{lacZ}$.

5.5 Preparazione della linea transgenica *TgCAGG-CreERTM*.

La linea transgenica *TgCAGG-CreERTM* rappresenta un utile strumento per l'inattivazione o l'attivazione condizionale di geni nel topo (Hayashi and McMahon, 2002). Nel mio lavoro di tesi questa linea è stata utilizzata per effettuare una delezione condizionale del gene *Tbx1* in tempi controllati. Per generare questa linea è stato ingegnerizzato un gene di fusione tra Cre ed una forma mutante del dominio di legame con il recettore degli estrogeni ERTM. Questa mutazione non permette il legame del recettore al suo ligando naturale (17-Estradiolo) ma rende questo dominio responsivo al Tamoxifen (Sohal *et al.*, 2001). Quando Cre è fusa all'ERTM, questo complesso viene sequestrato da uno chaperon Hsp90 nel citoplasma bloccandone l'evento di ricombinazione nel nucleo. In seguito a somministrazione con Tamoxifen si ha la distruzione del legame tra Cre-ERTM e Hsp90 per cui CRE-ERTM è libero di entrare nel nucleo e fare la ricombinazione. Il costrutto che contiene CRE-ERTM è stato clonato in un vettore pCAGGS per generare il costrutto pCAGGCre-ERTM (Fig.9E). Successivamente la sequenza CAGGCre-ERTM, dopo escissione dal plasmide ed opportuna purificazione, è stata iniettata nel pronucleo di blastocisti per la generazione della linea transgenica. I potenziali fondatori sono stati identificati mediante PCR e confermati per Southern Blot. I topi *TgCAGG-CreERTM* sono stati incrociati con topi *Tbx1^{lacZ/+}* ed i maschi *TgCAGG-CreERTM*; *Tbx1^{lacZ/+}* sono stati incrociati con femmine *Tbx1^{fllox/fllox}*. Alle femmine gravide è stato iniettato Tamoxifen allo stadio di E8.5 e gli embrioni sono stati raccolti a

E10.5 ed utilizzati per tutti gli esperimenti successivamente riportati.

E

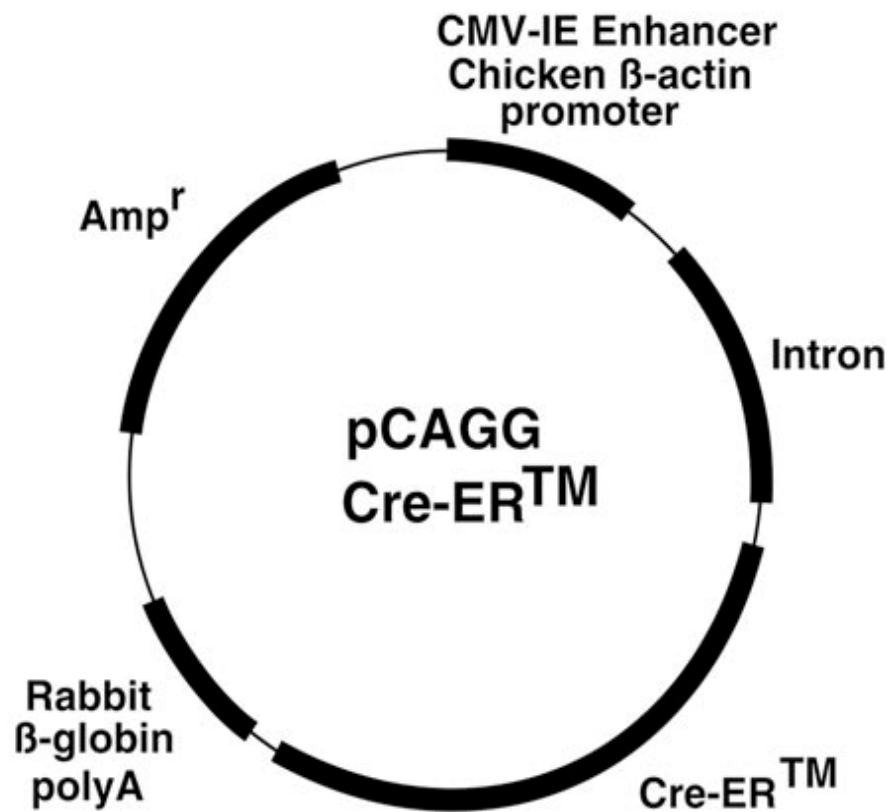


Figura 9E. Vettore di clonaggio che contiene la sequenza Cre-ERTM.

5.6 Preparazione della linea transgenica *TgFgf15Cre*.

La linea transgenica *TgFgf15Cre* (Zhang et al, 2005) è stata utilizzata per indurre una delezione condizionale del gene *Tbx1* in determinati tessuti. In particolare questa linea transgenica induce ricombinazione nell'ectoderma, endoderma degli archi faringei e nell'epitelio otico ma non nel mesoderma, compreso il mesenchima intorno all'orecchio.

Nel mio lavoro di tesi, l'utilizzo di questa linea è stato fondamentale perché mi ha aiutato a capire quale dei due tessuti (epitelio o mesenchima) in cui *Tbx1* è espresso è veramente essenziale per la morfogenesi dell'orecchio interno.

Zhang et al., hanno generato una linea transgenica stabile *Fgf15-Cre* dove è stato clonato un frammento enhancer di 4 kb a monte dal sito di inizio della trascrizione del gene *Fgf15* che contiene potenziali elementi regolatori tessuto-specifici. Questo frammento in combinazione con il promotore endogeno di *Fgf15* e *LacZ* reporter sono in grado di guidare in modo specifico l'espressione nell'ectoderma ed endoderma faringeo. Il frammento enhancer ed il promotore endogeno di *Fgf15* in combinazione con la Cre sono stati utilizzati per generare questa nuova linea transgenica (Figura 9F).

F



Figura 9F. Costrutto per la generazione della linea transgenica stabile *TgFgf15Cre*.

5.7 Ibridazione *in situ*

Gli embrioni sono stati raccolti tra E9 ed E13.5, fissati tutta la notte a 4 C° in agitazione in 4% di paraformaldeide/PBS, deidratati in etanolo, inclusi in paraffina e tagliati ad un microtomo in sezioni di 10 µm. Tutte le soluzioni sono state preparate in H₂O DEPC (Albrecht *et al.*, 1997).

L'ibridazione *in situ* su RNA (Wilkinson *et al.*, 1992) è stata eseguita deparaffinando le sezioni in HistoClear, reidratandole e successivamente al trattamento con proteinase K, sono state disidratate ed incubate con una soluzione di ibridazione contenente la sonda antisenso e senso. La sonda antisenso e senso sono state preparate mediante retrotrascrizione *in vitro* del DNA (Stratagene kit) e marcate attraverso incorporazione di S³⁵-UTP (Amersham). Le sonde utilizzate in questi studi includono: *Bmp4* (Col *et al.*, 2000), *Gsc* (ottenuto dal Dr. Perez), *Pax2* (ottenuto dal Dr. Dressler), *Prx2* (ottenuto dal Dott. Bergie), *Fgf8* (ottenuto dal Dott. Martin), *Fgf10* (ottenuto da Dr. Done), *Ngf1* (ottenuto dal Dr. Simeone), *Dlx5* (Depew *et al.*, 1999) e *Wntb* (ottenuto dal Dr. Choo).

CAPITOLO 6

Risultati



Espressione di *Tbx1*.

6.1 L'espressione di *Tbx1* è regolata durante lo sviluppo e la morfogenesi dell'orecchio interno.

Il pattern di espressione di *Tbx1* nello sviluppo è stato molto studiato utilizzando tecniche di ibridazione RNA *in situ* ed un allele knock-in *Tbx1-LacZ* (Vitelli *et al.*, 2003).

L'allele knock-in *Tbx1-LacZ*, che ricapitola l'espressione del gene endogeno *Tbx1*, (Fig. 10A-E e 2G-R) è stato utilizzato per seguire lo sviluppo e l'espressione di *Tbx1* durante il periodo di intensa morfogenesi dell'orecchio interno che avviene tra lo stadio embrionale di E9 ed E13.5. L'espressione di *Tbx1* comincia ad evidenziarsi nell'epitelio otico di embrioni di stadio E9 divenendo più esteso fino ad E10.5. In particolare, queste cellule sono presenti nella regione latero-ventrale dell'otocisti. Questo pattern è mantenuto esteso a E9.5 (Fig.10A). A E10.5 *Tbx1* è ampiamente espresso nell'epitelio otico (Fig. 10B e 11A-R) ma non è presente nelle regioni dorsali e mediali compreso il dotto endolinfatico. Inoltre, *Tbx1* è presente nella regione mesenchimale intorno all'epitelio otico in embrioni di E10.5 dove il dominio di espressione è molto vicino al secondo arco aortico (Fig. 10C). Negli embrioni di E11.5 l'otocisti va incontro ad un drastico evento morfogenetico in cui cominciano a formarsi le strutture tipiche di un orecchio interno maturo come l'apparato vestibolare ed acustico fino ad arrivare ad embrioni di E12.5 e E13.5 dove abbiamo l'apparato vestibolare completo di coclea e canali semicircolari (anteriore, posteriore, laterale) evidenziati dall'allele knock-in *Tbx1-LacZ* (Fig.10 D-E).

Lo sviluppo dell'orecchio interno di topi *Tbx1*^{-/-} sembra essere normale ad E9 ma ad E9.5, l'otocisti è più piccola rispetto agli

embrioni controllo (Fig. 10 A'-B') ed il ganglio cocleo-vestibolare non assume una posizione normale (Fig. 12A'-F'). Tra E10.5 e 11.5, l'otocisti del mutante *Tbx1*^{-/-} si espande minimamente mentre il dotto endolinfatico cresce normalmente. Tra E12.0 e E13.5, periodo di intensa morfogenesi dell'orecchio, l'otocisti del mutante *Tbx1*^{-/-} resta piccola (Fig. 10 D'). L'anormale morfologia dell'orecchio dei mutanti era confermata dall'analisi di sezioni istologiche di embrioni colorati mediante X-gal dove non sono presenti nell'otocisti cellule blu dopo lo stadio di E9 (Fig.10 A'-B'-D') a differenza degli embrioni normali.

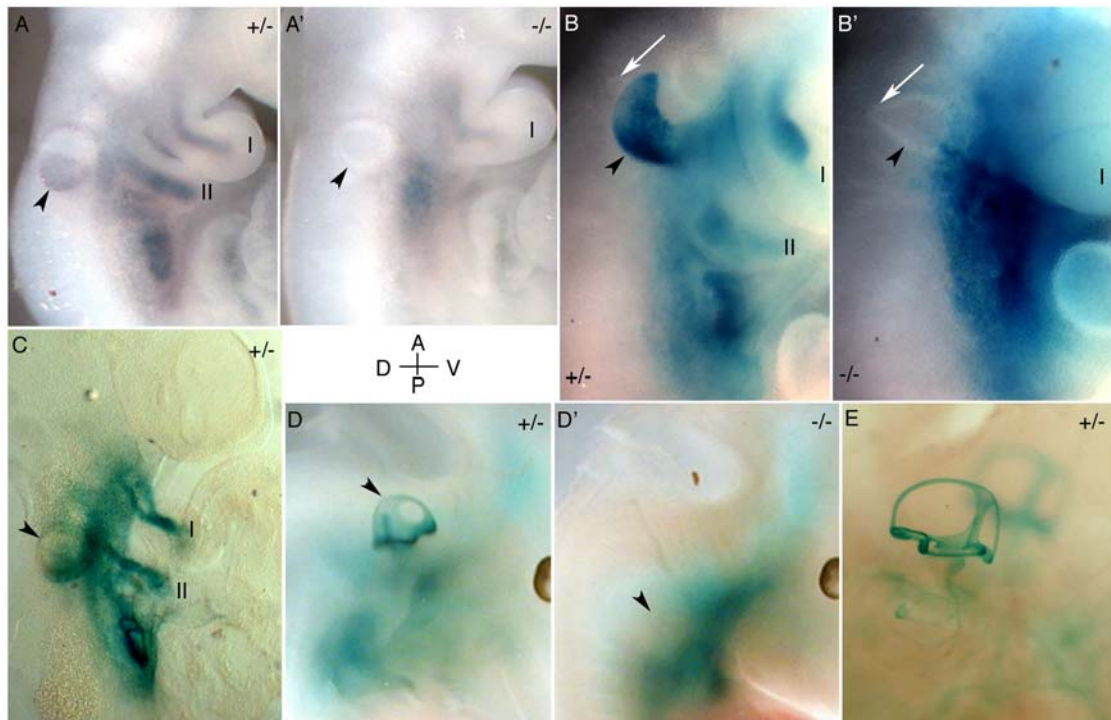


Figura 10. Sezione sagittali colorate con X-Gal di embrioni *Tbx1*^{+/-} (A-E) e *Tbx1*^{-/-} (A', B', D') a E9.5 (A, A'), E10.5 (B, B', C), E12.5 (D, D') e E13.5 (E). (A) *Tbx1* è espresso nella regione latero-ventrale dell'otocisti a E9.5 (B). A E10.5, *Tbx1* è espresso nella regione latero-ventrale dell'otocisti ma non nel dotto endolinfatico. (C) *Tbx1* è espresso nella regione mesenchimale che circonda l'otocisti ed è continua con l'espressione del mesenchima del secondo arco faringeo (II). (D) a E12.5, l'espressione di *Tbx1* delinea lo sviluppo dei canali semicircolari e a E13.5 (E), la coclea. In embrioni *Tbx1*^{-/-}, l'otocisti si forma (A') ma è più piccola degli embrioni *Tbx1*^{+/-} (10B-10B') e non da' origine a morfogenesi. In C e D la freccia indica l'otocisti.

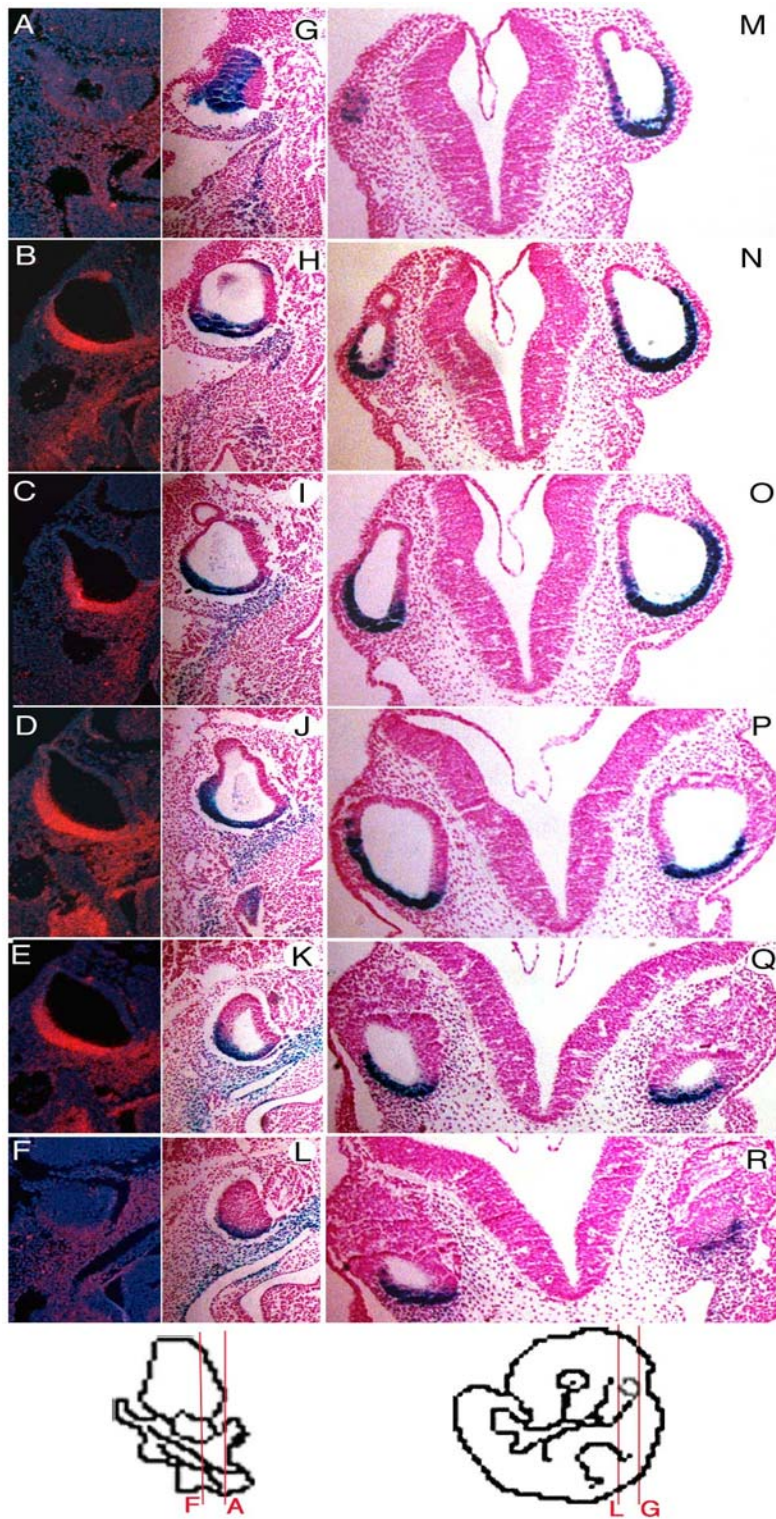


Figura 11. Sezioni sagittali (A-F e G-L) e sezioni coronali (M-R) dell'otocisti da RNA ibridazione *in situ* di embrioni normali a E10.5 $Tbx1^{+/+}$ oppure di embrioni eterozigoti $Tbx1^{+/-}$ a E10.5 colorati con X-gal.

6.2 *Tbx1* è richiesto per la morfogenesi dell'otocisti.

A questo punto abbiamo analizzato la natura molecolare della mancata morfogenesi dell'orecchio interno dei mutanti a livello dell'otocisti.

Abbiamo analizzato una serie di markers molecolari che identificano vari compartimenti dell'otocisti come i canali semicircolari, la coclea, il ganglio cocleo-vestibolare (CVG) ed il mesenchima intorno all'otocisti. Un primo marker ad essere analizzato è stato *Fgf10*, che è un marker della regione epiteliale dell'apparato vestibolare. *Fgf10* (Pauley *et al.*, 2003) ha un dominio di espressione nella regione laterale dell'otocisti, nell'epitelio alla base dell'otocisti e nel ganglio. Nei mutanti *Tbx1*^{-/-}, *Fgf10* non è presente nella regione laterale ma il suo dominio di espressione è preservato nel ganglio e nell'epitelio (Fig. 12A-A'). *Bmp4* (Liu *et al.*, 2003) è un marker dell'apparato vestibolare e della coclea. Presenta due domini di espressione: un dominio di espressione nella regione antero-laterale dell'otocisti (da cui si sviluppano le cristae laterali ed anteriori) ed uno più posteriore (da cui si sviluppano la macula e la coclea) (Fig. 12B-C). Nei mutanti *Tbx1*^{-/-}, *Bmp4* (Winnier *et al.*, 1995) perde entrambi i domini (Fig. 12B'-C'). *Gsc* come *Bmp4* è un marker della macula e della coclea ed anche esso è assente nell'omozigote (Fig. 12D-D'). *Pax2* è un marker della coclea e del dotto endolinfatico, mentre il dominio più posteriore manca nell'omozigote il dominio più mediale è preservato. Ciò è in accordo con il fatto che il dotto endolinfatico nel mutante si sviluppa normalmente (Fig. 12E-E').

Il ganglio cocleo-vestibolare, che è vicino all'VIII nervo craniale, ha origine da precursori neuronali che delaminano dall'epitelio otico a partire da E9.5 e solo dopo si differenzia in ganglio acustico e ganglio vestibolare. Un altro marker del ganglio è *Fgf8* (Vitelli *et al.*, 2002b) che come *Fgf10* è conservato nell'omozigote (12F-F') ma evidenzia una posizione anomala del ganglio che occupa una posizione più posteriore e ventrale rispetto alla posizione anteriore occupata negli embrioni normali. Ciò suggerisce che l'epitelio otico da cui si originano i precursori neuronali è responsabile del non corretto posizionamento del ganglio.

Le interazioni tra la regione epiteliale e quella mesenchimale rivestono un ruolo chiave nei segnali che sono mandati all'otocisti per avviare il processo di differenziamento ed essendo *Tbx1* presente in entrambi, è possibile che *Tbx1* sia richiesto nell'epitelio e nel mesenchima per la morfogenesi dell'orecchio interno. *Prx2* (Berge *et al.*, 1998), un marker della regione mesenchimale intorno all'otocisti, era ridotto nella regione laterale del mesenchima intorno all'otocisti dei mutanti *Tbx1*^{-/-} ma normale nel resto dell'embrione (12G-G').

Da quest'analisi si evince che tutti questi markers la cui espressione si sovrappone completamente o parzialmente con il dominio di espressione di *Tbx1* è ridotta o assente nei mutanti. Sebbene è possibile che tutti questi geni sono regolati da *Tbx1*, è più probabile che ci sia una mancanza di una popolazione di cellule dell'epitelio otico nei mutanti di *Tbx1*. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che l'espressione di tutti questi markers è normale nel resto degli embrioni mutanti (Fig. 10A'-B'-D').

Questo risultato potrebbe essere dovuto ad una riduzione della proliferazione cellulare o ad un aumento dell'apoptosi.

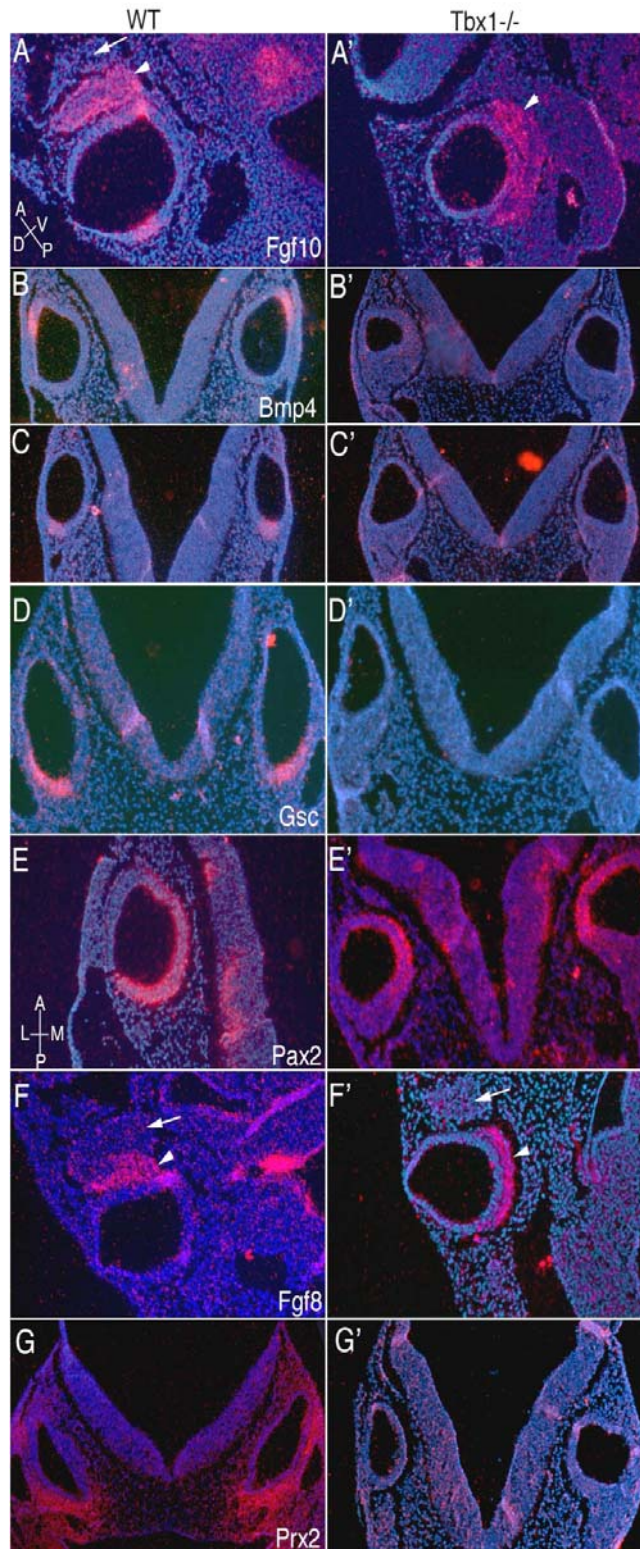


Figura 12. Espressione dei markers molecolari in embrioni normali (A-F) e *Tbx1*^{-/-} (A'-F') a E10.5 (A-D, F, G e A'-D', F', G') e E9.5 (E, E').

(A, A') L' espressione di *Fgf10* nella regione laterale dell'epitelio dell'otocisti manca negli omozigoti *Tbx1*^{-/-} ma è conservato nel ganglio cocleo-vestibolare ed alla base dell'epitelio otico. Il ganglio cocleo-vestibolare ha una posizione anormale negli embrioni *Tbx1*^{-/-} (A'-E').

(B, C, B', C') Entrambi i domini di espressione di *Bmp4* non sono presenti in *Tbx1*^{-/-}.

(D, D') L'espressione di *Gsc* è assente in embrioni *Tbx1*^{-/-}.

(E, E') L'espressione di *Pax2* è parzialmente conservata in embrioni *Tbx1*^{-/-}.

6.3 La ridotta proliferazione e l'aumento dell'apoptosi non giustifica il fenotipo dell'orecchio interno dei mutanti *Tbx1*^{-/-}.

L'allele knock-in *Tbx1*-LacZ è particolarmente utile per correlare fenotipo e l'espressione del gene, poiché esso visualizza cellule con un gene *Tbx1* trascrizionalmente attivo in assenza di un prodotto genico funzionale. Questo allele rivelava che una piccola popolazione di cellule epiteliali positive per LacZ è presente nella regione posteriore dell'otocisti di animali omozigoti *Tbx1*^{-/-} a E9 (13A-A') ma a E9.5 queste cellule non sono più presenti.

A questo punto abbiamo esaminato la proliferazione cellulare in embrioni E9.5 mediante incorporazione di BrdU. A questo stadio abbiamo trovato che circa il 50% delle cellule epiteliali erano in proliferazione ma non c'era differenza tra embrioni *Tbx1*^{+/-} ed embrioni *Tbx1*^{-/-} (13C-C'). Successivamente abbiamo testato l'apoptosi usando colorazione con LysoTracker tra embrioni a E9, E9.5 e E10.5. L'apoptosi è trovata normalmente nella regione ventrale-mediale dell'otocisti e nel dotto endolinfatico. Complessivamente, non abbiamo trovato differenze tra embrioni *Tbx1*^{+/-} ed embrioni *Tbx1*^{-/-} a E9 ed E9.5. A E10.5 il dominio relativo al dotto endolinfatico è identico tra embrioni *Tbx1*^{+/-} ed embrioni *Tbx1*^{-/-} (13D-D') mentre il dominio ventrale-mediale è più diffuso nell'otocisti dei mutanti *Tbx1*^{-/-} (13E-E'). Questo evento apoptotico potrebbe essere un evento secondario in un'otocisti già compromessa.

6.4 Le cellule *Tbx1*^{-/-} non popolano l'otocisti in embrioni chimerici.

A tal fine sono state generate cellule embrionali staminali che hanno su entrambi gli alleli *Tbx1* un reporter LacZ (Figura 13 F). Queste cellule sono state iniettate in blastocisti e gli embrioni chimerici raccolti a E9.5 e E10.5 e colorati con X-gal. Le cellule ES esprimono il reporter LacZ quando *Tbx1* è attivato. In questi embrioni si osserva che le cellule *Tbx1*^{-/-} non sono in grado di popolare l'otocisti (Figura 13G-13H) ma esse sono presenti in altri tessuti che normalmente esprimono *Tbx1*.

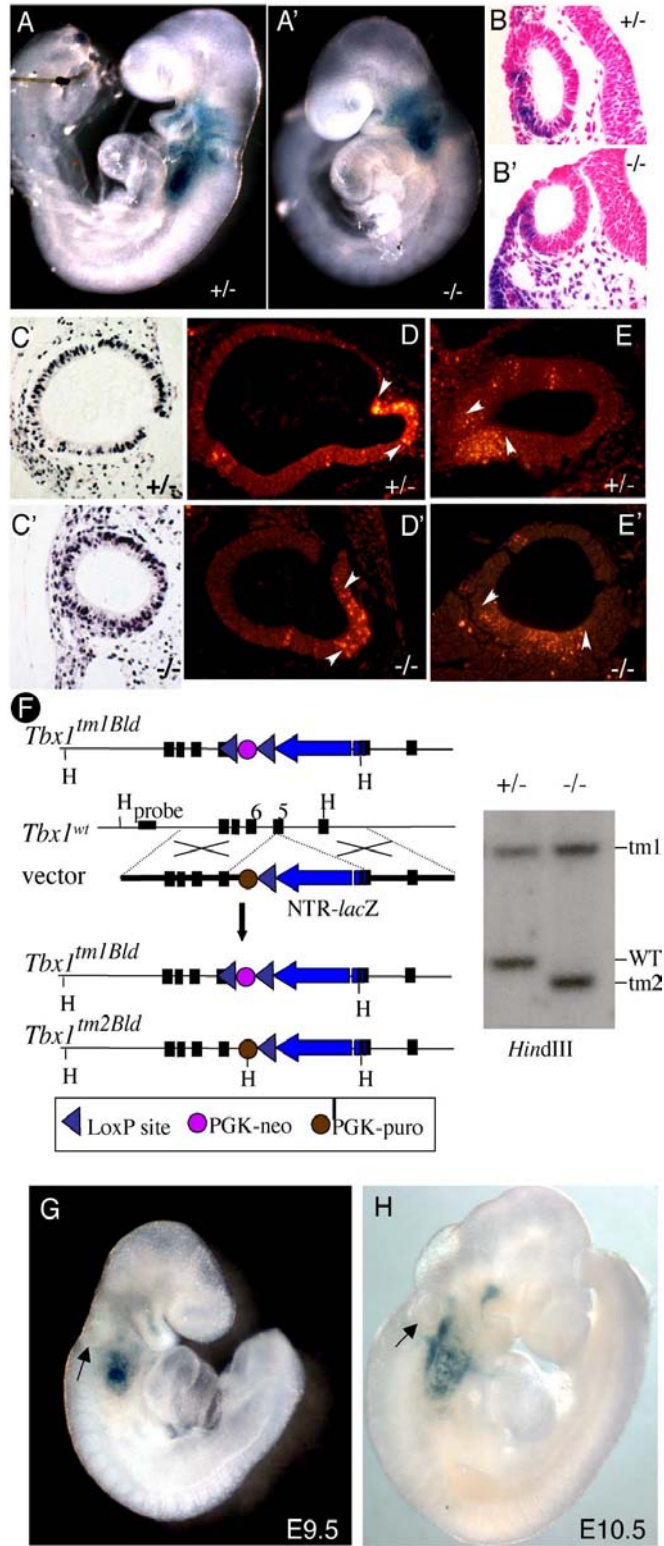


Figura 13. La colorazione con X-gal di embrioni interi a E9 rileva la presenza di cellule epiteliali LacZ positive nelle otocisti di embrioni *Tbx1*^{+/-} (A) e nei mutanti *Tbx1*^{-/-} (A'). Le sezioni degli stessi embrioni (B, B') mostra che le cellule LacZ-positive sono localizzate nella regione latero-posteriore dell'otocisti. (C, C') Colorazione con anti-BrdU per valutare la proliferazione cellulare nell'epitelio otico di embrioni *Tbx1*^{+/-} e *Tbx1*^{-/-} a E9.5. (D, D') LysoTracker identifica cellule in apoptosi nel dotto endolinfatico e nella regione ventrale dell'epitelio otico (E, E') di *Tbx1*^{+/-} e *Tbx1*^{-/-} a E10.5. (F) Strategia per la generazione di cellule staminali embrionali *Tbx1*^{-/-} che portano su entrambi gli alleli il gene reporter LacZ. Gli embrioni chimerici a E9.5 (G) e E10.5 (H) mostrano che le cellule blu *Tbx1*^{-/-} non sono in grado di popolare l'otocisti ma sono presenti in altre regioni dove *Tbx1* è normalmente espresso.

6.5 *Tbx1* fornisce un contributo cellulare all'otocisti.

L'allele knock-in *Tbx1*-LacZ ricapitola l'espressione del gene ma non è in grado di dare informazioni su quale sia "in vivo" il destino delle cellule che esprimono *Tbx1*.

A tal fine abbiamo generato un allele in cui *Tbx1* è fuso ad una Cre inducibile da tamoxifen e, come per LacZ, la sua espressione è guidata da elementi regolatori endogeni di *Tbx1*. Per questi esperimenti abbiamo utilizzato una Cre che ha due domini di ligando a due recettori mutagenizzati degli estrogeni (MerCreMer). L'allele *Tbx1^{mcm}* ci consente di esprimere Cre in tutti i tessuti embrionali in cui *Tbx1* è espresso in seguito ad attivazione mediante tamoxifen somministrato alle femmine incinte. L'altro allele utilizzato per questi esperimenti è *R26R* che ha una Cre reporter. Se incrociamo topi *Tbx1^{mcm/+}; R26R* con topi *Tbx1^{ΔE5/+}* (l'allele *Tbx1^{ΔE5}* non è funzionale) ed iniettiamo tamoxifen a femmine incinte a E8.5, avremo che, negli embrioni raccolti ad E10.5, le cellule che esprimono Cre (quindi *Tbx1* positive) saranno blu in seguito a colorazione con X-gal. Gli embrioni *Tbx1^{mcm/+}; R26R* hanno un considerevole numero di cellule blu nell'epitelio dell'otocisti (Figura 14A-C) a differenza degli embrioni *Tbx1^{mcm/ΔE5}; R26R* che hanno poche cellule blu nell'epitelio dell'otocisti (Figura 14B-D). Questi esperimenti ricapitolano gli esperimenti ottenuti dall'utilizzo dell'allele knock-in *Tbx1*-LacZ perciò *Tbx1* regola in modo positivo il contributo di cellule all'otocisti e l'assenza del gene determina una ridotta otocisti nei mutanti e la negatività dei markers molecolari che normalmente si sovrappongono con la popolazione di cellule che esprimono *Tbx1*.

Tbx1^{mcm/+}; R26R
TM: E8.5

Tbx1^{mcm/ Δ E5}; R26R
TM: E8.5

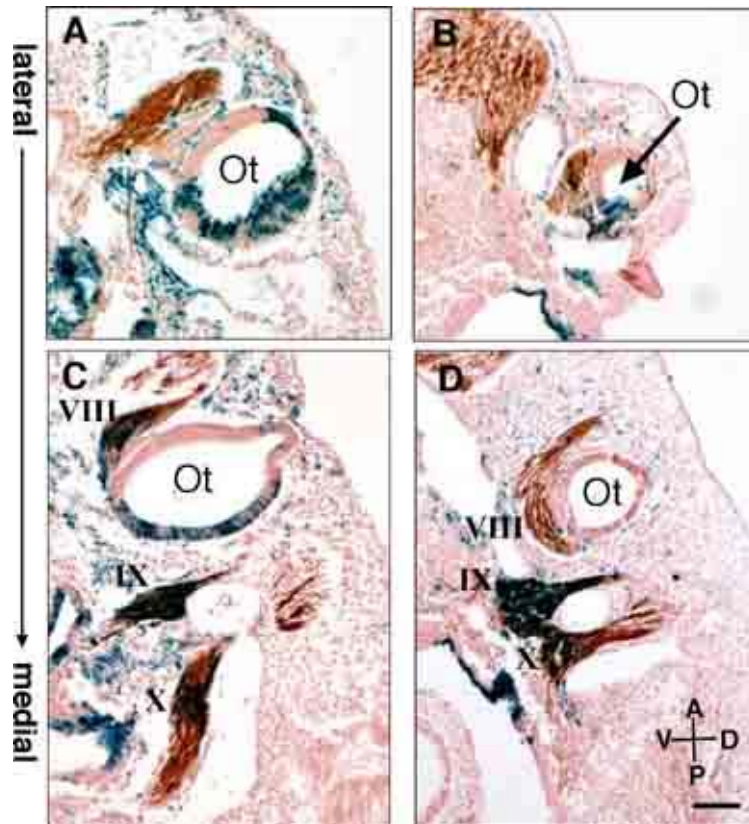


Figura 14. Sezioni sagittali di embrioni ad E10.5 dove le cellule blu esprimono *Tbx1*. (A-C) Numerose sono le cellule blu che esprimono *Tbx1* nell'epitelio dell'otocisti rispetto ai mutanti (B-D). In marrone sono evidenziati i neuroni differenziati grazie alla colorazione con un anticorpo anti-tubulina-beta III. Inoltre molte cellule che esprimono *Tbx1* sono presenti nel IX e X ganglio dell'eterozigote e meno nell'VIII. La stessa differenza si osserva nell'omozigote.

6.6 L'eliminazione di *Tbx1* dopo E8.5 è sufficiente a bloccare la morfogenesi dell'orecchio interno.

Per stabilire il ruolo di *Tbx1* nell'otocisti non possiamo utilizzare embrioni mutanti *Tbx1*^{-/-} visto che l'assenza del gene riduce drasticamente il contributo di cellule all'otocisti. A questo punto abbiamo eliminato il gene a E8.5 poiché *Tbx1* comincia ad essere espresso a E7.5 nell'otocisti, utilizzando una linea transgenica *TgCAGG-CreER*TM che contiene una Cre, ubiquitariamente espressa, inducibile da tamoxifen. Abbiamo incrociato maschi *TgCAGG-CreER*TM; *Tbx1*^{+/*lacZ*} con femmine *Tbx1*^{*fllox/fllox*} ed iniettato una dose di tamoxifen ad E8.5 in femmine incinte; successivamente gli embrioni sono stati raccolti ad E10.5 e colorati con X-gal. Negli embrioni *Tbx1*^{*fllox/lacZ*} vi sono cellule blu nella regione caudale dell'otocisti (Fig. 15A) a differenza degli embrioni *Tbx1*^{*ΔE5/lacZ*} (Fig. 15C). Nella maggior parte dei mutanti condizionali *TgCAGG-CreER*TM; *Tbx1*^{*fllox/lacZ*} (Fig. 15B) vi è un ridotto numero di cellule blu rispetto ai controlli eterozigoti *Tbx1*^{*fllox/lacZ*}. In embrioni a E12.5 cominciano a formarsi le strutture tipiche di un orecchio interno maturo come l'apparato vestibolare e cocleare. In embrioni *Tbx1*^{*fllox/LacZ*}, l'espressione di LacZ evidenzia queste strutture (Fig. 15D) mentre in embrioni mutanti *Tbx1*^{*fllox/LacZ*} l'assenza del gene non induce la formazione di queste strutture (Fig. 15F). Nei mutanti condizionali *TgCAGG-CreER*TM; *Tbx1*^{*fllox/lacZ*} pur essendoci numerose cellule blu nell'orecchio interno, queste strutture non si formano a causa di anomalie nei processi di morfogenesi (Fig. 15E). Sembra che l'assenza di *Tbx1* riduce il contributo di cellule all'otocisti e

blocca gli eventi morfogenetici che conducono alla formazione di un'orecchio normale.

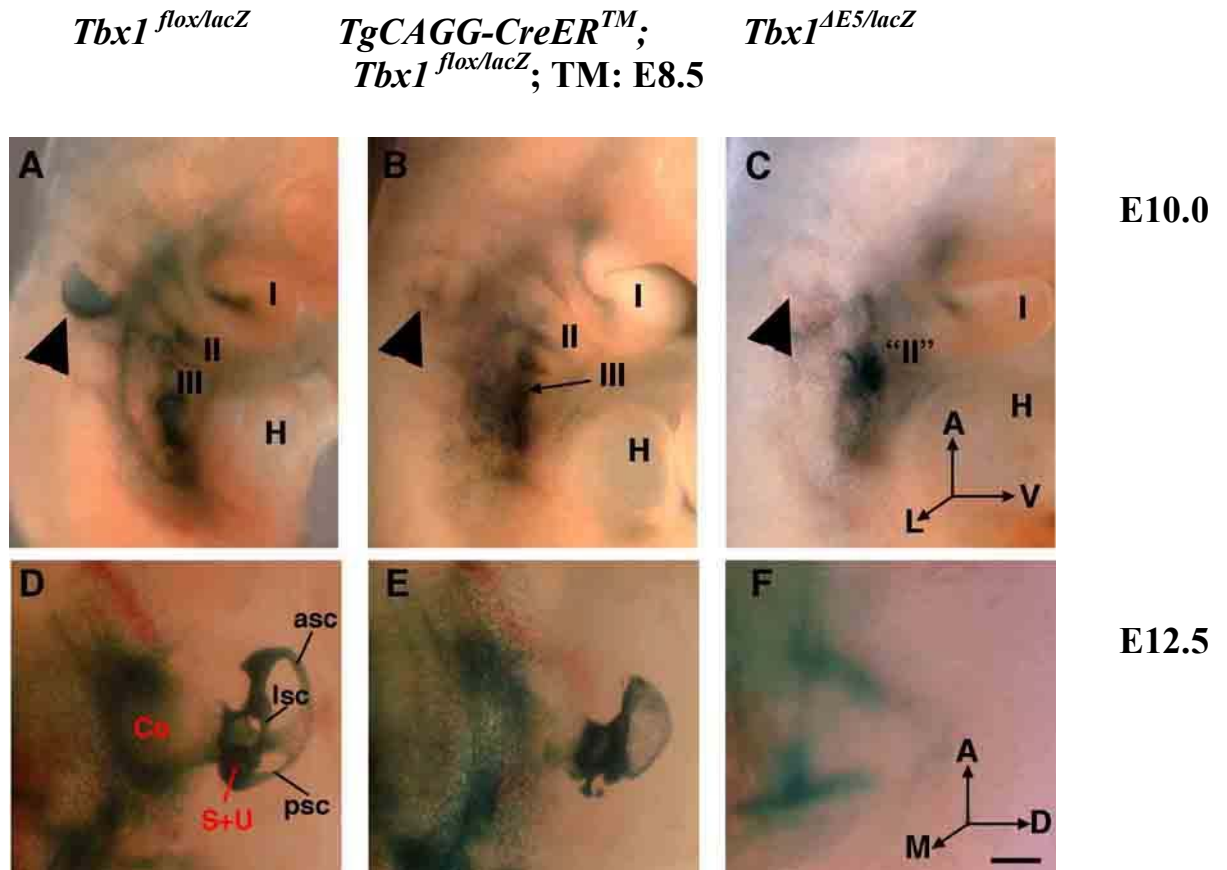


Figura 15. Embrioni a E10.0 colorati con X-gal (A-C). La freccia indica l'otocisti. In B si osserva la riduzione di cellule blu che esprimono *Tbx1* ed in C l'assenza delle stesse. I, II, III indicano rispettivamente il primo, il secondo ed il terzo arco faringeo.

Embrioni a E12.5 colorati con X-gal (D-F). Negli embrioni *Tbx1*^{flox/lacZ} (D), l'attività della β-gal evidenzia i primordi dell'orecchio interno, che sono anormali nel mutante condizionale (E) e mancano nel mutante omozigote (F).

6.7 *Tbx1* regola la proliferazione cellulare nell'epitelio otico in modo indipendente.

Per stabilire se *Tbx1* è richiesto per la proliferazione cellulare dopo che le cellule hanno popolato l'otocisti, noi abbiamo testato i mutanti condizionali in cui, prima che il gene sia eliminato, le cellule vanno a popolare l'otocisti. Le cellule in mitosi sono state marcate con un anticorpo anti fosfo-H3 e, successivamente, abbiamo calcolato l'indice mitotico. Noi abbiamo trovato che complessivamente non c'è una significativa differenza nella proliferazione cellulare tra embrioni controllo e mutanti condizionali. Quando andiamo a valutare la proliferazione nella popolazione cellulare che esprime solo *Tbx1* si osserva una riduzione della proliferazione del 40% dopo eliminazione di *Tbx1* (Fig. 16A-C).

Ciò dimostra che *Tbx1* regola in modo autonomo la proliferazione di cellule nell'epitelio otico.

Tbx1^{flox/lacZ} (controllo)
TM:E8.5

*TgCAGG-CreER*TM; *Tbx1*^{flox/lacZ}
(test) TM:E8.5

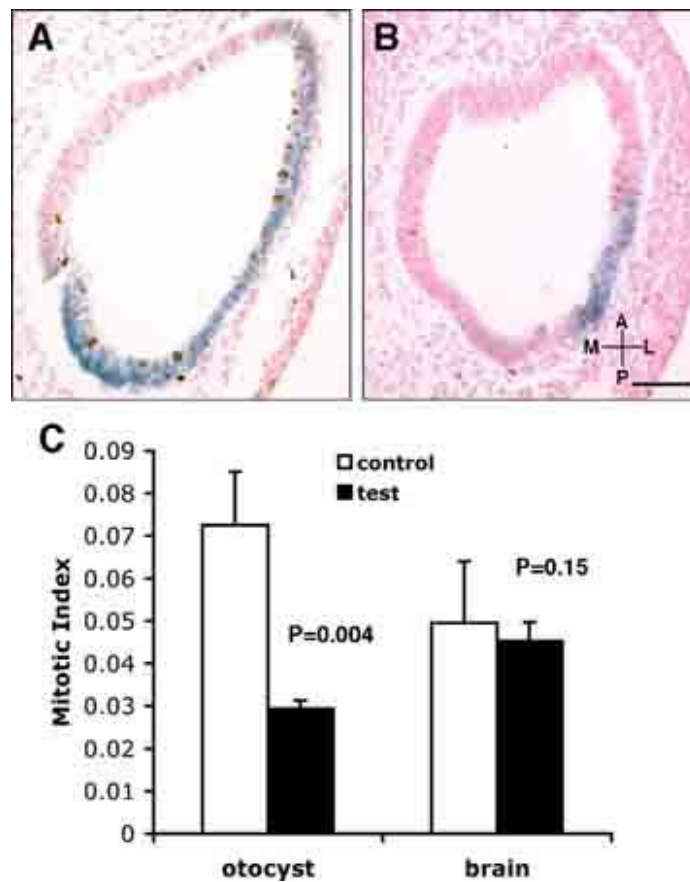


Figura 16. Sezioni coronali di embrioni ad E10.5 colorati con X-gal e processati per immunohistochimica con un anticorpo anti fosfo-H3 per identificare le cellule in mitosi (marroni) (A-B). In C è stato valutato con il test di student l'attività mitotica. L'indice mitotico è stato calcolato come la percentuale di cellule doppio-positive (β -gal e fosfo-H3) verso tutte le cellule blu nell'otocisti. Il cervello è usato come tessuto di controllo perché *Tbx1* non è espresso in questo tessuto.

6.8 *Tbx1* è un soppressore del fato neurale nell'epitelio otico.

Dati precedenti hanno dimostrato che *Tbx1* svolge un ruolo di soppressore del fato neurale in cellule presenti nell'epitelio otico. A questo punto, abbiamo effettuato un'immunoistochimica su sezioni di embrioni ad E10.5 *Tbx1^{mcm/+}*; *R26R* e *Tbx1^{mcm/ΔE5}*; *R26R* esposti al tamoxifen ad E8.5 e colorati con X-gal. Abbiamo osservato la presenza di molte cellule che esprimono *Tbx1* nel IX e nel X ganglio ma non nell'VIII ganglio in embrioni *Tbx1^{mcm/+}*; *R26R* (Fig.17C) mentre l'assenza di *Tbx1* in mutanti *Tbx1^{mcm/ΔE5}*; *R26R* non sembrerebbe che generi cambiamenti significativi al contributo di cellule che esprimono *Tbx1* al IX e X ganglio (Fig. 17D). Le cellule che esprimono *Tbx1* nell'VIII ganglio del mutante sono meno rappresentate rispetto al controllo (17 C-D).

Questi dati suggeriscono che *Tbx1* si comporta come un soppressore, per cui in assenza del gene, nei mutanti troviamo il dominio deputato alla neurogenesi espanso. Per capire se la neurogenesi anormale è una conseguenza indiretta dell'assenza di una popolazione di cellule che mancano nell'epitelio otico dei mutanti *Tbx1*, abbiamo analizzato la neurogenesi nei mutanti condizionali.

L'eliminazione di *Tbx1* a E8.5 ci consente di osservare che c'è una piccola popolazione di cellule che esprime *Tbx1* nell'epitelio otico (Fig. 15B-16B) e non c'è fusione dell'VIII ganglio (Fig. 17E-H) con i progenitori del VII, IX e X ganglio come si osserva nei mutanti omozigoti *Tbx1^{ΔE5/lacZ}* (Fig. 17F-I). Noi abbiamo esaminato le cellule che esprimono *Tbx1* in embrioni *Tbx1^{mcm/+}*; *R26R* e *Tbx1^{mcm/flox}*; *R26R* di stadio E10.0-E10.5 dove il gene è stato eliminato a E8.5. L'analisi è stata eseguita

mediante immunistoichimica con un anticorpo contro la tubulina BetaIII che marca i neuroni. In embrioni *Tbx1^{mcm/+}; R26R* il ganglio cocleo-vestibolare (VIII ganglio) è localizzato nella posizione normale (antero-ventrale all'otocisti) (Fig. 17A).

Nei mutanti condizionali *Tbx1^{mcm/flox};R26R*, dove abbiamo una corretta localizzazione delle cellule che esprimono *Tbx1* (Fig. 17B), si osserva la formazione di un ganglio ectopico le cui cellule sono positive per *Tbx1* ed alla tubulina-betaIII (Fig.17B-C). Questo ganglio ectopico era anche osservato in mutanti condizionali *TgCAGG-CreERTM;Tbx1^{flox/lacZ}* marcati con neurofilament (Fig.17E) e tubulina-beta III (Fig. 17H).

Per capire se le cellule positive per *Tbx1* nel ganglio ectopico sono di origine neurogenica, abbiamo eseguito una seconda immunistoichimica con un anticorpo anti-Ils1 che identifica neuroblasti che delaminano dall'epitelio otico. In questa immunistoichimica si osserva un'estensione del dominio di Ils-1, sia nei mutanti condizionali che negli omozigoti, che si sovrappone alla regione in cui vi sono cellule positive per *Tbx1* (Fig. 17K-L). Anche dall'analisi di RNA ibridazione *in situ* con *Ngn1*, sia nei mutanti condizionali che negli omozigoti, si osserva un'estensione caudale del dominio di espressione di *Ngn1* che si sovrappone alla regione in cui vi sono cellule positive per *Tbx1* (Fig.17N-O) a differenza dell'eterozigote (Fig. 17M). Questi dati suggeriscono che il ganglio ectopico è costituito prevalentemente da cellule che derivano dall'otocisti e che esprimono *Tbx1* ma, in assenza del gene, sono sottoposte ad un cambio di fato.

Questi dati dimostrano che è necessaria la presenza di cellule che esprimono *Tbx1* funzionale per delineare i confini tra regione

neurogenica e non neurogenica dell'epitelio dell'otocisti. Infatti, la popolazione di cellule che esprime *Tbx1* nell'otocisti dei mutanti condizionali non è sufficiente a ripristinare questi confini.

6.8.1 Notch1 è espanso nell'otocisti dei mutanti di *Tbx1*.

Notch1 è un soppressore del fato neurale di cellule epidermiche coinvolte nella formazione di gangli craniali. Ci siamo chiesti se Notch1 è coinvolto nel delineare i confini tra la regione neurogenica e non-neurogenica dell'otocisti. Dall'analisi di immunohistochimica con un anticorpo contro Notch1 attivato, si osserva che Notch1 attivato è presente in embrioni *Tbx1^{flox/lacZ}* di stadio E10.5 in una regione ben delimitata dell'epitelio otico adiacente all'VIII ganglio (Fig.17P). Questa regione si sovrappone anche con *Ngn1* (Fig.17M) e con una regione che esprime cellule *Tbx1* (Fig.18A-B). Questi dati suggeriscono che Notch1 è coinvolto nel definire i confini nei processi di neurogenesi. Nel mutante condizionale e nell'omozigote (Fig. 17Q-R), Notch1 presenta un dominio espanso così come *Ngn1* ed *Ils-1* (Dodou *et al.*, 2004). Questi dati suggeriscono che Notch1, in questi mutanti, non è in grado di sopprimere i processi di neurogenesi ectopica e che è influenzato dalla mutazione di *Tbx1*.

6.9 *Tbx1* delinea un limite ventrale-posteriore alla regione neurogenica dell'otocisti.

Per determinare se *Tbx1* è coinvolto nel delineare un confine con la regione dorsale dell'otocisti da cui si origina il dotto endolinfatico, noi abbiamo effettuato un'analisi di RNA ibridazione *in situ* con *Dlx5* e *Wntb2b* (due marker del dotto endolinfatico).

Complessivamente per entrambi i geni non si osservano differenze di espressione tra il controllo eterozigote, il mutante condizionale e l'omozigote (Fig.19A-F). Questi dati suggeriscono che la funzione principale di *Tbx1* nello sviluppo dell'orecchio interno è quella di delineare un confine tra regione neurogenica e non-neurogenica che interessa l'area ventro-posteriore dell'otocisti.

Tbx1^{mcm/+}; R26R
TM: E8.5

Tbx1^{mcm/flox}; R26R
TM: E8.5

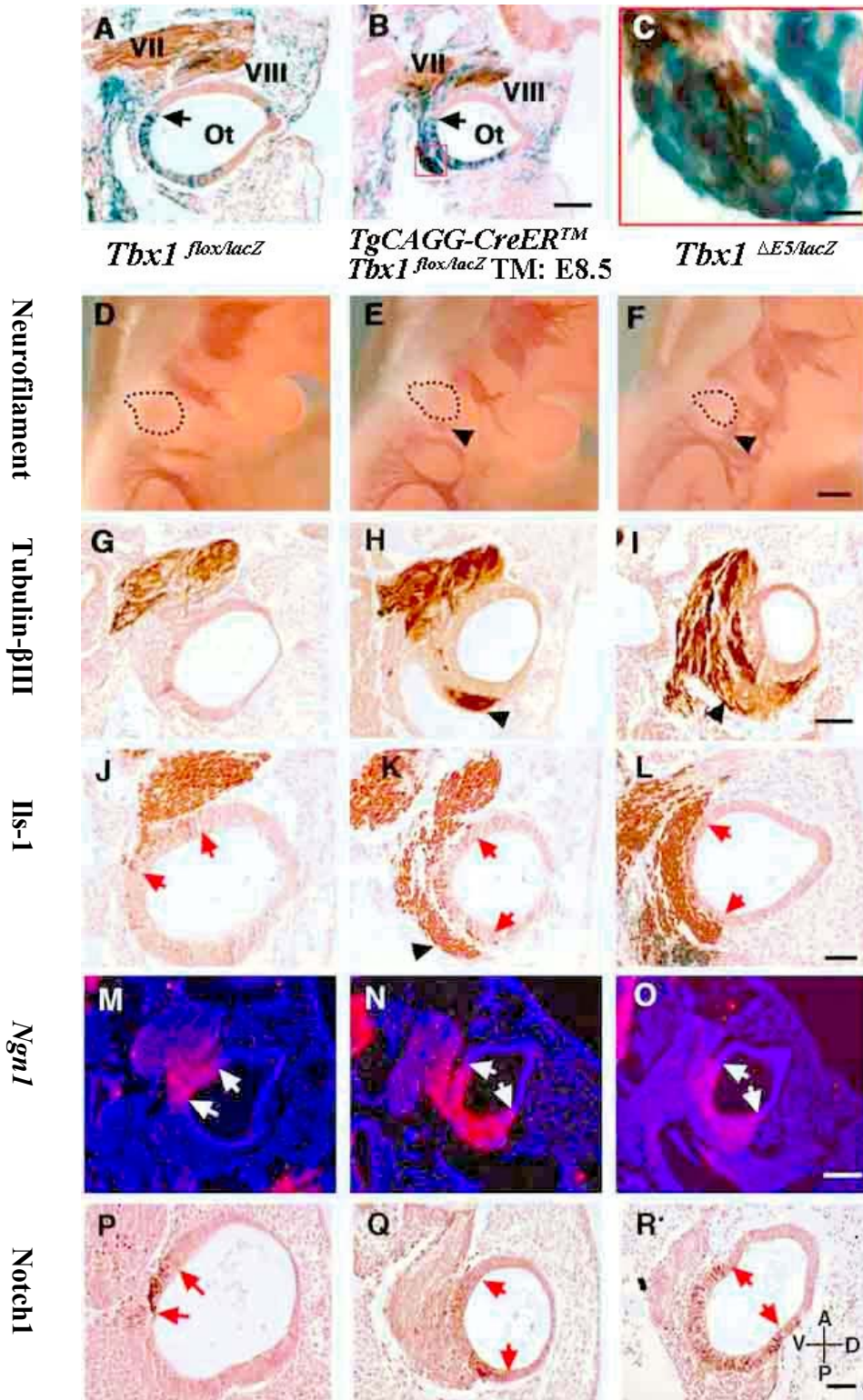


Figura 17. Sezioni sagittali di embrioni ad E10.5 che mostrano il destino delle cellule che esprimono *Tbx1* in un embrione eterozigote (**A**) ed in un mutante condizionale (**B** e **C**). In marrone sono marcati i neuroni differenziati con un anticorpo contro la tubulina-beta III. Le frecce indicano le regioni dell'otocisti positive per *Tbx1* in un embrione eterozigote (**A**) e in un mutante condizionale (**B**). In **C** è riportato un ingrandimento della regione in **B** dove si evidenzia il ganglio ectopico costituito prevalentemente da cellule *Tbx1* positive. In (**D-F**) si evidenzia un'immunoistochimica su embrioni interi a E10.0 con un anticorpo contro neurofilament. Si osserva un'otocisti più piccola nel mutante condizionale (**E**) e nell'omozigote (**F**). La freccia indica il ganglio ectopico nel mutante condizionale (**E**) e la non corretta posizione del VIII ganglio nell'omozigote (**F**). Questo risultato è confermato con un'immunoistochimica su sezioni sagittali di embrioni a E10.5 con un anticorpo contro la tubulina-beta III (**G-I**) dove si vede il ganglio ectopico (**H**) ed il non corretto posizionamento dell'VIII ganglio nell'omozigote (**I**).

L'immunoistochimica con *Ils-1* (**J-L**) evidenzia elementi neuroblastici che delaminano dall'epitelio dell'otocisti del mutante condizionale (**K**) e dell'omozigote (**L**). L'ibridazione *in situ* con *Ngn1* (**M-O**) su sezioni sagittali di embrioni a E10.5 mette in evidenza il dominio espanso di *Ngn1* nel mutante condizionale (**N**) e nell'omozigote (**O**). L'immunoistochimica con *Notch1* (**P-R**) evidenzia una regione di cellule positive per *Notch1* che è più estesa nel mutante condizionale (**Q**) e nell'omozigote (**R**).

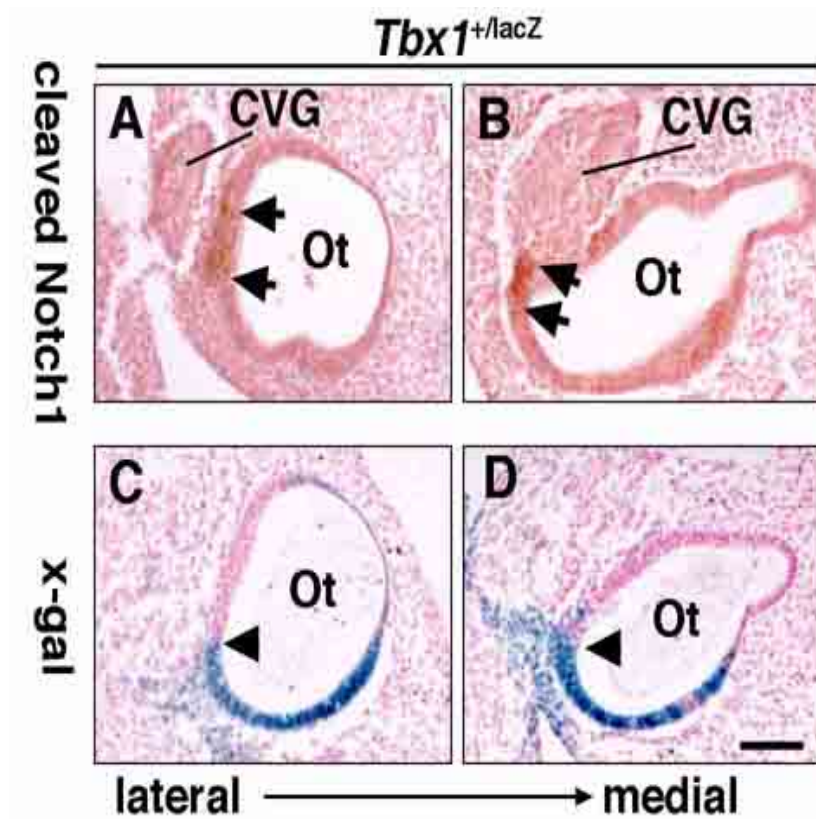


Figura 18. (A-B) Immunoistochimica su sezioni sagittali di embrioni *Tbx1^{+/lacZ}* di stadio E10.5 con un anticorpo anti-Notch1 attivato. Le frecce indicano le zone di espressione di Notch1 nell'otocisti (marroni). (C-D) Espressione di *Tbx1* in sezioni sagittali di embrioni di stadio E10.5 colorati con X-gal. Le frecce indicano il confine di espressione di cellule positive per *Tbx1* e di cellule negative per *Tbx1*.

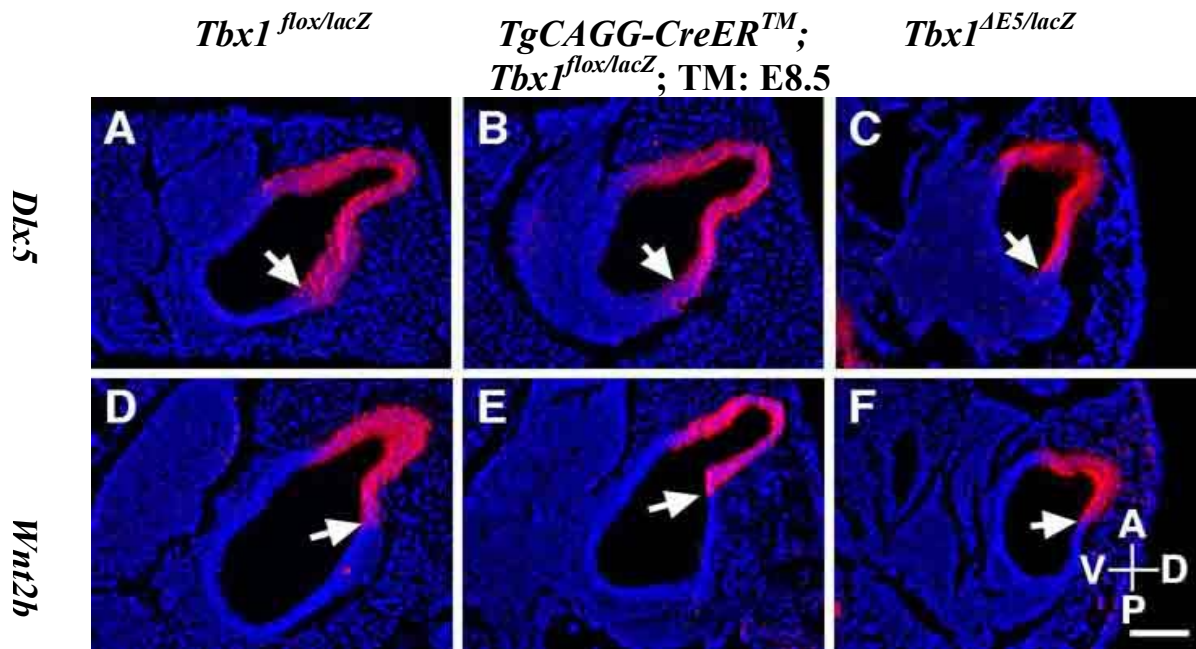


Figura 19. (A-C) RNA ibridazione *in situ* con *Dlx5* su sezioni sagittali di embrioni E10.5. Non c'è differenza tra il controllo (A), il mutante condizionale (B) e l'omozigote (C). In (D-F) RNA ibridazione *in situ* con *Wnt2b* su sezioni sagittali di embrioni E10.5. Non c'è differenza tra il controllo (D), il mutante condizionale (E) e l'omozigote (F).

6.9.1 L'espressione di *Tbx1* è fondamentale per una corretta morfogenesi dell'orecchio interno.

Tbx1 è espresso nel mesenchima intorno l'otocisti e nell'epitelio otico durante la morfogenesi dell'orecchio interno, ed entrambi i tessuti sono richiesti per un corretto processo di morfogenesi nell'orecchio interno. Per stabilire quali tra queste due regione è critica per lo sviluppo dell'orecchio interno, abbiamo eliminato *Tbx1* nell'epitelio dell'otocisti.

Per fare questo abbiamo utilizzato una linea transgenica *TgFgf15Cre* che induce ricombinazione omologa nell'ectoderma, endoderma faringeo ed epitelio otico ma non nel mesenchima intorno l'otocisti (Fig. 20A-A'). Nell'otocisti di embrioni a E12.5 (Fig. 20B), *TgFgf15Cre* media la ricombinazione del reporter *R26R* che identifica le strutture che derivano dall'otocisti.

Eliminando in *TgFgf15Cre* il gene *Tbx1* si osserva un'otocisti più piccola, un ganglio ectopico a E10.5 (Fig. 20C-C') ed una displasia dei derivati dell'otocisti (Fig. 20D). La colorazione con X-gal di embrioni *TgFgf15Cre; Tbx1^{lox/lacZ}*, che identificano le cellule che esprimono *Tbx1*, evidenzia la presenza di una piccola popolazione di cellule blu nell'otocisti (Fig. 20G-G' comparata a 20E-E'). L'estensione della popolazione di cellule è variabile probabilmente per l'azione della ricombinazione mediata da Cre. In embrioni a E12.5 (Fig. 20H comparata a 20F) non si formano le strutture tipiche di un orecchio interno. Il fenotipo osservato nell'otocisti di questi embrioni è simile a quello visto per i mutanti condizionali, infatti anche qui il gene viene eliminato a circa E9.0 in seguito ad induzione con tamoxifen ad E8.5.

Nei mutanti *TgFgf15Cre; Tbx1^{lox/lacZ}* ad E10.0, colorati per neurofilament, l'otocisti risulta più piccola rispetto al controllo (Fig. 21A-A') e si osserva la presenza del ganglio ectopico. L'immunoistochimica con l'anticorpo anti tubulina-beta III evidenzia un ganglio ectopico (Fig.21B-B') mentre l'immunoistochimica con Iis-1 (Fig.21C-C') e l'RNA ibridazione *in situ* con *Ngn1* (Fig.21D-D') evidenziano un dominio di espressione più esteso.

Anche il pattern di neurogenesi evidenziato da Notch1 è più esteso nell'omozigote (Fig. 21E-E'). Complessivamente i dati ottenuti dagli esperimenti effettuati sui mutanti *TgFgf15Cre*, concordano con i dati ottenuti dagli esperimenti effettuati sui mutanti *TgCAGG-CreERTM*. Infatti, i pattern di espressione delle diverse immunoistochimiche ed RNA ibridazione *in situ*, sono gli stessi. Questi dati suggeriscono che l'espressione di *Tbx1*, in determinate regioni dell'epitelio otico, è richiesta per la corretta morfogenesi dell'otocisti.

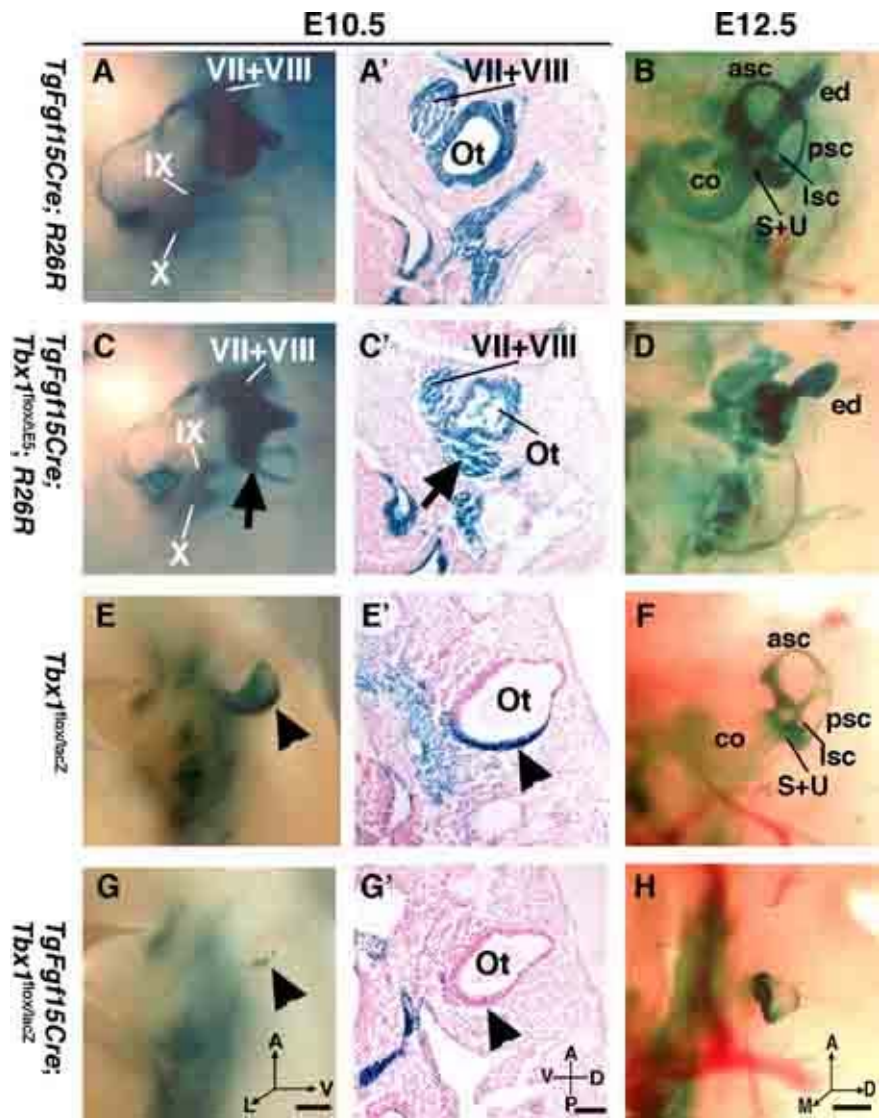


Figura 20. (A-A') Cellule che esprimono *TgFgf15Cre* in embrioni a E10.5. A' è una sezione sagittale dell'embrione mostrato in A. Le cellule blu sono trovate nell'epitelio otico, nel VII e nell'VIII ganglio ma non nel mesenchima intorno all'otocisti. In B sono evidenziate in blu le cellule che esprimono *TgFgf15Cre* in embrioni a E12.5. Queste cellule contribuiscono alle strutture che formano l'orecchio interno. (C-C') Colorazione con X-gal di embrioni mutanti *Tgfgf15Cre; Tbx1^{lox/lacZ}; R26R* in embrioni a E10.5. C'è una sezione sagittale dell'embrione mostrato in C. Si osserva un'otocisti più piccola ed un ganglio ectopico. In (D) cellule che esprimono *TgFgf15Cre* in embrioni a E12.5 in cui si evidenziano i gravi difetti dell'orecchio mentre il dotto endolinfatico è ben formato. (E-E') Localizzazione di cellule che esprimono *Tbx1* in un otocisti di embrioni a E10.5. E' è una sezione sagittale dell'embrione mostrato in E. Le cellule che esprimono *Tbx1* sono presenti nella maggior parte dell'otocisti e del ganglio ma non nel dotto endolinfatico. (F) Localizzazione di cellule che esprimono *Tbx1* negli organi di senso ma non nel dotto endolinfatico di otocisti di embrioni a E12.5. (G-G') Localizzazione di cellule che esprimono *Tbx1* nell'otocisti di mutanti condizionali a E10.5. C'è una sezione sagittale dell'embrione mostrato in G. Si evidenzia un ridotto contributo di cellule che esprimono *Tbx1* nell'otocisti. In (H) si osservano gravi difetti morfologici dell'orecchio interno di mutanti condizionali a E12.5.

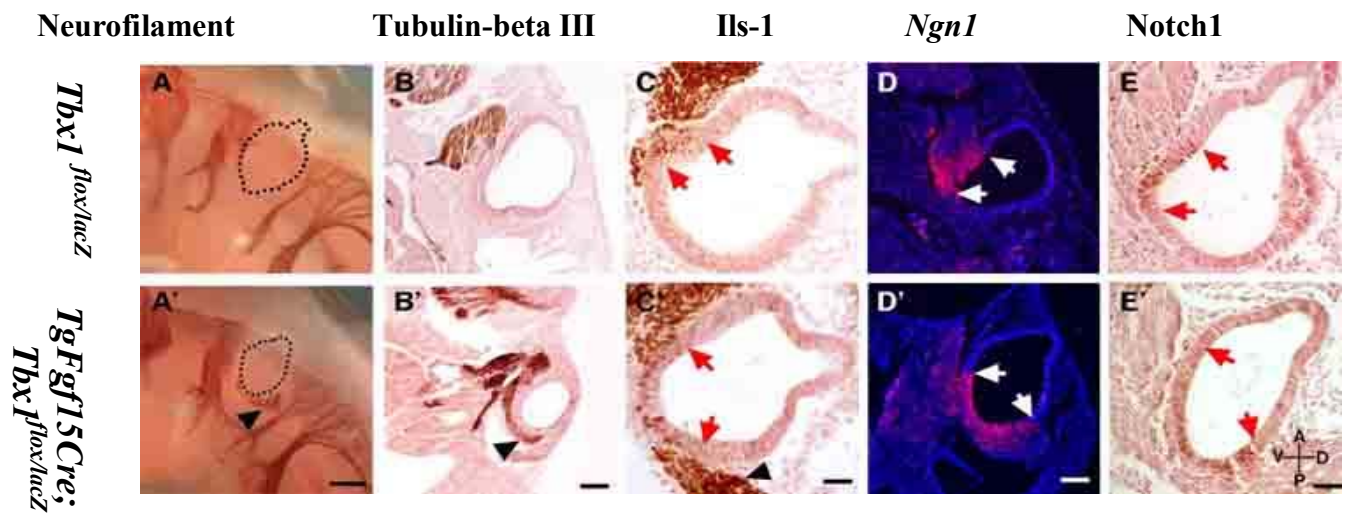


Figura 21. (A-A') L'immunoistochimica su embrioni interi a E10.0 con un anticorpo contro neurofilament evidenzia un otocisti più piccola nel mutante condizionale (A') rispetto al controllo (A) e la freccia indica la presenza del ganglio ectopico. (B-B') L'immunoistochimica con anticorpo anti Tubulina-beta III su sezioni sagittali di E10.5 evidenzia il ganglio ectopico nel mutante condizionale.

(C-C') L'immunoistochimica con anticorpo anti *Ils1* su sezioni sagittali di E10.5 evidenzia un dominio di espressione più espanso nel mutante condizionale (C') rispetto al controllo (C).

(D-D') RNA ibridazione *in situ* con *Ngn1* su sezioni sagittali di embrioni E10.5. Il mutante condizionale presenta un dominio di espressione più esteso (D') rispetto al controllo (D).

(E-E') L'immunoistochimica con anticorpo anti Notch1 su sezioni sagittali di E10.5 evidenzia un'area più estesa di cellule positive per Notch1 nel mutante condizionale (E') rispetto al controllo (E).

CAPITOLO 7

Conclusioni e Prospettive future



CEINGE Biotecnologie Avanzate.

7.1 *Tbx1* regola l'espansione e la proliferazione di una popolazione di cellule nella regione epiteliale dell'otocisti.

Tbx1 inizia ad essere espresso nella regione postero-laterale dell'otocisti a partire dallo stadio di E9.0, escludendo la regione del dotto endolinfatico e del ganglio cocleo-vestibolare. A E9.5 l'otocisti dei mutanti *Tbx1*^{-/-} si presenta più piccola con un epitelio sottile rispetto agli embrioni normali *Tbx1*^{+/+} o *Tbx1*^{+/-} e non si osserva nessun evento morfogenetico tra lo stadio di E9.5 ed E13.5 che porta ad un normale sviluppo dell'otocisti. L'assenza di sviluppo dei canali semicircolari, della coclea e l'assenza di espressione nella regione epiteliale di diversi markers dei precursori di queste strutture come *Bmp4* (Cole et al., 2000) e *Pax2* (Favor et al., 1996) suggerisce che *Tbx1* potrebbe essere richiesto per l'espansione di una piccola popolazione di cellule epiteliali che è destinata a formare l'apparato vestibolare e la coclea. Inoltre, l'assenza di cellule che attivano il gene *Tbx1* nell'otocisti di embrioni *Tbx1*^{-/-} e nei mutanti condizionali e l'assenza di cellule positive per LacZ nelle chimere suggerisce che le cellule mutanti potrebbero presentare seri problemi nei processi proliferativi che ne impediscono la sopravvivenza e l'espansione nella regione dell'otocisti. Nella linea germinale mutante, ciò induce un'assenza di una popolazione cellulare mentre nelle chimere le cellule mutanti sono rapidamente sostituite da quelle normali. Questa ipotesi è supportata dall'analisi di RNA ibridazione *in situ* con diversi markers di regioni specifiche dell'otocisti che evidenzia l'assenza di espressione con markers che hanno lo stesso pattern di espressione di *Tbx1*. A questo punto è lecito ipotizzare che

Tbx1 è richiesto per l'espansione e la proliferazione di una popolazione di cellule nell'epitelio dell'otocisti in modo indipendente. Infatti, dati presenti in letteratura dimostrano che *Tbx1* regola la proliferazione cellulare in altri tessuti ma il meccanismo non è chiaro. E' stato ipotizzato che questo processo è mediato dalla regolazione di geni che codificano per i fattori di accrescimento tra cui gli FGF (Pirvola *et al.*, 2000; Pirvola *et al.*, 2002).

7.2 *Tbx1* delinea i bordi delle regioni neurogeniche nell'otocisti.

Precedenti dati in letteratura suggeriscono che *Tbx1* è un "soppressore" dei processi di neurogenesi nell'otocisti (Raft *et al.*, 2004). Nei nostri esperimenti, mediante mappatura del destino di cellule che esprimono *Tbx1*, abbiamo osservato che il gene è espresso in precursori di cellule neurali a livello del XI-X ganglio craniale ed in misura minore nell'VIII ganglio. Negli embrioni *Tbx1*^{-/-} il numero di cellule tracciate nei gangli XI-X non si riduce ma si riduce nell'VIII ganglio. Dunque *Tbx1* non è richiesto in precursori neuronali, e non è uno specifico soppressore di cellule neuronali.

Inoltre, i precursori del ganglio cocleo-vestibolare (CVG) derivano dall'epitelio dell'otocisti per cui l'ipotesi che *Tbx1* è richiesto per il contributo di cellule verso l'otocisti è plausibile. Tuttavia, negli omozigoti *Tbx1*^{-/-}, osserviamo un ganglio CVG malposizionato, malformato, più grande e con domini neurogenici più espansi.

E' possibile ipotizzare che l'espansione dei domini neurogenici sia un effetto secondario dovuto all'assenza di una popolazione di cellule nell'otocisti per cui *Tbx1* potrebbe ricoprire un ruolo strettamente correlato alla presenza di queste cellule nell'otocisti. L'utilizzo di mutanti condizionali ci ha permesso di osservare che la posizione e la morfologia del ganglio CVG in parte erano normalizzati. Inoltre, era recuperata la popolazione di cellule che si localizzava correttamente nella regione dell'otocisti dove erano presenti, normalmente, le cellule che esprimevano *Tbx1*. Nonostante tutto, questo non era sufficiente a ristabilire un normale dominio di espressione neurogenica. Infatti, dati ottenuti con marcatori come *Isl1* (Radde-Gallwitz *et al.*, 2004) e *Ngn1* (Ma *et al.*, 1998) evidenziano ancora un dominio neurogenico che si estendeva fino alla popolazione di cellule che esprimevano *Tbx1*. Noi abbiamo anche dimostrato che una sottopopolazione di cellule che esprimevano *Tbx1* avevano cambiato il loro destino dando origine a cellule neuronali che formavano un ganglio ectopico localizzato nella regione postero-ventrale al CVG.

In definitiva, questi dati confermano l'ipotesi che è l'espressione di *Tbx1* a "delimitare i confini" della regione neurogenica e non la popolazione di cellule assenti. L'assenza di cellule che esprimono correttamente *Tbx1* induce uno spostamento dei confini della regione neurogenica fino ad incontrare, in posizione postero-ventrale, la regione del dotto endolinfatico identificata da *Dlx5* e *Wnt2b* (Depew *et al.*, 1999).

I nostri dati, indicano che la popolazione di cellule destinate ad esprimere *Tbx1*, sebbene localizzata in specifiche regioni, può non differenziarsi in un particolare tipo di cellule. Inoltre, può cambiare il proprio destino in funzione dell'espressione di geni

che agiscono nell'epitelio otico. In aggiunta, i dati relativi alla delezione del gene nell'epitelio dimostrano che la funzione di *Tbx1* nel delimitare i confini dei domini di espressione neurogenica, è localizzata nell'epitelio dell'otocisti.

Fondamentalmente, i meccanismi molecolari che delineano i confini della regione neurogenica nell'otocisti non sono conosciuti. In altri sistemi, la cascata di segnali indotta da Delta-Notch (Adam., 1998) sembra ricoprire un ruolo importante nel cambiare il destino di cellule da “neurogeniche” a “non neurogeniche”. Delta (Chitnis *et al.*, 1995) è regolato in modo positivo da geni proneurali come *Ngn1* e *NeuroD* (Chae *et al.*, 2004) (Kim *et al.*, 2001); in particolare Delta attiva Notch (Austin *et al.*, 1995) nelle cellule vicine e Notch (De la Pompa *et al.*, 1997) attivato sopprime l'espressione di geni proneurali in queste cellule (Fig. 22). Nei nostri esperimenti, si evidenzia un dominio di espressione positivo per Notch (Lai *et al.*, 2004) attivato ai confini della regione neurogenica per cui è presumibile ipotizzare che Delta-Notch (Nye *et al.*, 1994) è coinvolto nel settare questi confini. I mutanti omozigoti *Tbx1*^{-/-} ed i mutanti condizionali presentano un dominio Notch attivato espanso che non è comunque in grado di sopprimere *Ngn1*. Molto probabilmente, nell'otocisti *Tbx1* agisce in modo diretto o indiretto con Notch attivato per sopprimere *Ngn1*. In assenza di *Tbx1* questa cascata di segnali non si attiva per definire correttamente i confini della regione neurogenica (Fig. 23 A-B). Questo potrebbe spiegare lo spostamento della regione neurogenica in una regione più posteriore dove l'effetto soppressore di *Tbx1* è sostituito da altri meccanismi. E' probabile anche che *Tbx1* sopprime *Ngn1* indipendentemente da Notch

attivato ma comunque, ciò non spiegherebbe perché nei mutanti di *Tbx1* manca l'effetto di soppressione esercitato da Notch attivato.

In definitiva, *Tbx1* ricopre almeno tre ruoli nello sviluppo dell'orecchio interno:

- 1) Regolazione del contributo dei precursori ectodermici nell'otocisti.
- 2) Regolazione della proliferazione cellulare di una sottopopolazione di cellule epiteliali nell'otocisti.
- 3) Delimitazione dei confini tra una popolazione “neurogenica” ed una popolazione “non neurogenica” nelle cellule dell'epitelio dell'otocisti.

Noi proponiamo che i primi due ruoli sono attribuiti all'espressione dello stesso effetto proliferativo di *Tbx1*, dimostrato anche in altri processi di sviluppo.

Il terzo ruolo potrebbe essere il risultato derivato dall'interazione con Notch nel sopprimere l'espressione di *Ngn1*.

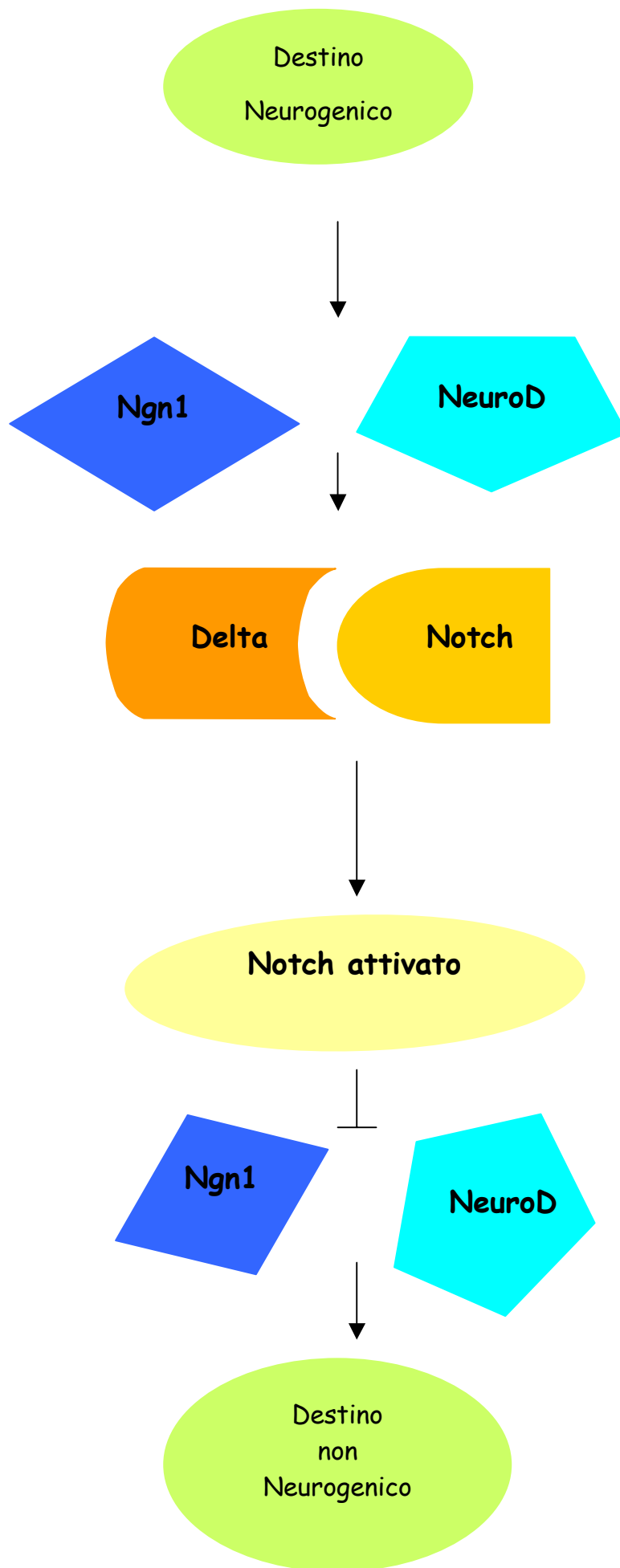


Figura 22. Rappresentazione dell'azione di *Notch*.

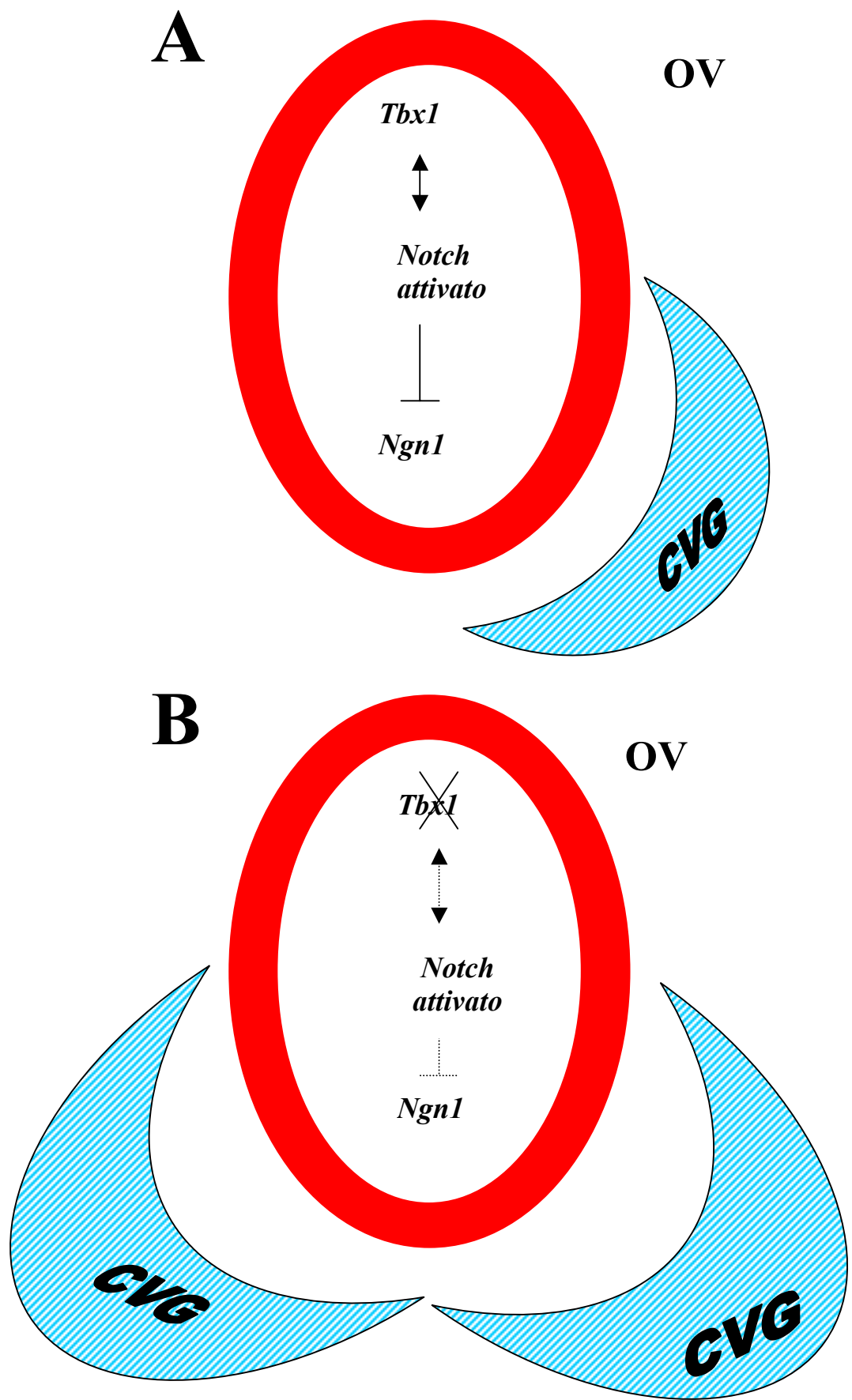


Figura 23. Modello di funzione di *Tbx1*.

7.3 I modelli animali nello sviluppo dell'orecchio interno e le relative patologie.

Nel corso degli ultimi anni, la ricerca sui modelli animali, in particolare l'utilizzo del topo, ha dimostrato come quest'ultimo fosse particolarmente efficiente nell'indirizzare correttamente lo studio di svariate forme di sordità congenita nell'uomo (Fekete *et al.*, 1997) (Liu *et al.*, 2000). Infatti, le attuali tecniche di manipolazione genetica sul topo ci consentono di eliminare in modo permanente, ad un determinato stadio e tessuto un gene che si ritiene coinvolto nello sviluppo dell'orecchio. *Tbx1* è uno di questi geni che contribuisce a fornire un buon “modello animale” per lo studio dei difetti morfogenetici nell'orecchio interno. Esistono diversi modelli di topo che hanno difetti di udito o equilibrio, ognuno dei quali contribuisce a comprendere il complesso puzzle della biologia dell'orecchio interno. Alcuni di questi sono rilevanti per comprendere casi di sordità umana mentre altri forniscono elementi utili per comprendere lo sviluppo e la funzione delle strutture sensoriali dell'orecchio. In questo lavoro di tesi, mi sono riproposta di approfondire lo studio relativo ai difetti dell'orecchio interno generati da *Tbx1* ma abbiamo solo eliminato il gene allo stadio di E8.5 sarebbe interessante capire cosa succede morfologicamente all'apparato vestibolare ed uditivo eliminando il gene in stadi più tardivi. Tecniche morfologiche, come il paint-fill, potrebbero fornire informazioni sulle strutture dell'orecchio interno i cui difetti giustificerebbero i problemi di udito.

CAPITOLO 8

BIBLIOGRAFIA

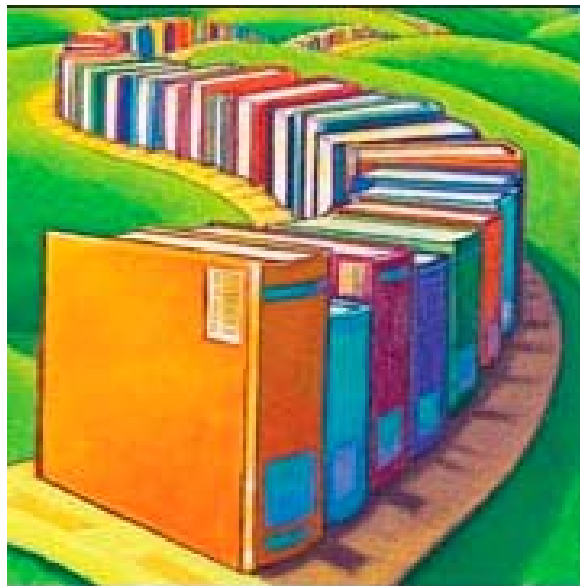


Immagine presa da Internet

Adam, J., Myat, A., le Roux, I., Eddison, M., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J. (1998). Cell fate choices and the expression of Notch, Delta, and Serrate homologues in the chick inner ear: parallels with *Drosophila* sense-organ development. *Development* 125,4645 –4654.

Albrecht, U., Eichele, G., Helms, J. A. and Lu, H. C. (1997). Visualization of gene expression patterns by in situ hybridization. In *Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology.*, (ed. G. P. Daston), pp. 23-48. *New York: CRC Press, Inc.*

Arnold, J. S., Braunstein, E. M., Ohyama T., Groves A., K., Adams J., C., Brown, M., C. and Morrow, B. E. (2006). Tissue specific roles of *Tbx1* in the development of the outer, middle and inner ear, defective in 22q11DS patients. *Human Molecular Genetics*.

Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A., Jr. and Cepko, C. L. (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development*. 121, 3637-50.

Avraham, K.B. (2003). Mouse model for deafness : Lessons for the human inner ear and hearing loss. *Ear & Earing*. 24, 332-341.

Baldini, A. (2002). DiGeorge syndrome: the use of model organisms to dissect complex genetics. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2363-2369.

Baldini, A. (2004). DiGeorge syndrome: an update. *Current Opinion in Cardiology* 19, 201-204.

Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Nissim, B.-A., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A. and Zoghbi, H. Y. (1999). *Math1*: An essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284,1837 –1841.

Brewer, C., Holloways S., Zawalnyski P., Schinzel, A & FitzPatrick, D. (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. *Am.J.Hum Genet.* 63, 1153-1159.

Burn, J., Takao, A., Wilson, D., Cross, I., Momma, K., Wadey, R., Scambler, P. and Goodship, J. (1993) Conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within chromosome 22q11. *J. Med. Genet.*, 30, 822–824.

Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. and Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* 5, 877-889.

Chae, J.H., Stein G. H., Lee J, E. (2004). Neuro D: The predicted and the surprising. *Mol.Cells.* 18, 271-288.

Chen, P., Johnson, J. E., Zoghbi, H. Y. and Segil, N. (2002). The role of Math1 in inner ear development: uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development* 129,2495 -2505.

Chapman, D.L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S.I., Gibson-Brown, J.J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R.J., Silver, L.M. and Papaioannou, V.E. (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dyn.*, 206, 379–390.

Chieffo C., Garvey N., Gong W., Roe B., Zhang G., Silver L., Emanuel B.S., Budarf M.L., (1997). Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*, 43, 267-77.

Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D. and Kintner, C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761-6.

Cole, L. K., le Roux, I., Nunes, F., Laufer, E., Lewis, J. and Wu, D. K. (2000). Sensory organ generation in the chicken inner ear: contributions of Bone Morphogenetic Protein 4, Serrate1, and Lunatic Fringe. *J. Comp. Neurol.* 424,509 -520.

De la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124,1139-48.

Depew, M. J., Liu, J. K., Long, J. E., Presley, R., Meneses, J. J., Pedersen, R. A. and Rubenstein, J. L. (1999). Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* 126, 3831-46.

Digilio, M. C., Pacifico, C., Tieri, L., Marino, B., Giannotti, A. and Dallapiccola, B. (1999). Audiological findings in patients with microdeletion 22q11 (DiGeorge/velocardiofacial syndrome). *Br J Audiol* 33, 329-33.

Dodou, E., Verzi, M. P., Anderson, J. P., Xu, S. M. and Black, B. L. (2004). Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development* 131, 3931-3942.

Driscoll, D.A., Budarf, M.L. and Emanuel, B.S. (1992) A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 924–933.

Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., Pretsch, W., Chatterjee, B., Senft, E., Wurst, W., Blanquet, V., Grimes, P., Sporle, R. et al. (1996) The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 13870–13875.

Fekete, D.M. (1996). Cell fate specification in the inner ear. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 533-541.

Fekete, D.M. and Wu, D.K. (2002) Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 12, 35-42.

Fekete, D. M. (1999). Development of the vertebrate ear: insights from knockouts and mutants. *Trends Neurosciences*. 22, 263-269.

Fekete, D.M., Homburger, S.A., Waring, M.T., Riedl, A.E. and Garcia, L.F. (1997) Involvement of programmed cell death in morphogenesis of the vertebrate inner ear. *Development*, 124, 2451–2461.

Fritsch, B., Beisel, K. W., Jones, K., Farinas, I., Maklad, A., Lee, J. and Reichardt, L. F. (2002). Development and evolution of inner ear sensory epithelia and their innervation. *J. Neurobiol.* 53,143 –156.

Fritsch, B., Signore, M. and Simeone, A. (2001). Otx1 null mutant mice show partial segregation of sensory epithelia comparable to lamprey ears. *Dev. Genes Evol.* 211,388 -396.

Funke, B., Epstein, J.A., Kochilas, L.K., Lu, M.M., Pandita, R.K., Liao, J., Bauerndistel, R., Schuler, T., Schorle, H., Brown, M.C. *et al.* (2001) Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2549–2556.

Garg, V., Yamagishi, C., Hu, T., Kathiriya, I.S., Yamagishi, H. and Srivastava, D. (2001) Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev. Biol.*, 235, 62–73.

Greenberg, F., Crowder, W.E., Paschall, V., Colon-Linares, J., Lubianski, B. and Ledbetter, D.H. (1984) Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. *Hum. Genet.*, 65, 317–319.

Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H. H. and Bober, E. (1998). Nkx5-1 controls semicircular canal formation in the mouse inner ear. *Development* 125, 33-39.

Hammond, K. L., Loynes, H. E., Folarin, A. A., Smith, J. and Whitfield, T. T. (2003). Hedgehog signaling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development* 130,1403 -1417.

Hayashi, S. and McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244, 305-18.

Hawkins, R. D., Lovett M. (2004). The development genetics of auditory hair cells. *Human Molecular Genetics* 13, 289-296.

Hu, T., Yamagishi, H., Maeda, J., McAnally, J., Yamagishi, C., and Srivastava, D., (2004). Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 131, 5491-5502.

Jerome, L. A. and Papaioannou, V. E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.* 27, 286-291.

Karis, A., Pata, I., Hikke van Doorninck, J., Grosveld, F., de Zeeuw, C. I., de Caprona, D. and Fritzscht, B. (2001). Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the inner ear. *J. Comp. Neurol.* 429,615 –630.

Kaufman, M. H. and Bard, J. B. L. (1999). The Anatomical Basis of Mouse Development. San Diego: *Academic Press*.

Kim, W. Y., Fritzscht, B., Serls, A., Bakel, L. A., Huang, E. J., Reichardt, L. F., Barth, D. S. and Lee, J. E. (2001). NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128, 417-26.

Kochilas, L., Merscher-Gomez, S., Lu, M. M., Potluri, V., Liao, J., Kucherlapati, R., Morrow, B. and Epstein, J. A. (2002). The role of neural crest during cardiac development in a mouse model of DiGeorge syndrome. *Dev. Biol.* 251, 157-166.

Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-73.

Lavoko-Kerali, G., Rivolta, M. N. and Holley, M. (2002). Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *J. Comp. Neurol.* 442,378-391.

Lindsay, E. A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H. F., Scambler, P. J. et al. (2001). Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410, 97-101.

Lindsay, E.A. (2001) Chromosomal microdeletion: dissecting Del22q11 syndrome *Nat. Rev. Genet.*, 2, 858–868.

Liu, W., Oh, S.H., Kang Yk, Y., Li, G., Doan, T.M., Little, M., Li, L., Ahn, K., Crenshaw, E.B., III and Frenz, D.A. (2003) Bone morphogenetic protein 4 (BMP4): A regulator of capsule chondrogenesis in the developing mouse inner ear. *Dev. Dyn.*, 226, 427–438.

Liu, M., Pereira, F. A., Price, S. D., Chu, M. J., Shope, C., Himes, D., Eatock, R. A., Brownell, W. E., Lysakowski, A. and Tsai, M. J. (2000). Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev* 14, 2839-54.

Liu, W., Li, G., Chien, J.S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C. and Frenz, D.A. (2002) Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev. Biol.*, 248, 240–250.

Jerome, L.A. and Papaioannou, V.E. (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat. Genet.*, 27, 286–291.

Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L. and Anderson, D. J. (1998). Neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20,469-82.

Merscher, S., Funke, B., Epstein, J. A., Heyer, J., Anne, P., Lu, M. M., Xavier, R., Demay, M. B., Russell, R. G., Factor, S. et al. (2001). TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104,619 -629.

McDermid, H.E. and Morrow, B.E. (2002) Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum. Genet.*, 70, 1077–1088.

McKay, I., Lewis, J. and Lumsden, A. (1996). The role of FGF-3 in early inner ear development: an analysis in normal and kreisler mutant mice. *Dev. Biol.* 174,370 -378.

Merlo, G. R., Paleari, L., Mantero, S., Zerega, B., Adamska, M., Rinkwitz, S., Bober, E. and Levi, G. (2002). The Dlx5 homeobox gene is essential for vestibular morphogenesis in the mouse embryo through a BMP4-mediated pathway. *Dev. Biol.* 248, 157 –169.

Moraes, F., Novoa, A., Jerome-Majewska, L. A., Papaioannou, V. E. and Mallo, M. (2005). Tbx1 is required for proper neural crest migration and to stabilize spatial patterns during middle and inner ear development. *Mech Dev* 122, 199-212.

Morest, D.K. and Cotanche D.A., (2004). Regeneration of the inner ear as a model of neural plasticity. *Journal of Neuroscience Research* 78,455-460.

Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. and Wu, D.K. (1998) Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. *J. Neurosci.*, 18, 3327–3335.

Morsli, H., Tuorto, F., Choo, D., Postiglione, M.P., Simeone, A. and Wu, D.K. (1999) Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development*, 126, 2335–2343.

Ng, J. K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C. M., Rodriguez Esteban, C., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D. M., Fishman, M. C. et al. (2002). The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10. *Development* 129, 5161-70.

Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. and Gruss, P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* 109,797 -809.

Noramly, S. and Grainger, R. M. (2002). Determination of the embryonic inner ear. *J Neurobiol* 53, 100-28.

Nye, J. S., Kopan, R. and Axel, R. (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421-30.

Nishikori, T., Hatta, T., Kawauchi, H. and Otani, H. (1999) Apoptosis during inner ear development in human and mouse embryos: an analysis by computer-assisted three-dimensional reconstruction. *Anat. Embryol. (Berl)*, 200, 19–26.

Pauley, S., Wright, T. J., Pirvola, U., Ornitz, D., Beisel, K. W. and Fritsch, B. (2003). Expression and function of FGF10 in mammalian inner ear development. *Dev. Dyn.* 227,203 –215.

Pirvola, U., Spencer-Dene, B., Xing-Qun, L., Kettunen, P., Thesleff, I., Fritsch, B., Dickson, C. and Ylikoski, J. (2000) FGF/FGFR-2(IIIb) signaling is essential for inner ear morphogenesis. *J. Neurosci.*, 20, 6125–6134.

Pirvola, U., Ylikoski, J., Trokovic, R., Hebert, J., McConnell, S. and Partanen, J. (2002). FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* 35,671 -680.

Radde-Gallwitz, K., Pan, L., Gan, L., Lin, X., Segil, N. and Chen, P. (2004). Expression of *Islet1* marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 477, 412-21.

Raft, S., Nowotschin, S., Liao, J. and Morrow, B. E. (2004). Suppression of neural fate and control of inner ear morphogenesis by *Tbx1*. *Development* 131, 1801-12.

Reyes, M. R., LeBlanc, E. M. and Bassila, M. K. (1999). Hearing loss and otitis media in velo-cardio-facial syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 47, 227-33.

Riley B., Phillips,. (2003). Ringing in the new ear: resolution of cell interactions in otic development. *Developmental Biology* 261, 289-312.

Riccomagno, M.M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D.K. and Epstein, D.J. (2002) Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes Dev.*, 16, 2365–2378.

Rubel, E. W. and Fritsch, B. (2002). Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 51-101.

Scambler, P.J. (2000) The 22q11 deletion syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 2421– 2426.

Scambler, P.J., Kelly, D., Lindsay, E., Williamson, R., Goldberg, R., Shprintzen, R., Wilson, D.I., Goodship, J.A., Cross, I.E. and Burn, J. (1992) Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet*, 339, 1138–1139.

Shailam, R., Lanford, P. J., Dolinsky, C. M., Norton, C. R., Gridley, T. and Kelly, M. W. (1999). Expression of proneural and neurogenic genes in the embryonic mammalian vestibular system. *J. Neurocytol* 28,809 -819.

Shprintzen, R.J., Goldberg, R.B., Young, D. and Wolford, L. (1981) The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics*, 67, 167–172.

Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M. and Molkentin, J.D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ. Res.* 89, 20-25.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain [letter]. *Nat Genet* 21, 70-1.

Taddei, I., Morishima, M., Huynh, T. and Lindsay, E. A. (2001). Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11428-11431.

Ten Berge, D., Brouwer, A., Korving, J., Martin, J.F. and Meijlink, F. (1998) Prx1 and Prx2 in skeletogenesis: roles in the craniofacial region, inner ear and limbs. *Development*, 125, 3831–3842.

Torres, M., Gomez-Pardo, E. and Gruss, P. (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*, 122, 3381–3391.

Verrou, C., Zhang, Y., Zurn, C., Schanel, W.W. & Reth, M. (1999). Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biol Chem* 380, 1435-8.

Vitelli, F., Morishima, M., Taddei, I., Lindsay, E. A. and Baldini, A. (2002a). Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Hum Mol Genet* 11, 915-922.

Vitelli, F., Taddei, I., Morishima, M., Meyers, E. N., Lindsay, E. A. and Baldini, A. (2002b). A genetic link between Tbx1 and Fibroblast Growth Factor signaling. *Development* 129, 4605-4611.

Vitelli, F., Viola, A., Morishima, M., Pramparo, T., Baldini, A. and Lindsay, E. (2003). TBX1 is required for inner ear morphogenesis. *Hum Mol Genet* 12, 2041-8.

Wang, W., Chan, E. K., Baron, S., van de Water, T. R. and Lufkin, T. (2001). Hmx2 homeobox gene control of murine vestibular morphogenesis. *Development* 128,5017 -5029.

Weinstein, D. C. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Neural induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 15,411 -433.

Wilkinson, D. G. (1992). *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.

Wilkinson, D. G., Bhatt, S. and Herrmann, B. G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343,617 -622.

Wilson, D. I., Cross, I. E., Wren, C., Scambler, P. J., Burn, J. and Goodship, J. (1994). Minimum prevalence of chromosome 22q11 deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 55, A975.

Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. and Hogan, B. L. M. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9,2105 -2116.

Xu, H., Cerrato, F. and Baldini, A. (2005). Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis, and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion. *Development* 132, 4387-95.

Xu, H., Morishima, M., Wylie, J. N., Schwartz, R. J., Bruneau, B. G., Lindsay, E. A. and Baldini, A. (2004). Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* 131, 3217-27.

Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S. et al. (2003). Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 362, 1366-1373.

Yamagishi, H., Maeda, J., Hu, T., McAnally, J., Conway, S.J., Kume, T., Meyers, E.N., Yamagishi, C. and Srivastava, D. (2003) Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev.*, 17, 269–281.

Yanagisawa, K. O., Fujimoto, H. and Urushihara, H. (1981). Effects of the Brachyury (T) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 87,242 -248.

Zhang, Z., Cerrato, F., Xu, H., Vitelli, F., Morishima, M., Vincentz, J., Furuta, Y., Ma, L., Martin, J. F., Baldini, A. et al. (2005). Tbx1 expression in pharyngeal epithelia is necessary for pharyngeal arch artery development. *Development* 132, 5307-15.

Zheng, W., Huang, L., Zhu-Bo, W., Silviu, D., Tang, B. and Xu, P.-X. (2003). The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development* 130,3989 -4000.