

(inglese)

The general interest of this group is on transcription factors and signalling molecules important for embryonic development of brain, head and limbs. Our experimental approaches combine in vivo genetics, organ cultures and stem cells. We recently extended our knowhow to transcription profiling and bioinformatics tools.

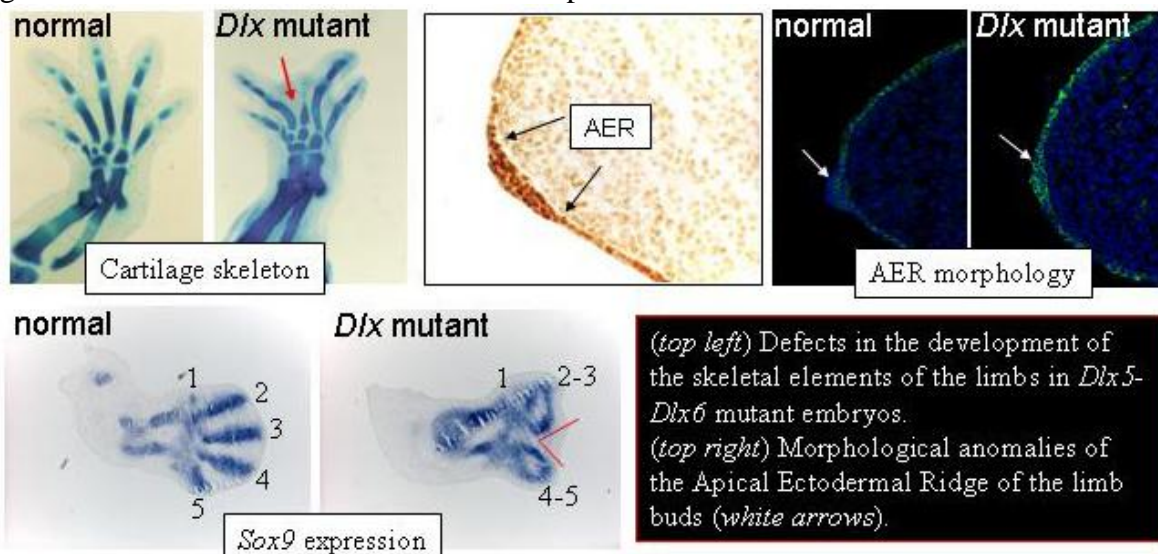
Our specific interests are :

- The role of *Dlx* and *p63* genes for limb development and morphogenesis, in light of the human congenital Split-Hand-Foot Malformation (SHFM)
- The molecular pathway controlled by *Dlx5* that promotes differentiation of neural stem cells into GABA⁺ neurons
- The molecular regulation of axon extension, guidance and connectivity in the olfactory sensory system, and of the migration and maturation of GnRH neurons, in light of the genetic congenital disease Kallmann syndrome and related disorders.
- Development and maturation of the network of inhibitory GABAergic neurons within the cortex and hippocampus

Limb development

Dlx genes are expressed on the tip of growing appendages of all animal species, including the mammalian limb buds. In human, mutations or genomic mis-organization of *DLX5-DLX6* cause the congenital malformation SHFM type I. We previously published that the combined *Dlx5+Dlx6* knockout mice reproduce the SHFM phenotype. This finding has opened the way to comprehend the molecular basis of *Dlx* gene functions for limb development.

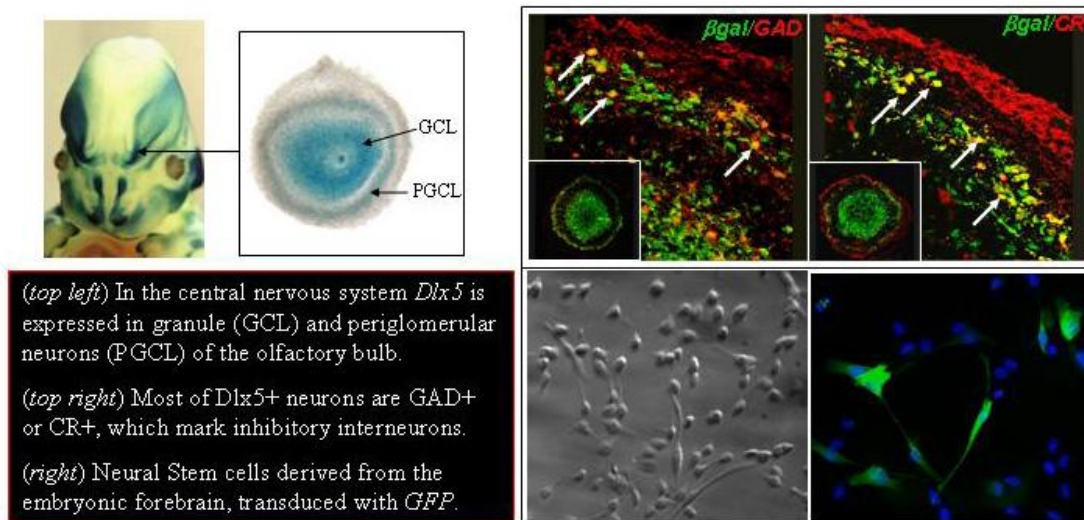
We are focusing on a regulatory network involving *Dlx5;Dlx6* and the *p63* transcription factor, essential for epithelial stem cell functions and for the maintenance of stratified epithelia. Indeed *p63* mutations in human cause the congenital disorders SHFM type IV and EEC. In cooperation with Dr. Guerrini (Univ. Milano) and Dr. Costanzo (Univ. Roma) we have evidence that *p63* controls expression of *Dlx5-Dlx6*, which in turn regulate FGF8 and Wnt5a. FGF8 promotes *p63* protein stability by antagonizing the isomerase Pin1, which tends to degrade *p63*. These regulations are needed for normal limb development.



We believe that the SHFM and EEC animal models offer a unique opportunity to optimize procedures for AAV-mediated gene transfer to the embryonic limb (the AER) and skin (epithelial progenitor cells), first in ex-vivo limb cultures and then in vivo (with Dr. Auricchio TIGEM Pozzuoli). If successful, the congenital defects of SHFM and EEC could in principle be corrected in-utero.

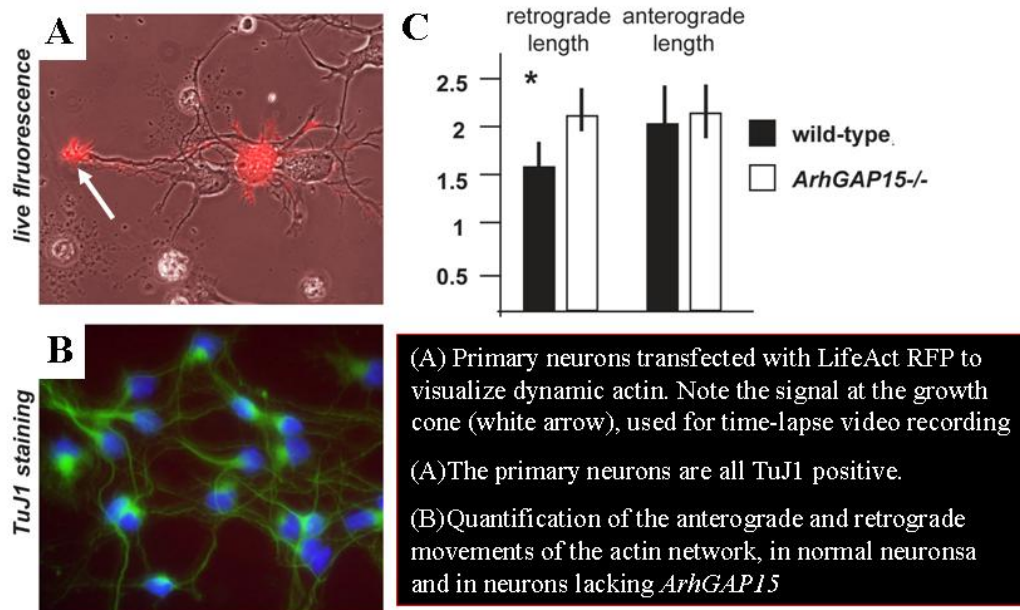
The role of Dlx transcription factors for interneuron development

Dlx genes are expressed in a temporal and spatial sequence in neurogenic area of the embryonic and adult forebrain (peri-ventricular region, hippocampus) and in most of the regions where GABA differentiation takes place, including migrating interneuron progenitors. The absence of *Dlx5* leads to loss of CR and TH interneurons in the olfactory regions of the neonatal brain. Using the neurosphere and the adherent NS methods to expand neural stem cells we have shown that *Dlx5*^{-/-} NSC have a reduced neuronal differentiation potential, thus *Dlx5* may control critical steps necessary for differentiation of interneuron progenitors.



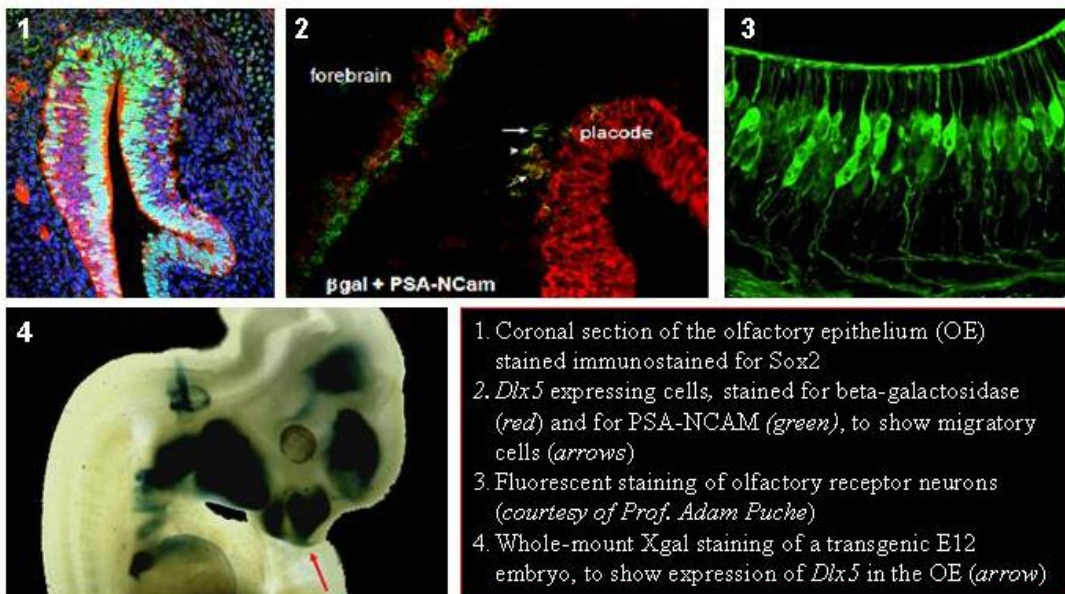
We aim to clarify a molecular signature for GABA⁺ differentiation and comprehend the role of *Dlx* genes in this process. Transcription profiling of *Dlx5*^{-/-} neurospheres has led us to recognize the secreted signalling molecule *Wnt5a* as a candidate for a *Dlx5* target, capable of promoting interneuron differentiation. We have functionally validated this regulation, using both primary culture of dissociated brain cells and adherent neural progenitor cells that recapitulates GABA⁺ interneuron differentiation, in vitro. We are now addressing the function of *Dlx5* in the adult cortex and hippocampus, using a cre-lox conditional technology (with Dr. Levi, CNRS Paris, FR). These results will be combined with data from single-cell RNAseq analyses of cortical neurons (with Dr. Zecchina, Politecn.Torino).

A new line of investigations addresses the role of the small GTPase Rac1 for migration maturation and electrical activity of the inhibitory network during cortical and hippocampal development. Preliminary results indicate that Rac1 hyperactivation leads to altered actin dynamic at the growth cone, increased risk of seizure, cognitive and electrophysiological defects.

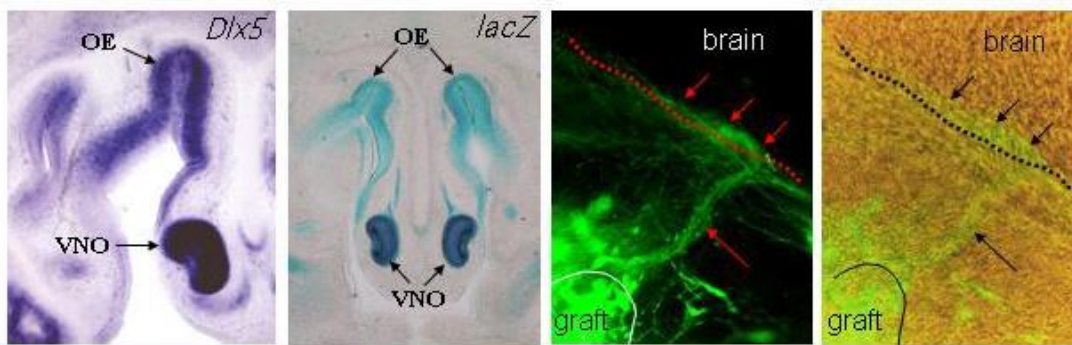


Axon Extension and Connectivity in the Olfactory System

During embryonic development, immature olfactory neurons project their axons towards the anterior forebrain, to establish the primitive connections; at the same time GnRH⁺ neurons use these axons to reach the septum-hypothalamus area. This process is specifically impaired in the Kallmann syndrome, characterized by the inability to perceive odors and defective GnRH hormonal system.

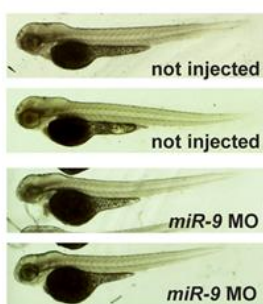
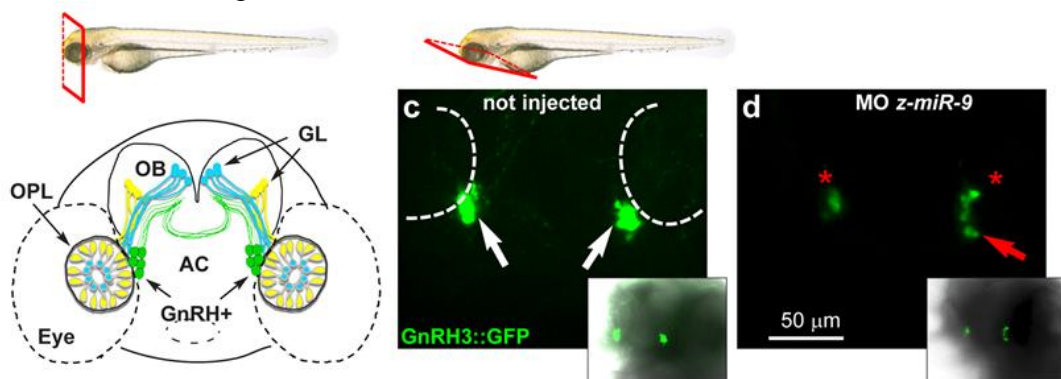


While several Kallmann-associated genes are known, the molecules involved in guidance and connectivity of olfactory axons are not well known. We have identified a Wnt responsive cell population on the surface of the OB, involved in olfactory connectivity, using a combination of a transgenic b-catenin reporter with organotypic cultures of the embryonic nasal region.



(left) In the peripheral nervous system *Dlx5* is expressed in the olfactory epithelium and vomero-nasal organ. (right) Grafting of *GFP+* (green) olfactory placodes onto organ-type cultures of embryonic heads, to visualize the extension, guidance and connectivity of the olfactory axons towards the forebrain.

The absence of *Dlx5* leads to a Kallmann-like phenotype, thus, *Dlx5* controls early steps in the guidance/connectivity of the olfactory axons. Using transcription profiling of the embryonic olfactory epithelium and bioinformatic analyses we have identified coding mRNAs and microRNA involved in the process (with Dr. Provero, Univ. Torino). We are also adopting lines or reporter zebrafish to image the olfactory and GnRH neurons, and provide functional information on novel Kallmann-associated genes (with Dr. Santoro, Univ. Torino, Dr. Pitteloud, Lausanne CH).



(top left) general organization of the olfactory and GnRH neurons in zebrafish. The olfactory axons are labeled with two markers, OMP and *Trcp2*, linked to blue and yellow fluorescence, respectively. The GnRh neurons are marked with green fluorescence.
 (top right) Example of GnRH-GFP cells in normal (left) or morpholino-treated (right) fish embryos. In this case miR-9 was depleted and a reduced number of GFP+ neurons is observed.

Added value of this research resides on the peculiarity of the adult peripheral olfactory system to renew its neural component: progenitor cells give rise to new neurons, these extend axons to the OB to re-establish connections and topography. On the long term, investigations on the regulatory network used for olfactory connectivity may have more general implications for the biology of nerve regeneration and repair.

(in italiano)

L' argomento generale è lo studio dei fattori di trascrizione e molecole segnale rilevanti per lo sviluppo embrionale del cervello, della testa e degli arti. I nostri sistemi sperimentali combinano la

genetica in vivo, colture d'organo, cellule staminali. Recentemente abbiamo esteso i nostri interessi ai profili trascrizionali e alla bioinformatica.

Gli argomenti specifici sono:

- 1) il ruolo dei geni *Dlx* e *p63* per lo sviluppo e la morfogenesi degli arti, alla luce della malattia congenita umana Split-Hand-Foot Malformation (SHFM)
- 2) il pathway molecolare controllato da *Dlx5* durante il differenziamento delle cellule neurali staminali a neuroni GABA+
- 3) la regolazione molecolare dell'estensione assonale, guidance e connettività del sistema sensoriale olfattivo, e della migrazione dei neuroni GnRH, alla luce della malattia genetica Kallmann syndrome
- 4) Sviluppo e maturazione delle network di neuroni inibitori GABAergici della corteccia cerebrale e ippocampo

Sviluppo degli arti

I geni *Dlx* sono espressi all'apice delle appendici di tutte le specie animali, compresi gli arti embrionali. Nell'uomo, mutazioni o mis-organizzazioni genomiche di *DLX5* e *DLX6* causano la malformazione SHFM tipo 1. Abbiamo precedentemente pubblicato che la eliminazione combinata di *Dlx5+Dlx6* nel topo causa la stessa malformazione, aprendo quindi la possibilità di studiare i determinanti cellulari e molecolari di questa malattia.

Ci stiamo focalizzando sulla network regolativa che comprende *Dlx5;Dlx6* e *p63*, un fattore di trascrizione essenziale per il mantenimento delle cellule staminali epidermiche e la loro stratificazione. Mutazioni di *p63* nell'uomo causano le malformazioni SHFM tipo 4 e la EEC. In collaborazione con la Dr.ssa Guerrini (Univ. Milano) e il Dr. Costanzo (Univ. Roma) abbiamo dimostrato che *p63* regola *Dlx5;Dlx6*, i quali regolano a loro volta *FGF8* e *Wnt5a*. *FGF8* promuove la stabilità di *p63* in quanto antagonizza la isomerasi *Pin1*, che tende a degradare *p63*. Il ruolo di *Wnt5a* è ancora da chiarire.

Crediamo che i modelli animali di SHFM e EEC offrano l'opportunità unica di ottimizzare delle procedure di trasferimento genico mediante AAV ai tessuti embrionali, prima in colture d'organo ex-vivo, poi direttamente in utero. Stiamo esplorando questa possibilità in collaborazione con il Dr. Auricchio (TIGEM, Pozzuoli). Un risultato positivo sarebbe essenziale per affermare che, in principio, una malattia genetica dello sviluppo potrebbe essere corretta già in utero.

Ruolo dei fattori trascrizionali Dlx per lo sviluppo degli interneuroni

I geni Dlx sono espressi secondo un ordine spaziale e temporale nelle aree neurogeniche del cervello embrionale e adulto, deputate alla genesi dei neuroni inibitori GABAergici. Sono anche espressi negli stessi neuroni durante il differenziamento e nella vita adulta. In assenza di *Dlx5* si osserva una riduzione dei neuroni CR e TH positivi (GABAergici) delle regioni olfattive del cervello neonatale. Utilizzando il modello neurosfere e il modello NS aderenti per espandere i progenitori neurali, abbiamo visto che questi progenitori *Dlx5*^{-/-} mostrano un ridotto potenziale differenziativo, quindi *Dlx5* controlla un passaggio critico del differenziamento precoce interneuronale.

Intendiamo chiarire la signature molecolare del differenziamento GABAergico e comprendere il ruolo di *Dlx5* in questo processo. I profili trascrizionali delle neurosfere *Dlx5*^{-/-} hanno individuato *Wnt5a* come target di Dlx5 capace di promuovere il differenziamento GABAergico. Abbiamo validato questa regolazione funzionalmente, usando sia colture primarie di neuroni corticali che cellule NS aderenti, le quali ricapitolano il differenziamento GABA⁺ in vitro. Al momento stiamo indagando sulla funzione di Dlx5 negli interneuroni adulti corticali e ippocampali, utilizzando tecnologie cre-lox per l'inattivazione condizionale (in collaborazione con Dr. Levi, CNRS Parigi). I risultati verranno combinati con dati provenienti da single-cell RNAseq di neuroni corticali (con Dr. Zecchina Politecn. Torino).

Una nuova linea di indagine, in collaborazione con Dr. Hirsch (Univ. Torino) riguarda il ruolo della GTPasi Rac1 per la migrazione, maturazione e attività elettrica degli interneuroni corticali e ippocampali

Estensione e collegamento assonale del sistema olfattivo – Malattia di Kallmann

Durante lo sviluppo embrionale, i neuroni olfattivi immaturi proiettano il loro assone verso il cervello anteriore a forma le prime connessioni. Allo stesso tempo i neuroni GnRH migrano dal placode verso la regione olfattiva del cervello, e da lì all'ipotalamo dove svolgono un ruolo centrale nella maturazione sessuale, gametogenesi e riproduzione. Questo processo è difettoso nella Malattia di Kallmann, una condizione congenita di ipogonadismo centrale e incapacità di percepire gli odori. Anche se molti geni associati alla malattia di Kallmann sono noti, i meccanismi di guidance assonale e di migrazione dei neuroni GnRH sono ancora poco noti. Abbiamo individuato una importante segnalazione da parte delle molecole Wnt sulla superficie dei bulbi olfattivi, importante per i collegamenti assonali, utilizzando una strategia combinata di colture organotipiche e topi transgenici reporter per b-catenina nucleare.

In assenza di *Dlx5* osserviamo un chiaro fenotipo Kallmann nel topo. Quindi *Dlx5* controlla qualche tappa precoce essenziale per lo sviluppo olfattivo e GnRH. Abbiamo generato i profili trascrizionali del tessuto olfattivo *Dlx5*^{-/-} e condotto le relative analisi bioinformatiche (con Dr. Provero, Univ. Torino) per arrivare a individuare alcuni geni coding e microRNA coinvolti in questo processo. Recentemente stiamo adottando linee transgeniche del pesce zebra per visualizzare lo sviluppo olfattivo e ricavare dati funzionali su nuovi possibili geni Kallmann (con Dr. Santoro, Univ. Torino, Dr. Pitteloud, Lausanne CH).

Un valore aggiunto di queste ricerche risiede nel fatto che il tessuto sensoriale olfattivo è in grado di rigenerare gli elementi cellulari e i collegamenti assonali, a seguito di traumi o danni chimici parziali, che in altre zone del CNS e PNS risulta invece molto inefficiente se non assente. Nel lungo periodo, la conoscenza sulle network regolative importanti per lo sviluppo delle connessioni olfattive potrebbe avere implicazioni più generali per la biologia della rigenerazione e riparo delle lesioni al sistema nervoso.

Pubblicazioni Rilevanti

- Zaghetto A, Paina S, Mantero S, Platonova N, Peretto P, Bovetti S, Puche A, Piccolo S, Merlo G. (2007) Activation of the *Wnt*- β -catenin pathway in a cell population on the surface of the forebrain is essential for the establishment of olfactory axon connections. **J. Neurosci.** 27: 9757-9768
- LoIacono N, Mantero S, Chiarelli A, Garcia E, Mills A, Morasso M, Costanzo A, Levi G, Guerrini L. and Merlo G. (2008) Regulation of *Dlx5* and *Dlx6* gene expression by p63 is involved in EEC and SHFM congenital limb defects. **Development** 135: 1377-1388
- Lopardo T., LoIacono N., Marinari B., Giustizieri M.L., Cyr D., Merlo G., Crosti F., Costanzo A., Guerrini L. (2008) Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development. **PLoS One**, Vol 3 (issue 7): e2715.
- Moretti F., Marinari B., LoIacono N., Botti E., Giunta A., Spallone G., Garaffo G., Vernersson-Lindhal E., Merlo G., Mills A.A., Ballarò C., Alemà S., Chimenti S., Guerrini L. and Costanzo A. (2010) A regulatory feed-back loop involving p63 and IRF6 links the pathogenesis of two genetically different ectodermal dysplasias. **J. Clin. Invest.** 120(5): 1570–1577
- Vieux-Rochas M., Mantero S., Heude E., Barbieri O., Astigiano S., Couly G., Kurihara H., Levi G. and Merlo G.R. (2010) Spatio-temporal dynamics of gene expression of the *Edn1-Dlx5/6* pathway during development of the lower jaw. **Genesis**, 48: 362-373
- Paina S., Garzotto D., DeMarchis S., Moiana, A., Cattaneo, E., Conti L., Perera M., Corte, G., Calautti E. and Merlo G.R. (2011) *Wnt5a* is a transcriptional target of *Dlx* genes and promotes differentiation of olfactory interneuron progenitors. **J. Neurosci.** 31: 2675-2687
- Guerrini L., Costanzo A. and Merlo G.R. (2011) A symphony of regulations centered on p63 to control development of ectoderm-derived structures. **J. Biomed. Biotech.** Vol 2011, pag. 1-13 (invited review).
- Vieux-Rochas M, Bouhali K, Mantero S, Garaffo G, Provero P, Barbieri O, Caratozzolo M, Tullo A, Lallemand Y, Robert B, Levi G, Merlo G.R. (2013) Bmp-mediated functional cooperation between *Dlx5;Dlx6* and *Msx1;Msx2* during mammalian limb development. **PLoS One**, 8: e51700
- Garaffo G, Provero P., Molineris I, Pinciroli P, Peano C., Battaglia C., Tomaiuolo D., Etzion T., Gothilf Y., Santoro M., Merlo G.R. (2013) Profiling, bioinformatic and functional data on the developing olfactory/GnRH system reveal cellular and molecular pathways essential for this process and potentially relevant for the Kallmann syndrome. **Front. Endocrinol.** 4:203. doi: 10.3389/fendo.2013.00203. PMID: 24427155
- Restelli, M., Lopardo T., Lo Iacono N., Garaffo G., Conte D., Rustighi A., Napoli M., Del Sal G., Perez-Morga D., Costanzo A., Merlo G.R. and Guerrini L. (2014) *DLX5, FGF8* and the *Pin1* isomerase control Δ Np63 α protein stability during limb development: a regulatory loop at the basis of the SHFM and EEC congenital malformations. **Hum. Mol. Genet.** 23: 3830-3842.
- Bonomi M, Cappa M, Cariboni A, Di Schiavi E, Fabbri A, Ferlin A, Foresta C, Ghizzoni L, Jannini E, Krausz C, Loche S, Lombardo F, Maggi M, Maggi R, Maghnie M, Mancini A, Merlo G, Panzica G, Radetti G, Russo G, Simoni M, Sinisi AA, Persani L. (2014) Kallmann's syndrome and normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism: two largely overlapping manifestations of one rare disorder. **J. Endocrin Invest.** 37(5):499-500

Conte D., Guerrini L. and Merlo G.R. (2015) Novel cellular and molecular interactions during limb development, revealed from studies on the Split Hand-Foot congenital malformation. Book Chapter **InTech, Open Science**. Embryology, ISBN 978-953-51-4214-0. *in press*.

Molineris I., Santoro R., Garaffo G., Provero P. and Merlo G.R. (2015) The contribution of developmental biology to human genetics in the era of next-gen genome sequencing: what we are learning from studying the Kallmann syndrome” **Trends Dev.** *in press*.

Garaffo G, Conte D., Provero P., Tomaiuolo D., Luo Z., Pinciroli P, Peano C., Battaglia C., Etzion T., Gothilf Y., Gays D., Santoro M.M. and Merlo G.R. (2015) Dlx5 and Foxg1 transcription factors, linked via microRNAs, are required for olfactory development and GnRH neuron migration. **Mol. Cell. Neurosci.** *in press*.

Restelli M., Marinari B., Gnesutta N., Conte D., Merlo G.R., Costanzo A., Guerrini L. (2015) FGF8, c-Abl and p300 cooperate in the regulation of $\Delta Np63\alpha$ protein stability. **Hum Mol Genet**, *under revision*.

Composizione del gruppo

Daniele Conte	daniele.conte@unito.it	338-8409520
Maria Armentano	maria.armentano@unito.it	340-4725975
Roberto Santoro	roberto.santoro90@gmail.com	349-1786083
Valentina Zamboni	valentina.zamboni@edu.unito.it	347-1917068
Giulia Zuccarini	zuccarini.g@gmail.com	327-3345593
Mattia Pagani	mattia.pagani@edu.unito.it	346-1442890