ABSTRACT

The discovery of the contribution of alterations in the epigenome to genetic diseases has driven research into epidrugs that target such alterations. 22q11.2 deletion syndrome, also called DiGeorge syndrome, is a rare genetic disease that is primarily a disease of *TBX1* haploinsufficiency. Studies conducted in animal models of 22q11.2DS, and especially in *Tbx1* mutant mice, suggest that epigenetic changes at the *Tbx1* locus might contribute to disease pathogenesis. Therefore, epidrugs capable of modulating *TBX1* expression are of particular interest because of their potential to increase our understanding of the mechanisms by which *Tbx1* is regulated during embryogenesis, which are largely unknown. They may also have therapeutic value for treating some of the signs and symptoms of 22q11.2DS, although many of these are congenital anomalies and therefore not amenable to pharmacological intervention.

The major goal of this research project was to identify epigenetic changes in the form of histone modifications that are *Tbx1*-activating in cell cultures and in embryonic tissues. For this, I used two different approaches; the first was a candidate drug approach for which I selected epidrugs that target histone modifications that are generally associated with gene activation. I then tested the ability of single and combined epidrug treatments to increase *Tbx1* expression in two cell culture systems. The second was a bioinformatics-based approach, in which a newly developed algorithm was applied to extract information about histone modifications across the mouse genome from large datasets of gene expression and chromatin organization deposited in public databases and integrate it with the sequence of newly identified putative *Tbx1* enhancers. This novel approach allowed me to identify the most highly represented histone modifications associated with activation of the *Tbx1* locus.

The goals of the project were largely met, as each approach identified two putative *Tbx1*-activating histone modifications. In addition, I identified a combination of epidrug treatment that targets these modifications and increases *Tbx1* expression in cells. In future experiments, the combined epidrug treatment regime will be used to determine the *in vivo* relevance of these *Tbx1*-activating histone modifications through phenotypic rescue experiments in *Tbx1* mutant mice.

ABSTRACT

La scoperta del contributo delle alterazioni dell'epigenoma nelle malattie genetiche ha spinto la ricerca verso gli epifarmaci (epidrugs) in grado di mirare a tali alterazioni. La sindrome da delezione 22q11.2, anche chiamata sindrome di DiGeorge, è una malattia genetica rara caratterizzata principalmente dall'aploinsufficienza di *TBX1*. Studi condotti su modelli animali della sindrome 22q11.2DS, in particolare nei topi mutanti *Tbx1*, suggeriscono che modifiche epigenetiche nel locus di *Tbx1* potrebbero contribuire alla patogenesi della malattia. Pertanto, gli epidrugs in grado di modulare l'espressione di *TBX1* rivestono particolare interesse sia per il loro potenziale nel migliorare la comprensione dei meccanismi con cui *Tbx1* è regolato durante l'embriogenesi, ancora in gran parte sconosciuti, sia per il loro possibile valore terapeutico nel trattamento di alcuni segni e sintomi della sindrome 22q11.2DS. Tuttavia, molte di queste sono anomalie congenite e quindi non suscettibili di intervento farmacologico.

L'obiettivo principale di questo progetto di ricerca è stato identificare le modifiche epigenetiche, sotto forma di modifiche istoniche, che attivano *Tbx1* in colture cellulari e nei tessuti embrionali. A tale scopo, sono stati utilizzati due approcci differenti. Il primo approccio è stato di tipo farmacologico e ha previsto la selezione di epidrugs mirati a modifiche istoniche generalmente associate all'attivazione genica. Questi composti sono stati testati, sia singolarmente che in combinazione, per valutarne la capacità di aumentare l'espressione di *Tbx1* in due modelli di coltura cellulare. Il secondo approccio, di natura bioinformatica, ha previsto l'applicazione di un nuovo algoritmo per estrarre informazioni sulle modifiche istoniche lungo il genoma murino da ampi dataset di espressione genica e organizzazione della cromatina depositati in banche dati pubbliche. Questi dati sono stati poi integrati con la sequenza di potenziali *enhancers* di *Tbx1* recentemente identificati. Questo approccio innovativo ha permesso di individuare le modifiche istoniche maggiormente associate all'attivazione del locus *Tbx1*.

Gli obiettivi del progetto sono stati ampiamente raggiunti, poiché ciascun approccio ha portato all'identificazione di due possibili modifiche istoniche attivanti per *Tbx1*. Inoltre, è stata individuata una combinazione di epidrugs che prende di mira queste modifiche e aumenta l'espressione di *Tbx1* nelle cellule. Nei futuri esperimenti, questo regime di trattamento combinato con epidrugs verrà utilizzato per determinare la rilevanza *in vivo* delle modifiche istoniche attivanti *Tbx1* attraverso esperimenti di *rescue* fenotipico nei topi mutanti *Tbx1*.