



# Geni TBX e patologia umana

Daniela Romagno





# Geni tbx e patologia umana

**Danlela Romagno**



Firenze University Press

SCUOLE DI DOTTORATO

- 1 -



# GENI TBX E PATOLOGIA UMANA

Daniela Romagno

Firenze University Press  
2002

Geni TBX e patologia umana / Daniela Romagno. - Firenze : Firenze University Press, 2002.

(Scuole di dottorato, 1)

<http://epress.unifi.it>

ISBN edizione print 88-8453-055-5

ISBN edizione on-line 88-8453-055-5

575.1 (ed. 20)

Genetica - Patologia medica

Questo volume è la pubblicazione della tesi prodotta dall'autrice per la specializzazione in Genetica medica presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", direttore prof. Bruno Dallapiccola, relatore prof. Antonio Pizzuti, anno accademico 2000/2001.

*Print on demand is available*

© 2002 Firenze University Press

Università degli Studi di Firenze

Firenze University Press

Borgo Albizi, 28

50122 Firenze, Italy

<http://epress.unifi.it/>

*Printed in Italy*

## INDICE

INTRODUZIONE .....	1
1. SOTTOFAMIGLIA T .....	9
1.1 Gene T .....	9
1.2 Gene TBX19 .....	10
1.3 Gene TBX23 .....	11
2. SOTTOFAMIGLIA Tbx1 .....	13
2.1 Gene TBX1 .....	13
2.2 Gene TBX10 .....	27
2.3 Gene TBX15 .....	28
2.4 Gene TBX18 .....	29
2.5 Gene TBX20 .....	29
2.6 Gene TBX22 .....	29
3. SOTTOFAMIGLIA Tbx2 .....	33
3.1 Gene TBX2 .....	36
3.2 Gene TBX3 .....	39
3.3 Gene TBX4 .....	44
3.4 Gene TBX5 .....	45
4. SOTTOFAMIGLIA Tbx6 .....	59
4.1 Gene TBX6 .....	59
4.2 Gene MGA .....	60
5. SOTTOFAMIGLIA Tbr1 .....	61
5.1 Gene TBR1 .....	61
5.2 Gene EOMES (TBR2) .....	62
5.3 Gene TBX21 (TBET) .....	63
CONCLUSIONI .....	65
BIBLIOGRAFIA .....	67





## INTRODUZIONE

È noto da tempo che il gene *Brachyury* (coda corta) o gene T (*tail*) ha un ruolo importante nelle prime fasi dello sviluppo dei vertebrati. Topi eterozigoti per una mutazione del gene *Brachyury* hanno la coda corta mentre negli embrioni con una mutazione in omozigosi la notocorda è assente, i somiti posteriori al settimo sono assenti o notevolmente anomali e la linea primitiva è fortemente ispessita. Nonostante la gravità di questi difetti, la morte dell'embrione in 10°-11° giornata avviene per mancato nutrimento, causato, a sua volta, da un non corretto sviluppo dell'allantoide con conseguente mancata connessione con la placenta (Chesley, 1935; Glueckson-Schoenheiner, 1944).

Il gene *Brachyury*, nel topo, è stato clonato da Herrmann *et al.* nel 1990 i quali hanno scoperto che esso codifica per una proteina di 436 aminoacidi. Questa proteina è espressa, inizialmente, dalle cellule della linea primitiva, all'inizio della gastrulazione e la sua espressione persiste durante le fasi successive della gastrulazione sia nell'ectoderma adiacente alla linea primitiva, sia nel mesoderma di nuova formazione. L'espressione diminuisce nella fase in cui le cellule migrano dalla linea primitiva alle regioni laterali e parassiali, persistendo, però, in quelle cellule che mancano nel mutante omozigote, cioè quelle della notocorda e quelle dell'abbozzo caudale dell'embrione (Herrmann *et al.*, 1990).

Studi sulla proteina codificata dal gene *Brachyury* hanno consentito di stabilire che essa è una DNA-binding protein che funziona come fattore di trascrizione tessuto-specifico (Kispert e Herrmann, 1993; Kispert *et al.*, 1995a; Conlon *et al.*, 1996); il suo ruolo nella differenziazione della notocorda e del mesoderma posteriore, durante la gastrulazione, si esplica attraverso il controllo della trascrizione in maniera dose-dipendente (Cunliffe e Smith, 1992; Smith, 1995).

Omologhi del gene *Brachyury* che mostrano struttura, *pattern* di espressione e funzione altamente conservati, oltre che nell'uomo (Edwards *et al.*, 1996), sono

stati trovati, tra i vertebrati ed i cordati in generale, nel cane (Haworth *et al.*, 2001), nei bovini (Hue *et al.*, 2001), nel pollo (Kispert *et al.*, 1995b), in *Xenopus* (Smith *et al.*, 1991), nel tritone (Sone *et al.*, 1997), nel pesce zebrato (Schulte-Merker *et al.*, 1992), nell'anfiosso (Holland *et al.*, 1995), nei larvacei (Bassham e Postlethwait, 2000) e negli ascidiacei (Yasuo e Satoh, 1994; Corbo *et al.*, 1997). Negli invertebrati privi di corda dorsale, omologhi del gene *Brachyury* sono stati ritrovati nell'idra (Technau e Bode, 1999), in *Ptychodera flava* (Tagawa *et al.*, 2000), nella stella di mare (Shoguchi *et al.*, 1999), nel riccio di mare (Harada *et al.*, 1995) e in *Drosophila* (Kispert *et al.*, 1994); anche se in questi casi è più difficile rilevare omologie funzionali, nel riccio di mare è stato riscontrato un picco di attività del gene durante la gastrulazione ed in *Drosophila* sono stati riportati dati che indicano una sua implicazione nello sviluppo delle strutture posteriori.

La prima indicazione che *Brachyury* fosse un membro di una famiglia genica è scaturita dall'osservazione che il prodotto del gene omb (*optomotor-blind*) di *Drosophila* presentava un'estesa omologia di sequenza con la regione DNA-binding del prodotto del gene *Brachyury*, pur essendo molto diverso per quanto riguarda il resto della sequenza, per la grandezza e per la posizione della regione DNA-binding all'interno della proteina (Pflugfelder *et al.*, 1992). Questo suggerì che la cosiddetta T-box, il dominio di legame con il DNA, avrebbe potuto caratterizzare una nuova famiglia di proteine presente sia nei vertebrati che negli invertebrati e, in effetti, diversi studi successivi hanno confermato questa idea. Infatti, in molte specie animali (topo, pollo, tritone, pesce zebrato, *Xenopus*, ascidiacei, anfiosso, riccio di mare, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Ptychodera flava*) come anche nell'uomo, sono state identificate diverse proteine che hanno in comune una T-box di 180-200 residui aminoacidici (Agulnik *et al.*, 1996; Smith, 1997).

Negli anni successivi alla scoperta della similitudine tra il gene *Brachyury* del topo e il gene omb di *Drosophila* si sono accumulati un gran numero di dati e a tutt'oggi sono stati scoperti almeno 20 distinti membri della famiglia T-box in diversi gruppi animali di cui i meglio caratterizzati sono riportati in tab. 1; (Papaioannou, 2001).

Sebbene i polipeptidi codificati dai vari geni della famiglia siano molto diversi, la spiccata conservatività della regione T-box depone fortemente per una altrettanto spiccata conservatività della funzione DNA-binding. Per alcune di queste proteine, come nel caso di quella codificata dal gene omb in *Drosophila* e VegT in *Xenopus*, questo tipo di attività è stata dimostrata sperimentalmente (Pflugfelder *et al.*, 1992; Zhang e King, 1996). In pratica, i prodotti dei vari geni della famiglia T-box hanno una sequenza aminoacidica altamente conservata con attività DNA-binding ed il resto della sequenza, contenente domini che possono essere coinvolti in interazioni con altre proteine, che differisce e che, probabilmente, conferisce una attività specifica ad ogni membro (Law *et al.*, 1995).

Tab. 1 Geni della famiglia T-box in varie specie animali (da Papaioannou, 2001; modificata).

Sotto-famiglia T-box	Idra	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Riccio di mare	Stella di mare	<i>P. flava</i>	Larvacei	Ascidacei	Anfiosso	Pesce zebrato	Xenopus	Tritone	Pollo	Topo	Uomo
T	HyBra1		Trg	HpTa, SpBra	ApBra	PfBra	OdiT	AsT,CiBra	AmBra	Zft	Xbra	CpBra	T	T	T
Tbx1			org1						AmphiTbx1			NvTbox2		Tbx1	TBX1
														Tbx10	TBX10
		tbx17							AmphiTbx15			NvTbox4		Tbx15	TBX15
		tbx12	H15									NvTbox3			TBX18
									AmphiTbx20	tbx20				Tbx20	TBX22
Tbx2		tbx2	omb												TBX20
									CiVegTR	tbx2	Tbx2	CpTbx2		Tbx2	TBX2
										tbx3	ET	CpTbx3		Tbx3	TBX3
										tbx4	Tbx4			Tbx4	TBX4
										tbx5	Tbx5	NvTbox1		Tbx5	TBX5
Tbx6															
									AmphiTbx6	tbx6		CpTbx6R		Tbx6	TBX6
												CpUbiqT		Mga	MGA
										tbx16	VegT		Tbx6L		
Tbr1					PfTbrain				AmphiTbr1	tbr1	Eomes	CpEomes	Tbr1	Tbr1	TBR1
													Tbr2	Eomes	EOMES
n.c.*		tbx7						AsT2						Tbet	TBX21

\* geni non classificabili in nessuna sottofamiglia.

Dallo studio dei geni Tbx del topo e dei geni ortologhi trovati nelle altre specie si desume che la famiglia genica T-*box* è molto antica e che l'iniziale espansione da una singola sequenza progenitrice potrebbe essersi verificata all'inizio dell'evoluzione dei Metazoi (Agulnik *et al.*, 1996). Ulteriori espansioni per duplicazione genica si sarebbero avute nelle singole linee evolutive. Le comparazioni filogenetiche hanno consentito la suddivisione dei geni T-*box* in 5 sottofamiglie (tab. 1) i cui membri derivano da più recenti duplicazioni (Chapman *et al.*, 1996). Sulla base dell'epoca di comparsa delle varie linee geniche, è stato stimato che il genoma della maggior parte delle specie animali abbia almeno 5 geni T-*box* (Papaioannou e Silver, 1998) rappresentati dalle sottofamiglie riportate in tabella 1 e che i cordati potrebbero averne 8 o più (Ruvinsky *et al.*, 2000).

I vari geni della famiglia T-*box* vengono espressi in diversi tessuti, in vari stadi dello sviluppo, soprattutto embrionario ed anche, in misura minore, nell'adulto (Papaioannou e Silver, 1998). I *patterns* di espressione e le funzioni dei geni ortologhi della famiglia T-*box* come è stato esposto per il gene *Brachyury* del topo ed i geni equivalenti di altre specie, anche molto distanti a livello evolutivo, sono molto simili. Per quanto riguarda i geni della famiglia T-*box* non ortologhi all'interno di specie strettamente correlate o della stessa specie, il grado di condivisione del *pattern* di espressione e dei domini funzionali dei loro prodotti è commisurabile al grado di relazione filogenetica; in pratica si può ritrovare, come nel caso dei paraloghi Tbx2/Tbx3 e Tbx4/Tbx5 del topo, che due geni derivati da duplicazioni evolutivamente recenti hanno funzioni ridondanti nelle aree in cui entrambi sono espressi e funzioni uniche nelle aree dove sono espressi singolarmente (Papaioannou e Silver, 1998; Smith, 1999).

Non si conosce molto delle modalità di funzionamento dei geni T-*box*. In particolare, poco è noto relativamente ai geni che regolano la loro attività, ai geni *target* ed a come venga esplicata l'azione dei loro prodotti proteici. In molti casi le informazioni disponibili sono limitate al *pattern* di espressione. Le informazioni più dettagliate riguardano il gene T e da queste si può partire per indirizzare le ricerche sugli altri membri della famiglia. È stato dimostrato che, nel prodotto proteico del gene T, il dominio che si lega al DNA (T-*box*) è contenuto all'interno dei primi 229 aminoacidi, nella metà amino-terminale, mentre nella regione carbossi-terminale sono contenuti due domini di transattivazione con azione di promozione della trascrizione e due domini con azione repressiva sulla trascrizione (Papaioannou, 2001); bisogna precisare, comunque, che i prodotti dei geni omologhi in *Xenopus* e nel pesce zebrato mostrano un unico sito di transattivazione che promuove la trascrizione e che la principale funzione del gene T è, in ogni caso, l'attivazione della trascrizione (Smith, 1997). Una procedura per l'individuazione del sito di legame al DNA basata sulla PCR ha rivelato che la proteina si lega preferenzialmente come dimero in corrispondenza di una sequenza di 20 nucleotidi parzialmente palindro-

mica: T[G/C]ACACCTAGGTGTGAAATT (Kispert e Herrmann, 1993). In *Xenopus* la struttura cristallografica del dominio *T-box* legato al DNA rivela che questo, a livello della sequenza palindromica, interagisce sia con il solco maggiore che con il solco minore del DNA (Muller e Herrmann, 1997). Studi più recenti, comunque, hanno dimostrato che la proteina codificata dal gene T può legarsi anche come monomero ad una metà della sequenza palindromica che può essere variamente orientata e distribuita. Il numero e la spaziatura dei siti di legame influenzano, in saggi di trascrizione *in vitro*, sull'attività di regolazione, per cui è possibile che, *in vivo*, la proteina T possa interagire solo con "emisiti" spazati ed orientati in una certa maniera (Casey *et al.*, 1998; Tada *et al.*, 1998). È possibile, inoltre, che la selezione di un appropriato sito di legame possa essere influenzata da fattori che interagiscono con la proteina T o con il sito stesso. Poiché tutte le proteine *T-box* finora studiate possono legare la sequenza *target* del gene T (Carreira *et al.*, 1998; Tada *et al.*, 1998; Hsueh *et al.*, 2000) si pensa che la specificità di azione dei vari membri della famiglia non risieda nel dominio di legame con il DNA ma negli altri domini. È possibile che questa sia determinata dall'associazione con diversi cofattori che potrebbero essere importanti anche nel conferire una azione di promozione o repressiva della trascrizione (Tada e Smith, 2001). Tuttavia, visto che, probabilmente, le proteine *T-box* possono legarsi al DNA sia come monomeri che come omodimeri o eterodimeri, una parte della specificità di azione potrebbe essere effettivamente dovuta al tipo di legame che si forma con il DNA. In ogni caso, per capire come le proteine *T-box* esercitino le loro specifiche funzioni è necessario identificare i geni *target*. Finora sono stati individuati geni *target* diretti, nel senso che nei loro elementi regolatori è stata rilevata la presenza di un sito di legame *T-box* funzionale e geni *target* potenziali, i quali devono essere ulteriormente studiati (tab. 2).

Si tratta di geni che hanno ruoli chiave nella specificazione dei tipi cellulari e nella morfogenesi e sembra probabile che, almeno alcuni di essi, debbano mediare, a loro volta, le funzioni dei loro regolatori *T-box* in questi ruoli. Gli studi più importanti, a questo riguardo, sono stati condotti su *Xenopus* in cui è stato dimostrato che i geni *Xbra*, *Eomes* e *VegT* sono attivati da molecole segnale delle famiglie TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) e FGF (*fibroblast growth factor*); a loro volta i fattori di trascrizione prodotti da questi geni regolano i geni specifici del mesoderma, per almeno uno dei quali (eFGF) è stata dimostrata una azione di controllo su *Xbra*. I geni *Xbra*, *Eomes* e *VegT*, inoltre, autoregolano la propria espressione e svolgono una attività di regolazione gli uni sugli altri con una limitazione consistente nel fatto che *Xbra* non può indurre l'espressione di *Eomes* (fig. 1; Papaioannou e Silver 1998).

Tutte queste azioni sono sensibili al dosaggio. *Xbra*, per esempio, è sensibile al dosaggio di fattori di crescita dei fibroblasti (Papaioannou e Silver 1998) e la sua espressione nell'area che darà origine al mesoderma, in una fase precoce della gastrulazione, avviene in risposta all'attivina (membro della famiglia TGF $\beta$ ); l'atti-

Tab. 2 Geni *target* diretti ed alcuni geni *target* potenziali dei prodotti dei geni T-box (da Tada e Smith, 2201; modificata).

Gene	Specie	Gene T-box	Trascrizione	Espressione	Funzione
Target diretti					
eFGF	<i>Xenopus</i>	Xbra	attivata	zona marginale	formazione e distribuzione del mesoderma
Bix4	<i>Xenopus</i>	Xbra, VegT	attivata	zona marginale e polo vegetativo	formazione e distribuzione del mesoderma e dell'endoderma
Xnr1	<i>Xenopus</i>	VegT	attivata	zona marginale e polo vegetativo	formazione e distribuzione del mesoderma e dell'endoderma
Trp-1	topo	Tbx2	repressa	melanociti	Regolazione della attività dei melanociti
Ci-Trop	<i>Ciona</i>	Ci-Bra	attivata	notocorda	formazione della notocorda?
POMC	topo	Tbx19 (Tpit)	attivata	cellule melanocorticotrope dell'ipofisi e loro progenitrici	differenziazione delle linee cellulari melanocorticotrope, produzione di proopiomelanocortina
cx40	topo	Tbx5	attivata	Tessuti cardiaci in embrione, feto e adulto	conduzione cardiaca
ANF	topo	Tbx5	attivata	Tessuti cardiaci in embrione, feto e adulto	controllo omeostasi elettrolitica
Target potenziali					
reclina	ratto	Tbr1	attivata	corteccia cerebrale	controllo del comportamento
Xwnt11	<i>Xenopus</i>	Xbra	attivata	zona marginale	movimenti della gastrulazione
Miml	topo	Eomes	attivata	endoderma viscerale e linea primitiva	movimenti della gastrulazione?
IFN $\gamma$	topo	Tbet	attivata	linfociti Th1	differenziazione ed attivazione dei linfociti Th1

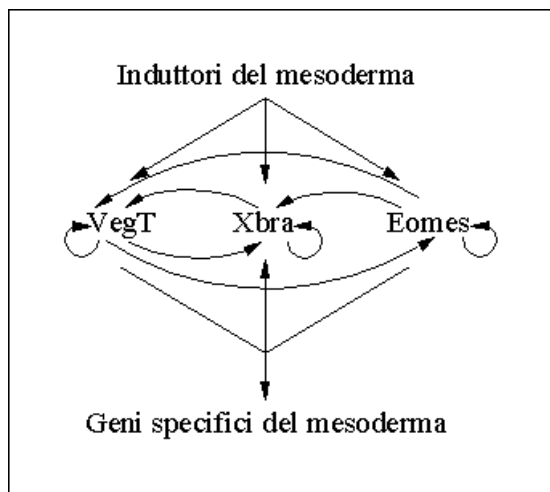


Fig. 1 Regolazione di geni della famiglia T-box in *Xenopus* (da Papaioannou e Silver, 1998; modificata).

vina induce l'espressione di Xbra in una ristretta finestra di concentrazioni: se i livelli di attivina sono troppo alti o troppo bassi Xbra non è espresso (Smith, 1999). Inoltre, l'induzione di diversi tipi di mesoderma dipende dalla concentrazione del prodotto di Xbra; ne deriva che anche piccoli cambiamenti quantitativi possono influenzare qualitativamente la differenziazione del mesoderma (Smith, 1995).

Attualmente, nell'uomo, si conoscono 18 geni della famiglia T-box. Per 15 di essi sono stati ritrovati ortologhi nel topo che presentano un'alta omologia di sequenza e che mappano in regioni sinteniche (tab. 3).

L'interesse relativo al ruolo funzionale dei vari membri della famiglia T-box è cresciuto in relazione al fatto che, come già era stato osservato per il gene T, mutazioni di questi geni in *Drosophila*, nel pesce zebrato, nel topo e nell'uomo hanno pesanti conseguenze sullo sviluppo. La mutazione del gene omb in *Drosophila* comporta problemi di sviluppo delle ali, delle zampe e del lobo ottico (Pflugfelder e Heisenberg, 1995); nel pesce zebrato una mutazione in *tbx16* comporta mancato sviluppo dei somiti del tronco e una gemma caudale espansa (Griffin *et al.*, 1998); nel topo mutazioni dei geni *Tbx6* e *Tbx1* comportano, rispettivamente, morte dell'embrione a metà della gestazione con la differenziazione dei precursori dei somiti in strutture simili al tubo neurale (Chapman e Papaioannou, 1998) ed anomalie cardiovascolari (Lindsay *et al.* 2001). Nell'uomo ci sono importanti evidenze a sostegno del coinvolgimento del gene TBX1 nella sindrome DiGeorge/Velocardiofaciale (DGS/VCFS; Merscher *et al.*, 2001) ed è stato dimostrato che i geni TBX3 e TBX5 sono implicati, rispettivamente, nella UMS (*ulnar mammary syndrome*; Bamshad *et al.*, 1997) e nella sindrome di Holt-Oram (Li *et al.*, 1997;

Tab. 3 Localizzazione cromosomica dei geni TBX umani e degli ortologhi di topo. L'ultima colonna si riferisce a patologie umane in cui sono state ritrovate mutazioni dei geni TBX o a patologie in cui potrebbero essere implicati geni TBX (da Papaioannou, 2001; modificata).

Gene del topo	Localizzazione cromosomica	Gene dell'uomo	Localizzazione cromosomica	Patologie umane associate o candidate
T	17.4	T	6q27	Difetti del tubo neurale ?
Tbx19		TBX19	1q23-q24	Deficit di ACTH
		TBX23	1	
Tbx1	16.6	TBX1	22q11.2	DGS/VCFS
Tbx10	19.2	TBX10	11q13.1-q13.2	BBS1?
Tbx15	3.49	TBX15	1p13	AFAS?
		TBX18	6q14-q15	
Tbx20	9	TBX20	7p15.1-p13	
		TBX22	Xq21	CPX
Tbx2	11.46	TBX2	17q23	
Tbx3	5.67	TBX3	12q24.1	UMS
Tbx4	11.46	TBX4	17q21-q22	
Tbx5	5.67	TBX5	12q24.1	HOS
Tbx6	7.6	TBX6	16p11.2	
Mga	2.67	MGA	15q15	
Tbr1	2.33	TBR1	2q23-q37	
Eomes (Tbr2)	9.64	EOMES (TBR2)	3p21.3-p21.2	
Tbet		TBX21 (TBLYM)	17	

DGS/VCFS = DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome; BBS1 = Bardet-Biedl Syndrome 1; AFAS = Acromegaloid Facial Appearance Syndrome; CPX = Cleft Palate X-linked, Cleft Palate with Ankyloglossia; UMS = Ulnar Mammary Syndrome; HOS = Holt-Oram Syndrome

Basson *et al.*, 1997). Per questo motivo è diventato di estremo interesse identificare i geni TBX, capire la loro funzione e come questa viene esercitata e controllata.

In questo lavoro sono state raccolte le informazioni aggiornate ad ottobre 2001 sui geni TBX dell'uomo, con particolare attenzione al ruolo che essi hanno o potrebbero avere in patologia umana.



## SOTTOFAMIGLIA T

### 1.1 Gene T

Nell'uomo codifica per un polipeptide di 435 aminoacidi che ha un'omologia del 91% con il polipeptide omologo del topo ed una identità completa del dominio T-box (Edwards *et al.*, 1996).

Il *pattern* di espressione del gene T umano è molto simile a quello delle altre specie di vertebrati ed è, in pratica, relativo alle cellule derivate dalla notocorda (Edwards *et al.*, 1996). Informazioni più dettagliate si hanno per l'omologo del topo in cui, nella prima fase della gastrulazione, il gene T viene espresso nel nodo primitivo, nella linea primitiva e nel mesoderma prossimale ad essa. L'espressione diminuisce parallelamente alla differenziazione del mesoderma ma persiste nella notocorda e nell'abbozzo della coda e permane, fino ad una fase tardiva della gestazione, nelle cellule derivate da queste strutture ma non è stata rilevata nei tessuti adulti (Wilkinson *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993). L'espressione del gene T, nel topo, sembra essere indotta da Wnt3a (Arnold *et al.*, 2000) ed entrambi questi geni sono essenziali per la differenziazione del mesoderma posteriore.

È stata investigata la possibilità che polimorfismi del gene T, nell'uomo, possano conferire suscettibilità ai difetti del tubo neurale ed in effetti, in due lavori (Morrison *et al.*, 1996 e Shields *et al.*, 2000) condotti su famiglie tedesche, inglesi ed irlandesi è stata individuata una associazione fra l'allele TIVS7-2 e spina bifida. Non si può escludere, comunque, che in realtà la suscettibilità sia determinata da alleli in *linkage disequilibrium* con l'allele TIVS7-2 nelle popolazioni considerate, anche perché in un altro lavoro su popolazioni di Minnesota, Nebraska e Iowa, questa associazione non è stata confermata (Trembath *et al.*, 1999) pur essendo, il campione considerato, piuttosto piccolo.

## 1.2 Gene TBX19

Sulla base di sequenze di vari geni della famiglia *T-box* è stato fatto uno *screening* di un *database* di EST ed è stato identificato un clone di cDNA la cui sequenza corrispondeva a sequenze genomiche di un PAC. In questo modo è stato possibile identificare il gene TBX19 il quale contiene, probabilmente, 8 esoni, e codifica per una proteina di 448 aminoacidi. Il gene TBX19 è molto simile al gene T, non solo a livello delle sequenze del DNA e del polipeptide codificato ma anche per la grandezza degli esoni e per la loro organizzazione nella *T-box* (Yi *et al.*, 1999).

Nel topo, durante lo sviluppo, il gene *Tbx19* è espresso nelle cellule progenitrici della linea corticotropa/melanotropa nell'ipofisi e nella parte rostro-ventrale del diencefalo (Yi *et al.*, 1999); nell'adulto, l'espressione si ritrova nelle cellule melanotrope e corticotrope dell'ipofisi (Lamolet *et al.*, 2001). Questo gene sembra avere un ruolo nell'attivazione del gene POMC (*proopiomelanocortin*) e nella repressione dei geni  $\alpha$ GSU ( *$\alpha$  glycoprotein subunit*) e TSH $\beta$  (*thyroid stimulating hormon  $\beta$* ) (Liu *et al.*, 2001). Una conferma del ruolo di attivazione del gene POMC viene dal lavoro di Lamolet *et al.* (2001), i quali hanno identificato, nel topo, un gene che hanno chiamato *Tpit* il quale codifica per un fattore *T-box* presente nelle linee cellulari corticotrope e melanotrope ipofisarie che producono proopiomelanocortina. In queste cellule l'attivazione della trascrizione di POMC da parte del prodotto di *Tpit* richiede la cooperazione di *Pitx1*, un fattore di trascrizione che si lega insieme ad esso a siti contigui dello stesso elemento regolatore. È stato dimostrato che il promotore del gene POMC presenta una sequenza corrispondente a metà della sequenza palindromica a cui si lega la proteina T e che, *in vitro*, la proteina *Tpit* è in grado di legare questa sequenza ad indicare che POMC è un gene *target* di *Tpit*. Inoltre, l'espressione di *Tpit*, indotta in cellule pituitarie indifferenziate, induce l'espressione di POMC ad indicare che *Tpit* ha un ruolo nella differenziazione delle linee cellulari che esprimono POMC a livello dell'ipofisi.

Il prodotto di *Tpit* (*Tbx19*) ha il 94% di identità della sequenza aminoacidica con il prodotto del gene umano TBX19.

Lamolet *et al.* (2001), hanno dimostrato l'esistenza di mutazioni del gene TBX19 in due pazienti con deficienza isolata di ACTH il quale deriva dalla proopiomelanocortina prodotta dalle cellule ipofisarie. Una delle mutazioni è stata ritrovata in un soggetto, figlio di consanguinei, in omozigosi e consiste in una mutazione *nonsense* che ha, come conseguenza, la formazione di un prodotto proteico mancante di gran parte della regione carbossi-terminale. La mutazione è stata ritrovata, in eterozigosi, nei genitori e nell'unico nonno vivente. La seconda mutazione è stata ritrovata, in eterozigosi, in un soggetto con un fratello affetto e consiste in una mutazione *missense* nell'esone 2 che fa parte del dominio DNA-*binding* e necessita di ulteriori approfondimenti per essere correttamente interpretata.

Nel pollo i dati relativi all'espressione del gene ortologo (TbxT), durante l'embriogenesi, sono molto contrastanti rispetto a quanto osservato nel topo. Infatti, mentre nel topo non è stata trovata espressione se non nelle cellule progenitrici della linea corticotropo-melanotropica a partire dal 12.5° giorno *p.c.*, nel pollo, TbxT è stato trovato temporaneamente espresso nella prima fase della formazione della linea primitiva e, successivamente, nel nodo di Hensen e nell'area circostante, nella prima fase di sviluppo della piastra precordale, nel processo della testa e nella notocorda e viene considerato candidato per completare ed estendere la funzione del gene T nella parte anteriore dell'embrione (Knezevic *et al.*, 1997). Questi dati contrastanti potrebbero essere dovuti al fatto che Tbx19 e TbxT non sono realmente ortologi oppure al fatto che l'espressione nella prima fase dell'embriogenesi si ha per un periodo limitato e che perciò, nel topo, non sia stata rilevata.

### 1.3 Gene TBX23

Il gene è stato identificato in base alle sequenze disponibili della *GenBank* (Ruvinsky *et al.*, 2000). Gli unici dati a disposizione riguardano la localizzazione sul cromosoma 1 e la correlazione con i geni T e TBX19.



## SOTTOFAMIGLIA TBX1

Rispetto alla sottofamiglia T, la sottofamiglia Tbx1 sembra essere più ampiamente espressa; questo indica un coinvolgimento dei geni che la compongono in un maggior numero di siti durante lo sviluppo ed anche nell'adulto (Papaionnaou, 2001)

## 2.1 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 di 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 aminoacidi. Questi ultimi presentano il 93-98% di omologia con i prodotti del gene Tbx1 del topo, mentre la T-box è conservata al 100% (Chieffo *et al.*, 1997; 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 (Chieffo *et al.*, 1997). 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 (Chieffo *et al.*, 1997).

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 RNAm 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'RNAm del muscolo scheletrico e del testicolo dell'adulto e due trascritti approssimativamente di 2.1 e 3.1 Kb che mostrano ibridazione con l'RNAm del polmone fetale e, a bassi livelli, del rene (Chieffo *et al.*, 1997). Il *pattern* di espressione fetale sembra confermare l'esistenza dei due trascritti alternativi identificati con la RACE-PCR, ritrovati, peraltro, anche nel topo (Garg *et al.*, 2001) 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 (Chieffo *et al.*, 1997).

Maggiori dettagli sul *pattern* di espressione embrionario, ottenuti mediante ibridazione *in situ* (Chieffo *et al.*, 1997; Garg *et al.*, 2001), si hanno sul topo e sul pollo.

Nel topo è stato documentato che il picco massimo di espressione si ha a 9.5 giorni *p.c.* (Bollag *et al.*, 1994), quando si ha la migrazione delle cellule della porzione cranica della cresta neurale. Nell'embrione di topo di 7.5 giorni *p.c.* l'espressione di Tbx1 è limitata al mesoderma anteriore mentre in quello di 9.5 giorni *p.c.* 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 (Garg *et al.*, 2001). Nell'embrione di 10.5 giorni *p.c.* 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 (Garg *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2001). Evidenze di espressione sono state riscontrate anche nell'endoderma faringeo ma non nel mesenchima derivato dalla cresta neurale (Garg *et al.*, 2001) anche se Lindsay *et al.* (2001) ne riportano tracce a livello del mesenchima faringeo adiacente al III, IV e VI paio di arterie degli archi faringei. A 11.5 giorni *p.c.* l'espressione è localizzata nella testa, nel mesenchima periaortico ed anche nello sclerotomo; a 12.5 giorni nella porzione prossimale degli abbozzi degli arti e a 15.5 nell'epitelio della trachea e del polmone (Garg *et al.*, 2001). L'esame della testa in stadi di sviluppo successivi ha messo in evidenza trascritti negli abbozzi dei denti, delle vibrisse e delle orecchie (Garg *et al.*, 2001).

Nell'embrione di pollo il *pattern* di espressione è sovrapponibile, con presenza di trascritti anche nell'epitelio dei solchi faringei (Garg *et al.*, 2001).

Considerando le strutture che derivano dai tessuti embrionari 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 (Chieffo *et al.*, 1997) ed in quelle del cuore, con particolare riferimento alla regione del polo vascolare.

Garg *et al.* (2001) hanno dimostrato che l'espressione di Tbx1 è dipendente dal prodotto del gene Shh (*sonic hedgehog*) e questo concorderebbe con la loro espres-

sione sovrapponibile negli archi faringei. Il gene *Shh* 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 (Garg *et al.*, 2001). Gli autori hanno dimostrato che, in embrioni di topi *Shh/null*, 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 (Garg *et al.*, 2001). Studi sull'espressione di *Shh*, di proteine BM (*bone morphogenetic*) 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 (Wall e Hogan, 1995) di cui sono meglio conosciuti i meccanismi di regolazione, sia nei vertebrati che in *Drosophila* (Nellen *et al.*, 1996; Litington *et al.*, 1998). 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* (Garg *et al.*, 2001). 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 (Helms *et al.*, 1997), l'espressione di *Tbx1* potrebbe essere regolata dall'acido retinoico attraverso *Shh* (Garg *et al.*, 2001). Inoltre, poiché *Tbx1* ed il gene *ET1* (*endothelin 1*) sono espressi entrambi nell'endoderma e nel mesoderma faringei e sono implicati nello sviluppo delle stesse strutture, sarebbe interessante appurare se il gene *ET1* possa essere un gene *target* di *Tbx1* (Garg *et al.*, 2001).

Negli ultimi anni sono stati pubblicati lavori in cui vengono presentati dati che indicano un importante coinvolgimento del gene *TBX1* nella sindrome DGS/VCFS (Jerome e Papaioannou, 2001; Lindsay *et al.*, 2001; Merscher *et al.*, 2001; Chieffo *et al.*, 1997) o, per meglio dire, nel gruppo di patologie legate alle delezioni interstiziali all'interno della banda q11.2 del cromosoma 22. Studi di citogenetica molecolare hanno dimostrato che circa il 90% dei pazienti con DGS/VCFS presentano microdelezioni in una copia della regione 22q11.2. Di questi oltre il 90% presenta delezioni simili di circa 3 Mb; nella quasi totalità dei rimanenti casi si hanno delezioni simili di circa 1,5 Mb che cadono all'interno della regione di cui sopra, mentre nel resto si ritrovano delezioni di grandezza diversa (Carlson *et al.*, 1997). Nella regione più comunemente deleta nella DGS/VCFS sono stati individuati circa 30 geni (Garg *et al.*, 2001).

Studi più dettagliati ed estensivi, comprendenti anche casi di DGS/VCFS associati a traslocazioni con punto di rottura in 22q11.2, hanno permesso di individua-

re una regione critica di circa 500 Kb (Carlson *et al.*, 1997) ed al suo interno una regione critica minima (MDGCR) di 250 Kb (Gong *et al.*, 1996). Studi successivi sulle mappe di delezione, tuttavia, non hanno consentito l'individuazione di una regione minima di delezione comune e quindi una efficace selezione di geni candidati perché ci sono affetti, con fenotipo clinico simile, portatori di delezioni che non presentano aree di sovrapposizione (McQuade *et al.*, 1999); in un lavoro del 1999, attraverso lo studio della correlazione genotipo-fenotipo, in pazienti con delezioni atipiche in 22q11.2, viene suggerita l'esistenza di almeno cinque distinte regioni critiche (Amati *et al.*, 1999).

L'elevata frequenza con cui ricorrono le delezioni in 22q11.2 (circa 1/4000 nati) è stata spiegata dalla presenza di sequenze ripetute a basso numero di copie; eventi di *crossing over* ineguale, più probabilmente intracromosomici, per malappaiamento, favoriti da queste sequenze, ne sarebbero la causa (Edelmann *et al.*, 1999).

Nelle patologie legate a delezioni in 22q11.2 che, oltre alla DGS/VCFS comprendono la CAFS (*conotruncal anomaly face syndrome*; Matsuoaka *et al.*, 1998), la sindrome di Opitz-GBBB (Robin *et al.*, 1995), la sindrome cardiofaciale di Cayler (Giannotti *et al.*, 1994), si ritrovano una serie di manifestazioni cliniche che possono presentarsi in combinazioni diverse e possono avere differenti gradi di severità. Esiste una grande variabilità fenotipica anche nei casi familiari che rappresentano il 5-10% del totale (Scambler, 2000). Inoltre, non c'è correlazione genotipo-fenotipo, nel senso che non c'è un rapporto lineare tra dimensioni della delezione e gravità della malattia. La principale causa di morbilità e mortalità sono le cardiopatie congenite, frequentemente malformazioni troncoconali le quali comprendono: l'arco aortico interrotto di tipo B, la persistenza del tronco arterioso, la tetralogia di Fallot, difetti del setto interventricolare infundibolare, anomalie delle vene polmonari ecc. (Marino *et al.*, 1999). Altre caratteristiche cliniche importanti sono: ipoplasia o aplasia del timo e delle paratiroidi che possono portare, rispettivamente, a deficienze nell'immunità cellulo-mediata e a ipocalcemia, dismorfismi facciali, anomalie a livello del palato, difficoltà di apprendimento, problemi comportamentali ecc. (Scambler, 2000).

Dalle caratteristiche cliniche si desume che le strutture principalmente interessate nelle patologie che sottendono microdelezioni in 22q11.2 derivano tutte dal sistema di archi e tasche faringei dell'embrione alla cui costituzione contribuiscono anche cellule che migrano dalla cresta neurale (Scambler, 2000). Inoltre, difetti simili a quelli del fenotipo del 22q11.2 sono stati ottenuti in esperimenti di ablazione della cresta neurale nelle prime fasi dello sviluppo nell'embrione di pollo (Bockman *et al.*, 1987) e si osservano in caso di mutazioni indotte o spontanee di geni che si pensa abbiano un ruolo nel controllo dello sviluppo della cresta neurale (Conway *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 2000).

Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che delezioni in 22q11.2 comportano un danno a livello delle cellule della cresta neurale o di cellule con le quali



la cresta neurale interagisce, in una fase critica dell'organogenesi (Scambler, 2000).

Wendling *et al.* (2000) hanno proposto che il difetto primario nelle sindromi da delezioni in 22q11.2 sia a livello dell'endoderma faringeo piuttosto che nelle cellule della cresta neurale. Essi hanno dimostrato, nel topo, che la mediazione dell'acido retinoico, in una breve finestra temporale, precedente la migrazione delle cellule della cresta neurale nel III e IV arco faringeo, è indispensabile per la differenziazione dell'endoderma faringeo ed è necessaria a creare le condizioni locali che consentono una corretta migrazione delle cellule della cresta neurale. Era già noto, d'altronde, che un eccesso o una carenza di acido retinoico, durante l'embriogenesi, possono comportare un fenotipo simile a quello osservato nelle sindromi da delezioni in 22q11.2 (Kastner *et al.*, 1995).

Da quanto esposto sopra risulta evidente la sovrapposizione tra il *pattern* di espressione del gene TBX1 e le strutture embrionarie implicate nelle sindromi da delezione in 22q11.2. Infatti, anche se non sono state trovate tracce di espressione di TBX1 nelle cellule della cresta neurale, la sua espressione nelle cellule degli archi faringei, non derivate dalla cresta neurale, potrebbe avere un ruolo nella migrazione, nella proliferazione o nella sopravvivenza delle cellule della cresta neurale in queste strutture (Jerome e Papaioannou, 2001).

A sostegno di questa ipotesi Jerome e Papaioannou (2001) hanno dimostrato che, in assenza del prodotto di *Tbx1*, le strutture derivate dalle cellule che migrano dalla cresta neurale negli archi faringei possono formarsi ma alcune risultano essere anormali (cartilagini dell'osso ioide e della mandibola) mentre altre non si formano affatto; è questo il caso del setto tra l'aorta e l'arteria polmonare che non si forma sebbene le cellule della cresta neurale contribuiscano solo in piccola parte alla sua costituzione. Gli autori concludono che le anomalie delle strutture alla cui costituzione contribuiscono le cellule della cresta neurale sono secondarie alla mancata azione che il gene *Tbx1* ha, normalmente, sullo sviluppo degli archi faringei.

I lavori più importanti a sostegno di un ruolo principale di TBX1 nelle sindromi da delezioni in 22q11.2 ed in particolare nella DGS/VCFS, sono stati fatti utilizzando modelli animali. Infatti, una possibilità per selezionare geni che possono avere un ruolo nelle patologie da delezioni in cui non è possibile determinare una regione di delezione minima comune, come in questo caso, è quella di creare modelli animali portatori di delezioni che coinvolgono *clusters* di geni simili a quelli deleti negli affetti. Nel caso della DGS/VCFS questo è possibile perché la sintenia della regione critica sul cromosoma 22 dell'uomo si ritrova altamente conservata sul cromosoma 16 del topo (Lindsay *et al.*, 1999). La maggior parte dei geni della sintenia, nell'uomo e nel topo, si trovano nella stessa posizione ed allineati nello stesso ordine ad eccezione di alcuni geni che si trovano in posizione diversa e di un blocco di geni che si trova in posizione invertita (Lindsay *et al.*, 1999; Merscher *et al.*, 2001; fig. 2).

Un'altra diversità riguarda la mancanza, nel topo, delle brevi sequenze ripetute che, nell'uomo, sono indicate come responsabili dell'elevata frequenza di delezioni, che si ritrovano, invece, nei primati non umani (Shaikh *et al.*, 2000). I risultati di studi condotti su modelli murini, che hanno permesso di orientare le ricerche su determinati geni della regione critica della DGS/VCFS, sono riportati in maniera schematica in fig. 2 e fig. 3.

Merscher *et al.* (2001) hanno ottenuto, con tecniche di mutagenesi mirata mediante sistema di ricombinazione cre-loxP, topi eterozigoti per una delezione di circa 1.5 Mb che va dal *locus* Idd al *locus* Hira (Lgdel/+) contenente 24 geni, cinque geni in più rispetto alla delezione Df1 (circa 1,2 Mb) dei topi Df1/+ ottenuti, con lo stesso metodo, in un lavoro precedente da Lindsay *et al.* (1999) (fig. 2). Come nel caso dei topi Df1/+ i topi Lgdel/+ presentavano difetti troncoconali, i più comuni nella DGS/VCFS ed una mortalità perinatale ancora più elevata ma presentavano anche aplasia delle paratiroidi. Gli autori affermano che l'aploinsufficienza della regione compresa tra Idd ed Hira compromette il normale sviluppo di diverse strutture derivate dalla cresta neurale come, appunto, le paratiroidi, il cuore ed i grandi vasi che da esso si dipartono.

Per restringere la ricerca dei geni responsabili di queste anomalie si possono fare, prima di tutto, alcune considerazioni sulla base di dati precedentemente pubblicati. Poiché le delezioni delle regioni Znf74-Ctp (Kimber *et al.*, 1999) e Idd-Arvcf (Puech *et al.*, 2000) in topi eterozigoti non comportano mortalità perinatale, nè difetti troncoconali, nè aplasia delle paratiroidi, si potrebbe pensare, per esempio, che una delezione della regione Arvcf-Hira sia sufficiente a determinare il fenotipo Lgdel/+ e che una delezione della regione Arvcf-Ufd11 sia sufficiente a determinare il fenotipo Df1/+. Si potrebbe pensare, inoltre, che la maggior incidenza della mortalità perinatale riscontrata nei topi Lgdel/+ rispetto ai topi Df1/+ e l'aplasia delle paratiroidi siano dovute all'aploinsufficienza di uno o entrambi i geni Nlvcf e Hira.

Per confermare la prima di queste osservazioni, Merscher *et al.* (2001) hanno condotto esperimenti di complementazione mediante incroci di topi Lgdel/+ con topi con duplicazione della regione Idd-Arvcf per ottenere una linea Dup/Lgdel. Come ci si aspettava, i topi Dup/Lgdel non presentavano alcun miglioramento rispetto al fenotipo dei topi Lgdel/+; la regione critica per questo fenotipo doveva, perciò, essere compresa tra Arvcf e Hira.

Per restringere ulteriormente la regione critica gli autori hanno ottenuto, mediante iniezione diretta di tre BAC umani nel pronucleo femminile fecondato, tre linee di topi transgenici. I BAC utilizzati, nel complesso, contengono i geni omologhi a quelli compresi tra Arvcf e Nlvcf (non comprendono il gene Hira) i quali sono arrangiati in ordine invertito nelle due specie. Mediante le tre linee di topi transgenici ottenute, sono stati fatti esperimenti di complementazione incrociando topi di ognuna delle tre linee con topi Lgdel/+. Dallo studio dei prodotti di

questi incroci è stato appurato che un parziale recupero del fenotipo *Lgdel/+* si ottiene solo con la presenza di copie aggiuntive della regione di circa 200 Kb contenente i geni *WDVCF*, *TBX1*, *GP1B $\beta$*  e *PNUTL* (BAC 316) ad indicare che uno di questi geni è responsabile della mortalità perinatale e dei difetti troncoconali dei topi *Lgdel/+*.

Esaminando i *patterns* di espressione ed altre caratteristiche dei quattro geni individuati è stato considerato, come gene candidato, il gene *Tbx1* in quanto fa

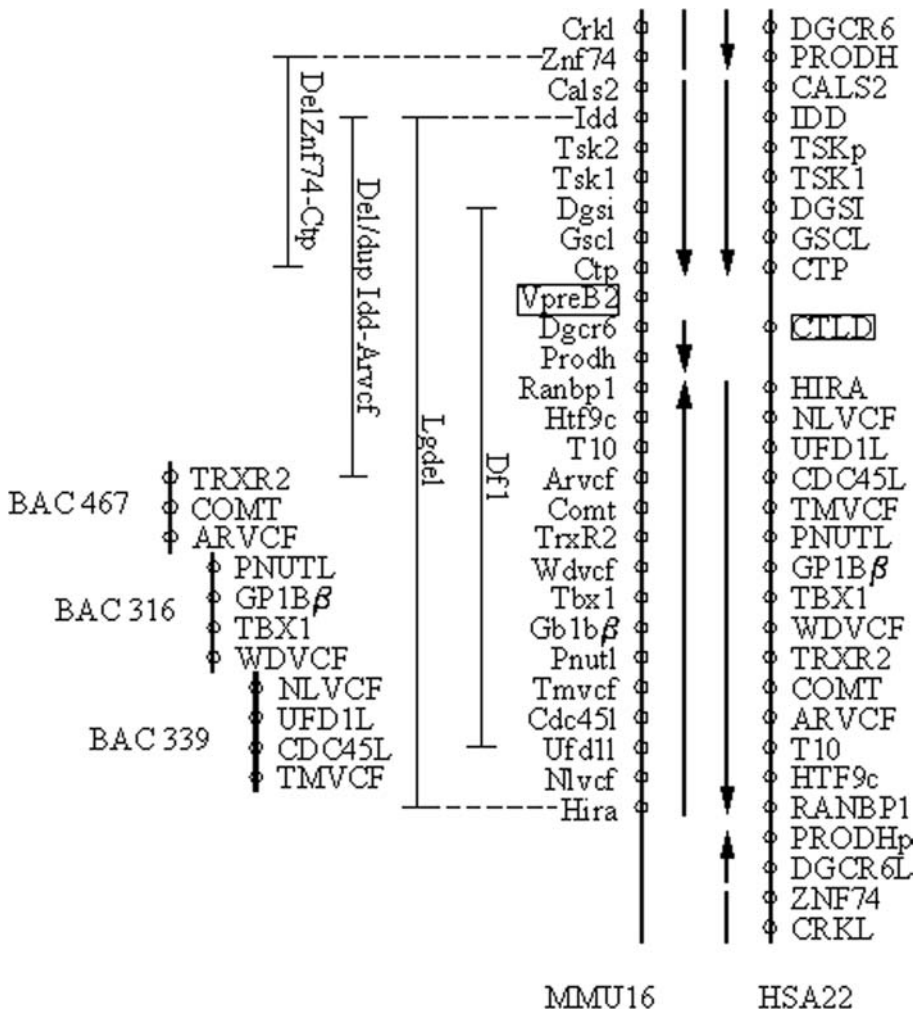


Fig. 2 Mappa della regione più frequentemente deleta nella DGS/VCFS e della regione corrispondente nel topo con indicazione dell'ordine relativo dei geni nelle due specie; i geni non ortologhi sono evidenziati. I dati riportati sulla sinistra sono relativi ai modelli murini di cui si discute nel testo (da Merscher *et al.*, 2001; modificata).

parte di una famiglia genica i cui membri codificano per fattori di trascrizione che regolano i processi di sviluppo ed è espresso, nelle fasi precoci dell'embriogenesi, negli archi e nelle tasche faringei (Chieffo *et al.*, 1997). Lo sviluppo di anomalie cardiovascolari, simili a quelle dei topi *Lgdel/+*, in topi eterozigoti per una mutazione *null* in *Tbx1*, ha permesso agli autori di confermare che l'aploinsufficienza di questo gene gioca un importante ruolo nella determinazione dei difetti cardiovascolari che si ritrovano nella DGS/VCFS.

Con un approccio simile a quello usato da Merscher *et al.* (2001), Lindsay *et al.* (2001), utilizzando tecniche di ingegneria cromosomica, hanno prodotto modelli murini portatori di delezioni all'interno della regione Df1 (fig. 3) che, se deleta, comporta difetti troncoconali dovuti ad alterazioni dello sviluppo del IV paio di arterie degli archi faringei, sempre riscontrabili nell'embrione di 10.5 giorni p.c. anche se con gradi di espressività variabile (Lindsay *et al.*, 1999). Questo ha consentito loro di restringere la regione critica per lo sviluppo del IV paio di arterie degli archi faringei, all'interno di Df1, ad un'area di 200 Kb che va da T10 a *Cdcrel1*; gli autori hanno escluso che la delezione di quest'area possa comportare l'eliminazione di elementi regolatori di geni a valle di *Cdcrel1* creando un modello murino con delezione Df1 e duplicazione della regione corrispondente a Df3 (Dp3); in questo caso, infatti, si osservava un normale sviluppo del IV paio di arterie degli archi faringei ad indicare che il gene responsabile è prossimale a *Cdcrel1*.

Il recupero dello sviluppo normale che si ottiene nei prodotti degli incroci di un topo con delezione Df1 con un topo transgenico portatore di una o due copie del PAC 344g21, che contiene un segmento genomico di 140 Kb dell'intervallo T10-

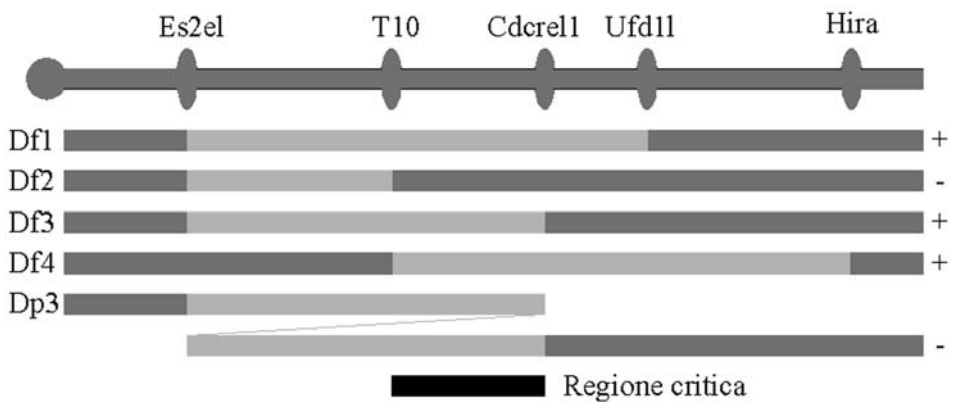


Fig. 3 Rappresentazione schematica delle delezioni (segmenti rossi) e della duplicazione (doppio segmento rosso) nei modelli murini del lavoro di Lindsay *et al.* (2001). Sulla destra i segni + e - indicano la presenza o l'assenza delle anomalie del IV paio di arterie degli archi faringei negli embrioni portatori delle mutazioni.

Cdcrel1, indica che il gene responsabile dello sviluppo del IV paio di arterie degli archi faringei ed i suoi elementi regolatori fondamentali che agiscono in *cis* sono compresi in questo segmento genomico. L'analisi della sequenza del PAC 344g21 ha rivelato che il clone contiene 4 geni: Gnb11, Tbx1, GpIb $\beta$  e Cdcrel1. Di questi quattro geni si può scartare Cdcrel1 perché i topi Cdcrel1<sup>-/-</sup> non presentano problemi cardiovascolari; si può scartare anche GpIb $\beta$  perché è noto che questo gene, se mutato in omozigosi, causa la sindrome di Bernard-Soulier, una malattia recessiva della coagulazione dovuta ad una alterata funzione delle piastrine, anche se, in casi sporadici, forme molto simili a questa malattia sono state trovate associate alla DGS/VCFS (Lascone *et al.*, 2001). Esaminando i *patterns* di espressione di Gnb11 e di TBX1 gli autori hanno concluso che il miglior gene candidato, in questo intervallo, è Tbx1 poiché viene espresso negli archi e tasche faringei negli embrioni di 9.5-12.5 giorni *p.c.* (Chieffo *et al.*, 1997). Per stabilire se la delezione del solo Tbx1, in eterozigosi, fosse sufficiente per avere anomalie dello sviluppo del IV paio di arterie degli archi faringei Lindsay *et al.* (2001) hanno generato un allele Tbx1 mutante con perdita di funzione e topi eterozigoti ed omozigoti per questa mutazione. Gli embrioni eterozigoti di 10.5 giorni *p.c.* mostravano le stesse anomalie riscontrate nei topi con delezione Df1, con la stessa penetranza del 100% ad indicare un improbabile coinvolgimento di altri geni oltre Tbx1. Gli embrioni di 10.5 giorni *p.c.* omozigoti per la mutazione in Tbx1, come anche quelli eterozigoti composti Df1/Tbx1, presentavano gravi anomalie del sistema delle arterie degli archi faringei ad indicare drastiche alterazioni dello sviluppo degli archi faringei stessi, probabilmente dovute a mancata segmentazione degli archi e delle tasche. Gli autori ipotizzano che Tbx1 sia coinvolto nelle interazioni endoderma-mesenchima faringei che comportano la segmentazione degli archi faringei distali; essi ritengono che sia improbabile che il fenotipo osservato nei topi mutanti per Tbx1 sia dovuto a difetti primari delle cellule della cresta neurale in quanto queste ultime, invece, non sono implicate nella segmentazione. Poiché Lindsay *et al.* (2001) non hanno analizzato stadi più avanzati di sviluppo, rimane da determinare se altre caratteristiche del fenotipo DGS/VCFS, oltre quelle cardiovascolari, possono essere correlate alla perdita di funzione del gene Tbx1.

Jerome e Papaioannou (2001) hanno prodotto, mediante mutagenesi mirata, embrioni di topo con mutazione *null* del gene Tbx1 in omozigosi ed in eterozigosi. Grazie al fatto che gli embrioni Tbx1<sup>-/-</sup> sono andati avanti nello sviluppo fino ad una fase avanzata della gestazione, è stato possibile effettuare un'analisi dettagliata anche dei più sfumati difetti anatomici. Questa analisi ha messo in evidenza che l'embrione Tbx1<sup>-/-</sup> mostra praticamente tutte le caratteristiche della DGS/VCFS, incluse l'ipoplasia del timo e delle paratiroidi, i difetti troncoconali, i dismorfismi facciali e la palatoschisi. L'analisi degli embrioni, nelle varie fasi dello sviluppo, ha rivelato che le malformazioni riscontrate sono dovute ad anomalo sviluppo degli

archi e delle tasche faringee, del mesenchima della testa e della vescicola otica. L'anomalo sviluppo delle strutture scheletriche derivate dal I e II arco faringeo comporta i dismorfismi facciali, la micrognazia e la palatoschisi, tutti sintomi frequenti nella DGS/VCFS; inoltre, si possono avere malformazioni dell'orecchio esterno, degli ossicini dell'orecchio medio e, a causa dell'anomalo sviluppo della vescicola otica, dell'orecchio interno. Difetti a livello delle orecchie (elici ripiegati) che spesso sono a basso impianto, e perdita dell'udito sono stati descritti nella DGS/VCFS (McDonald-McGinn *et al.*, 1997). L'ipoplasia o l'aplasia del timo e delle ghiandole paratiroidi possono essere attribuite al mancato o anomalo sviluppo delle tasche faringee. Le malformazioni cardiache sono dovute alla mancata settazione delle strutture in uscita dal cuore e all'anomalo rimodellamento dei grossi vasi che comportano persistenza del tronco arterioso ed anomalie dei vasi come arco aortico a destra e arco aortico doppio. Gli embrioni aploinsufficienti presentano un fenotipo meno penetrante che non comprende l'intero spettro di manifestazioni riscontrabili nella DGS/VCFS. Dipendentemente dal *background* genetico, ad indicare l'implicazione di geni modificatori, gli embrioni  $Tbx1^{+/-}$  mostrano assenza del IV paio di arterie degli archi faringee o vari gradi di riduzione di spessore degli stessi. Poiché il difetto presente nei topi  $Tbx1^{+/-}$  è sovrapponibile a quello riscontrato in topi eterozigoti per la delezione  $Df1$ , gli autori concludono che l'aploinsufficienza del gene  $Tbx1$  è responsabile del fenotipo che si riscontra in questi ultimi. Essi ipotizzano che alterazioni dell'espressione di  $Tbx1$  negli archi e tasche faringee disturbino la migrazione e la differenziazione delle cellule della cresta neurale in queste strutture; questo disturbo sarebbe alla base della DGS/VCFS.

Dai lavori riportati risulta evidente che, considerando tutti i geni compresi nell'intervallo di delezione  $Df1$ , l'aploinsufficienza di  $Tbx1$  è la più importante causa dei difetti cardiovascolari della DGS/VCFS; rimane da stabilire il suo eventuale ruolo nelle altre manifestazioni fenotipiche.

Il fatto che le anomalie riscontrate nei topi mutanti per  $Tbx1$  siano dello stesso tipo di quelle che si ritrovano nei pazienti con DGS/VCFS e si riscontrino negli stessi organi indicherebbe che mutazioni di  $TBX1$  potrebbero comportare tutte le manifestazioni fenotipiche della DGS/VCFS; non bisogna dimenticare, però, che, nel topo, il fenotipo completo della DGS/VCFS si manifesta solo negli omozigoti  $Tbx1^{-/-}$  mentre nell'uomo si manifesta in seguito ad una aploinsufficienza (Jerome e Papaioannou 2001). Una possibile spiegazione è una differenza specie-specifica di sensibilità al dosaggio che comporta una differenza di penetranza che, peraltro, è già stata osservata nel caso di altri geni come  $MSX2$  e  $PAX9$  (Stockton *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 1998; Satokata *et al.*, 2000; Wilkie *et al.*, 2000).

L'osservazione che nei topi mutanti eterozigoti il fenotipo patologico relativo all'arco aortico si presenta variabile, dipendentemente dal *background* genetico, potrebbe dimostrare l'implicazione di geni modificatori (Jerome e Papaioannou

2001); in pratica, i topi mutanti omozigoti potrebbero essere un modello che mostra quali sono i tessuti che, nell'uomo, possono essere potenzialmente coinvolti nelle manifestazioni fenotipiche della DGS/VCFS negli affetti (eterozigoti) che hanno un *background* genetico permissivo (Jerome e Papaioannou 2001). Questa ipotesi sembra essere confermata in un recente lavoro (Taddei *et al.*, 2001) in cui è stato dimostrato che la ridotta penetranza dei difetti cardiovascolari nel topo *Df1/+* dipende prevalentemente dal *background* genetico ed è dovuta alla capacità, da parte di alcuni dei mutanti, di recuperare, nel corso dello sviluppo, una crescita ritardata del IV paio di arterie degli archi faringei che è, invece, pienamente espressa nelle prime fasi dell'embriogenesi. Questo effetto non sembra essere dovuto agli alleli presenti nella regione corrispondente alla *Df1* del cromosoma selvatico ma a geni modificatori che si trovano in altre regioni del genoma. Nello stesso lavoro viene dimostrato che fattori genetici sono alla base di una estensione del fenotipo *Df1/+* a coinvolgere anomalie del timo e delle paratiroidi, le quali sono state rilevate in alcune linee congeniche ed in alcuni incroci. Inoltre, come anche si ha nei pazienti DGS/VCFS, nei topi *Df1/+* i difetti cardiaci e del timo sembrano essere indipendenti tra loro ad indicare il coinvolgimento di geni modificatori diversi. Gli autori si ripropongono, in futuro, di creare topi deficitari per una copia del gene *Tbx1* utilizzando le linee congeniche e gli incroci che, in presenza della delezione *Df1*, mostrano difetti del timo e delle paratiroidi per verificare se *Tbx1* possa essere responsabile, oltre che del fenotipo cardiovascolare della DGS/VCFS, anche di altri due dei più frequenti sintomi della malattia.

Un'altra possibilità per spiegare eventuali differenze delle conseguenze dell'aploinsufficienza nell'uomo e nel topo potrebbe essere relativa al fatto che *TBX1*, insieme ad altri geni candidati quali *HIRA* e *UFD1L*, fanno parte del gruppo di geni che si trova in posizione invertita nelle due specie per cui la regolazione della loro espressione potrebbe essere diversa.

Anche se si ammettesse che l'aploinsufficienza di *TBX1*, nell'uomo, comportare tutte le caratteristiche cliniche della DGS/VCFS, risulta difficile dimostrare che il gene *TBX1* sia l'unico gene implicato in tutti i casi di DGS/VCFS. Infatti il *locus* *TBX1* non è sempre incluso nelle delezioni in 22q11.2 che comportano la malattia. Se si ritenesse che la carenza del prodotto di *TBX1* sia l'unica causa della DGS/VCFS bisognerebbe ammettere che, oltre alla perdita della regione codificante del gene, la malattia possa essere determinata dalla perdita di elementi regolatori o geni modificatori che agiscono a distanza su *TBX1* (Jerome e Papaioannou 2001). In alternativa, delezioni di regioni a monte o a valle, potrebbero comportare cambiamenti conformazionali della cromatina i quali andrebbero ad interferire con l'espressione di *TBX1* (Jerome e Papaioannou 2001). Tali meccanismi di regolazione a distanza sono stati osservati relativamente al gene *SOX9* implicato nella displasia campomelica (Pfeifer *et al.*, 1999).

Se si ammette la partecipazione di altri geni al fenotipo DGS/VCFS, si potrebbe pensare che gli effetti di bassi livelli di trascritti di geni che agiscono, indipendentemente o in congiunzione, sullo sviluppo delle stesse strutture possano sommersi e dare origine al fenotipo DGS/VCFS (Jerome e Papaioannou 2001; Schinke e Izumo, 2001).

Oltre al gene TBX1, numerosi sono i geni spesso deleti nella DGS/VCFS che, per il loro *pattern* di espressione e per la loro funzione, sono stati presi in considerazione come possibili candidati. Per i più accreditati ad avere un ruolo principale nella DGS/VCFS, sono stati sviluppati modelli animali in cui sono stati studiati gli effetti dell'attenuazione dell'espressione o di delezioni in eterozigosi e omozigosi.

HIRA è, probabilmente, un regolatore della trascrizione che agisce attraverso alterazioni strutturali della cromatina (Farrell *et al.*, 1999); nel topo è stato dimostrato che il suo prodotto interagisce con il gene Pax3 il quale ha un ruolo nella settazione troncoconale (Magnaghi *et al.*, 1998). I geni omologhi di HIRA, nel topo e nel pollo, sono espressi nella cresta neurale, nel mesenchima della testa e negli archi faringei (Wilming *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1997), ed esperimenti condotti sul pollo sembrano confermare un suo ruolo nella settazione delle strutture in uscita dal cuore (Farrel *et al.*, 1999).

UFD1L è omologo di un gene di lievito altamente conservato coinvolto nella degradazione delle proteine mediata dall'ubiquitina (Pizzuti *et al.*, 1997) la cui mancanza potrebbe comportare un accumulo di proteine indesiderate, risultante nell'apoptosi o in una differenziazione aberrante durante lo sviluppo (Epstein e Buck, 2000); nel topo è stato dimostrato che Ufd1l è un gene target di dHAND il quale è un gene coinvolto nel controllo dello sviluppo del cuore ed è espresso negli archi faringei, nella vescicola otica e nelle strutture in uscita dal cuore (Yamagishi *et al.*, 1999). In un paziente con una delezione in cui risultano implicati solo i geni CDC45 e UFD1L, è stato ipotizzato che l'aploinsufficienza di UFD1L sia la principale responsabile del fenotipo DGS/VCFS (Yamagishi *et al.*, 1999) anche se recentemente è stato dimostrato che CDC45 ha un ruolo essenziale nello sviluppo embrionale del topo (Yoshida *et al.*, 2001). In un lavoro recente (De Luca *et al.*, 2001) sono state mostrate evidenze a sostegno di un ruolo di UFD1L nella genesi della schizofrenia e delle manifestazioni schizofreniche che possono ritrovarsi nella DGS/VCFS.

CRKL codifica per una proteina "adattatore" implicata nella risposta a fattori di crescita e a molecole con funzione di segnali di adesione cellulare (Guris *et al.*, 2001). Il suo omologo nel topo (Crkl) è fortemente espresso in tessuti derivati dalla cresta neurale durante lo sviluppo ed ha un ruolo essenziale in un determinato stadio dello sviluppo per la loro differenziazione e la loro funzione (Guris *et al.*, 2001).

Nei modelli animali la ridotta espressione di Hira e l'aploinsufficienza di Tbx1 comportano, rispettivamente, persistenza del tronco arterioso e assenza o riduzione



del IV paio di arterie degli archi faringei ma non il fenotipo DGS/VCFS completo (Farrel *et al.*, 1999; Lyndsay *et al.*, 2001) mentre l'aploinsufficienza di Crkl e di Ufd1l danno luogo a fenotipi normali (Guris *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 1999); la mancanza assoluta dei prodotti genici di Tbx1 e Crkl, nei mutanti omozigoti, comporta alterazioni dello sviluppo di un po' tutte le strutture che possono presentare anomalie nella DGS/VCFS, mentre quella del prodotto di UFD1L è letale per l'embrione (Lindsay *et al.*, 1999). Da queste considerazioni si può ipotizzare che, anche se la ridotta espressione o l'aploinsufficienza di nessuno di questi geni, se presi singolarmente, è in grado di sviluppare il fenotipo DGS/VCFS, essi potrebbero aumentare l'espressività delle varie manifestazioni cliniche agendo, in parallelo o in congiunzione, sullo sviluppo delle stesse strutture (Schinke e Izumo, 2001). Tra i modelli murini sviluppati, quello con la delezione della regione tra Idd e Hira presenta aploinsufficienza sia di Tbx1, che di Ufd1l, che di Hira ma non presenta il fenotipo DGS/VCFS completo; sarebbe interessante, in futuro, sviluppare un modello murino aploinsufficiente anche per Crkl ed eventualmente per altri geni candidati, per testare l'ipotesi che la DGS/VCFS sia, in realtà, una sindrome da geni contigui. Anche in questo caso, tuttavia, bisogna procedere con cautela nel rapportare i modelli murini all'uomo. Infatti, nel topo, delezioni in eterozigosi abbastanza estese che comprendono, tra gli altri, i geni CDC45 e UFD1L non comportano il fenotipo DGS/VCFS completo che invece è stato ritrovato, nell'uomo, in un paziente con una delezione piuttosto piccola che comprende questi due geni, come accennato in precedenza.

Non va dimenticato che, oltre quelli citati, altri geni della regione critica per la DGS/VCFS, sul cromosoma 22, sono stati presi in considerazione come geni candidati ad avere un ruolo nella determinazione del fenotipo (Holmes *et al.*, 1997; Gottlieb *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1997; Wadey *et al.*, 1995, Pizzuti *et al.*, 1996; McQuade *et al.*, 1999; Kurahashi *et al.*, 1995; Sirotkin *et al.*, 1997); lo stesso dicasi per altri geni della stessa regione solo recentemente isolati (Berti *et al.*, 2001; Funke *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Anche se gli indizi per un coinvolgimento primario di questi geni nella DGS/VCFS sono meno probanti bisogna precisare che, per alcuni di essi, le conoscenze relativamente all'espressione ed alla funzione, sono molto scarse e solo in pochi casi sono stati sviluppati modelli animali. Inoltre, bisogna ricordare che non tutti i geni della regione critica sono stati identificati e che potrebbe essercene qualcuno importante che non è stato ancora isolato.

Negli ultimi anni è stata sviluppata un'ipotesi alternativa a quelle esposte precedentemente per spiegare il riscontro di fenotipi sovrapponibili in pazienti che non hanno regioni di delezione comuni (Novelli *et al.*, 1999). Questa ipotesi prevede che i geni della regione implicata nella DGS/VCFS, in 22q11.2, siano correlati, a livello funzionale, da elementi regolatori che mediano interazioni fra essi o da fattori che agiscono sulla struttura della cromatina la quale, a sua volta, ne modifica

l'attività trascrizionale. L'interruzione di questa architettura funzionale, prodotta da una qualunque delezione o traslocazione all'interno della regione, produrrebbe fenotipi simili; d'altra parte lo stesso avviene per il segmento cromosomico Xq21-q26, in cui qualunque interruzione comporta il fenotipo amenorrea primaria. L'identificazione di trascritti non tradotti di regioni interessate da rotture in pazienti con DGS/VCFS con una possibile funzione regolatrice (Sutherland *et al.*, 1996; Pizzuti *et al.*, 1999) e la conservazione della sintenia nella regione critica per la DGS/VCFS, nell'uomo e nel topo, potrebbero essere elementi a sostegno di questa ipotesi. Relativamente a quest'ultimo punto, le differenze riscontrate nell'uomo e nel topo in questa regione (disposizione invertita di blocchi di geni, posizione diversa di singoli geni, presenza di geni non omologhi, Puech *et al.*, 1997), pur non comportando variazioni sostanziali nello sviluppo di strutture di base importanti quali quelle implicate nella DGS/VCFS, potrebbero spiegare le diversità osservate nei modelli murini creati per riprodurre la patologia, anche se, proprio a causa di queste differenze, una riproduzione fedele di una delle delezioni ritrovate nell'uomo non è mai stata ottenuta.

Un'altra possibilità per spiegare l'esistenza di fenotipi sovrapponibili, in pazienti che non hanno regioni di delezione comuni, è che il fenotipo DGS/VCFS sia il risultato di un'alterazione della conformazione della cromatina, dovuta alla delezione delle sequenze a basso numero di ripetizioni presenti nella regione critica che potrebbe comportare un'alterazione dell'espressione genica (Edelmann *et al.*, 1999; Shaikh *et al.*, 2000). A questo proposito bisogna, però, segnalare che queste sequenze sembrano essere un'acquisizione relativamente recente nell'evoluzione; si ritrovano, infatti, nei primati non umani ma non nel topo (Shaikh *et al.*, 2000). Questo sembrerebbe indicare che il ruolo di queste ripetizioni non sia tale da determinare, in caso di delezioni, un'alterazione dello sviluppo delle strutture implicate nella DGS/VCFS, anche se non si può escludere un loro coinvolgimento nella regolazione genica.

In ogni caso la DGS/VCFS può essere associata anche a cause indipendenti dalla regione 22q11.2 visto che non sono state ritrovate mutazioni nei principali geni candidati per la DGS/VCFS, compreso TBX1, nei casi di pazienti senza evidenza di delezioni in 22q11.2 (Lindsay *et al.*, 2001; Chieffo *et al.*, 1997; Novelli *et al.*, 1999; Wadey *et al.*, 1999; Epstein e Buck, 2000) e che esiste una regione critica per la DGS/VCFS in 10p13-p14 (Daw *et al.*, 1996; Lichtner *et al.*, 2000; van Esch *et al.*, 2000). Questo non dovrebbe stupire se si pensa alle cause che sottendono la DGS/VCFS. Al difetto di migrazione delle cellule della cresta neurale e, comunque, al difetto della formazione degli archi faringei concorrono infatti, direttamente o indirettamente, un gran numero di geni i quali codificano per fattori di crescita, fattori di trascrizione, molecole segnale ecc. (Olson e Srivastava, 1996; Hunt *et al.*, 1991; Qiu *et al.*, 1997; Satokata e Maas, 1994; Epstein *et al.*,

2000; Peters *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 1998; Wendling *et al.*, 2000; Helms *et al.*, 1997; Trumpp *et al.*, 1999) molti dei quali sono stati studiati solo marginalmente. Questi geni possono interagire nella stessa via di sviluppo o agire parallelamente in vie di sviluppo diverse. Inoltre, difetti simili a quelli del fenotipo DGS/VCFS si osservano, nel topo, in caso di mutazioni indotte o spontanee di geni diversi dagli omologhi che, nell'uomo, si possono ritrovare deleti nella regione 22q11.2 (Conway *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 2000; Garg *et al.*, 2001) anche se, in alcuni casi, esistono dei rapporti funzionali tra di essi (Yamagishi *et al.*, 1999; Managachi *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2001). Esempi sono costituiti dai geni ET1, dHAND e Msx1 che sembrano interagire nella stessa via di sviluppo (Thomas *et al.*, 1998), dal gene ET<sub>A</sub> la cui assenza comporta la ridotta o la mancata espressione di alcuni fattori di trascrizione tra cui dHAND (Clouthier *et al.*, 1998; Clouthier *et al.*, 2000), dal gene Pax3 (Conway *et al.*, 1997) e dal gene Shh che, come discusso precedentemente, sembra avere una azione regolatrice su Tbx1 (Garg *et al.*, 2001). Solo per il gene Pax3 sono stati studiati mutanti eterozigoti nei quali sono stati riscontrati difetti troncoconali (Conway *et al.*, 1997). Anche i topi omozigoti per una mutazione *null* dei recettori dell'acido retinoico  $\alpha$  e  $\beta$  mostrano il fenotipo tipico da ablazione delle cellule della cresta neurale (Mendelsohn *et al.*, 1994; Ghyselinck *et al.*, 1997; Mark *et al.*, 1998), con alterazioni simili a quelle del fenotipo del 22q11.2. A questo proposito, Wendling *et al.*, (2000) asseriscono che nello studio delle cause della DGS/VCFS devono essere presi in considerazione i geni *target* dell'acido retinoico. Anche l'esposizione a fattori teratogeni come l'alcool (Amman *et al.*, 1982), l'iperglicemia e la vitamina A (Lammer *et al.*, 1985) possono concorrere a determinare il fenotipo DGS/VCFS attraverso un'alterazione della migrazione delle cellule della cresta neurale negli archi faringei.

Dato che casi di DGS/VCFS non dovuti a delezioni nella regione 22q11.2 costituiscono una minima percentuale e che, in questi casi, la ricerca dei geni responsabili appare ardua, se non disperata, l'attenzione continuerà ad essere concentrata su questa regione del genoma. Per questo motivo le conoscenze sul gene TBX1, che sembra essere uno dei candidati più promettenti, sulla sua regolazione e sui suoi geni *target*, sono destinate a crescere enormemente nei prossimi anni.

## 2.2 Gene TBX10

Il gene TBX10 codifica per una proteina che mostra una ampia omologia di sequenza con quella codificata da TBX1, sia per quanto riguarda la T-*box* che le altre regioni (Law *et al.*, 1998). Mediante RT-PCR è stato rilevato che l'espressione si

manifesta a livello del cervello, dell'ovaio, dell'utero, dell'ipofisi e del rene fetale (Law *et al.*, 1998).

Nel topo, mediante *Northen blotting* l'espressione del gene omologo (Tbx10) è stata rilevata, oltre che nei tessuti degli embrioni di 8.5-15.5 giorni *p.c.*, nel cervello, nel fegato e nel rene dell'adulto, mentre, tramite RT-PCR, l'espressione è stata rilevata nell'ovaio, nell'utero e nel rene dell'adulto. I risultati preliminari di studi di ibridazione *in situ* suggeriscono che l'espressione di Tbx10 è sovrapponibile a quella di Tbx1 nell'embrione di 12.5 giorni, in particolare nel mesenchima del polmone e nei tessuti dell'orecchio in via di sviluppo (Law *et al.*, 1998).

La localizzazione cromosomica di TBX10 ed il suo *pattern* di espressione lo fanno ritenere un gene candidato per la sindrome di Bardet-Biedl tipo 1 (Law *et al.*, 1998) la quale è caratterizzata da ritardo mentale, retinopatia, obesità, polidattilia, ipogenitalismo, alterazioni renali.

### 2.3 Gene TBX15

Non si sa molto del gene umano a parte la posizione che occupa nel genoma.

Agulnik *et al.* (1998), tramite lo *screening* di un *database* di EST e RACE-PCR, hanno individuato la sequenza del trascritto del gene Tbx15 del topo. Utilizzando la sequenza ottenuta, hanno fatto uno *screening* di un *database* di EST dell'uomo ed hanno identificato tre cloni di cDNA contenenti la regione non tradotta in 3' del gene umano. La sequenza di questa regione è stata utilizzata, a sua volta, per identificare un clone di DNA genomico tramite il quale è stato possibile mappare il gene TBX15 nell'uomo con l'ibridazione *in situ*.

Nel topo Tbx15 codifica per un prodotto proteico che presenta una buona omologia con il prodotto di Tbx1 (Agulnik *et al.*, 1998). La sua espressione è stata studiata, mediante ibridazione *in situ*, in vari stadi dell'embriogenesi (Agulnik *et al.*, 1998). Nell'embrione di 9.5 giorni *p.c.* Tbx15 è espresso a livello degli arti anteriori e successivamente negli arti posteriori. L'espressione è limitata alla regione mediale degli arti, esclusi i margini posteriori e la cresta ectodermica apicale. A partire dal 10.5° giorno *p.c.*, l'espressione si rileva nel I e nel II arco faringeo, in particolare nelle aree che daranno origine ai processi mandibolari e mascellari e nelle prominenze ottiche. In 12.5° giornata l'espressione si rileva, in uno strato superficiale, lungo le aree laterali dell'embrione, intorno agli occhi ed alla bocca.

TBX15 può essere considerato come gene candidato per la sindrome AFA (*acromegaloïd facial appearance*) che ha una trasmissione di tipo dominante, è in *linkage* con la porzione prossimale del braccio corto del cromosoma 1 (Huges *et al.*, 1985; Dallapiccola *et al.*, 1992) e comporta un fenotipo in cui tutte le aree in cui Tbx15 è espresso, nel topo, possono presentare anomalie.

## 2.4 Gene TBX18

Il gene è stato scoperto attraverso lo *screening* di un *database* di EST ma a parte la sua localizzazione, non si conosce nulla circa la sua espressione o la sua funzione. L'unica informazione è relativa al fatto che il gene è stato isolato da librerie di cDNA di tessuti di derivazione ossea (Yi *et al.*, 1999). Nel tritone, il gene ortologo è espresso negli arti anteriori e nella coda (Simon *et al.*, 1997).

## 2.5 Gene TBX20

Attraverso lo *screening* di un *database* genomico alla ricerca di sequenze simili al gene H15 di *Drosophila*, Meins *et al.*, (2000) hanno isolato il gene TBX20 da un clone BAC. La sequenza proteica codificata è stata stimata essere di 297 aminoacidi. L'espressione di TBX20 si manifesta a livello del cuore, degli occhi e degli arti fetali. Un *pattern* di espressione più dettagliato si ha per l'ortologo di topo. In questa specie, a livello fetale, l'espressione è sovrapponibile a quanto si osserva nell'uomo mentre, in diversi stadi dello sviluppo embrionale, attraverso l'ibridazione *in situ*, l'espressione è stata rilevata nell'allantoide, nel corion, nell'amnios, nei precursori del tessuto cardiaco, nel cuore in via di sviluppo, nella regione mascellare e mandibolare della faccia, nella parte ventrale del tubo neurale, nei motoneuroni della parte posteriore del cervello e nel midollo spinale (Carson *et al.*, 2000; Kraus *et al.*, 2001; Meins *et al.*, 2000).

## 2.6 Gene TBX22

Durante un lavoro di ricostruzione sistematica della mappa trascrizionale della regione Xq12-q21, mediante sequenze di cloni genomici alla ricerca di nuovi geni potenzialmente coinvolti nel ritardo mentale X-linked, Laugier-Anfossi e Villard (2000) hanno individuato un nuovo gene della famiglia *T-box* che è stato chiamato TBX22. Inizialmente è stato identificato un cDNA tramite il quale era stato possibile ricostruire una struttura genomica di TBX22 che presentava sette esoni da cui sarebbe derivata una proteina con un dominio *T-box* tronco. Gli autori avevano ipotizzato che il prodotto tronco potesse derivare da *splicing* alternativo e che fosse una caratteristica del tessuto e dello stadio di sviluppo analizzati. Infatti, in uno studio successivo, è stato dimostrato che TBX22 contiene otto esoni collocati all'interno di una sequenza di DNA genomico di 9487 bp. Ne deriva una proteina di 520 aminoacidi che contiene un dominio *T-box* completo codificato dagli esoni 3, 4, 5 e da parte degli esoni 2 e 6 (Braybrook *et al.*, 2001). In un primo studio era stato dimo-

strato che l'espressione di TBX22 era ristretta solo ad un determinato stadio dello sviluppo dell'uomo (12 settimane; Laugier-Anfossi e Villard, 2000). In un lavoro successivo, mediante RT-PCR, trascritti di TBX22 sono stati rilevati in tessuti umani di 8-12 settimane di sviluppo, a livello del cervello, del cuore, degli arti, dei reni, dello stomaco, dell'intestino, della lingua, della mandibola; inoltre è stata trovata espressione in linee cellulari linfoblastiche nell'adulto (Braybrook *et al.*, 2001).

Non è stato possibile identificare un gene omologo nel topo (Laugier-Anfossi e Villard, 2000).

Braybrook *et al.* (2001) hanno dimostrato che la palatoschisi *X-linked* che si presenta spesso associata ad anchiloglossia, può essere causata da mutazioni del gene TBX22. Questa affezione, che mappa in Xq21.3 (Forbes *et al.*, 1996), nella maggior parte dei casi, sembra essere ereditata con modalità recessiva (Lowry, 1969, 1970; Rushton, 1979; Moore *et al.*, 1987, 1988) ma sono state trovate madri di affetti le quali presentavano anchiloglossia (Bjornsson *et al.*, 1989). Sono stati descritti casi con la sola palatoschisi, con la sola anchiloglossia o con entrambi i sintomi (Bjornsson *et al.*, 1989). Le mutazioni, identificate mediante l'analisi di 6 famiglie di origini etniche diverse in cui segregava la malattia, sono riportate in tab. 4.

A parte la delezione di una base, si rilevano mutazioni puntiformi dei siti di *splicing*, *nonsense* e *missense*. Queste ultime sono all'interno della regione che codifica la T-box, e comportano, probabilmente, alterazioni a livello del legame con il DNA (Braybrook *et al.*, 2001). In ogni famiglia segregava la stessa mutazione la quale è

Tab. 4 Mutazioni ritrovate nel gene TBX22 nella CPX (*cleft palate X-linked*); da Braybrook *et al.* (2001).

Famiglie studiate	Mutazione della proteina	Cambiamento a livello della sequenza nucleotidica	Conseguenze della mutazione
1	Glu56ter	esone 1 nt173 G→T	nonsense: codone di stop molto precoce, probabile abolizione del prodotto proteico
2	Gly118Cys	esone 2 nt359 G→T	missense: alterazione nella T-box
3		IVS4+1G→A	alterazione dello splicing: probabile rimozione dell'esone 4
4		esone 5 nt671 delC	frameshift: codone di stop con formazione di una proteina tronca
5	Thr260Met	esone 5 nt785 C→T	missense: alterazione nella T-box
6		IVS6+1G→C	alterazione dello splicing: probabile rimozione dell'esone 6

N.B. IVS4+1G→A e IVS6+1G→C sono mutazioni nei siti donatori di *splicing* degli introni 4 e 6.

stata ritrovata solo negli affetti e nelle femmine portatrici sintomatiche o asintomatiche e non è mai stata ritrovata nei cromosomi di un gruppo di controllo (Braybrook *et al.*, 2001).

Sulla base dei risultati del lavoro di Braybrook *et al.* (2001) si può concludere che TBX22 è uno dei fattori genetici più importanti per il corretto sviluppo del palato. In futuro, oltre che cercare di individuare i geni *target* di TBX22, per ottenere informazioni sui meccanismi molecolari che intervengono in questo processo, sarebbe interessante verificare se questo gene possa avere un ruolo nelle forme sporadiche di palatoschisi.





## SOTTOFAMIGLIA TBX2

La sottofamiglia dei geni Tbx2 è composta di due sottogruppi di geni paraloghi, Tbx2/Tbx3 e Tbx4/Tbx5, che si ritrovano arrangiati in due *clusters* strettamente concatenati sui cromosomi 5 e 11 di topo e sui cromosomi 12 e 17 dell'uomo (Papaioannou, 2001). Si ritiene che i geni di questa sottofamiglia derivino da una duplicazione di un singolo gene ancestrale a formare un *cluster* di due geni che si è avuta, per *crossing over* ineguale, più di 600 milioni di anni fa, prima della divergenza delle linee evolutive dei vertebrati e dei nematodi (Agulnik *et al.*, 1996; Ruvinsky e Silver 1997). Un ulteriore evento di duplicazione, che si stima si sia verificato più di 400 milioni di anni fa, prima della separazione delle linee che avrebbero dato origine ai pesci ossei ed ai tetrapodi, ha coinvolto entrambi i geni del *cluster* ed una copia di ognuno di essi è stata dislocata su un altro cromosoma (fig. 4; Agulnik *et al.*, 1996; Ruvinsky e Silver 1997).

Se questa stima è corretta, l'arrangiamento genomico dei due *clusters* T-box dovrebbe essere simile in tutti i vertebrati. Inoltre, l'ipotesi del secondo evento di duplicazione concorda con i probabili ruoli che i geni dei due *clusters* hanno durante lo sviluppo embrionale di molti vertebrati ed è stata confermata in uno studio di Ruvinsky e Silver (1997) in cui è stato dimostrato che, in questo evento, sono stati coinvolti diversi altri geni strettamente concatenati ad essi.

L'espressione di questi geni si ritrova ampiamente conservata anche in specie molto distanti a livello filogenetico. Aree comuni di espressione del gene Tbx2 e dei suoi omologhi, dalla *Drosophila* all'uomo, sono gli occhi, gli organi sensori in generale e gli arti; nei vertebrati i geni paraloghi Tbx2 e Tbx3 mostrano *patterns* di espressione sovrapponibili, in queste aree, ad indicare funzioni ridondanti accanto a quelle specifiche acquisite dai singoli geni dopo l'evento di duplicazione da cui sono originati (Papaioannou, 2001). La comparazione dei geni TBX2 e TBX3 dell'uomo rivela che i domini amino-terminali delle proteine da essi codificate sono

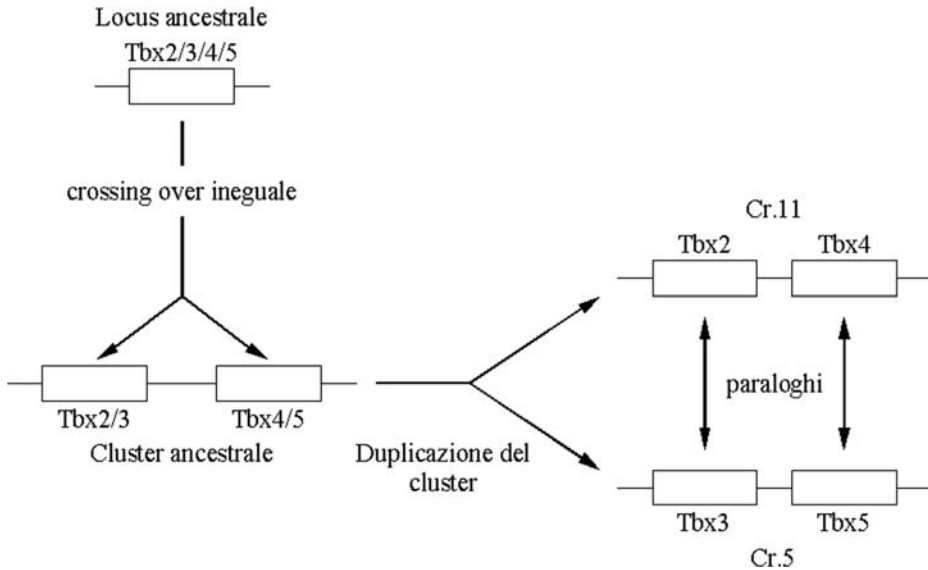


Fig. 4 Schema evolutivo dei geni Tbx2, Tbx3, Tbx4, Tbx5 nel topo (da Agulnik *et al.*, 1996).

simili anche relativamente ad alcune regioni al di fuori della *T-box* (Papaioannou, 2001). Anche Tbx5, come Tbx2 e Tbx3, ha una espressione a livello degli occhi, del cuore e degli arti anteriori che si ritrova conservata in molte specie; invece, l'espressione del suo gene paralogo, Tbx4, presenta notevoli differenze, essendo principalmente espresso negli arti posteriori.

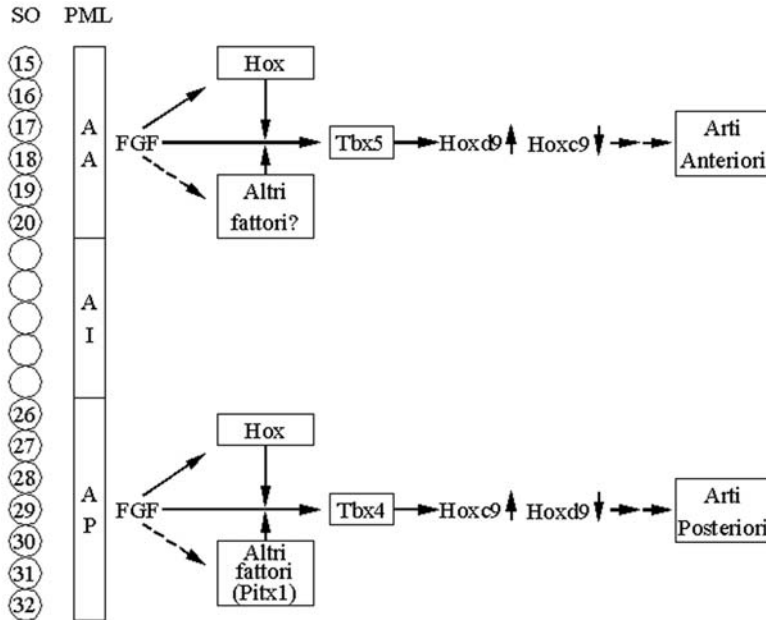
Il ruolo che i geni di questo gruppo hanno nella formazione degli arti è stato molto studiato, soprattutto nel pollo (Simon, 1999) ma anche nel topo (Gibson-Brown *et al.*, 1996). Tbx2 e Tbx3 hanno un *pattern* di espressione spazio-temporale, a livello degli arti sia anteriori che posteriori, ampiamente sovrapponibile, con alcune eccezioni la più importante delle quali consiste nel fatto che solo Tbx3 si ritrova espresso nella cresta ectodermica apicale (Isaac *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 1996; Gibson-Brown *et al.*, 1996). In contrasto con quanto osservato per Tbx2 e Tbx3, Tbx4 e Tbx5 hanno *patterns* di espressione distinti e ristretti rispettivamente agli arti posteriori ed anteriori (Isaac *et al.*, 1998). Il fatto che l'espressione di Tbx2 e Tbx3 si ritrovi sia negli arti anteriori che in quelli posteriori potrebbe far pensare che questi due geni abbiano avuto un ruolo nello sviluppo dell'appendice pelvica ancestrale la quale, nel modello di Tabin e Laufer (1993), sarebbe andata incontro ad una trasposizione omeotica verso la regione rostrale. Successivamente la duplicazione delle sequenze di Tbx2 e Tbx3 avrebbe dato origine, rispettivamente, ai geni Tbx4 e Tbx5 i quali, durante l'evoluzione dei tetrapodi, avrebbero acquisito ruoli unici nello sviluppo degli arti posteriori ed anteriori (Agulnik *et al.*, 1996). Si pensa

che il mantenimento di uno stretto *linkage* tra *Tbx3* e *Tbx5* e tra *Tbx2* e *Tbx4*, durante l'evoluzione, possa avere un significato funzionale in analogia con quanto osservato per i geni *Hox* (Chapman *et al.*, 1996); questi ultimi hanno una organizzazione in *clusters* altamente conservata che sembra essere la conseguenza della condivisione di uno o più elementi regolatori che agiscono in *cis* sui geni di ogni singolo *cluster* (Agulnik *et al.*, 1996). Gibson-Brown *et al.* (1996), sulla base della più precoce espressione di *Tbx4* e *Tbx5*, hanno proposto che questi possano essere coinvolti nella regolazione dell'espressione di *Tbx2* e *Tbx3* durante lo sviluppo degli arti.

L'espressione differenziale di *Tbx4* e *Tbx5* ha portato a considerare la possibilità che i due geni controllino, rispettivamente, l'identità degli arti posteriori ed anteriori (Simon, 1999). Per saggiare questa ipotesi sono stati condotti numerosi esperimenti sul pollo nel quale arti ectopici possono essere sperimentalmente indotti lungo i fianchi dell'embrione, tramite l'apporto di una fonte esogena di FGF. La natura degli arti ectopici dipende dalla posizione in cui viene posta la fonte di FGF: si ha lo sviluppo di ali se viene posta in posizione anteriore, lo sviluppo zampe se viene posta in posizione posteriore, di arti che sono un mosaico di ala e zampa se viene posta in posizione mediana (Cohn *et al.*, 1995; Ohuchi *et al.*, 1995). In vari studi è stato usato questo sistema per investigare sul ruolo di *Tbx4* e *Tbx5* nella determinazione dell'identità degli arti (Gibson-Brown *et al.*, 1998; Isaac *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998; Ohuchi *et al.*, 1998). In tutti i casi è stato dimostrato che il tipo di arto che si svilupperà in una determinata zona, in seguito all'induzione di FGF, dipende dal rapporto tra il livello di espressione di *Tbx4* e quello di *Tbx5* in quella regione. Inoltre, se si impiantano porzioni di mesenchima degli arti anteriori nella regione degli arti posteriori e viceversa, il mesenchima trapiantato mantiene la sua identità e si sviluppa autonomamente perché mantiene inalterata la sua espressione originaria di *Tbx4* e *Tbx5*.

L'induzione dell'espressione di *Tbx5* nell'arto posteriore dell'embrione di pollo comporta una conversione della zampa in una struttura parzialmente simile ad un'ala, mentre l'induzione dell'espressione di *Tbx4* nell'ala comporta lo sviluppo di una struttura simile ad una zampa; lo stesso accade se si induce, nell'arto anteriore, l'espressione di *Pitx1*, un fattore di trascrizione che viene espresso nel solo arto posteriore prima di *Tbx4* e che sembra avere un'azione di induzione della trascrizione su di esso (Rodriguez-Esteban *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Logan e Tabin, 1999; Szeto *et al.*, 1999). In questi arti anomali l'espressione dei geni *Hoxc9*, *Hoxc10* e *Hoxc11*, specifici dell'arto posteriore e del gene *Hoxd9*, specifico dell'arto anteriore, aumenta o diminuisce in relazione ai cambiamenti morfologici rilevati negli abbozzi degli arti. Questo indica che alcuni geni *Hox* sono geni *target* di *Tbx4* e *Tbx5* negli abbozzi degli arti (Logan e Tabin, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999).

Ci sono prove a sostegno del fatto che l'espressione di *Tbx4* è indotta da *Pitx1*. Infatti, in topi *knock-out* per il gene *Pitx1*, si ha una parziale trasformazione degli



SO = somiti, PML = piastra mesodermica laterale, AA = area sviluppo arto anteriore, AI = area intermedia, AP = area sviluppo arto posteriore.

Fig. 5 Modello molecolare della determinazione dell'identità degli arti (da Ohuchi *et al.*, 1998 e Takeuchi *et al.*, 1999; modificato).

arti posteriori in arti anteriori ed una riduzione, negli stessi, dell'espressione di Tbx4 (Lanctot *et al.*, 1997; Szeto *et al.*, 1999).

Un modello molecolare che illustra i meccanismi che determinano l'identità degli arti, ripreso dai lavori di Ohuchi *et al.* (1998) e di Takeuchi *et al.* (1999) sul pollo, viene illustrato in fig. 5.

### 3.1 Gene TBX2

Il gene TBX2 è stato il primo membro della famiglia T-box identificato e clonato nell'uomo ed ha una *open reading frame* di oltre 2106 nucleotidi (Campbell *et al.*, 1995). Sia TBX2 che il suo omologo murino codificano per trascritti multipli di grandezza variabile tra 2 e 4 Kb; almeno in parte questa variabilità sembra essere dovuta a poliadenilazione alternativa (Campbell *et al.*, 1995). L'omologia di sequenza per i probabili prodotti proteici è di oltre il 95%, con una identità assoluta relativamente alla regione *DNA-binding* (Campbell *et al.*, 1995). Mediante

*Northen blotting* sono stati rilevati elevati livelli di espressione di TBX2 nel rene e nel polmone fetali e bassi livelli nel fegato fetale. Nei tessuti adulti si hanno: una espressione moderata nel rene, nel polmone, nella placenta, nella prostata, nella milza, nel testicolo e nell'ovaio ed un livello di espressione più basso nel cuore, nei polimorfonucleati, nell'intestino tenue e nel timo (Law *et al.*, 1995).

Il *pattern* di espressione, nel topo, sembra essere sovrapponibile ad eccezione del mancato rilevamento del trascritto nella milza e nel testicolo (Bollag *et al.*, 1994) e della sua presenza a livello dei melanoblasti, dei melanociti (Carreira *et al.*, 1998), dei condroblasti e degli osteociti (Chen *et al.*, 2001). Una descrizione dettagliata dell'espressione di *Tbx2* durante lo sviluppo è stata fatta, mediante ibridazione *in situ*, nel topo (Chapman *et al.*, 1996) e nel pollo (Gibson-Brown *et al.*, 1998); i *patterns* di espressione riportati sono ampiamente sovrapponibili e sembrano indicare che l'espressione di *Tbx2* coinvolga un gran numero di tessuti. Nel topo le prime evidenze di espressione si hanno a 9.5 giorni *p.c.* nella regione facciale intorno alla placca olfattiva, nel primo arco faringeo e nelle vescicole ottica e otica. Nel periodo che va dagli 11.5 ai 12.5 giorni *p.c.*, l'espressione di *Tbx2* si estende a livello dei processi mascellari e mandibolari e si ritrova nell'epitelio dell'orecchio interno e nella regione dorsale della componente nervosa della retina. Durante l'organogenesi *Tbx2* viene espresso anche a livello dei padiglioni auricolari in via di sviluppo, nei gangli del trigemino e nei gangli delle radici dorsali dei nervi spinali, nell'infundibolo e nel circostante ectoderma neurale del pavimento del diencefalo, in alcuni nuclei della parte posteriore del cervello, nei margini anteriori e posteriori degli abbozzi degli arti, nei miotomi, nella parete del tronco e, lateralmente, nel mesenchima che darà origine allo stroma delle ghiandole mammarie, nella cartilagine che darà origine alle costole, nel mesenchima dei polmoni, nel mesonefro, nella cresta genitale e nella papilla genitale. Questo *pattern* di espressione è ampiamente sovrapponibile a quello di *Tbx3* sebbene ci siano alcune differenze temporali ed alcune aree di espressione unica; per esempio, solo *Tbx2* è espresso nel tessuto di origine mesodermica che darà origine allo stroma delle ghiandole mammarie e nei padiglioni auricolari in via di sviluppo; inoltre l'espressione di *Tbx2* è più precoce di quella di *Tbx3* negli organi di senso.

Sebbene non siano stati stabiliti rapporti diretti tra TBX2 e patologie umane, è stato condotto un certo numero di studi nell'uomo, nel topo e nel pollo che hanno permesso di mettere in luce alcuni aspetti delle modalità di funzionamento e possibili geni *target* e regolatori.

Nel pollo, l'espressione di *Tbx2* non sembra essere dipendente né da segnali provenienti dalla cresta ectodermica apicale (AER) che induce il mesoderma sottostante degli abbozzi degli arti a proliferare lungo l'asse prossimo-distale, né dalla zona di attività polarizzante (ZPA) indotta da AER che provvede alle informazioni posizionali lungo l'asse antero-posteriore. Questo si evince dal fatto che l'e-

spressione di Tbx2 negli abbozzi degli arti dell'embrione, dopo ablazione della AER, viene mantenuta; sembra invece che, a questo livello, l'espressione di Tbx2 possa essere regolata in maniera diretta da Shh (Gibson-Brown *et al.*, 1998a,b) il quale, peraltro, in una fase precedente dello sviluppo, potrebbe essere, invece, un gene *target* di Tbx2 ed anche di Tbx3 (Gibson-Brown *et al.*, 1998a,b). Sempre nel pollo, dove è stata dimostrata una espressione di Tbx2 in vari stadi dello sviluppo del tubo cardiaco primitivo, sulla base dell'osservazione che Tbx2 e BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) presentavano lo stesso *pattern* di espressione spazio-temporale, sono stati fatti ulteriori approfondimenti (Yamada *et al.*, 2000). È stato così dimostrato che BMP2 induce l'espressione di Tbx2 in tessuti embrionali non cardiogenici mentre un suo antagonista la reprime e che l'espressione di Tbx2 è decisamente ridotta nell'embrione di topo con una mutazione *null* in BMP2. Questi dati indicano che Tbx2 è un gene *target* di BMP2 durante lo sviluppo cardiaco (Yamada *et al.*, 2000).

Il promotore di Tbx2, nel topo, contiene potenziali siti di legame per diversi fattori di trascrizione ma è stato provato, tramite studi di legame *in vitro* e saggi di trascrizione *in vivo*, che Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*), che ha un ruolo importante nello sviluppo dei melanociti, regola Tbx2 tramite legame di una E-box al suo promotore (Carreira *et al.*, 2000). Per quanto riguarda i geni *target* di Tbx2, sempre nei melanociti, il promotore del gene TRP-1 (*tyrosinase-related protein-1*) contiene due elementi regolatori dove si legano fattori stimolanti e repressivi della trascrizione (Carreira *et al.*, 1998). Entrambi questi elementi contengono sequenze simili a metà della sequenza consenso alla quale si lega il prodotto del gene T ed è stato dimostrato che il prodotto di Tbx2 è capace di legarsi a questi siti e reprimere la trascrizione di TRP-1 nei melanociti ed in linee cellulari di melanoma (Carreira *et al.*, 1998). Considerato che Tbx2 sembra essere l'unico gene della famiglia T-box espresso nei melanoblasti e nei melanociti, questi dati sperimentali suggeriscono che potrebbe regolare, *in vivo*, l'espressione di TRP-1 durante lo sviluppo dei melanociti (Carreira *et al.*, 1998).

Sempre nel topo, sono stati studiati gli effetti dell'espressione ectopica di Tbx2 in una linea cellulare di fibroblasti in cui normalmente il gene non è espresso; è stata utilizzata la tecnologia dei *microarrays* per studiare le differenze tra i profili di espressione di svariati geni di questa linea cellulare, transfettata in modo da presentare espressione di Tbx2, rispetto a cellule della stessa linea utilizzate come controllo (Chen *et al.*, 2001). I risultati di questo lavoro indicano che Tbx2 può essere un importante modulatore nello sviluppo delle ossa e che potrebbe essere coinvolto nella regolazione del ciclo e dell'adesione cellulari. Inoltre, utilizzando una diversa linea cellulare, gli autori hanno dimostrato che Tbx2 può agire sia come repressore che come attivatore della trascrizione e che il contesto cellulare può influenzare l'effetto sull'espressione dei geni sottoposti alla sua regolazione.

Nell'uomo è stato ipotizzato un ruolo di TBX2 nella genesi dei tumori. Jacobs *et al.* (2000) hanno effettuato uno *screening* genetico per identificare nuovi geni immortalizzanti in grado di sbloccare il rapido e deciso avvio alla senescenza in fibroblasti primari, carenti dell'oncogene BMI1. Essi hanno descritto TBX2 come un potente gene immortalizzante che agisce inibendo la trascrizione di CDKN2A (inibitore di una chinasi dipendente dalla ciclina) e causa allungamento della vita delle cellule ed incremento della proliferazione. Nello stesso lavoro viene riportato che il gene TBX2 si ritrova amplificato in alcuni tipi di carcinoma primario della mammella ad indicare che esso potrebbe contribuire al suo sviluppo.

### 3.2 Gene TBX3

Il cDNA di questo gene è stato completamente caratterizzato da Bamshad *et al.* (1999); precedentemente era stata identificata una sequenza di cDNA parziale che non comprendeva la regione terminale in 3' della *open reading frame* (Bamshad *et al.*, 1997). Il gene, di cui è stata determinata anche la sequenza in 3' non tradotta, è composto da almeno sette esoni ed ha una *open reading frame* di 2172 bp che si pensa codifichi per una proteina di 723 aminoacidi. La comparazione con i prodotti dei geni omologhi, nel topo e nel pollo, rivela un alto livello di conservatività. Il dominio DNA-*binding* presenta un alto grado di omologia con quello della proteina codificata da TBX2 e ci sono domini con sequenze molto simili anche al di fuori di esso. Questo potrebbe suggerire che TBX3 e TBX2 condividono domini funzionali oltre al dominio di legame con il DNA.

Un fine mappaggio fisico ha consentito di stabilire che il gene TBX3 si trova in posizione più telomerica, rispetto a TBX5, sul cromosoma 12 (Li *et al.*, 1997).

Tramite *Northern blotting*, in tessuti umani adulti, è stato individuato un trascritto principale di circa 5.2 Kb che suggerisce che il trascritto completo del gene contiene una regione in 5' non tradotta piuttosto lunga la quale non è stata ancora caratterizzata (Bamshad *et al.*, 1999). Sono stati individuati, inoltre, almeno altri tre trascritti dovuti probabilmente a siti alternativi di inizio della trascrizione, di poliadenilazione e di *splicing* (Bamshad *et al.*, 1999). Uno dei trascritti alternativi contiene 60 paia di basi addizionali che interrompono il dominio DNA-*binding* altamente conservato. Ne deriva una proteina con 20 aminoacidi addizionali all'interno della T-*box*, i quali, probabilmente, alterano le proprietà di legame con il DNA. Un altro trascritto alternativo comporta lo *splicing* di una regione che contiene l'intera T-*box* (Bamshad *et al.*, 1999); il significato di trascritti di questo tipo rimane sconosciuto ma sono stati segnalati per alcuni geni HOX i quali possono produrre trascritti mancanti dell'*homeobox* (Chariot *et al.*, 1995).

Il *pattern* di espressione di TBX3, come quello di TBX2, è molto ampio. Nei tessuti adulti, un elevato livello di espressione si ha nella placenta, nelle ghiandole surrenali, nella tiroide, nella prostata, nelle ghiandole mammarie, nella vescica, nell'utero e nel fegato ed è stato riscontrato anche a livello di alcune linee cellulari di carcinomi della mammella (Bamshad *et al.*, 1997; Bamshad *et al.*, 1999). Un livello di espressione più basso si ha nelle ovaie, nei polmoni, nelle ghiandole salivari, nei reni, nell'intestino tenue, nei muscoli scheletrici e nell'ipofisi (Bamshad *et al.*, 1999). Nei tessuti fetali l'espressione di TBX3 si manifesta a livello dei polmoni, dei reni, del cuore, del fegato e della milza (Bamshad *et al.*, 1999).

L'espressione, durante l'embriogenesi, è stata studiata dettagliatamente per i geni omologhi del topo (Chapman *et al.*, 1996; Gibson-Brown *et al.*, 1996) e del pollo (Gibson-Brown *et al.*, 1998b) e risulta ampiamente sovrapponibile nelle due specie. Nel topo *Tbx3* è espresso già nella blastocisti prima dell'impianto e, temporaneamente, dopo l'impianto, nei foglietti mesodermico ed endodermico del sacco vitellino e nel mesoderma dell'amnios, del corion e dell'allantoide. Successivamente *Tbx3* si ritrova espresso nella regione faringea intorno alla bocca in via di sviluppo, nel diverticolo tiroideo, nell'orecchio interno, nella regione dorsale della componente nervosa della retina, nei gangli del trigemino e delle radici dorsali dei nervi spinali, nell'infundibolo, nei miotomi, nelle pareti della regione toracica ed addominale, nelle gemme epiteliali delle ghiandole mammarie in via di sviluppo, nella cartilagine che darà origine alle costole, nel mesenchima del polmone, nel mesonefro, nella cresta genitale e nella papilla genitale. Dalla comparsa degli abbozzi degli arti, *Tbx3* si ritrova espresso nel mesenchima dei margini anteriori e posteriori e nella cresta ectodermica apicale degli abbozzi stessi. In uno stadio successivo, l'espressione nel mesenchima dei margini anteriori regredisce a partire dall'estremità distale (Isaac *et al.*, 1998). Yamada *et al.* (2000), nel pollo, hanno rilevato un'espressione di *Tbx3* anche nelle prime fasi dello sviluppo del cuore. Nel topo adulto, i dati a disposizione sul *pattern* di espressione (Bollag *et al.*, 1994) sembrano indicare un buon livello di somiglianza con quanto si osserva nell'uomo; inoltre, nelle femmine di topo, è stato rilevato che *Tbx3* viene espresso nelle ghiandole mammarie in tutti gli stadi della gravidanza e durante l'allattamento (Papaioannou, 2001).

Dai dati relativi a *Tbx2* e *Tbx3* si rileva l'elevato livello di sovrapposizione del *pattern* di espressione di questi due geni. Aree di espressione esclusiva di TBX3 sono la blastocisti pre-impianto, le membrane extraembrionali, le gemme epiteliali delle ghiandole mammarie dalle quali originerà il sistema dei dotti (*Tbx2* è espresso nel mesenchima mammario che darà origine allo stroma) e la cresta ectodermica apicale degli abbozzi degli arti (Chapman *et al.*, 1996).

Sulla regolazione di TBX3, sui suoi geni *target* e sulle sue modalità funzionali sono disponibili poche informazioni. In arti ectopici, indotti mediante l'introduzione di una pallina rivestita di FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) a livello del mesoder-



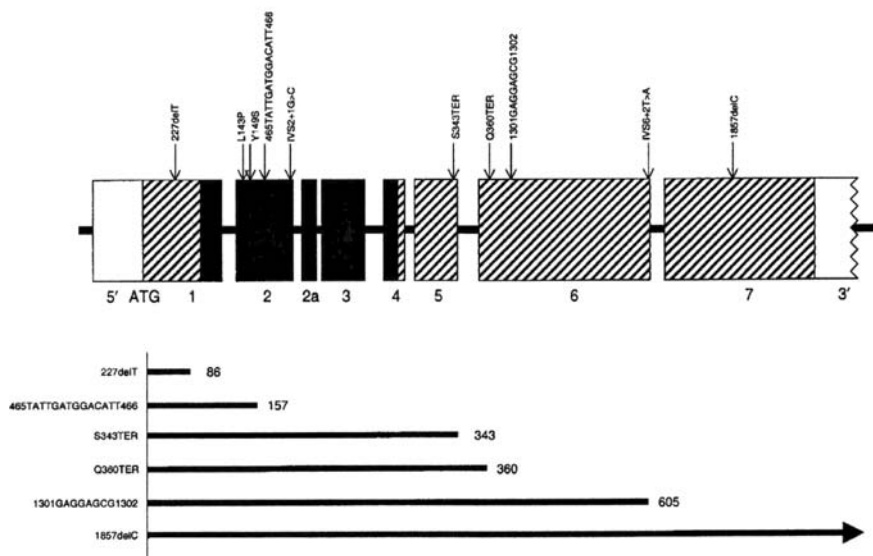
ma laterale dell'embrione di pollo, il prodotto di *Tbx3* risulta essere distribuito normalmente lungo i margini anteriori e posteriori (Isaac *et al.*, 1998). Sempre nel pollo, come già esposto per *Tbx2*, l'espressione di *Tbx3* non sembra essere dipendente dai segnali provenienti dalla cresta ectodermica apicale (AER) e dalla zona di attività polarizzante (ZPA) indotta da AER. Anche in questo caso, infatti, l'espressione di *Tbx3* viene mantenuta negli abbozzi degli arti dell'embrione, dopo ablazione della AER (Gibson-Brown *et al.*, 1998). He *et al.* (1999) hanno caratterizzato il gene ET in *Xenopus* ed hanno dimostrato che questo gene è ortologo al gene TBX3 dell'uomo. Mediante saggi funzionali di trascrizione, essi hanno dimostrato che ET e TBX3 possono reprimere la trascrizione. Inoltre, esperimenti di dissezione funzionale della proteina codificata da ET hanno permesso di identificare un dominio repressore localizzato nella regione carbossi-terminale che si ritrova, conservato, nell'uomo, nella proteina codificata da TBX3 ed anche in quella codificata da TBX2 per la quale, peraltro, una attività di repressione sulla trascrizione era già stata dimostrata (Carreira *et al.*, 1998).

Li *et al.* (1997), in base alla sua localizzazione, hanno proposto TBX3 come candidato per la sindrome di Noonan e per la UMS (*ulnar mammary syndrome*). Studi successivi hanno confermato che la seconda delle due sindromi citate può essere causata da mutazioni del gene TBX3 (Bamshad *et al.*, 1997).

La UMS è una rara sindrome autosomica dominante a penetranza completa ed espressività variabile anche all'interno della stessa famiglia (Papaioannou, 2001). Negli affetti si possono ritrovare, con differenti gradi di gravità, malformazioni delle strutture degli arti superiori derivate dall'ulna embrionaria o dai raggi post-assiali, ipoplasia e/o disfunzione delle ghiandole apocrine (ghiandola mammaria, ghiandole sudoripare), anomalie dentarie, endocrine e genitali (Bamshad *et al.*, 1997). Sebbene nella maggior parte degli affetti i difetti a livello degli arti superiori consistano in deficienze post-assiali di uno degli arti, in alcuni individui, sempre a livello post-assiale, sono state ritrovate fusioni o duplicazioni, con o senza deficienze, nell'arto controlaterale (Bamshad *et al.*, 1997). La varietà ed il tipo di alterazioni che possono essere ritrovate a livello degli arti superiori fanno ritenere che nella UMS possono essere alterati sia l'asse prossimo-distale, che gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale (Bamshad *et al.*, 1997).

Tramite PCR e sequenziamento dei segmenti amplificati, Bamshad *et al.* (1999) hanno condotto un'analisi per la ricerca di mutazioni di TBX3 in almeno due individui affetti di ognuna delle 10 famiglie non imparentate selezionate per lo studio. Sono state ritrovate mutazioni negli affetti di tutte le famiglie analizzate che consistono in: delezioni di una singola base, piccole duplicazioni, mutazioni puntiformi *missense* e *nonsense*, mutazioni dei siti di *splicing* (fig. 6; tab. 5).

Ognuna delle mutazioni individuate era presente solo all'interno di una delle famiglie studiate ed era presente solo negli individui affetti; inoltre nessuna di esse



Bianco: sequenze non tradotte; nero: sequenze del dominio T-box; righe oblique: altre sequenze codificanti.

Fig. 6 Organizzazione degli esoni di TBX3 (da Bamshad *et al.*, 1999). La localizzazione delle mutazioni di TBX3 trovate in 10 famiglie con UMS è indicata dalle frecce. I probabili polipeptidi codificati da alcuni degli alleli TBX3 mutanti vengono mostrati nella parte inferiore della figura.

è stata ritrovata in 200 cromosomi di individui sani di controllo. Ulteriori varianti sono state identificate all'interno degli introni di individui affetti e non affetti, ad indicare che si tratta di polimorfismi non patogenici. La maggior parte delle mutazioni comportano la formazione di prodotti proteici tronchi. Almeno due delle mutazioni individuate causano l'interruzione o l'eliminazione del dominio DNA-binding e producono un frammento proteico che, presumibilmente, ha un'attività di legame fortemente ridotta se non nulla. Le due mutazioni *missense* sono all'interno della T-box e si trovano vicine ad un sito che, in base alle omologie riscontrate con la proteina Xbra di *Xenopus*, sarebbe critico per la dimerizzazione. Altre cinque mutazioni individuate coinvolgono la regione che si trova in 3' rispetto alla sequenza che codifica la T-box. Questo suggerisce che uno o più domini al di fuori della T-box sono ugualmente importanti per la funzione del prodotto proteico di TBX3. Sarebbe interessante appurare se alcune delle mutazioni identificate comportano interruzione o eliminazione del dominio con azione di repressione della trascrizione, in posizione carbossi-terminale, identificato da He *et al.* (1999).

Si pensa che le mutazioni in TBX3 alterino il processo di sviluppo a causa dell'aploinsufficienza del normale prodotto proteico e che l'ampia varietà dei difetti

Tab. 5 Mutazioni ritrovate nel gene *TBX3* nella UMS (*ulnar mammary syndrome*); da Bamshad *et al.* (1999).

Famiglie studiate	Mutazione della proteina	Cambiamento a livello della sequenza nucleotidica	Conseguenze della mutazione
1		esone 1 nt227delT	frameshift: formazione di proteina tronca
2		esone 7 nt1857delC	frameshift: prodotto proteico alterato
3	Leu143Pro	esone 2	missense: alterazione nella T-box
4	Tyr149Ser	esone 2	missense: alterazione nella T-box
5	Gln360ter	esone 6	nonsense: codone di stop con formazione di proteina tronca
6	Ser343ter	esone 5 G→A+C→A	nonsense: codone di stop con formazione di proteina tronca
7		IVS2 <sub>+1</sub> G→C	mutazione di un sito donatore di splicing: probabile formazione di proteina tronca
8		IVS6 <sub>+2</sub> T→A	mutazione di un sito donatore di splicing: probabile formazione di proteina tronca
9		esone 2 ins nt465TATTGATGGACATT466 (dovuta a duplicazione)	frameshift: formazione di proteina tronca
10		esone 6 ins nt1301GAGGAGCG1302 (dovuta a duplicazione)	frameshift: formazione di proteina tronca

N.B. IVS2<sub>+1</sub>G→C e IVS6<sub>+2</sub>T→A sono mutazioni nei siti donatori di *splicing* degli introni 2 e 6.

osservati, all'interno di ogni famiglia in cui segrega la UMS, sia dovuta a modificatori epistatici (Bamshad *et al.*, 1999). Questa ipotesi è quella che meglio si concilia con il fatto che la gamma di manifestazioni fenotipiche è fundamentalmente la stessa, indipendentemente dal tipo di mutazione che si ritrova in *TBX3* e con il fatto che esiste una variabilità nel tipo e nella gravità dei difetti, anche tra individui portatori della stessa mutazione (Bamshad *et al.*, 1999).

Che *TBX3* abbia un ruolo nel determinare le anomalie dello sviluppo che si riscontrano nella UMS si può desumere dal *pattern* di espressione di questo gene durante l'embriogenesi. Nel topo ed anche nel pollo, nel mesenchima dell'abbozzo degli arti anteriori, *Tbx3* è espresso soprattutto lungo il margine posteriore (Gibson-Brown *et al.*, 1996; Isaac *et al.*, 1998). Dal mesenchima di questa area si sviluppano gli elementi post-assiali compresi ulna, ossa metacarpali e falangi del lato ulnare che sono quelli interessati dalla malattia (Bamshad *et al.*, 1999). L'espressione a livello degli abbozzi delle ghiandole mammarie, dell'epitelio buccale e del tuber-

colo genitale può spiegare i difetti riscontrati a carico delle ghiandole apocrine, dei denti e dei genitali esterni (Bamshad *et al.*, 1999).

Per risalire allo specifico ruolo di TBX3 nella UMS si possono fare alcune considerazioni. Sia gli abbozzi delle ghiandole mammarie, che l'epitelio buccale, che il tubercolo genitale, dove Tbx3 viene espresso, sono strutture epiteliali che hanno un effetto induttivo sul mesoderma sottostante a sviluppare, rispettivamente, il sistema dei dotti della mammella, i denti e i genitali esterni (Hennighausen e Robinson, 1998; Thesleff e Sharpe, 1997; Dollè *et al.*, 1991); anche la cresta ectodermica apicale degli abbozzi degli arti, che è un'altra struttura in cui Tbx3 si ritrova espresso, ha un effetto induttivo sul mesoderma anche se la sua azione è molto più articolata (Gibson Brown *et al.*, 1996). Poiché studi anatomici e molecolari indicano che le prime fasi di sviluppo degli arti, dei denti, dei peli e delle ghiandole apocrine, comprese le mammelle, è simile (Schwabe *et al.*, 1998), si pensa che TBX3 possa avere una funzione nella modulazione delle interazioni tra epitelio e mesoderma (Bamshad *et al.*, 1999). Questo conferma le osservazioni di Bamshad *et al.* (1997) i quali, sulla base degli effetti pleiotropici della sindrome, avevano suggerito che il prodotto del gene implicato avrebbe potuto avere una funzione nella modulazione delle interazioni tra epitelio e mesoderma.

Considerando l'ampio *pattern* di espressione di TBX3 risulta difficile spiegare come mai molti tessuti dove TBX3 viene espresso risultano normali negli individui affetti da UMS. È possibile che i diversi tessuti necessitino di quantità differenti di proteina prodotta da TBX3 (Bamshad *et al.*, 1999). In alternativa, altri geni dello stesso tipo, con *patterns* di espressione sovrapponibili, come per esempio TBX2, potrebbero compensare, a livello di certi tessuti, la carenza del prodotto di TBX3 (Bamshad *et al.*, 1997). A sostegno di questa ipotesi va segnalato che una ridondanza funzionale di questo genere è stata osservata nel caso di altre famiglie geniche che codificano fattori di trascrizione con un ruolo importante nello sviluppo degli arti, le cui anomalie possono causare quadri sindromici con difetti congeniti nell'uomo (geni HOX).

TBX3 è ampiamente espresso anche nei tessuti adulti. Sebbene il suo ruolo a questo livello sia stato poco studiato, sulla base del ritardo della pubertà che si osserva frequentemente negli affetti da UMS, è stato suggerito che TBX3 potrebbe avere una parte nel sistema di controllo trascrizionale dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Bamshad *et al.*, 1996). L'espressione del gene a livello dell'ipofisi e delle ghiandole surrenali, nell'adulto, sembrano essere a sostegno di questa ipotesi.

### 3.3 Gene TBX4

Sequenze del cDNA del gene Tbx4 del topo e del pollo sono state utilizzate per fare uno *screening* di sequenze di un *database* genomico umano ed è stato, così, pos-

sibile identificare sequenze simili (Yi *et al.*, 2000). A partire da queste, tramite PCR, è stata ricostruita la sequenza del gene umano e, attraverso la comparazione dell'organizzazione dei geni ortologhi, identificare otto esoni ed un cDNA virtuale di TBX4 (Yi *et al.*, 2000). Poiché TBX4 sembra avere una struttura genomica molto simile a quella di TBX5, si pensa che debba essere identificato un ulteriore esone corrispondente all'esone 1 di TBX5 (Yi *et al.*, 2000). Si stima che il polipeptide codificato da TBX4 sia composto di 545 residui aminoacidici ed abbia oltre il 95% di sequenze simili al polipeptide codificato dal gene ortologo di topo, con una identità completa della regione *T-box* (Yi *et al.*, 2000). Un fine mappaggio fisico ha permesso di stabilire che TBX4 occupa una posizione più centromerica rispetto a TBX2 sul cromosoma 17 (Yi *et al.*, 2000).

Il *pattern* di espressione è stato studiato, durante l'embriogenesi, nel pollo e nel topo, mediante ibridazione *in situ* (Gibson-Brown *et al.*, 1998b; Chapman *et al.*, 1996) ed è risultato essere più limitato rispetto a quello dei geni *Tbx2* e *Tbx3*. Nel topo, la prima espressione del gene si ha, alla 7.5° giornata *p.c.*, nell'allantoide dove persiste anche dopo la fusione di quest'ultimo con il corion; nel pollo in cui, peraltro, il *pattern* di espressione risulta essere sovrapponibile, non si ritrova espressione nell'allantoide. In 9.5° giornata *p.c.* *Tbx4* è espresso nella papilla genitale ed in 12.5° giornata *p.c.* è espresso nell'atrio comune del cuore in via di sviluppo, nella parete del torace e nel mesenchima dell'arco mandibolare, del polmone ed intorno alla trachea. Relativamente allo sviluppo degli arti, un grado di espressione molto elevato di *Tbx4* si ritrova in 9.5° giornata nella regione che darà origine agli abbozzi degli arti posteriori mentre l'espressione negli abbozzi degli arti anteriori è di gran lunga inferiore. L'espressione di *Tbx4* nel mesenchima degli arti posteriori viene mantenuta lungo tutto l'asse prossimo-distale fino alla 13.5° giornata *p.c.*, sebbene si abbia un decremento nel tempo.

### 3.4 Gene TBX5

Il gene TBX5 dell'uomo è stato identificato, insieme a TBX3, da Li *et al.* (1997) e, contemporaneamente, da Basson *et al.* (1997), dopo che studi di *linkage* avevano indicato che il *locus* della sindrome di Holt-Oram (HOS) si trovava nella regione distale del braccio lungo del cromosoma 12 (Terret *et al.*, 1994; Bonnet *et al.*, 1994). In entrambi i lavori il gene TBX5 è stato identificato mediante analisi *exon trapping*; in un caso l'analisi è stata condotta su cloni genomici contenenti marcatori in *linkage* con il *locus* HOS (Basson *et al.*, 1999), nell'altro su sequenze di un punto di rottura di un paziente con un riarrangiamento cromosomico che aveva coinvolto la regione 12q2 (Li *et al.*, 1997).

Una mappatura precisa è stata ottenuta mediante ibridazione *in situ* con un

cosmide contenente il marcatore D12S129, che era stato dimostrato essere strettamente concatenato al *locus* HOS ed ha consentito di stabilire che TBX5 si trova in posizione più centromerica rispetto a TBX3 (Basson *et al.*, 1997).

Nel lavoro di Li *et al.* (1997) sono stati individuati diversi esoni uno dei quali presenta una forte somiglianza con sequenze del gene Tbx5 del topo. Utilizzando questo esone come *probe* in uno *screening* di una *library* di cDNA è stato identificato un clone di 2,4 Kb. La *open reading frame* si estende dal nucleotide 666 al nucleotide 2205 e codifica per una proteina putativa di 512 aminoacidi. La regione T-*box* è compresa tra i nucleotidi 847 e 1388. Poiché non sono stati trovati siti di poliadenilazione nella regione non tradotta in 3', gli autori sostengono che la sequenza del cDNA identificato non sia completa. È stato rilevato un grado di omologia del 95% tra la proteina umana e quella codificata dal gene Tbx5 di topo. Dati parziali degli stessi autori, relativi alla struttura genomica di TBX5, attestano la presenza di 7 introni e 8 esoni dei quali i due più esterni, in 3' ed in 5', sono stati caratterizzati solo parzialmente. I dati ottenuti da Basson *et al.* (1997) sono piuttosto diversi. Essi, infatti, riportano una *open reading frame* di 1050 bp che codifica per una proteina putativa di 349 aminoacidi con una T-*box* che va dal 56° al 238° aminoacido e che è codificata dagli esoni 3, 4, 5, 6, e da parte dell'esone 7; anche in questo caso, comunque, viene riportato un alto grado di omologia con il prodotto del gene Tbx5 del topo. In un lavoro successivo Basson *et al.* (1999) riportano dati più completi sulla struttura genomica di TBX5 che potrebbero spiegare le incongruenze tra gli studi precedenti. Da essi si desume che dal trascritto non maturo di TBX5 possono derivare, per *splicing* alternativo, RNAm diversi. Di conseguenza, si possono avere cDNA che differiscono a livello del primo esone in 5' e per l'eventuale presenza di un esone addizionale in 3'. Inoltre, in un lavoro più recente, Cross *et al.* (2000) affermano che una estesa revisione della struttura genomica e delle sequenze del DNA genomico e del cDNA di TBX5 ha messo in luce che il secondo esone (esone B) descritto da Li *et al.* (1997) consiste in realtà di due esoni e che la sequenza della regione codificante è sovrapponibile a quella descritta da Basson *et al.* (1997; 1999).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che la proteina codificata da TBX5 si lega ad un ottamero di basi che corrisponde a parte di una metà della sequenza consenso del gene T (Ghosh *et al.*, 2001). Perché si abbia attività DNA-*binding* la T-*box* deve essere integra così come la regione amino-terminale della proteina. (Ghosh *et al.*, 2001). L'eliminazione della regione carbossi-terminale comporta invece un aumento dell'attività DNA-*binding* ad indicare che, probabilmente, la regione carbossi-terminale ha un'azione di inibizione nei confronti del legame con il DNA e che la proteina codificata da TBX5 necessita di cofattori proteici per esprimere appieno la sua attività sulla trascrizione dei geni *target* (Ghosh *et al.*, 2001).

Tramite ibridazione *in situ*, è stato determinato il *pattern* di espressione di TBX5 in tessuti di embrioni umani di 26-52 giorni di gestazione (Li *et al.*, 1997). Per quan-

to riguarda il cuore, a 26 giorni, il più alto livello di espressione è stato rilevato nelle regioni in entrata del tubo cardiaco (atrio primitivo e seno venoso). Negli stadi successivi, sono stati osservati alti livelli di espressione nelle pareti e nel setto atriali e nel seno coronarico e livelli di espressione più bassi nei cuscinetti endocardiaci atrio-ventricolari e a livello delle valvole. Un dettagliato *pattern* di espressione, relativamente ai tessuti ed alle cellule cardiache, è stato determinato, durante l'embriogenesi e nel cuore adulto dell'uomo, attraverso studi immunoistochimici (Hatcher *et al.*, 2000). Sia nell'embrione che nel cuore adulto TBX5 è espresso in tutto l'epicardio e nei cardiomiociti del miocardio di tutte e quattro le camere cardiache. L'espressione a livello dell'endocardio è presente solo nel ventricolo sinistro. Nell'embrione ma non nell'adulto è stato rilevato un gradiente di espressione transmiocardico con una asimmetria di espressione, essendo TBX5 maggiormente espresso nella parte sinistra del cuore. Per quanto riguarda gli altri organi, negli stadi di sviluppo dal 33° al 52° giorno, alti livelli di espressione sono stati rilevati negli arti anteriori in via di sviluppo, nella trachea, nel polmone e nella parete toracica; livelli più bassi sono stati ritrovati a livello della retina e del telencefalo (Li *et al.*, 1997). Un *pattern* di espressione più dettagliato, durante l'embriogenesi, si ha per il gene *Tbx5* del topo e del pollo (Bruneau *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1996; Gibson-Brown *et al.*, 1998b; Isaac *et al.*, 1998; Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000; Logan *et al.*, 1998; Ohuchi *et al.*, 1998); esso si presenta molto simile nelle due specie se si esclude la presenza di una espressione temporanea nell'allantoide, ritrovata esclusivamente nel topo e della espressione nella notocorda, ritrovata esclusivamente nel pollo. Entrambe le specie mostrano espressione di *Tbx5* nella vescicola ottica e, in uno stadio successivo, nella parte dorsale della componente nervosa della retina; espressione di *Tbx5* si rileva anche nella papilla genitale, nella parete del corpo a livello del torace, nel mesenchima dell'arco mandibolare, nel polmone, ed intorno alla trachea. Per quanto riguarda lo sviluppo degli arti, l'espressione di *Tbx5* si ha nella piastra mesodermica laterale a livello della regione che darà origine all'arto anteriore, prima che la formazione della gemma degli arti anteriori diventi evidente e, successivamente, in tutto il mesenchima; in una fase ancora successiva la sua espressione diventa ristretta alla regione prossimale ed al pericondrio degli elementi scheletrici prossimali e distali. Per quanto riguarda lo sviluppo del cuore, l'espressione si rileva già nella regione cardiogenica nel mesoderma dell'estremità cefalica del disco germinativo, localizzandosi nelle regioni posteriori che daranno origine all'atrio primitivo ed al seno venoso, durante la formazione del tubo cardiaco e viene mantenuta negli atri e nelle vene cave definitivi. Durante il *looping* del tubo cardiaco, l'espressione si espande anteriormente e si rileva nella regione che darà origine al ventricolo sinistro. Successivamente, durante la divisione delle camere cardiache, l'espressione di *Tbx5* si rileva anche a livello dei cuscinetti endocardiaci atrio-ventricolari, del *septum primum* e del *septum secundum*, mentre l'espressione a livello del setto ventricolare è limitata alla parte sinistra del setto stesso.

Le informazioni più interessanti sulla funzione del gene Tbx5 derivano da mutazioni del gene TBX5 dell'uomo che sono responsabili della sindrome di Holt-Oram (Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Si tratta di un disordine dello sviluppo che ha una frequenza di 1/100000 individui, è autosomico dominante, con espressività variabile, caratterizzato da difetti cardiaci e degli arti anteriori che, in alcuni casi, coinvolgono anche la spalla. (Terret *et al.*, 1994). I difetti degli arti anteriori vanno da malformazioni delle ossa del carpo, rilevabili solo a livello radiografico, alle più frequenti anomalie del raggio radiale pre-assiale (ipoplasia, aplasia, o trifalanga del pollice) fino ad arrivare alla ipoplasia o aplasia del radio ed alla focomelia. I difetti degli arti tendono ad essere bilaterali ed asimmetrici, essendo l'arto sinistro più severamente colpito del destro (Terret *et al.*, 1994; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). I difetti cardiaci possono variare da disturbi asintomatici di conduzione ai più frequenti difetti del setto atriale, usualmente di tipo *ostium secundum* e del setto interventricolare, usualmente a livello delle trabecole muscolari, fino a disordini complessi come la tetralogia di Fallot (Li *et al.*, 1997; Bruneau *et al.*, 1999). Possono essere presenti anche difetti dei cuscinetti endocardiaci, ipoplasia del cuore sinistro, prollasso della valvola mitrale ed altri difetti che sono in accordo con il *pattern* di espressione di TBX5 (Bruneau *et al.*, 1999; Terret *et al.*, 1994).

Sono state studiate diverse famiglie in cui segrega la HOS e diversi casi sporadici e sono state individuate variazioni della sequenza di TBX5 che sono state considerate mutazioni sulla base del fatto che segregano insieme alla malattia e che non sono state ritrovate nei cromosomi di individui non affetti di controllo. In 34 famiglie in cui segregava la HOS ed in 13 casi sporadici Li *et al.* (1997) e Cross *et al.* (2000), mediante sequenziamento degli esoni codificanti in cui erano state individuate mutazioni tramite SSCP (*single stranded conformation polymorphism*), hanno identificato le mutazioni riportate in tab. 6.

Yang *et al.* (2000), con lo stesso metodo, hanno analizzato altre 3 famiglie in cui segregava la HOS e 4 casi sporadici. Le mutazioni identificate da Yang *et al.* (2000) sono riportate, in tab. 7, insieme a quelle ritrovate da Basson *et al.* (1999) tramite PCR degli esoni codificanti e sequenziamento, in un non precisato numero di casi familiari e sporadici.

Come si evince dalle tabelle le mutazioni identificate sono di vario tipo e, nella maggior parte dei casi, comportano la formazione di proteine tronche. In generale si può dire che le mutazioni che comportano la produzione di proteine tronche, sia che si abbia interruzione del dominio T-box che la mancanza di parti più o meno grandi del dominio carbossi-terminale, possono essere definite mutazioni *null* (Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Basson *et al.*, 1999). Queste comportano la malattia per aploinsufficienza dovuta o ad incapacità, da parte della proteina trunca, di legare il DNA o all'assenza di regioni importanti per l'attività di regolazione della trascrizione (es. domini attivatori o repressori; Li *et al.*, 1997). Questo sembra



Tab. 6 Mutazioni ritrovate nel gene *TBX5* in affetti da Sindrome di Holt-Oram (Cross et al., 2000\*; Hi et al., 1997\*\*).

Famiglie studiate	Mutazione della proteina	Cambiamento a livello della sequenza nucleotidica	Conseguenze della mutazione
1*		introne 4 T→C	alterazione dello splicing: probabile formazione di una proteina tronca
2*	Gly169 Arg	esone 5 nt1170 G→A	missense: alterazione nella T-box
3*		esone 8 nt1611 G→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
4*		esone 8 nt1233 G→C	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
5*	Ser252Ile	esone 7 nt1420 G→T	missense: alterazione nella regione carbossi-terminale
6*		esone 8 nt1470 delT	frameshift: codone di stop con formazione di una proteina tronca
7*	Arg279ter	esone 8 nt1500 C→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
8*	Arg279ter	esone 8 nt1500 C→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
9**	Arg279ter	esone 8 nt1500 C→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
10**	Arg279ter	esone 8 nt1500 C→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
11**	Arg279ter	esone 8 nt1500 C→T	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
12**	InsAsn198FSter	esone 6 nt1258 insA	frameshift: codone di stop con formazione di una proteina tronca
13**	Ser196ter	esone 6 nt1252 C→A	nonsense: codone di stop con formazione di una proteina tronca
14**	InsSer387FSter	esone 9 nt1824 insA	frameshift: codone di stop con formazione di una proteina tronca

N.B. La posizione dei nucleotidi che hanno subito mutazioni non è raffrontabile a quella di tab. 7 perché, in questo caso, gli autori cominciano la numerazione dei nucleotidi a partire dalla regione in 3' non tradotta.

Introne 4 T→C è una mutazione in un sito di *splicing*.

essere confermato da studi sulla proteina T del topo in cui è stato dimostrato che anche la rimozione di pochi aminoacidi dal dominio *T-box* abolisce la capacità di legare il DNA (Kispert e Herrmann, 1993) e che la regione carbossi-terminale regola l'attività trascrizionale (Kispert et al., 1995a). Le più rare mutazioni *missense*, pro-

Tab. 7 Mutazioni ritrovate nel gene TBX5 nella Sindrome di Holt-Oram (\*Basson *et al.*, 1999; \*\*Yang *et al.*, 2000).

Famiglie studiate	Mutazione della proteina	Cambiamento a livello della sequenza nucleotidica o a livello cromosomico	Conseguenze della mutazione
1*	Gly80Arg	esone 3 nt238 G→A	missense: alterazione nella T-box
2*	Arg237Gln	esone 7 nt710 G→A	missense: alterazione nella T-box
3*	Arg237Gln	esone 7 nt710 G→A	missense: alterazione nella T-box
4*	Arg237Trp	esone 7 nt709 C→T	missense: alterazione nella T-box
5*	ΔGlu243FSter	esone 7 nt727 delG	frameshift: codone di stop 263 con formazione di proteina tronca
6*	Glu69ter	esone 3 nt205 G→T	nonsense: codone di stop 69 con formazione di proteina tronca
7*		t(5;12)(q15;q24)	rottura a livello dell'introne 1A e traslocazione: separazione delle sequenze codificanti degli esoni 2-9 dal promotore e dalle sequenze in 5' non tradotte
8*	Ser196ter	esone 6 nt587 C→A	nonsense: codone di stop 196 con formazione di proteina tronca
9*	ΔAsp140FSter	esone 5 nt420-432 del	frameshift: codone di stop 145 con formazione di proteina tronca
10*		introne 2 AS C <sub>2</sub> →A	alterazione dello splicing con formazione di proteina tronca
11*		introne 2 AS G <sub>1</sub> →C	alterazione dello splicing con formazione di proteina tronca
12*	InsMet83FSter	esone 4 nt246G→AA	frameshift: codone di stop 94 con formazione di proteina tronca
13**		esone 4 nt416 delC	frameshift: codone di stop con formazione di proteina tronca
14**	Gln49Lys	esone 2 nt145 C →A	missense: alterazione dominio amino-terminale
15**	Ile54Thr	esone 2 nt161 T→C	missense: alterazione dominio amino-terminale

N.B. La posizione dei nucleotidi che hanno subito mutazioni non è raffrontabile a quella di tab. 6 perché, in questo caso, gli autori cominciano la numerazione dei nucleotidi a partire dall'inizio della regione tradotta.

Introne 2 AS C<sub>2</sub>→A e introne 2 AS G<sub>1</sub>→C sono mutazioni in siti accettori di *splicing*.

babilmente, comportano la malattia per un effetto dominante negativo dovuto ad una funzionalità diminuita (Basson *et al.*, 1999).

Il fenotipo della HOS è variabile anche tra individui portatori di mutazioni identiche ed almeno in parte, questa variabilità potrebbe essere spiegata dal fatto che se la proteina si lega al DNA *target* come omodimero, negli eterozigoti, si possono avere tre tipi diversi di interazioni TBX5-DNA *target* (Basson *et al.*, 1999). Molto più interessante, a questo riguardo, sembra essere il rilevamento di una correlazione tra le manifestazioni cliniche della sindrome di Holt-Oram ed il tipo di mutazione (tab. 8; Basson *et al.*, 1999).

Le mutazioni *null*, di qualunque tipo, comportano un fenotipo simile in cui sono quasi sempre presenti sia alterazioni scheletriche, spesso gravi, sia alterazioni cardiache, spesso composite. Questo sta ad indicare che una adeguata concentrazione del prodotto di TBX5 è necessaria per l'espressione fisiologica di geni critici durante lo sviluppo di queste strutture (Basson *et al.*, 1999). Le mutazioni *missense* che comportano alterazioni della *T-box* sembrano avere un effetto diverso, sul fenotipo, a seconda della loro posizione all'interno di essa (Basson *et al.*, 1999). Le probabili conseguenze del cambiamento di singoli aminoacidi nella *T-box* possono consistere nell'alterazione della struttura tridimensionale della proteina e, di conseguenza, dei suoi rapporti con il DNA. Per avere un'idea più precisa di come le mutazioni *missense* all'interno della *T-box* di TBX5 da loro individuate possono agire a questo livello, Basson *et al.* (1999) le hanno mappate sulla struttura tridimensionale della *T-box* della proteina Xbra di *Xenopus* legata alla sua sequenza *target* di DNA (Muller e Herrmann, 1997). Questo è stato fatto sulla base di una omologia di sequenza del 74% tra la *T-box* di questa proteina e quella della proteina codificata da TBX5 (Muller e Herrmann, 1997) che implica una probabile similitudine anche a livello della struttura tridimensionale e quindi delle interazioni con il DNA. Questa analisi ha messo in evidenza che la mutazione Gly80Arg che si trova vicino all'estremità amino-terminale della *T-box* potrebbe alterare una struttura a laccio che si trova in corrispondenza di questa regione alterando, a sua volta, l'interazione con il solco maggiore del DNA (fig. 7). L'arginina in posizione 237 che si trova, nella *T-box*, in posizione carbossi-terminale è, probabilmente, impegnata nella formazione

Tab. 8 Incidenza di anomalie cardiache e scheletriche in affetti da Sindrome di Holt-Oram portatori di mutazioni del gene TBX5 (Basson *et al.*, 1999).

Mutazioni	N. famiglie studiate	N. individui studiati	Totale anomalie cardiache	Totale anomalie scheletriche	Anomalie cardiache composite	Anomalie scheletriche severe
Varie con produzione di proteine tronche	8	26	21	26	16	18
Missense Gly80	1	19	19	19	4	0
Missense Arg237	3	26	14	26	1	9

di un ponte salino con un residuo di glutammato. La sostituzione sia con la glutamina che con il triptofano, che non presentano carica, potrebbe comportare la rottura di questo ponte con il ripristino della struttura ad elica in questa regione e la conseguente alterazione dell'interazione con il solco minore del DNA *target* (fig. 7).

Prima dell'identificazione di TBX5 come responsabile della HOS, in uno studio clinico di due grandi famiglie, era stata osservata una sostanziale diversità dei sintomi che gli affetti delle due famiglie presentavano. Infatti, mentre in una delle famiglie erano presenti difetti cardiaci compositi, a fronte di alterazioni scheletriche più blande, nell'altra erano presenti severe malformazioni scheletriche a fronte di alterazioni cardiache semplici (Basson *et al.*, 1994). In seguito, alla luce delle nuove scoperte, è stato appurato che in una famiglia segregava la mutazione Gly80Arg, con una probabile alterazione delle interazioni con il solco maggiore del DNA *target*, mentre nell'altra ed in due ulteriori famiglie con una maggiore rilevanza delle manifestazioni scheletriche, segregava la mutazione Arg237Gln o Arg237Trp con una probabile alterazione dell'interazione con il solco minore (Basson *et al.*, 1999).



Fig. 7 Struttura tridimensionale della T-box della proteina Xbra di *Xenopus* legata alla sua sequenza *target* di DNA. In evidenza le presunte posizioni degli aminoacidi Gly80 e Arg237 della proteina codificata da TBX5 coinvolti in mutazioni *missense* nella sindrome di Holt-Oram; da Basson *et al.*, 1999.

Possibili conferme delle osservazioni di Basson *et al.* (1999) vengono dai lavori di Cross *et al.* (2000) e di Yang *et al.* (2000). Anche in questi studi, infatti, le mutazioni *null* comportavano un fenotipo in cui erano sempre presenti sia i difetti cardiaci che scheletrici, spesso gravi. Per quanto riguarda le mutazioni *missense*, Yang *et al.* (2000) ne riportano due che, pur essendo al di fuori della *T-box*, si trovano subito in prossimità della sua porzione amino-terminale e parlano di effetti fenotipici più blandi a livello scheletrico rispetto a quanto osservato per una mutazione *null* da loro stessi caratterizzata negli affetti di una famiglia. Cross *et al.* (2000) riportano altre due mutazioni *missense*. Per una di queste, che è al di fuori della *T-box*, nella porzione carbossi-terminale della proteina e comporta un fenotipo particolare, non vengono formulate ipotesi sulle possibili conseguenze a livello strutturale e funzionale; l'altra, ritrovata in otto affetti di una famiglia, consiste nella sostituzione di una glicina in posizione 169, che si ritrova conservata nei geni *T-box* di varie specie (Muller e Herrmann, 1997), con una arginina. Secondo gli autori, l'inserimento di una carica positiva all'interno di una regione non polare del dominio *T-box* potrebbe avere delle conseguenze a livello della sua struttura tridimensionale e quindi delle sue interazioni. I portatori di questa mutazione presentano alterazioni cardiache piuttosto gravi accanto a manifestazioni scheletriche piuttosto blande (Cross *et al.*, 1999). Sebbene il numero di mutazioni esaminate sia ancora abbastanza esiguo, questi dati, nel loro complesso, sembrano indicare che le interazioni critiche tra la proteina codificata da *TBX5* ed il DNA *target* sono diverse nel cuore e negli arti in via di sviluppo (Basson *et al.*, 1999). Potrebbe essere che la proteina *TBX5*, direttamente o indirettamente, regoli la trascrizione di geni diversi durante lo sviluppo del cuore e degli arti e che proteine non conosciute, espresse elettivamente nei due tessuti, influenzino il legame di *TBX5* con il suo DNA *target*. (Basson *et al.*, 1999).

In un lavoro recente Ghosh *et al.*, (2001) hanno studiato, *in vitro*, mediante EMSA (*electromobility shift essay*), la capacità di legare il DNA da parte di proteine *TBX5* con alcune delle mutazioni individuate in pazienti affetti da HOS. La mutazione *nonsense* Arg279Ter, corrispondente alla mutazione C→T del nucleotide 1500 riportata da Cross *et al.* (2000), lasciando inalterato il dominio *T-box*, non influisce sulla capacità di legame con il DNA. La proteina che ne deriva manca della maggior parte della regione carbossi-terminale e, pur non essendo completamente chiaro se conservi una qualche attività biologica, si pensa che comporti aploinsufficienza per assenza di domini attivatori o repressori (Li *et al.*, 1997). Le mutazioni *missense* Gly80Arg e Arg237Gln causano una completa mancanza di attività DNA-binding; al contrario, le proteine con le mutazioni *missense* Gly169Arg e Ser252Ile, corrispondenti rispettivamente alle mutazioni G→A del nucleotide 1170 e alla mutazione G→T del nucleotide 1420 descritte da Cross *et al.* (2000), mantengono l'attività DNA-binding. Come riportato in precedenza, i portatori di mutazioni Gly80Arg e

Gly169Arg mostrano significative anomalie cardiache e minori anomalie scheletriche, mentre i portatori della mutazione Arg237Gln mostrano significative alterazioni scheletriche e minori anomalie cardiache; il portatore della mutazione Ser252Ile che è al di fuori della *T-box* non presenta un fenotipo particolarmente severo ma presenta un sintomo non comune nella HOS come la scoliosi. L'importanza delle interazioni tra la proteina ed il DNA, nel determinare questa variabilità fenotipica tra portatori di mutazioni diverse, sembra essere sminuita dai dati del lavoro di Gosh *et al.*, (2001). La totale mancanza di attività *DNA-binding* delle proteine con le mutazioni Gly80Arg e Arg237Gln che comportano fenotipi diversi suggerisce, piuttosto, che questi potrebbero essere dovuti a differenze nel modo in cui il prodotto di TBX5 interagisce con proteine diverse, durante lo sviluppo degli arti e del cuore. L'importanza delle interazioni proteina-proteina sembra essere confermata dal fatto che la proteina con la mutazione Gly169Arg, all'interno della *T-box*, mantiene l'attività *DNA-binding*. In questo caso, infatti, la glicina 169 sulla base della similitudine TBX5-Xbra, non sembra essere direttamente coinvolta nel legame con il DNA ma più probabilmente partecipa all'interazione con una proteina che potrebbe essere alterata a causa dell'introduzione di un residuo positivamente carico. La proteina con la mutazione Ser252Ile, in accordo con il fatto che la mutazione cade al di fuori della *T-box*, non mostra alterazioni dell'attività *DNA-binding*. Anche in questo caso il fenotipo è, probabilmente, determinato dall'alterazione di un legame proteina-proteina; la scoliosi potrebbe essere legata al tipo specifico di mutazione o più probabilmente, trattandosi di un caso sporadico, ad una concomitanza casuale.

Tra le mutazioni finora identificate ce ne sono alcune che sono state ritrovate in più famiglie non imparentate (Basson *et al.*, 1999; Cross *et al.*, 2000). Questo è abbastanza sorprendente se si pensa che nella HOS prevalgono le mutazioni *de novo* e che la sindrome è piuttosto rara. Addirittura, la presenza della stessa mutazione, consistente in una transizione C→T nella stessa posizione (nucleotide 1500) dell'esone 8, che comporta la formazione di un codone di stop invece che di arginina, è stata rilevata in tre casi sporadici ed in due casi familiari analizzati da Li *et al.* (1997) e da Cross *et al.* (2000). Un'analisi delle famiglie coinvolte con *markers* della regione HOS, condotta per escludere l'eventualità di un antenato comune, non ha messo in evidenza condivisione di aplotipi per cui si pensa che le mutazioni ritrovate rappresentino eventi indipendenti (Li *et al.*, 1997; Cross *et al.*, 2000). Il ritrovamento della stessa mutazione in famiglie diverse può essere spiegato o considerando la possibilità di *hot spot* mutazionali o la possibilità che certe mutazioni comportino fenotipi più evidenti e quindi più facilmente rilevabili (Basson *et al.*, 1999). Il fatto che il residuo coinvolto nella mutazione C→T, di cui sopra, faccia parte di una doppietta CG sembra sostenere la prima ipotesi.

Dai lavori di Cross *et al.* (2000) e di Yang *et al.* (2000) risulta che mutazioni in TBX5 sono state ritrovate in 17 dei 54 casi familiari e sporadici di HOS esamina-

ti. Questa bassa incidenza di mutazioni di TBX5 può essere spiegata o con una eterogeneità genetica della HOS, o con la presenza di mutazioni nelle regioni non tradotte e nella regione del promotore che non sono state esaminate in questi studi o, ancora, con la presenza di delezioni di interi esoni che potrebbero non essere rilevabili con l'SSCP (Cross *et al.*, 1999).

Del ruolo di TBX5 nello sviluppo degli arti si è parlato in un precedente paragrafo in cui l'argomento è stato affrontato unitamente al ruolo di TBX4, vista la loro azione praticamente sovrapponibile negli arti anteriori e posteriori, soprattutto attraverso lo studio degli omologhi del pollo. Per quanto riguarda il ruolo di TBX5 nel cuore, sono stati fatti recentemente numerosi studi che hanno messo in evidenza almeno alcuni dei ruoli di questo gene durante la cardiogenesi (Horb e Thomsen, 1999; Liberatore *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001; Hatcher *et al.*, 2001; Bruneau *et al.*, 2001).

Il fenotipo cardiaco dei pazienti con HOS suggerisce che TBX5 abbia un ruolo importante soprattutto nella formazione dei setti ma attraverso questi pazienti è possibile avere un'idea solo degli effetti dell'aploisufficienza o, comunque, di una diminuzione della funzionalità della proteina codificata. Per studiare più dettagliatamente gli effetti di deficienza o dell'espressione ectopica di TBX5 si è ricorso a modelli sperimentali.

Horb e Thomsen (1999) hanno dimostrato che l'espressione ectopica di una versione dominante negativa, ormone-inducibile, della proteina Tbx5 nell'embrione di *Xenopus*, riduce significativamente l'espressione di geni importanti per lo sviluppo del cuore quali Nkx2-5 (codifica per una proteina *homeobox* cardiaca) e Mlc2 (*myosin light chain 2*) e blocca la formazione del tubo cardiaco quasi completamente, ad indicare un'azione globale della proteina Tbx5 sullo sviluppo del cuore.

Liberatore *et al.*, (2000) hanno dimostrato che, durante lo sviluppo del cuore, nell'embrione di pollo, il trattamento con acido retinoico comporta un'espansione dell'espressione di Tbx5, analogamente a quanto avviene per l'espressione di Amhc1 (*atrial myosin heavy chain 1*), un gene specifico dello sviluppo degli atri che, normalmente, è espresso solo nei precursori atriali nella parte posteriore del tubo cardiaco e non in quelli ventricolari posti in posizione anteriore. Inoltre, in embrioni di topi transgenici in cui è stata indotta l'espressione di Tbx5 in tutto il tubo cardiaco primitivo, mediante introduzione di un gene Tbx5 legato al promotore della catena pesante della  $\beta$ -miosina, Liberatore *et al.* (2000) hanno osservato la mancanza di espressione di un gene specifico dello sviluppo ventricolare ed un ritardo nello sviluppo ventricolare, con ridotta formazione delle trabecole. Questo sembra essere dovuto all'espressione costante, nella regione anteriore del tubo cardiaco che darà origine ai ventricoli, della proteina Tbx5 che normalmente, prima del *looping*, è ristretta alla porzione posteriore, deputata alla formazione degli atri e dei seni venosi.

Questi studi mettono in evidenza l'importanza del ruolo di Tbx5 nella formazione degli atri e dei ventricoli sia dal punto di vista del loro sviluppo che nella determinazione della loro identità e l'importanza della localizzazione, dei tempi e del dosaggio della sua espressione.

Hatcher *et al.* (2001) hanno dimostrato che l'espressione ectopica di TBX5 *in vitro* e del suo omologo del pollo, *in vivo*, durante l'embriogenesi, inibisce, nel primo caso, la proliferazione cellulare ed altera, nel secondo caso, la cardiogenesi, con inibizione della proliferazione dei cardiomiociti. Gli autori hanno, inoltre, illustrato come la proteina TBX5 con la mutazione Gly80Arg all'estremità 5' della *T-box*, che comporta gravi difetti cardiaci e minori effetti scheletrici nei pazienti con HOS, abbia una ridotta attività antiproliferativa rispetto alla proteina selvatica. Sulla base di questi dati e di studi immunostochimici, i quali indicano che l'espressione della proteina TBX5, in vari tessuti umani, è inversamente proporzionale alla loro proliferazione, Hatcher *et al.* (2001) propongono che TBX5 abbia un ruolo importante nella regolazione della proliferazione, durante l'ontogenesi, negli organi in cui viene espresso, compreso il cuore.

Nel tentativo di identificare possibili geni *target* di TBX5 nello sviluppo cardiaco Ghosh *et al.* (2001) hanno operato una ricerca in un *database*, ed hanno ritrovato la sequenza *target* di TBX5 nelle regioni a monte di numerosi geni importanti a livello cardiaco. La loro attenzione si è concentrata su quei geni in cui la sequenza si ritrovava conservata anche nel topo: ANF (*atrial natriuretic factor*), MYH6 (*cardiac myosin heavy chain  $\alpha$* ) e Mlc1v (*myosin light chain 1V*). In particolare, il miglior candidato come gene *target* per TBX5 è risultato essere ANF il quale mostra un *pattern* di espressione simile a quello di TBX5, con l'espressione di TBX5 che si manifesta leggermente prima, durante lo sviluppo cardiaco. In esperimenti di co-trasfezione è stato dimostrato che la delezione del sito DNA-*binding* di TBX5 comporta una significativa riduzione dell'attività trascrizionale di ANF, ad indicare che parte dell'attività di quest'ultimo è dovuta a specifiche interazioni della proteina TBX5 con il suo sito di legame sul DNA. Poiché, però, l'eliminazione del sito DNA-*binding* non elimina completamente l'attivazione di ANF da parte della proteina TBX5, è possibile che questa possa attivare la trascrizione di ANF tramite interazione con altri fattori. Un duplice ruolo di attivazione della trascrizione, tramite legame alla sequenza *target* sul DNA e tramite interazione con altri fattori proteici che legano il DNA, è già stata descritta per un altro importante fattore di trascrizione cardiaco quale GATA4 (Sepulveda *et al.*, 1998; Durocher *et al.*, 1997).

Sempre tramite esperimenti di co-trasfezione Hiroi *et al.* (2001) hanno dimostrato che la proteina Tbx5 si associa con la proteina Nkx2-5 nelle cellule di mammifero. Le proteine formano un eterodimero e si legano in tandem al promotore del gene che codifica per il precursore del peptide natriuretico cardiaco o fattore natriuretico atriale (NppaA o ANF) e dimostrano di avere attività sinergica. Un'analisi di



delezioni ha dimostrato che, per questa transattivazione, sono importanti sia il dominio amino-terminale che la regione amino-terminale della *T-box* della proteina *Tbx5* e l'omeodominio della proteina *Nkx2-5*. La proteina *TBX5* con la mutazione *Gly80Arg* all'estremità 5' della *T-box* (amino-terminale), che comporta gravi difetti cardiaci e minori effetti scheletrici nei pazienti con HOS, presenta una significativa riduzione dell'attivazione di *ANF* e dell'attività sinergica con *Nkx2-5* mentre quella con la mutazione *Arg237Gln* all'estremità 3' della *T-box* (carbossi-terminale), che comporta significative alterazioni scheletriche e minori anomalie cardiache, è in grado di attivare *ANF* e mostra attività sinergica con *Nkx2-5*, anche se in maniera leggermente inferiore rispetto alla proteina selvatica. Utilizzando cellule di una linea cellulare derivata da un tumore embrionale di topo, in grado di differenziare in cardiomiociti pulsatili, è stato possibile mettere in evidenza che, se si induce, in queste cellule, una espressione ectopica della proteina *Tbx5*, si ha una maggiore espressione di geni importanti per lo sviluppo del cuore come *Nkx2-5*, *Gata4*, *ANF*, *Myl2* ecc. e la differenziazione avviene più precocemente. Se si induce l'espressione della proteina mutante *Gly80Arg* o *Arg237Gln* si hanno: marcata riduzione dell'espressione dei geni cardiaci e mancata differenziazione, nel primo caso, lieve diminuzione dell'espressione dei geni cardiaci e lieve ritardo della differenziazione, nel secondo caso. Questo lavoro conferma l'azione di regolazione di *Tbx5* su *ANF* e mette in evidenza il suo importante ruolo nella differenziazione dei cardiomiociti e come questo ruolo sia svolto in un'azione concertata con *Nkx2-5*.

Da questi studi si rileva come la proteina *TBX5*, durante lo sviluppo del cuore, possa avere una azione di regolazione della proliferazione e di promozione della differenziazione dei cardiomiociti e come le sue azioni di regolazione della trascrizione possano essere attuate, direttamente, mediante il legame con il DNA o indirettamente, mediante interazioni con altri fattori di trascrizione.

Per avere dati più certi sul meccanismo attraverso il quale l'aploinsufficienza di *TBX5* comporta i difetti cardiaci e degli arti anteriori della HOS e per approfondire le conoscenze dell'azione di *Tbx5* sullo sviluppo cardiaco, sono stati generati topi eterozigoti ed omozigoti per una delezione dell'esone 3 del gene che, codificando parte della *T-box*, comporta, con tutta probabilità, la produzione di una proteina inattiva (Bruneau *et al.*, 2001). I topi *Tbx5<sup>del/+</sup>* presentano, dipendentemente dal ceppo, ad indicare l'azione di geni modificatori, una certa incidenza di mortalità perinatale; quelli che sopravvivono presentano difetti del setto atriale e ventricolare, blocco della conduzione atrio-ventricolare e malformazioni a livello del polso e del primo dito degli arti anteriori, tutti sintomi che si ritrovano frequentemente nella HOS. I topi *knock-out* muoiono in utero e, a livello cardiaco, presentano strutture seno-atriali posteriori e ventricolo sinistro fortemente ipoplasici e mancato *looping* cardiaco. Inoltre, l'espressione di geni importanti per lo sviluppo del cuore è ridotta. L'espressione di alcuni di questi geni, come *ANF* e *cx40* (*connexin-40*), si

presenta alterata anche negli eterozigoti. Gli autori hanno dimostrato, sia *in vitro* che *in vivo*, che l'espressione di questi due geni è regolata da Tbx5 e da Nkx2-5 il cui prodotto interagisce con quello di Tbx5, confermando le osservazioni di Hiroi *et al.* (2001). Questa interazione ha un effetto sinergico sull'attivazione dei promotori di ANF e cx40 in cui sono state ritrovate sequenze simili a quelle a cui si legano i prodotti di geni della famiglia T-box. Queste sequenze sono conservate a livello evolutivo ed è stato dimostrato che, *in vitro*, legano il prodotto di Tbx5 e che sono funzionalmente attive.

Con queste informazioni è possibile spiegare perché l'aploinsufficienza di TBX5 comporti i difetti cardiaci associati alla HOS e come questi si possano ritrovare anche in seguito a mutazioni di Nkx2-5 sebbene, in questo caso, non si osservano i difetti a carico degli arti anteriori (Benson *et al.*, 1999; Schott *et al.*, 1998).

La riduzione dell'espressione di cx40 può contribuire ai problemi di conduzione che si osservano nella HOS.

La variabilità fenotipica osservata nei modelli animali Tbx5<sup>del/del</sup> e Tbx5<sup>del/+</sup> e nella HOS può essere spiegata, oltre che attraverso l'azione di geni modificatori, anche attraverso variazioni polimorfiche di proteine che, come Nkx2-5, interagiscono con la proteina Tbx5.

In sintesi si può dire che Tbx5 ha più ruoli durante la morfogenesi e la differenziazione cardiaca. Esiste un importante effetto del dosaggio di Tbx5 sull'espressione di specifici geni cardiaci da cui si può dedurre che, una precisa regolazione spazio-temporale dei livelli del prodotto, è alla base della normale espressione di questi. Inoltre, l'interazione tra le proteine Tbx5 e Nkx2-5 costituisce, probabilmente, un meccanismo per aumentare l'attività trascrizionale in particolari localizzazioni o in particolari stadi, durante lo sviluppo cardiaco (Bruneau *et al.*, 2001).

Un'altra importante azione del gene TBX5 sembra aversi a livello dell'occhio. Questo concorda con il fatto che, nei pazienti con HOS, possono essere ritrovate alterazioni a livello oculare. Una dettagliata descrizione del *pattern* di espressione oculare di Tbx5 è stata riportata per l'embrione di pollo (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000). Negli stadi iniziali dello sviluppo dell'occhio, l'espressione di Tbx5 si rileva in un'ampia area e successivamente viene relegata alla metà dorsale ed è graduale, essendo massima nella porzione più dorsale (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000). Se si induce espressione di Tbx5 nella parte ventrale dell'occhio in via di sviluppo, si ha una dorsalizzazione di questa, ad indicare un ruolo di Tbx5 nella determinazione dell'asse dorso-ventrale insieme ad altri fattori come BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*), che agisce a monte di Tbx5 e come Pax2, Vax, EphrinB1, EphrinB2, che sembrano agire a valle di esso (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000). L'espressione di Tbx5, indotta nella parte ventrale dell'occhio in via di sviluppo, comporta, oltre alla dorsalizzazione, un'alterata proiezione degli assoni delle cellule nervose retiniche ad indicare che Tbx5 potrebbe essere un determinante topografico della proiezione visiva tra la retina ed il *tectum* (Koshiba-Takeuchi *et al.*, 2000).

## SOTTOFAMIGLIA TBX6

Papaioannou (2001) ha inserito, in questa sottofamiglia, due geni umani, anche se precisa che con i dati attualmente a disposizione è difficile stabilire delle sicure relazioni filogenetiche.

#### 4.1 Gene TBX6

Questo gene è stato identificato da Yi *et al.* (1999) e da Papapetrou *et al.* (1999). Questi ultimi lo hanno caratterizzato in maniera dettagliata e ne hanno fornito una precisa mappatura sul cromosoma 16 in p11.2. Il gene è stato identificato tramite lo *screening* di una *library* di DNA genomico umano con un *probe* di cDNA murino. L'omologia delle sequenze codificanti del gene umano e dell'omologo murino è dell'84% e la struttura esoni-introni è conservata. La sequenza aminoacidica della *T-box* della probabile proteina codificata ha, invece, un'omologia del 96% con la sequenza corrispondente del topo.

L'espressione, durante l'embriogenesi umana, è stata studiata mediante RT-PCR in vari tessuti (Papapetrou *et al.*, 1999). In embrioni di 48-55 giorni, trascritti di TBX6 si ritrovano nella regione caudale ed in stadi successivi, anche nei dischi intervertebrali e nei testicoli. Nei tessuti adulti, trascritti di TBX6 si ritrovano nei testicoli, nei reni, nei polmoni, nei muscoli, nel timo e nei mieloblasti (Papapetrou *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 1999).

L'espressione, in uno stadio molto precoce dello sviluppo, è stata studiata, mediante ibridazione *in situ*, nel topo (Chapman *et al.*, 1996), dove trascritti di Tbx6 si ritrovano nella linea primitiva e nel mesoderma parassiale appena formato. Successivamente Tbx6 continua ad essere espresso nel mesoderma parassiale pre-somitico non segmentato della regione caudale e nell'abbozzo della coda. La sua

espressione decrementa con lo sviluppo dei somiti fino a cessare a metà della gestazione, quando si ha formazione di nuovo mesoderma dall'abbozzo della coda.

Chapman *et al.* (1998) hanno generato topi eterozigoti ed omozigoti per una mutazione *null* del gene *Tbx6* ed hanno rilevato che, mentre i topi eterozigoti risultavano vitali e fertili, quelli omozigoti morivano a metà della gestazione a causa di una profonda alterazione della differenziazione del mesoderma parassiale, cui consegue la formazione di strutture simili al tubo neurale al posto dei somiti, con la presenza di motoneuroni differenziati. Questi dati inducono gli autori a ritenere che il prodotto di *Tbx6* sia necessario per orientare le cellule progenitrici dei somiti verso un differenziamento mesodermico, piuttosto che neuronale.

## 4.2 Gene MGA

Nell'uomo non si sa nulla di questo gene se non che è stato mappato nella regione 15q15 (Hurlin *et al.*, 1999). Nel topo il gene omologo è un gene *T-box* atipico che codifica per una proteina che ha due domini DNA-*binding*: un dominio *T-box* ed un dominio bHLHZip (*basic-helic-loop-helix-leucine zipper*). Mediante saggi di legame e trascrizione *in vitro* è stato dimostrato che il prodotto del gene *Mga* può funzionare da regolatore della trascrizione di geni controllati dal sistema dipendente da Max, una piccola proteina bHLHZip, che forma un eterodimero con *Mga*, consentendo il legame a promotori che possiedono una sequenza simile a quella a cui si lega il gene *T* (Hurlin *et al.*, 1999).

Nell'embrione di topo di 9.5-10.5 giorni *p.c.* *Mga* si ritrova espresso negli abbozzi degli arti, negli archi faringei e nella coda (Hurlin *et al.*, 1999).

## SOTTOFAMIGLIA TBR1

A questa sottofamiglia appartengono due geni che presentano un forte livello di espressione nelle cellule nervose, soprattutto nel cervello anteriore. Un terzo membro della famiglia sembra essere importante nel sistema linfoide ma il suo *pattern* di espressione durante l'embriogenesi non è stato determinato.

### 5.1 Gene TBR1

Utilizzando sequenze del gene *Tbr1* del topo come *probe* per lo *screening* di una *library* di cDNA fetale umano Bulfone *et al.* (1995) hanno identificato un cDNA che codifica per una proteina di 682 aminoacidi. La sequenza della proteina TBR1 presenta un'omologia del 99% con quella della proteina del gene omologo del topo ed entrambe sono molto simili alla proteina T, specialmente nel dominio *T-box*. Sulla base dello studio delle regioni sinteniche, in uomo e topo, si ritiene che il gene TBR1 sia localizzato in 2q23-37 (Bulfone *et al.*, 1995). Il *pattern* di espressione non è stato studiato nell'uomo. Nel topo, tramite *Northern blotting* ed ibridazione *in situ*, si è appurato che *Tbr1* è espresso principalmente nel cervello anteriore e viene rilevato, a partire dal 10 giorno *p.c.*, nelle cellule post-mitotiche della corteccia della regione rostro-ventrale del telencefalo che si estende verso la regione caudo-ventrale. Questo *pattern* di espressione potrebbe indicare che *Tbr1* ha un ruolo nella differenziazione dei neuroni (Bulfone *et al.*, 1995). Durante l'embriogenesi l'espressione di *Tbr1* rimane fortemente confinata ai domini della corteccia cerebrale che daranno origine alla paleocorteccia, alla corteccia del sistema limbico ed alla neocorteccia. L'espressione persiste nella corteccia dell'adulto. Altre aree di espressione embrionaria sono: gruppi cellulari del cervelletto, la pelle e l'epitelio della lingua, mentre, a livello del talamo espressione di *Tbr1* si rileva solo nella vita post-natale

(Bulfone *et al.*, 1995). Poiché l'espressione, durante l'embriogenesi, è dieci volte maggiore rispetto a quella che si rileva nei tessuti adulti, si può dedurre che anche Tbr1 esplica la sua funzione principale durante lo sviluppo.

Studi condotti *in vitro* hanno messo in luce che esiste un'interazione tra Tbr1 ed una guanilato chinasi associata alla membrana (CASK; Hsueh *et al.*, 2000). Questi studi hanno dimostrato che CASK entra nel nucleo e si lega al DNA formando un eterodimero con la proteina Tbr1, in corrispondenza di una sequenza simile a quella cui si lega la proteina T. Tbr1 è in grado di legare il DNA ed attivare la trascrizione dei suoi geni *target* anche da solo ma la sua attività viene fortemente incrementata dall'interazione con CASK.

Si può concludere che CASK agisce come coattivatore di Tbr1 per indurre la trascrizione di geni che contengono sequenze simili a quella a cui si lega la proteina T. Questo è stato dimostrato per la *reelina*, un gene essenziale per lo sviluppo cerebrocorticale, che potrebbe essere un gene *target, in vivo*, di Tbr1. Infatti, topi *knock-out* per Tbr1, mostrano le stesse anomalie di sviluppo della corteccia cerebrale che si ritrovano in topi con mutazioni del gene della *reelina* (Hsueh *et al.*, 2000).

## 5.2 Gene EOMES (TBR2)

Questo gene è stato scoperto per la prima volta in *Xenopus* ed è stato chiamato Eomesodermina (Eomes) per la sua precoce espressione nel mesoderma (Ryan *et al.*, 1996).

Utilizzando sequenze di motivi T-box di vari geni di questa famiglia, in uno *screening* di un *database* di EST dell'uomo, Yi *et al.* (1999) hanno identificato un clone di cDNA contenente una regione T-box con sequenze molto simili al gene Eomes (Tbr2) di topo. La probabile proteina prodotta, ha una T-box che presenta un'omologia del 99% con quella corrispondente del topo ed è molto simile alla proteina TBR1.

Nell'uomo, non è stato studiato il *pattern* di espressione. Nel topo, una precoce espressione di Eomes si ha nel trofoectoderma della blastocisti e, successivamente, nell'ectoderma extraembrionale fino alla formazione del corion (Ciruna e Rossant, 1999; Hancock *et al.*, 1999). Una seconda fase di espressione si ha a livello della linea primitiva, nel mesoderma ad essa laterale e nell'endoderma viscerale, distale ed anteriore, in un'area implicata nell'organizzazione della testa. Successivamente, l'espressione rimane confinata alla parte anteriore della linea primitiva fino a scomparire. Una terza fase di espressione, più tardiva, si ha nella precartilagine metacarpare posteriore e nella corteccia del telencefalo. L'espressione a livello cerebrale è largamente sovrapponibile a quella osservata per Tbr1 e si ritrova anche nella parte nervosa della retina (Ciruna e Rossant, 1999; Hancock *et al.*, 1999). Alla nascita,

Eomes è espresso nelle cellule periventricolari della corteccia e dell'ippocampo e nel bulbo olfattivo (Bulfone *et al.*, 1999).

Il *pattern* di espressione riportato da Kimura *et al.* (1999) per il gene *Tbr2*, da loro indipendentemente clonato, si presenta molto diverso, soprattutto perché l'espressione viene rilevata in aree posteriori del cervello. Poiché le incongruenze fra i dati pubblicati sono difficilmente spiegabili, saranno necessarie delle verifiche da parte di altri laboratori.

È stato dimostrato che Eomes ha un ruolo essenziale sia nello sviluppo del trofoblasto, che nella gastrulazione (Russ *et al.*, 2000). Infatti, embrioni di topo che mancano del prodotto di Eomes, arrestano il loro sviluppo allo stadio di blastocisti perché il trofoectoderma non si differenzia in trofoblasto. Questo potrebbe indicare che Eomes è implicato nella formazione delle cellule totipotenti del trofoblasto. L'aggregazione delle cellule mutanti con embrioni tetraploidi consente allo sviluppo di progredire per un po' e rende possibile rilevare che non si ha differenziazione del mesoderma dalla linea primitiva, sebbene il gene *T* venga espresso. Questi dati sperimentali, se confrontati con quelli rilevati per il gene omologo di altre specie, indicano che la proteina codificata da Eomes ha un ruolo conservato nel controllo della formazione del mesoderma durante la gastrulazione ed un ruolo, acquisito nei mammiferi, nella formazione del trofoblasto (Russ *et al.*, 2000).

È stato proposto che FGF4 regoli Eomes. Infatti, in mancanza dell'espressione di FGF4, l'espressione di Eomes e la proliferazione delle cellule totipotenti del trofoblasto diminuiscono (Tanaka *et al.*, 1998). Come gene *target* è stato proposto *Mml*, che normalmente si ritrova espresso nell'endoderma viscerale e nella linea primitiva nelle prime fasi dell'embriogenesi, poiché non se ne rileva espressione nei topi *knock-out* per Eomes (Russ *et al.*, 2000).

### 5.3 Gene TBX21 (TBET)

Questo gene è stato scoperto nel topo in cui è stato rilevato che agisce come fattore di trascrizione nei linfociti Th1 (*T-helper 1*), controllando l'espressione di citochine specifiche dei linfociti Th1 e dell'interferone  $\gamma$  da cui il nome *Tbet* (*T-box expressed in T cells*; Szabo *et al.*, 2000). Sulla base dell'identificazione del gene murino, è stato clonato il gene omologo dell'uomo (Szabo *et al.*, 2000). La probabile sequenza della proteina codificata da TBX21 consiste di 535 aminoacidi ed è, per l'88%, identica alla proteina omologa del topo. L'analisi mediante *Northern blotting* ha consentito di rilevare l'espressione di TBX21 nei polmoni, nel timo e nella milza. Potenziali siti di legame per le proteine *T-box* sono stati individuati nei promotori dei geni IL2 e INF $\gamma$ . Inoltre, saggi di trascrizione *in vitro*, indicano che TBX21 reprime l'espressione di IL2, IL4 e IL5 ed attiva quella di INF $\gamma$  che è un *marker* spe-

cifico dei linfociti Th1. Tramite transfezione mediata da retrovirus, in cellule immunitarie di vario tipo, è stato dimostrato che TBX21 è responsabile della differenziazione della linea Th1, innescando nei linfociti *T-helper* nativi il programma genetico di sviluppo per le cellule Th1 e reprimendo quello delle cellule Th2 (Szabo *et al.*, 2000). Non si hanno dati sull'espressione di TBX21 e del suo omologo nel topo durante l'embriogenesi.



## CONCLUSIONI

Sebbene la famiglia dei geni *T-box* sia stata scoperta meno di dieci anni fa, grazie alla grossa mole di dati relativi al sequenziamento dei genomi di vari organismi, che si stanno sempre più accumulando, si conosce l'intero complemento di questi geni in almeno due specie animali: *C. elegans* e *Drosophila* ed è noto che geni *T-box* non esistono nei lieviti (Papaioannou, 2001).

Anche nell'uomo sono stati scoperti molti geni *T-box* e negli anni a venire si conoscerà con esattezza la reale estensione della famiglia.

La velocità con cui i geni vengono scoperti è tale da non consentire un altrettanto veloce approfondimento della loro conoscenza per cui, in molti casi, si hanno a disposizione solo dati frammentari e di difficile interpretazione. Nello specifico caso dei geni *T-box* si ha l'impressione che la strada per arrivare ad un buon livello di conoscenza sia ancora molto lunga e sia resa particolarmente ardua dalle caratteristiche intrinseche di questi geni. Infatti, anche se non limitata al solo embrione, l'azione dei geni di questa famiglia, in generale, risulta essere rivolta principalmente alle dinamiche dello sviluppo di molti tessuti ed organi, in aree in cui avvengono interazioni induttive che dirigono la differenziazione e l'orientamento spaziale delle cellule. Alla base di queste dinamiche ci sono meccanismi estremamente complicati ed articolati in cui entrano in gioco un gran numero di fattori che interagiscono fra loro in una complessa catena di eventi. Per questo motivo è difficile individuare i geni *target* ed i geni che regolano l'attività dei geni *T-box*. Infatti, anche se una gran quantità di geni agiscono a monte e a valle di essi, ne sono stati individuati solo pochi che possono essere considerati *target* diretti, nel senso che, nelle regioni dei loro promotori, è stata appurata la presenza di una sequenza funzionale a cui si lega la *T-box*.

Per quanto riguarda la regolazione dei geni *T-box*, gli studi su *Xenopus* sembrano indicare che essi possano regolarsi fra loro, che possano autoregolarsi e che possano essere regolati dai prodotti dei loro stessi geni *target*. Inoltre, è importante sottolineare che le funzioni di regolazione sono dose-dipendenti.

In base a studi condotti sulla proteina codificata dal gene T ed al fatto che tutte le proteine prodotte dai geni T-*box* possono legarsi alla stessa sequenza del DNA, si pensa che la loro specificità di azione dipenda dai domini che interagiscono con le altre proteine, dall'orientamento e dalla spaziatura dei siti di legame al DNA e dalla possibile formazione di omodimeri ed eterodimeri.

Per alcune proteine codificate dai geni T-*box*, come per esempio la proteina T, sono stati identificati sia domini di attivazione che di repressione ad indicare che, una singola proteina della famiglia T-*box*, può avere effetti diversi sulla regolazione della trascrizione dei geni *target*. Il tipo di funzione di ogni proteina T-*box* può essere diverso a seconda del tessuto e del periodo dello sviluppo in cui viene espressa a causa, probabilmente, di interazioni con proteine specifiche dei vari tessuti e di vari momenti dello sviluppo stesso. Questi effetti sono stati messi in evidenza nel caso di TBX5 in cui mutazioni *missense* diverse possono comportare conseguenze diverse a livello degli arti e del cuore nella sindrome di Holt-Oram ed in cui è stata dimostrata l'importanza di una regolazione spazio-temporale dei livelli di espressione per un corretto sviluppo cardiaco.

L'importanza del contesto cellulare in cui la proteina T-*box* viene espressa è ribadita dal fatto che in alcune patologie umane determinate da mutazioni dei geni TBX si ritrovano anomalie solo a carico di alcuni degli organi in cui essi vengono espressi. È possibile che in alcuni tessuti ma non in altri, geni dello stesso tipo possano compensare la carenza del prodotto del gene mutato; è concepibile, d'altronde, che esista un certo grado di ridondanza funzionale per processi così importanti come quelli dello sviluppo e questo potrebbe spiegare anche perché le mutazioni, finora individuate, si comportino come recessive o come semidominanti.

Accanto a ruoli chiave nella morfogenesi e nella specificazione dei tipi cellulari nelle prime fasi di sviluppo, i geni T-*box* possono avere anche funzioni specifiche in fasi di sviluppo successive e nei tessuti adulti come nel caso di T-bet (TBX21) o nel caso di TBX19. È possibile che la funzione originaria dei geni T-*box* sia quella che si esplica durante le prime fasi dell'embriogenesi, soprattutto a livello del mesoderma e che abbiano acquisito poi, durante l'evoluzione, ruoli specifici anche in altri stadi dello sviluppo e nei tessuti adulti.

La strada più promettente, per approfondire le conoscenze sulle funzioni dei geni T-*box*, sembra essere quella dello studio delle loro mutazioni. A questo proposito, sarà importante sviluppare modelli animali con specifiche mutazioni all'interno di particolari tessuti. In questo modo sarà possibile identificare i molteplici ruoli che le varie proteine T-*box* possono avere. Parallelamente sarà utile ricercare altri eventuali coinvolgimenti di questi geni nelle patologie umane, in particolare in quelle patologie che hanno, alla base, difetti dello sviluppo. Questi due tipi di approccio offriranno l'opportunità di individuare geni *target* e regolatori.

Si auspica che i dati raccolti in questo lavoro possano offrire utili spunti per orientare le ricerche future in queste direzioni.

## BIBLIOGRAFIA

- Agulnik SI, Garvey N, Hancock S, Ruvinsky I, Chapman DL, Agulnik I, Bollag R, Papaioannou V, Silver LM. Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics*. 1996; 144(1):249-254.
- Agulnik SI, Papaioannou VE, Silver LM. Cloning, mapping, and expression analysis of TBX15, a new member of the T-box gene family. *Genomics*. 1998; 51(1):68-75.
- Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, Giannotti A, Gabrielli O, Novelli G, Dallapiccola B. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet*. 1999; 7(8):903-909.
- Ammann AJ, Wara DW, Cowan MJ, Barrett DJ, Stiehm ER. The DiGeorge syndrome and the fetal alcohol syndrome. *Am J Dis Child*. 1982; 136: 906-908.
- Arnold SJ, Stappert J, Bauer A, Kispert A, Herrmann BG, Kemler R. Brachyury is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mech Dev*. 2000; 91(1-2):249-258.
- Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet*. 1997; 16(3):311-315.
- Bamshad M, Le T, Watkins WS, Dixon ME, Kramer BE, Roeder AD, Carey JC, Root S, Schinzel A, Van Maldergem L, Gardner RJ, Lin RC, Seidman CE, Seidman JG, Wallerstein R, Moran E, Sutphen R, Campbell CE, Jorde LB. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(6):1550-1562.
- Bassham S, Postlethwait J. Brachyury (T) expression in embryos of a larvacean urochordate, *Oikopleura dioica*, and the ancestral role of T. *Dev Biol*. 2000; 220(2):322-332.
- Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, Weissman B, Poznanski AK, Traill TA, Seidman JG, Seidman CE. The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N Engl J Med*. 1994 Mar 31; 330(13):885-91.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997; 15(1):30-35.
- Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G, Silengo M, Pereira A, Krieger J, Mesquita SF, Kamisago M, Morton CC, Pierpont ME, Muller CW, Seidman JG, Seidman CE. Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(6):2919-2924.
- Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the

- cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest.* 1999; 104(11):1567-1573.
- Berti L, Mittler G, Przemek GK, Stelzer G, Gunzler B, Amati F, Conti E, Dallapiccola B, Hrabe de Angelis M, Novelli G, Meisterernst M. Isolation and characterization of a novel gene from the DiGeorge chromosomal region that encodes for a mediator subunit. *Genomics.* 2001; 74(3):320-332.
- Bjornsson A, Arnason A, Tippet P. X-linked cleft palate and ankyloglossia in an Icelandic family. *Cleft Palate J.* 1989; 26:3-8.
- Bockman DE, Redmond ME, Waldo K, Davis K, Kirby ML. Effect of neural crest ablation on development of the heart and arch arteries in the chick. *Am J Anat.* 1987; 180(4):332-341.
- Bollag RJ, Siegfried Z, Cebra-Thomas JA, Garvey N, Davison EM, Silver LM. An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. *Nat Genet.* 1994; 7(3):383-389.
- Bonnet D, Pelet A, Legeai-Mallet L, Sidi D, Mathieu M, Parent P, Plauchu H, Serville F, Schinzel A, Weissenbach J, et al. A gene for Holt-Oram syndrome maps to the distal long arm of chromosome 12. *Nat Genet.* 1994; 6(4):405-408.
- Braybrook C, Doudney K, Marciano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, Goodfellow PJ, Moore GE, Stanier P. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet.* 2001; 29(2):179-183.
- Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* 1999; 211(1):100-108.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001; 106(6):709-721.
- Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puellas L, Rubenstein JL. T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron.* 1995; 15(1):63-78.
- Bulfone A, Martinez S, Marigo V, Campanella M, Basile A, Quaderi N, Gattuso C, Rubenstein JL, Ballabio A. Expression pattern of the Tbr2 (Eomesodermin) gene during mouse and chick brain development. *Mech Dev.* 1999 Jun; 84(1-2):133-8.
- Campbell CE, Goodrich K., Casey G, Beatty B. Cloning and mapping of a human gene (TBX2) sharing a highly conserved protein motif with the Drosophila omb gene. *Genomics.* 1995; 28:255-260.
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, Scambler P, Shprintzen R, Kucherlapati R, Morrow BE. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(3):620-629.
- Carreira S, Dexter TJ, Yavuzer U, Easty DJ, Goding CR. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(9):5099-5108.
- Carreira S, Liu B, Goding CR. The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem.* 2000; 275(29):21920-21927.
- Carson CT, Kinzler ER, Parr BA. Tbx12, a novel T-box gene, is expressed during early stages of heart and retinal development. *Mech Dev.* 2000; 96:137-140.
- Casey ES, O'Reilly MA, Conlon FL, Smith JC. The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development.* 1998; 125(19):3887-3894.
- Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn.* 1996; 206(4):379-390.

- Chapman DL, Papaioannou VE. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature*. 1998; 391(6668):695-697.
- Chariot A, Moreau L, Senterre G, Sobel ME, Castronovo V. Retinoic acid induces three newly cloned *HOXA1* transcripts in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215(2):713-720.
- Chen J, Zhong Q, Wang J, Cameron RS, Borke JL, Isales CM, Bollag RJ. Microarray analysis of *Tbx2*-directed gene expression: a possible role in osteogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 177(1-2):43-54.
- Chesley P. Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J Exp Zool*. 1935; 70:429-459.
- Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse *Tbx1* gene. *Genomics*. 1997; 43(3):267-277.
- Ciruna BG, Rossant J. Expression of the T-box gene *Eomesodermin* during early mouse development. *Mech Dev*. 1999; 81(1-2):199-203.
- Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998; 125(5):813-824.
- Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M. Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Dev Biol*. 2000; 217(1):10-24.
- Cohn MJ, Izpisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*. 1995; 80(5):739-746.
- Conlon FL, Sedgwick SG, Weston KM, Smith JC. Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm. *Development*. 1996; 122(8):2427-2435.
- Conway SJ, Henderson DJ, Copp AJ. *Pax3* is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the *spotch* (*Sp2H*) mutant. *Development*. 1997; 124(2):505-514.
- Corbo JC, Levine M, Zeller RW. Characterization of a notochord-specific enhancer from the *Brachyury* promoter region of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Development*. 1997; 124(3):589-602.
- Cross SJ, Ching YH, Li QY, Armstrong-Buisseret L, Spranger S, Lyonnet S, Bonnet D, Penttinen M, Jonveaux P, Leheup B, Mortier G, Van Ravenswaaij C, Gardiner CA. The mutation spectrum in Holt-Oram syndrome. *J Med Genet*. 2000; 37(10):785-787.
- Cunliffe V, Smith JC. Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a *Brachyury* homologue. *Nature*. 1992; 358(6385):427-430.
- Dallapiccola B, Zelante L, Accadia L, Mingarelli R. Acromegaloid facial appearance (AFA) syndrome: report of a second family. *J Med Genet*. 1992; 29:419-422.
- Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitinger T, Lipson T, Goodship J, Scambler P. A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nat Genet*. 1996 Aug; 13(4):458-60.
- De Luca A, Pasini A, Amati F, Botta A, Spalletta G, Alimenti S, Caccamo F, Conti E, Trakalo J, Macciardi F, Dallapiccola B, Novelli G. Association study of a promoter polymorphism of *UFD1L* gene with schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2001; 105(6):529-533.
- Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Brown JM, Tickle C, Duboule D. *HOX-4* genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev*. 1991; 5(10):1767-1776.
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors *Nkx2-5* and *GATA-4* are mutual cofactors. *EMBO J*. 1997; 16(18):5687-5696.
- Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(4):1076-1086.

- Edwards YH, Putt W, Lekoape KM, Stott D, Fox M, Hopkinson DA, Sowden J. The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res.* 1996; 6(3):226-233.
- Epstein JA, Li J, Lang D, Chen F, Brown CB, Jin F, Lu MM, Thomas M, Liu E, Wessels A, Lo CW. Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos. *Development.* 2000; 127(9):1869-1878.
- Epstein JA, Buck CA. Transcriptional regulation of cardiac development: implications for congenital heart disease and DiGeorge syndrome. *Pediatr Res.* 2000; 48(6):717-724.
- Farrell MJ, Stadt H, Wallis KT, Scambler P, Hixon RL, Wolfe R, Leatherbury L, Kirby ML. HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ Res.* 1999; 84(2):127-135.
- Forbes SA, Richardson M, Brennan L, Arnason A, Bjornsson A, Campbell L, Moore G, Stanier P. Refinement of the X-linked cleft palate and ankyloglossia (CPX) localisation by genetic mapping in an Icelandic kindred. *Hum Genet.* 1995; 95:342-346.
- Forbes SA, Brennan L, Richardson M, Coffey A, Cole CG, Gregory SG, Bentley DR, Mumm S, Moore GE, Stanier P. Refined mapping and YAC contig construction of the X-linked cleft palate and ankyloglossia locus (CPX) including the proximal X-Y homology breakpoint within Xq21.3. *Genomics.* 1996; 31:36-43.
- Funke B, Pandita RK, Morrow BE. Isolation and characterization of a novel gene containing WD40 repeats from the region deleted in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome on chromosome 22q11. *Genomics.* 2001; 73(3):264-271.
- Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriya IS, Yamagishi H, Srivastava D. Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol.* 2001; 235(1):62-73.
- Ghosh TK, Packham EA, Bonser AJ, Robinson TE, Cross SJ, Brook JD. Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(18):1983-1994.
- Ghyselinck NB, Dupe V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, Chambon P, Mark M. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol.* 1997; 41(3):425-447.
- Giannotti A, Digilio MC, Marino B, Mingarelli R, Dallapiccola B. Cayler cardiofacial syndrome and del 22q11: part of the CATCH22 phenotype. *Am J Med Genet.* 1994; 53(3):303-304.
- Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM, Papaioannou VE. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev.* 1996; 56(1-2):93-101.
- Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Silver LM, Niswander L, Papaioannou VE. Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development. *Development.* 1998a; 125(13):2499-2509.
- Gibson-Brown JJ, Agulnik S, Silver LM, Papaioannou VE. Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis. *Mech Dev.* 1998b; 74(1-2):165-169.
- Glueckson-Schoeheimer S. The development of normal and homozygous brachy (T/T) mouse embryos in the extraembryonic coelom of the chick. *Proc Natl Acad Sci USA* 1944; 30:134-140.
- Gong W, Emanuel BS, Collins J, Kim DH, Wang Z, Chen F, Zhang G, Roe B, Budarf ML. A transcription map of the DiGeorge and velo-cardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(6):789-800.
- Gong W, Emanuel BS, Galili N, Kim DH, Roe B, Driscoll DA, Budarf ML. Structural and mutational analysis of a conserved gene (DGS1) from the minimal DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(2):267-276.
- Gottlieb S, Emanuel BS, Driscoll DA, Sellinger B, Wang Z, Roe B, Budarf ML. The DiGeorge syndrome minimal critical region contains a gooseoid-like (GSCL) homeobox gene that is expressed early in human development. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(5):1194-1201.

- Griffin KJ, Amacher SL, Kimmel CB, Kimelman D. Molecular identification of spadetail: regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development*. 1998; 125(17):3379-3388.
- Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet*. 2001; 27(3):293-298.
- Hancock SN, Agulnik SI, Silver LM, Papaioannou VE. Mapping and expression analysis of the mouse ortholog of *Xenopus Eomesodermin*. *Mech Dev*. 1999; 81(1-2):205-208.
- Harada Y, Yasuo H, Satoh N. A sea urchin homologue of the chordate *Brachyury (T)* gene is expressed in the secondary mesenchyme founder cells. *Development*. 1995; 121(9):2747-2754.
- Hatcher CJ, Goldstein MM, Mah CS, Delia CS, Basson CT. Identification and localization of *TBX5* transcription factor during human cardiac morphogenesis. *Dev Dyn*. 2000; 219(1):90-95.
- Hatcher CJ, Kim MS, Mah CS, Goldstein MM, Wong B, Mikawa T, Basson CT. *TBX5* transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis. *Dev Biol*. 2001; 230(2):177-188.
- Haworth K, Putt W, Cattanach B, Breen M, Binns M, Lingaas F, Edwards YH. Canine homologue of the T-box transcription factor *T*; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. *Mamm Genome*. 2001; 12(3):212-218.
- He ML, Wen L, Campbell CE, Wu JY, Rao Y. Transcription repression by *Xenopus ET* and its human ortholog *TBX3*, a gene involved in ulnar-mammary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(18):10212-10217.
- Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C, Eichele G. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol*. 1997; 187(1):25-35.
- Hennighausen L, Robinson GW. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev*. 1998; 12(4):449-455.
- Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lerach H. Cloning of the *T* gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990; 343: 617-622.
- Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. *Tbx5* associates with *Nkx2-5* and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet*. 2001 Jul; 28(3):276-80.
- Holland PW, Koschorz B, Holland LZ, Herrmann BG. Conservation of *Brachyury (T)* genes in amphioxus and vertebrates: developmental and evolutionary implications. *Development*. 1995; 121:4283-4291.
- Horb ME, Thomsen GH. *Tbx5* is essential for heart development. *Development*. 1999; 126(8):1739-1751.
- Holmes SE, Riazi MA, Gong W, McDermid HE, Sellinger BT, Hua A, Chen F, Wang Z, Zhang G, Roe B, Gonzalez I, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Emanuel BS, Budarf ML. Disruption of the clathrin heavy chain-like gene (*CLTCL*) associated with features of DGS/VCFS: a balanced (21;22)(p12;q11) translocation. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(3):357-367.
- Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase *CASK/LIN-2*. *Nature*. 2000; 404(6775):298-302.
- Hue I, Renard JP, Viebahn C. *Brachyury* is expressed in gastrulating bovine embryos well ahead of implantation. *Dev Genes Evol*. 2001; 211(3):157-159.
- Hughes HE, McAlpine PJ, Cox DW, Philipps S. An autosomal dominant syndrome with acromegaly features and thickened oral mucosa. *J Med Genet*. 1985; 22:119-125.
- Hunt P, Whiting J, Muchamore I, Marshall H, Krumlauf R. Homeobox genes and models for patterning the hindbrain and branchial arches. *Dev Suppl*. 1991; 1:187-196.
- Hurlin PJ, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Eisenman RN. *Mga*, a dual-specificity transcription factor that interacts with *Max* and contains a T-domain DNA-binding motif. *EMBO J*. 1999; 18(24):7019-7028.

- Isaac A, Rodriguez-Esteban C, Ryan A, Altabef M, Tsukui T, Patel K, Tickle C, Izpisua-Belmonte JC. Tbx genes and limb identity in chick embryo development. *Development*. 1998; 125(10):1867-1875.
- Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, van Welsem T, van de Vijver MJ, Koh EY, Daley GQ, van Lohuizen M. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet*. 2000; 26(3):291-299.
- Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet*. 2001; 27(3):286-291.
- Jones FS, Kioussi C, Copertino DW, Kallunki P, Holst BD, Edelman GM. Barx2, a new homeobox gene of the Bar class, is expressed in neural and craniofacial structures during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(6):2632-2637.
- Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*. 1995; 83(6):859-869.
- Kim MH, Hur H, Park J, Kim YJ. Isolation of novel cDNA encompassing the ADU balanced translocation break point in the DiGeorge critical region. *Mol Biotechnol*. 2001; 17(3):213-217.
- Kimber WL, Hsieh P, Hirotsune S, Yuva-Paylor L, Sutherland HF, Chen A, Ruiz-Lozano P, Hoogstraten-Miller SL, Chien KR, Paylor R, Scambler PJ, Wynshaw-Boris A. Deletion of 150 kb in the minimal DiGeorge/velocardiofacial syndrome critical region in mouse. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(12):2229-2237.
- Kimura N, Nakashima K, Ueno M, Kiyama H, Taga T. A novel mammalian T-box-containing gene, Tbr2, expressed in mouse developing brain. *Brain Res Dev*. 1999; 115(2):183-193.
- Kispert A, Herrmann BG. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J*. 1993; 12(12):4898-4899.
- Kispert A, Herrmann BG, Leptin M, Reuter R. Homologs of the mouse Brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev*. 1994; 8(18):2137-2150.
- Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J*. 1995a; 14(19):4763-4772.
- Kispert A, Ortner H, Cooke J, Herrmann BG. The chick Brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Dev Biol*. 1995b; 168(2):406-415.
- Knezevic V, De Santo R, Mackem S. Two novel chick T-box genes related to mouse Brachyury are expressed in different, non-overlapping mesodermal domains during gastrulation. *Development*. 1997; 124(2):411-419.
- Koshiba-Takeuchi K, Takeuchi JK, Matsumoto K, Momose T, Uno K, Hoepker V, Ogura K, Takahashi N, Nakamura H, Yasuda K, Ogura T. Tbx5 and the retinotectum projection. *Science*. 2000; 287(5450):134-137.
- Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene tbx20. *Mech Dev*. 2001; 100(1):87-91.
- Kurahashi H, Akagi K, Inazawa J, Ohta T, Niikawa N, Kayatani F, Sano T, Okada S, Nishisho I. Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(4):541-549.
- Kurahashi H, Tsuda E, Kohama R, Nakayama T, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I. Another critical region for deletion of 22q11: a study of 100 patients. *Am J Med Genet*. 1997; 72(2):180-185.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT, Richard JM, Sun SC. Retinoic acid embryopathy. *New Eng. J. Med*. 1985; 313: 837-841.
- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*. 2001; 104(6):849-859.



- Lanctot C, Lamolet B, Drouin, J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development*. 1997; 124:2807-2817.
- Lascone MR, Sacchelli M, Vittorini S, Giusti S. Complex conotruncal heart defect, severe bleeding disorder and 22q11 deletion: a new case of Bernard-Soulier syndrome and of 22q11 deletion syndrome? *Ital Heart J*. 2001; 2(6):475-477.
- Laugier-Anfossi F, Villard L. Molecular characterization of a new human T-box gene (TBX22) located in Xq21.1 encoding a protein containing a truncated T-domain. *Gene*. 2000; 255(2):289-296.
- Law DJ, Gebuhr T, Garvey N, Agulnik SI, Silver LM. Identification, characterization, and localization to chromosome 17q21-22 of the human TBX2 homolog, member of a conserved developmental gene family. *Mamm Genome*. 1995; 6(11):793-797.
- Law DJ, Garvey N, Agulnik SI, Perlroth V, Hahn OM, Rhinehart RE, Gebuhr TC, Silver LM. TBX10, a member of the Tbx1-subfamily of conserved developmental genes, is located at human chromosome 11q13 and proximal mouse chromosome 19. *Mamm. Genome*. 1998; 9:397-399.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*. 1997; 15(1):21-29.
- Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular expression of Tbx5 inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol*. 2000; 223(1):169-80.
- Lichtner P, Konig R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S. An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet*. 2000; 37(1):33-37.
- Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, Bradley A, Baldini A. Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*. 1999; 401(6751):379-383.
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001; 410(6824):97-101.
- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet*. 1998; 20(1):58-61.
- Liu J, Lin C, Gleiberman A, Ohgi KA, Herman T, Huang HP, Tsai MJ, Rosenfeld MG. Tbx19, a tissue-selective regulator of POMC gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(15):8674-8679.
- Logan M, Simon HG, Tabin C. Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development*. 1998; 125(15):2825-2835.
- Logan M, Tabin CJ. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science*. 1999; 283(5408):1736-1739.
- Lowry RB, Renwick DH. Incidence of cleft lip and palate in British Columbia Indians. *J Med Genet*. 1969; 6:67-69.
- Lowry RB. Sex-linked cleft palate in a British Columbia Indian family. *Pediatrics*. 1970 Jul; 46(1):123-8.
- Magnaghi P, Roberts C, Lorain S, Lipinski M, Scambler PJ. HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet*. 1998; 20(1):74-77.
- Marino B, Digilio MC, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart defects in patients with DiGeorge/velocardiofacial syndrome and del22q11. *Genet Couns*. 1999; 10(1):25-33.
- Mark M, Ghyselinck NB, Kastner P, Dupe V, Wendling O, Krezel W, Mascres B, Chambon P. Mesectoderm is a major target of retinoic acid action. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106 Suppl 1:24-31.
- Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, Morrow BE, Imamura S, Minoshima S, Shimizu N, Yamagishi H, Joh-o K, Watanabe S, Oyama K, Saji T, Ando M, Takao A, Momma K. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Human Genet*. 1998; 103:70-80.

- McDonald-McGinn DM, LaRossa D, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Wang P, Solot C, Schultz P, Lynch D, Bingham P, Keenan G, Weinzierl S, Ming JE, Driscoll D, Clark BJ 3rd, Markowitz R, Cohen A, Moshang T, Pasquariello P, Randall P, Emanuel BS, Zackai EH. The 22q11.2 deletion: screening, diagnostic workup, and outcome of results; report on 181 patients. *Genet Test*. 1997; 1(2):99-108.
- McQuade L, Christodoulou J, Budarf M, Sachdev R, Wilson M, Emanuel B, Colley A. Patient with a 22q11.2 deletion with no overlap of the minimal DiGeorge syndrome critical region (MDGCR). *Am J Med Genet*. 1999; 86(1):27-33.
- Meins M, Henderson DJ, Bhattacharya SS, Sowden JC. Characterization of the human TBX20 gene, a new member of the T-Box gene family closely related to the Drosophila H15 gene. *Genomics*. 2000; 67(3):317-332.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*. 1994; 120(10):2749-2471.
- Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001; 104(4):619-629.
- Moore GE, Ivens A, Chambers J, Farrall M, Williamson R, Page DC, Bjornsson A, Arnason A, Jensson O. Linkage of an X-chromosome cleft palate gene. *Nature*. 1987; 326: 91-92.
- Moore, G.; Ivens, A.; Chambers, J.; Bjornsson, A.; Arnason, A.; Jensson, O.; Williamson, R. The application of molecular genetics to detection of craniofacial abnormality. *Development*. 1988; 103 (suppl.):233-239.
- Morrison K, Papapetrou C, Attwood J, Hol F, Lynch SA, Sampath A, Hamel B, Burn J, Sowden J, Stott D, Mariman E, Edwards YH. Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(5):669-674.
- Muller CW, Herrmann BG. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature*. 1997; 389(6653):884-888.
- Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell*. 1996; 85(3):357-368.
- Novelli G, Amati F, Dallapiccola B. UFD1L and CDC45L: a role in DiGeorge syndrome and related phenotypes? *Trends Genet*. 1999; 15(7):251-254.
- Ohuchi H, Nakagawa T, Yamauchi M, Ohata T, Yoshioka H, Kuwana T, Mima T, Mikawa T, Nohno T, Noji S. An additional limb can be induced from the flank of the chick embryo by FGF4. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 209(3):809-816.
- Ohuchi H, Takeuchi J, Yoshioka H, Ishimaru Y, Ogura K, Takahashi N, Ogura T, Noji S. Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick Tbx5 and Tbx4. *Development*. 1998; 125(1):51-60.
- Olson EN, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science*. 1996; 272(5262):671-676.
- Papaioannou VE, Silver LM. The T-box gene family. *Bioessays*. 1998; 20(1):9-19.
- Papaioannou VE. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol*. 2001; 207:1-70.
- Papapetrou C, Putt W, Fox M, Edwards YH. The human TBX6 gene: cloning and assignment to chromosome 16p11.2. *Genomics*. 1999; 55(2):238-241.
- Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev*. 1998; 12(17):2735-2747.

- Pfeifer D, Kist R, Dewar K, Devon K, Lander ES, Birren B, Korniszewski L, Back E, Scherer G. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(1):111-124.
- Pflugfelder GO, Roth H, Poeck B. A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 186(2):918-925.
- Pflugfelder GO, Heisenberg M. Optomotor-blind of *Drosophila melanogaster*: a neurogenetic approach to optic lobe development and optomotor behaviour. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1995; 110(3):185-202.
- Pizzuti A, Novelli G, Mari A, Ratti A, Colosimo A, Amati F, Penso D, Sanguuolo F, Calabrese G, Palka G, Silani V, Gennarelli M, Mingarelli R, Scarlato G, Scambler P, Dallapiccola B. Human homologue sequences to the *Drosophila* dishevelled segment-polarity gene are deleted in the DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(4):722-729.
- Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Mari A, Calabrese G, Nicolis S, Silani V, Marino B, Scarlato G, Ottolenghi S, Dallapiccola B. UFD1L, a developmentally expressed ubiquitination gene, is deleted in CATCH 22 syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(2):259-265.
- Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Bordoni R, Mandich P, Bellone E, Conti E, Bengala M, Mari A, Silani V, Dallapiccola B. Isolation and characterization of a novel transcript embedded within HIRA, a gene deleted in DiGeorge syndrome. *Mol Genet Metab.* 1999; 67(3):227-235.
- Puech A, Saint-Jore B, Funke B, Gilbert DJ, Sirotkin H, Copeland NG, Jenkins NA, Kucherlapati R, Morrow B, Skoutchi AI. Comparative mapping of the human 22q11 chromosomal region and the orthologous region in mice reveals complex changes in gene organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(26):14608-14613.
- Puech A, Saint-Jore B, Merscher S, Russell RG, Cherif D, Sirotkin H, Xu H, Factor S, Kucherlapati R, Skoutchi AI. Normal cardiovascular development in mice deficient for 16 genes in 550 kb of the velocardiofacial/DiGeorge syndrome region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(18):10090-10095.
- Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL. Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol.* 1997; 185(2):165-184.
- Roberts C, Daw SC, Halford S, Scambler PJ. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(2):237-245.
- Robin NH, Feldman GJ, Aronson AL, Mitchell HF, Weksberg R, Leonard CO, Burton BK, Josephson KD, Laxova R, Aleck KA, et al. Opitz syndrome is genetically heterogeneous, with one locus on Xp22, and a second locus on 22q11.2. *Nat Genet.* 1995; 11(4):459-461.
- Rodriguez-Esteban C, Tsukui T, Yonei S, Magallon J, Tamura K, Izpisua Belmonte JC. The T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity. *Nature.* 1999; 398(6730):814-818.
- Rushton, A. R. Sex-linked inheritance of cleft palate. *Hum Genet.* 1979; 48: 179-181.
- Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature.* 2000; 404(6773):95-99.
- Ruvinsky I, Silver LM. Newly identified paralogous groups on mouse chromosomes 5 and 11 reveal the age of a T-box cluster duplication. *Genomics.* 1997; 40(2):262-266.
- Ruvinsky I, Silver LM, Gibson-Brown JJ. Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics.* 2000; 156(3):1249-1257.
- Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature.* 2000; 404(6773):95-99.
- Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994 Apr; 6(4):348-56.

- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* 2000; 24(4):391-395.
- Scambler PJ. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(16):2421-2426.
- Schinke M, Izumo S. Deconstructing DiGeorge syndrome. *Nat Genet.* 2001; 27(3):238-240.
- Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science.* 1998; 281(5373):108-111.
- Schulte-Merker S, Ho RK, Herrmann BG, Nusslein-Volhard C. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development.* 1992; 116(4):1021-1032.
- Schwabe JW, Rodriguez-Esteban C, Izpisua Belmonte JC. Limbs are moving: where are they going? *Trends Genet.* 1998 Jun;14(6):229-35.
- Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, Chen CY, Nemer M, Schwartz RJ. GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(6):3405-3415.
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(4):489-501.
- Shields DC, Ramsbottom D, Donoghue C, Pinjon E, Kirke PN, Molloy AM, Edwards YH, Mills JL, Mynett-Johnson L, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *Am J Med Genet.* 2000; 92(3):206-211.
- Shoguchi E, Satoh N, Maruyama YK. Pattern of Brachyury gene expression in starfish embryos resembles that of hemichordate embryos but not of sea urchin embryos. *Mech Dev.* 1999; 82(1-2):185-189.
- Simon HG, Kittappa R, Khan PA, Tsilfidis C, Liversage RA, Oppenheimer S. A novel family of T-box genes in urodele amphibian limb development and regeneration: candidate genes involved in vertebrate forelimb/hindlimb patterning. *Development.* 1997; 124(7):1355-1366.
- Simon H. T-box genes and the formation of vertebrate forelimb and hindlimb specific pattern. *Cell Tissue Res.* 1999; 296(1):57-66.
- Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Das Gupta R, Patanjali SR, Skoultchi A, Weissman SM, Kucherlapati R. Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* 1997; 42(2):245-251.
- Smith JC, Price BM, Green JB, Weigel D, Herrmann BG. Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell.* 1991; 67(1):79-87.
- Smith JC. Mesoderm-inducing factors and mesodermal patterning. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7(6):856-861.
- Smith J. Brachyury and the T-box genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1997; 7(4):474-480.
- Smith J. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet.* 1999; 15(4):154-158.
- Sone K, Takeshima K, Takahashi TC, Takabatake T. Temporal alteration of dose-dependent response activin in newt animal-cap explants. *Devel Genes Evol* 1997; 207:147-155.
- Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet.* 2000; 24(1):18-19.
- Sutherland HF, Wadey R, McKie JM, Taylor C, Atif U, Johnstone KA, Halford S, Kim UJ, Goodship J, Baldini A, Scambler PJ. Identification of a novel transcript disrupted by a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet.* 1996; 59(1):23-31.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, Tbet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000 Mar 17; 100(6):655-669.

- Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 1999; 13(4):484-494.
- Tabin C, Laufer E. Hox genes and serial homology. *Nature.* 1993; 361(692-693).
- Tada M, Casey ES, Fairclough L, Smith JC. Bix1, a direct target of Xenopus T-box genes, causes formation of ventral mesoderm and endoderm. *Development.* 1998; 125(20):3997-4006.
- Tada M, Smith JC. T-targets: clues to understanding the functions of T-box proteins. *Dev Growth Differ.* 2001; 43(1):1-11.
- Taddei I, Morishima M, Huynh T, Lindsay EA. Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(20):11428-11431.
- Tagawa K, Humphreys T, Satoh N. T-Brain expression in the apical organ of hemichordate tornaria larvae suggests its evolutionary link to the vertebrate forebrain. *J Exp Zool.* 2000; 288(1):23-31.
- Takada N, Tagawa K, Takahashi H, Satoh N. Characterization of an ascidian maternal T-box gene, AsmT. *Int J Dev Biol.* 1998; 42(8):1093-1100.
- Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, Matsumoto K, Vogel-Hopker A, Naitoh-Matsuo M, Ogura K, Takahashi N, Yasuda K, Ogura T. Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature.* 1999; 398(6730):810-814.
- Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science.* 1998; 282(5396):2072-2075.
- Technau U, Bode HR. HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in Hydra. *Development.* 1999; 126(5):999-1010.
- Terrett JA, Newbury-Ecob R, Cross GS, Fenton I, Raeburn JA, Young ID, Brook JD. Holt-Oram syndrome is a genetically heterogeneous disease with one locus mapping to human chromosome 12q. *Nature Genet.* 1994; 6:401-404.
- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997; 67(2):111-123.
- Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H, Kurihara Y, Yazaki Y, Olson EN, Srivastava D. A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development.* 1998; 125(16):3005-3014.
- Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology.* 1999; 59(5):331-341.
- Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev.* 1999; 13(23):3136-3148.
- Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, Harding B, Beetz R, Bilous RW, Holdaway I, Shaw NJ, Fryns JP, Van de Ven W, Thakker RV, Devriendt K. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature.* 2000; 406(6794):419-422.
- Wadey R, Daw S, Taylor C, Atif U, Kamath S, Halford S, O'Donnell H, Wilson D, Goodship J, Burn J, et al. Isolation of a gene encoding an integral membrane protein from the vicinity of a balanced translocation breakpoint associated with DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(6):1027-1033.
- Wadey R, McKie J, Papapetrou C, Sutherland H, Lohman F, Osinga J, Frohn I, Hofstra R, Meijers C, Amati F, Conti E, Pizzuti A, Dallapiccola B, Novelli G, Scambler P. Mutations of UFD1L are not responsible for the majority of cases of DiGeorge Syndrome/velocardiofacial syndrome without deletions within chromosome 22q11. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(1):247-249.
- Wall NA, Hogan BL. Expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), fibroblast growth factor-8 (FGF-8) and sonic hedgehog (SHH) during branchial arch development in the chick. *Mech Dev.* 1995; 53(3):383-392.

- Wendling O, Dennefeld C, Chambon P, Mark M. Retinoid signaling is essential for patterning the endoderm of the third and fourth pharyngeal arches. *Development*. 2000; 127(8):1553-1562.
- Wilkie AO, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SR, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE Jr. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nat Genet*. 2000; 24(4):387-390.
- Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature*. 1990; 343(6259):657-659.
- Wilming LG, Snoeren CA, van Rijswijk A, Grosveld F, Meijers C. The murine homologue of *HIRA*, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human *CATCH22* patients. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(2):247-258.
- Wilson V, Rashbass P, Beddington RS. Chimeric analysis of *T* (Brachyury) gene function. *Development*. 1993; 117(4):1321-1331.
- Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Barron M, Schwartz RJ. Expression of chick *Tbx-2*, *Tbx-3*, and *Tbx-5* genes during early heart development: evidence for *BMP2* induction of *Tbx2*. *Dev Biol*. 2000; 228(1):95-105.
- Yamagishi H, Garg V, Matsuoka R, Thomas T, Srivastava D. A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science*. 1999; 283(5405):1158-1161.
- Yasuo H, Satoh N. An ascidian homolog of the mouse Brachyury (*T*) gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Devel Growth Differentiation*. 1994; 36: 9-18.
- Yang J, Hu D, Xia J, Yang Y, Ying B, Hu J, Zhou X. Three novel *TBX5* mutations in Chinese patients with Holt-Oram syndrome. *Am J Med Genet*. 2000; 92(4):237-240.
- Yi CH, Terrett JA, Li QY, Ellington K, Packham EA, Armstrong-Buisseret L, McClure P, Slingsby T, Brook JD. Identification, mapping, and phylogenomic analysis of four new human members of the T-box gene family: *EOMES*, *TBX6*, *TBX18*, and *TBX19*. *Genomics*. 1999; 55(1):10-20.
- Yoshida K, Kuo F, George EL, Sharpe AH, Dutta A. Requirement of *CDC45* for postimplantation mouse development. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(14):4598-4603.
- Zhang J, King ML. *Xenopus VegT* RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Development*. 1996; 122(12):4119-4129.