

Università degli studi di Siena

Scuola di Specializzazione in
Genetica Medica

Caratterizzazione funzionale del gene
di ritardo mentale X-legato ACSL4

Relatore

Prof. Alessandra Renieri

Tesi di:

Dr. Ilaria Meloni

Anno accademico 2006-2007

Indice

Introduzione

Il Ritardo Mentale	p. 4
Il Ritardo Mentale X-linked	p. 5
Il gene <i>ACSL4</i>	p. 9

Materiali e Metodi

A. Linee cellulari	p. 16
B. Immunofluorescenza	p. 17
C. Western Blot	p. 19
D. Analisi d'espressione	p. 20
1-Estrazione dell'RNA	p. 20
2-Analisi della qualità dell'RNA	p. 20
3-RT-PCR	p. 21
4-Real Time PCR	p. 23

Risultati

Analisi della proteina	p. 32
Conferma della specificità dell'anticorpo	p. 32
Localizzazione sub-cellulare di <i>ACSL4</i>	p. 33
Analisi di espressione mediante Western Blot	p. 36
Analisi dell'RNA	p. 37
Identificazione della terza variante di splicing di <i>ACSL4</i>	p. 37
Analisi di espressione tramite Real Time RT-PCR	p. 38

Discussione	p. 44
-------------	-------

Referenze	p. 52
-----------	-------

Introduzione

Il ritardo mentale

Il ritardo mentale (**MR**) è la causa più frequente di handicap grave e rappresenta quindi un importante problema sanitario in tutto il mondo; è caratterizzato da una significativa riduzione delle funzioni cognitive e delle capacità adattative che si manifesta prima dei 18 anni (DMS-IV). La funzionalità cognitiva di un individuo è comunemente determinata in base ai risultati da esso ottenuti in un pannello di test standardizzati che consentono di definire il “Quoziente Intellettivo” (IQ= Intelligence Quotient) dell’individuo. Considerando pari a 100 l’IQ medio della popolazione, il MR può essere suddiviso in 4 categorie, in base ai valori di IQ:

- 1- LIEVE con IQ tra 50 e 70
- 2- MODERATO, con IQ tra 35 e 50
- 3- SEVERO, con IQ tra 20 e 35
- 4- PROFONDO, con IQ inferiore a 20

Si calcola che la prevalenza nella popolazione generale del MR da moderato a profondo sia dello 0,3-0,5%; tale stima sale all’1-1,5% se si include anche il MR lieve [1,2].

Le cause del MR sono ancora poco conosciute; il 25-40% circa dei casi di MR severo e la maggior parte dei casi di MR lieve rimangono ad eziologia sconosciuta [1,2]. Esistono numerosi fattori ambientali che sembrano contribuire all’insorgenza della patologia: esposizione all’alcool, malnutrizione e malattie infettive durante la gravidanza, nascita prematura, anossia perinatale sono alla base del 10-30% di MR moderato-profondo e del 15% circa dei casi di MR lieve. Tuttavia, la maggior parte dei casi è attribuita ad alterazioni cromosomiche o di singoli geni [3]. Una ricerca sul database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim>) con il termine “mental retardation” da come risultato 1456 patologie nelle quali MR è presente in almeno una parte dei pazienti (Novembre 2007); ciò mette in evidenza l’enorme eterogeneità del MR. Per una parte di queste patologie, la base genetica è già stata individuata; si tratta di riarrangiamenti cromosomici o alterazioni di singoli geni (malattia monogenica). Nei pazienti con riarrangiamenti cromosomici, il MR è in genere presente insieme ad uno specifico gruppo di anomalie fisiche, metaboliche o neurologiche; si parla in questo caso di MR “sindromico”. A questa categoria appartengono patologie relativamente comuni quali la sindrome di Down (trisomia 21), le sindromi di Prader-Willi e Angelman (dovute a delezioni in 15q11.3), la Williams (delezione in 7q11.2) o la Wolf-

Hirschorn (delezione dell'estremità distale del braccio corto del cromosoma 4). Si stima inoltre che piccoli riarrangiamenti subtelomerici, invisibili all'analisi citogenetica classica, possano rendere conto del 7% circa dei casi di MR moderato-profondo e dello 0,5% dei pazienti con MR lieve [4]. I recenti importanti sviluppi della tecnica dell'array-CGH (Comparative Genomic Hybridization), che consente di evidenziare riarrangiamenti dell'ordine delle 100 Kb ci permetteranno probabilmente nell'immediato futuro di verificare se tale stima sia reale. La comprensione delle basi molecolari del MR dovuto a alterazioni di singoli geni è ancora molto limitata, benché negli ultimi anni siano stati fatti enormi progressi, soprattutto per quanto riguarda il MR X-linked. Le forme monogeniche di MR si distinguono in "sindromiche" e "non sindromiche"; in queste ultime il MR è l'unico sintomo presente.

Il ritardo mentale X-linked

Il MR è significativamente più frequente nei maschi che nelle femmine (circa il 30% in più di casi). Per spiegare questa differenza sono state suggerite varie ipotesi. Infine, è stato dimostrato che nel 20-25% dei maschi il ritardo mentale è causato da difetti di geni presenti sul cromosoma X (Ritardo Mentale X-Legato: XLMR) [2]. La bassa percentuale di femmine affette nei casi familiari di XLMR indica che la maggior parte dei casi XLMR hanno eredità di tipo recessivo; infatti, nelle femmine l'allele normale presente su uno dei 2 cromosomi X può compensare l'effetto della mutazione in un gene X-linked, mentre nei maschi emizigoti ciò non è possibile poiché hanno un solo cromosoma X. La prevalenza di una eredità di tipo recessivo nei casi familiari non è inattesa, poiché i pazienti MR di solito non si riproducono e quindi è altamente probabile che le condizioni dominanti, prive di portatori sani, restino confinate al singolo individuo.

Si stima attualmente che l'XLMR potrebbe essere alla base del 20-30% dei casi di MR nei maschi [1,2]. L'XLMR viene distinto in "sindromico" (MRXS) e "non sindromico" (MRX) in base alla presenza o meno di uno specifico pattern di anomalie fisiche, neurologiche e metaboliche in aggiunta al ritardo mentale [2,5,6].

Attualmente, sono stati caratterizzati 59 geni la cui mutazione causa MRXS (<http://xlmr.interfree.it/home.htm>); più di 100 condizioni hanno tuttavia ancora una base genetica sconosciuta e per circa il 50% di esse non è attualmente noto nemmeno il locus genetico associato. Benché alcuni MRXS mappino in regioni sovrapposte e

potrebbero quindi avere una base genetica comune, molti geni responsabili di MRXS restano ancora da identificare. La forma di MRXS più comune è probabilmente la sindrome dell'X Fragile che rappresenta il 2-3 circa dei casi MRXS nei maschi e circa l'1% nelle femmine [1].

La denominazione “MR X-legato non sindromico” (MRX) fu introdotta da Kerr et al. nel 1991 per indicare una condizione segregante con il cromosoma X che si manifesta in pazienti maschi senza un fenotipo consistente, ad eccezione del ritardo mentale [6,7]. Data l'assenza di caratteristiche cliniche distintive, i pazienti possono essere classificati solo sulla base dei dati di linkage; ciò è ovviamente possibile solo per famiglie ampie con molti individui affetti. La prima famiglia MRX è stata mappata nel 1988 [8]. Successivamente altre famiglie sono state identificate e mappate in regioni definite del cromosoma X. Inizialmente il numero MRX veniva assegnato in base al linkage a regioni comuni; cioè a famiglie diverse in cui l'MRX mappava su regioni sovrapposte del cromosoma X veniva assegnato lo stesso numero. Tuttavia questo sistema di numerazione poteva generare confusione, ad esempio se per una famiglia veniva definito un intervallo di linkage ampio che si sovrapponeva a 2 intervalli distinti, ognuno con il suo numero. Per risolvere questo problema, nel 1992 è stato deciso di considerare ogni famiglia per la quale fosse possibile stabilire una regione di linkage come un'entità distinta, indipendentemente dalla eventuale sovrapposizione con altri loci MRX [7]. In questo modo, ad ogni famiglia viene assegnato l'acronimo “MRX” e un numero progressivo. Attualmente, sono presenti 84 loci MRX (Figura 1) (<http://www.ggc.org/xlmr.htm>). Molti di questi loci sono parzialmente sovrapposti per cui potrebbero essere dovuti ad alterazioni nello stesso gene; tuttavia, l'analisi di mutazione per i geni già identificati ha dimostrato che non tutte le famiglie che mappano in un locus contenente un gene di ritardo mentale presentano mutazioni in tale gene, indicando che più di un gene di MRX è probabilmente anche in loci sovrapposti. Questi dati, oltre al fatto che la frequenza di mutazioni nella maggior parte dei geni fino ad ora identificati è tra lo 0,1 e l'1%, suggerisce che probabilmente i geni ancora da identificare sono molti; è possibile che esistano più di 100 geni MRX diversi [2,5].

L'elevata eterogeneità genetica, insieme all'assenza di caratteristiche cliniche distintive, rende impossibile prevedere quante delle famiglie che mappano in un certo locus abbiano effettivamente mutazioni nello stesso gene; di conseguenza i dati di linkage di famiglie diverse non possono essere confrontati e quindi gli intervalli di linkage risultanti sono molto grandi (20-30cM) e contengono spesso molti geni,

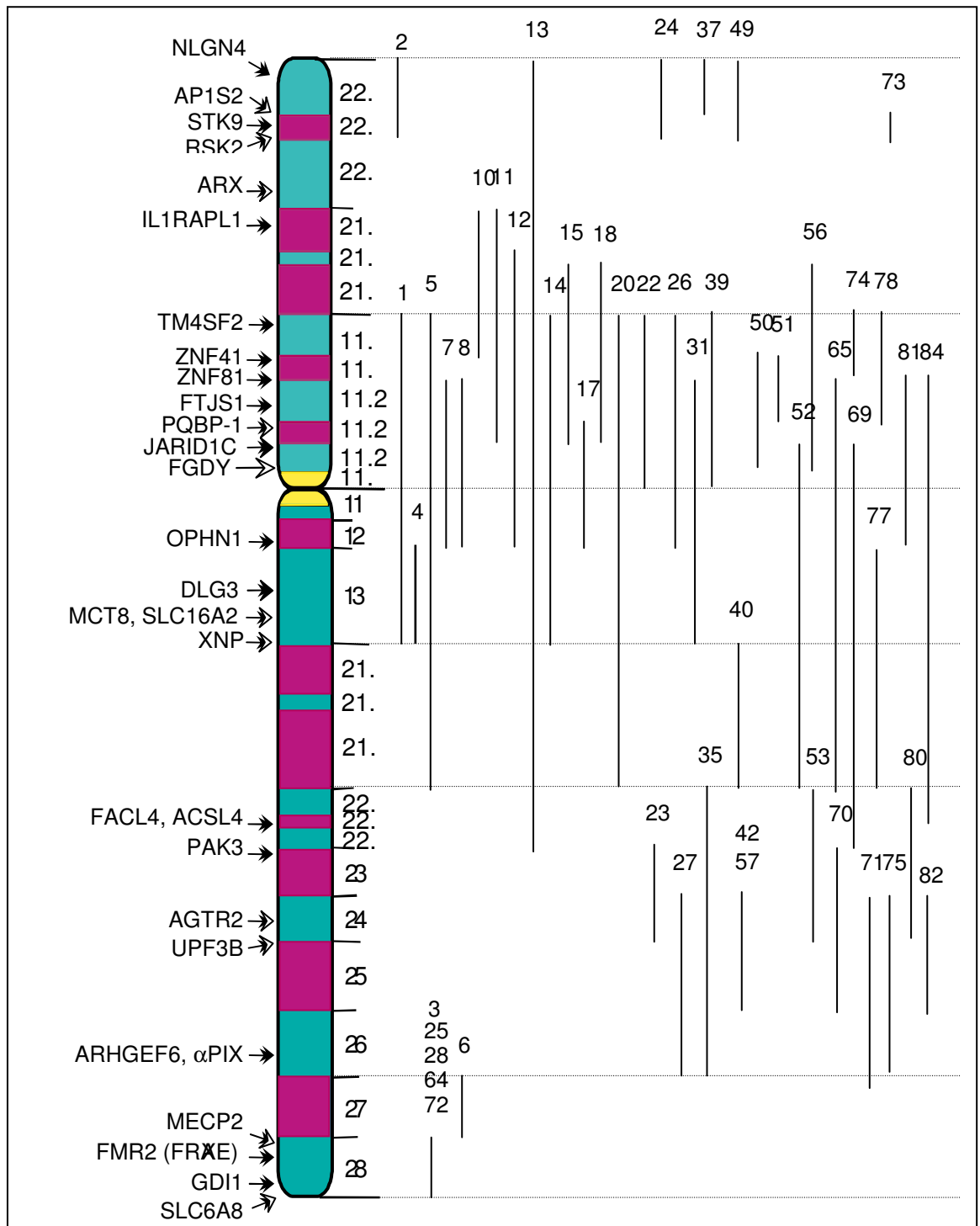


Figura 1: *Mapa dei loci MRX ad oggi noti.* Le linee verticali a destra dell'ideogramma del cromosoma indicano gli intervalli di linkage per le singole famiglie MRX; i numeri relativi sono riportati sopra le linee. I geni MRX noti sono riportati sulla sinistra. L'immagine è stata riprodotta dal sito del Greenwood Genetic Center (<http://www.ggc.org/xlmr.htm>).

rendendo difficile l'identificazione del gene MRX. Nonostante ciò, negli ultimi anni sono stati fatti enormi progressi e, ad oggi, sono stati identificati 27 geni responsabili di

MRX. Per tutti si ha una conoscenza limitata del meccanismo patogenetico; tuttavia, per alcuni di essi, delle vie comuni stanno progressivamente emergendo, suggerendo la possibilità che l'alterazione di pochi specifici processi sia alla base dell'insorgenza dell'MRX. Le vie comuni identificate ad oggi sono 3:

1- *Regolazione dei filamenti di actina mediata dalle GTPasi della famiglia Rho.* Queste *GTPasi* la funzione di trasdurre segnali extra-cellulari all'interno della cellula inducendo la riorganizzazione dei filamenti di actina che formano il citoscheletro cellulare. Questi cambiamenti sono essenziali in modo particolare nelle cellule neuronali in quanto determinano numerosi processi fondamentali quali il differenziamento morfologico, la crescita assonale, la determinazione della polarità cellulare e, infine, la formazione e l'organizzazione delle spine dendritiche e delle sinapsi [3,9,10]. I geni MRX codificanti per proteine coinvolte a vari livelli in tale ciclo ad oggi noti sono *OPHN1*, *GDII*, *PAK3*, *ARHGEF6*, *FGD1*, *TM4SF2* e *FMR1* [2].

2- *Regolazione dell'espressione genica.* L'attivazione o l'inibizione selettiva dell'espressione genica rappresenta la base molecolare per il corretto differenziamento e funzione cellulare. L'espressione genica è determinata da due fattori fondamentali: la modulazione della struttura della cromatina e la regolazione dell'azione delle molecole coinvolte nel processo multistep che porta alla maturazione funzionale dell'RNA (fattori trascrizionali, fattori di splicing, fattori coinvolti nell'esportazione dell'RNA, etc). Attualmente sono quattro i geni MRX codificanti per proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina (*RPS6KA3*, *ATRX*, *MECP2* e *JARID1C*), e tre quelli codificanti per fattori trascrizionali (*ZNF41*, *ZNF81*, *ZNF674*) [2]. Oltre questi, altri geni MRX sono coinvolti a vari livelli nella regolazione dell'espressione genica: *PQBPI*, interagisce con i componenti dello spliceosoma; *FTSJI*, è coinvolto nel processamento dell'rRNA [11,12]; e infine *CDKL5* che codifica per una serina-treonina chinasi che interagisce con l'inibitore trascrizionale *MECP2* e per tale motivo potrebbe essere indirettamente coinvolta nella modulazione dell'espressione genica [13].

3- *Ciclo delle vescicole sinaptiche.* La corretta regolazione del trasporto vescicolare è essenziale per garantire il controllo quantitativo del rilascio di

neurotrasmettitori che a sua volta è fondamentale per una corretta funzionalità sinaptica. Anche tale processo può essere alterato in seguito a mutazioni in geni MRX; in particolare, sono state trovate mutazioni nei geni *SLC6A8*, *NLGN4*, *DLG3*, *GDI1* (coinvolto anche nel ciclo delle *GTPasi* Rho) e *ILIRAPL1* [2]. Infine, recentemente, è stata identificata una mutazione nel gene *APIS2* che codifica per una proteina direttamente coinvolta nell'assemblaggio delle vescicole endocitiche [14].

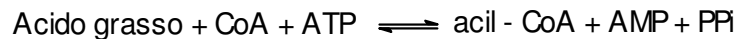
La chiara distinzione fenotipica tra MRX e MRXS ha indotto per lungo tempo a pensare che le due patologie avessero base genetica diversa. In particolare, si pensava che i geni MRXS codificassero per proteine con un ampio ventaglio di bersagli molecolari e perciò causassero fenotipi complessi [15]. Al contrario, i geni MRX sembravano coinvolti in processi più specifici importanti per lo sviluppo cognitivo; ad esempio *GDI1* codifica per una proteina coinvolta specificamente nel ciclo delle vescicole sinaptiche [16-18]. Tuttavia, negli ultimi sono stati identificati un numero crescente di casi in cui un fenotipo MRX era dovuto a mutazioni in un gene associato a MRXS o viceversa [2,5]. Di conseguenza, la distinzione netta tra le due condizioni non è più appropriata da un punto di vista molecolare, mentre può ancora essere utile nella pratica clinica, per consentire una prima classificazione fenotipica della famiglia prima di effettuare l'analisi molecolare.

Il gene *ACSL4*

Nel 1996 presso l'Unità Operativa di Genetica Medica è giunta una famiglia con una sospetta nefropatia X-linked (sindrome di Alport=ATS) nella quale i 2 maschi affetti presentavano anche ritardo mentale. Una prima caratterizzazione della famiglia ha rivelato la presenza di una delezione in Xq22.3 che includeva il gene *COL4A5*, responsabile dell'ATS, e si estendeva per circa 2 Mb verso il telomero [19]. La successiva caratterizzazione del contenuto genico di questa delezione, e il confronto con due delezioni che si estendevano anch'esse oltre il gene *COL4A5* in direzione del telomero ma causavano solo sindrome di Alport e con una seconda famiglia con ATS e MR ed una delezione sovrapposta ma più piccola ha permesso di identificare una regione critica minima per il ritardo mentale (380 Kb) contenente i geni *GUCY2F*,

NXT2, *KCNE5* e *ACSL4* [20]. La ricerca di mutazioni puntiformi in questi quattro geni in un gruppo di pazienti con MRX e MRXS ha permesso di dimostrare che il gene di ritardo mentale era *ACSL4* [21]. Come altri geni di MRX, *ACSL4* sembra essere responsabile di circa l'1% dei casi di ritardo mentale non specifico nei maschi [21,22].

ACSL4 è una proteina appartenente ad un'ampia famiglia di enzimi: le Acil-CoA sintetasi. Tali enzimi catalizzano la reazione generale [23]:



La reazione avviene in due passaggi: nel primo all'acido grasso viene aggiunto ATP, con formazione di Acil-AMP e pirofosfato, mentre nel secondo all'Acil-AMP viene legato il CoA, dando luogo ad Acil-CoA e AMP (Figura 2). Gli acidi grassi vengono in questo modo attivati per partecipare a reazioni successive, come la sintesi di lipidi complessi (trigliceridi, fosfolipidi e esteri del colesterolo) [24]. Oltre che nel metabolismo degli acidi grassi, le acil-CoA sintetasi sono anche coinvolte in molti altri processi, tra cui la trasduzione del segnale cellulare, la regolazione del traffico di membrana, dei flussi ionici, dell'attività della protein chinasi C e dell'espressione genica [25-27]. L'attività delle Acil-CoA sintetasi è presente in diversi compartimenti cellulari: sulla membrana esterna dei mitocondri, sulla superficie citosolica dei perossisomi, organelli citoplasmatici in cui avviene la β -ossidazione, e, infine, sulla superficie del reticolo endoplasmatico, dove ha luogo la sintesi dei glicolipidi [28].

Le Acil-CoA sintetasi possono essere classificate in base alla lunghezza della catena carboniosa del loro substrato, gli acidi grassi. In particolare è possibile distinguere 4 sottofamiglie: le Acil-CoA sintetasi specifiche per acidi grassi a catena corta, le Acil-CoA sintetasi specifiche per acidi grassi a media catena (MACS), le Acil-CoA sintetasi specifiche per acidi grassi a catena lunga (LACS) e le Acil-CoA sintetasi specifiche per acidi grassi a catena molto lunga (VLACS). *ACSL4* appartiene alla sottofamiglia delle Acil-CoA sintetasi specifiche per gli acidi grassi catena lunga. Ad oggi si conoscono 5 membri di questa famiglia.

Lo studio del pattern di espressione del gene *ACSL4*, effettuato mediante Northern Blot commerciale umano, ha evidenziato l'espressione di un trascritto di circa 5Kb in quasi tutti i tessuti sebbene con diversi livelli di espressione. *ACSL4*, apparentemente assente nel fegato adulto, è molto espresso nei tessuti steroidogenici come la ghiandola surrenale e le ovaie mentre se ne rilevano solo delle tracce nel muscolo scheletrico [29].

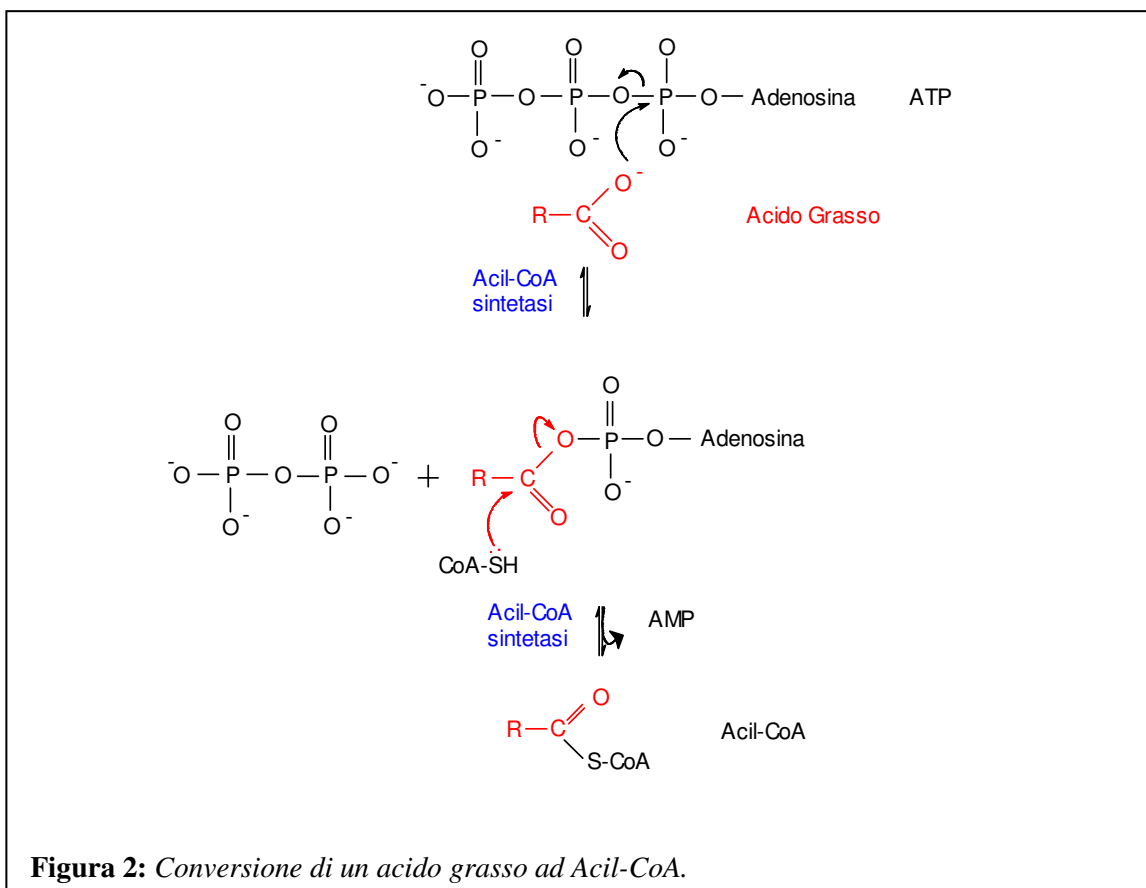
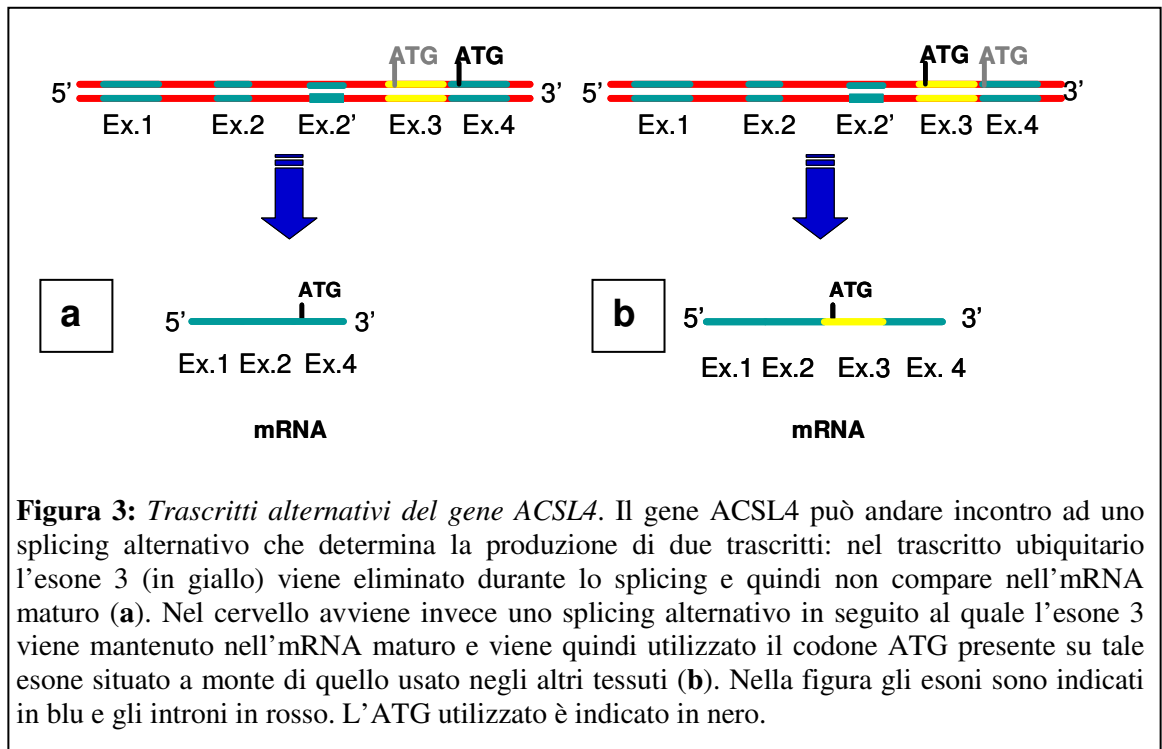


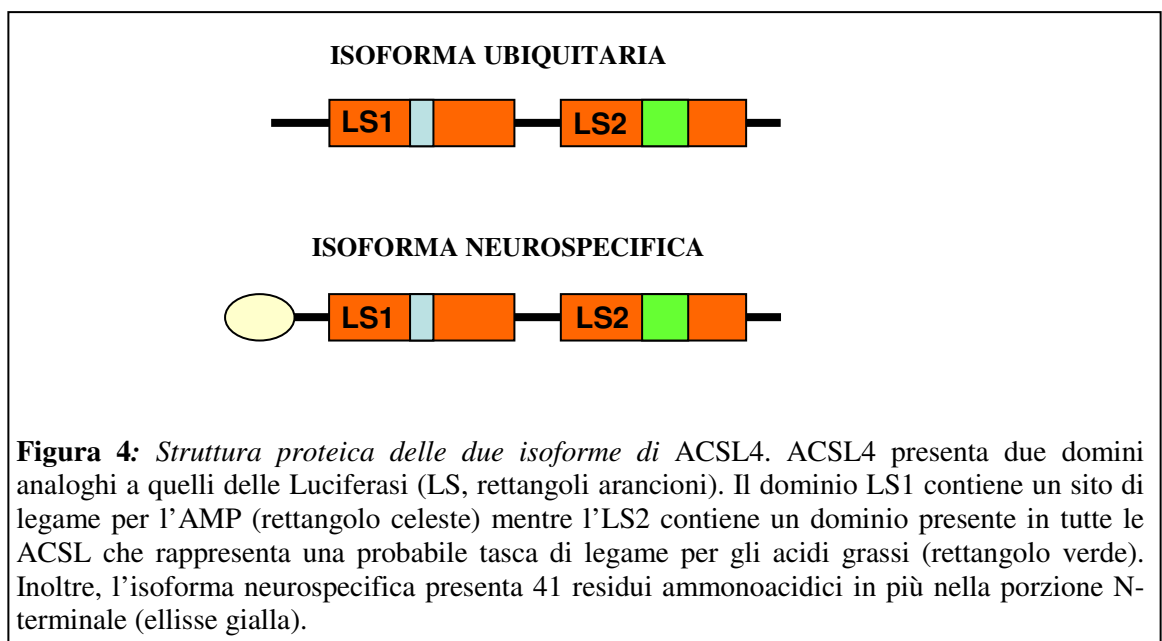
Figura 2: Conversione di un acido grasso ad Acil-CoA.

Il gene *ACSL4* è organizzato in 17 esoni e codifica per due isoforme distinte della proteina: una formata da 711 residui amminoacidici specifica per il tessuto cerebrale (79KDa) e una seconda isoforma ubiquitaria di 670 residui amminoacidici (74KDa). Le due isoforme derivano da uno splicing alternativo che consente di usare nel cervello un codone d'inizio tessuto-specifico localizzato 123bp a monte di quello usato negli altri tessuti determinando così l'introduzione di 41 amminoacidi idrofobici aggiuntivi all'N-terminale (Figure 3 e 4). Si ipotizza che tale peptide addizionale possa determinare un cambiamento nella localizzazione intracellulare dell'enzima [30,31] ma ciò non è stato dimostrato.

La proteina *ACSL4* ha una struttura molto simile a quella delle altre *ACSL*, sia umane che di topo e ratto, ed è caratterizzata dalla presenza di due domini analoghi a quelli delle luciferasi (LS) a livello dei quali avviene l'interazione tra i gruppi carbossilici degli acidi grassi e l'ATP per formare l'Acil-AMP. In particolare, il primo dominio presenta un putativo sito di legame per l'AMP. Il secondo dominio contiene invece 25 residui amminoacidici comuni a tutte le Acil-CoA sintetasi sia procariotiche che eucariotiche; in questa regione sono presenti numerosi residui specifici essenziali per l'attività catalitica che sembrano formare una tasca di legame per il substrato all'interno dell'enzima [31,32] (Figura 4).



Il substrato di ACSL4 è l'acido arachidonico (AA), un acido grasso poliinsaturo (PUFA) a catena lunga abbondante nei fosfolipidi di membrana del cervello [33]. Il sistema nervoso centrale usa gli acidi grassi poliinsaturi durante diversi processi



cellulari come il differenziamento, la sinaptogenesi e la biogenesi dei fotorecettori di membrana. In particolare, l'acido arachidonico (AA) sembra implicato in diverse cascate di segnalazione [25,26,34] nonché nel riciclo delle vescicole sinaptiche alla terminazione presinaptica [35]. Al momento è difficile ipotizzare come una riduzione

della produzione di arachidonil CoA o un aumento della concentrazione di AA libero in seguito all'assenza di *ACSL4* possa causare ritardo mentale. È noto che l'AA determina apoptosi cellulare mediante attivazione della caspasi 3 [34]. Studi su cellule di adenocarcinoma del colon hanno dimostrato che è proprio la sovra-espressione di *ACSL4* e della Ciclooossigenasi 2 (*COX2*) a ridurre i livelli di AA non esterificato presente nel citoplasma proteggendo le cellule dall'attivazione di un pathway pro-apoptotico AA-mediato [34]. Per questo motivo è possibile ipotizzare che l'assenza di *ACSL4* possa indurre un'apoptosi precoce nei neuroni alterando quindi il normale sviluppo cerebrale; ciò appare tuttavia poco probabile poiché non si osservano alterazioni significative all'MRI nei pazienti con mutazioni di *ACSL4*. Alternativamente, il mancato funzionamento di *ACSL4* potrebbe influenzare la composizione della membrana dei neuroni. Infatti, l'AA è tra gli acidi grassi poliinsaturi più abbondanti nelle membrane del cervello; la composizione lipidica della membrana ne determina le proprietà ed è quindi essenziale che nei fosfolipidi del cervello sia mantenuta la giusta quantità di specifici acidi grassi [36,37]. Infine l'assenza di *ACSL4* potrebbe influenzare la trasmissione sinaptica. Infatti l'AA è coinvolto nella regolazione di "Long Term Potentiation" (LTP) e "Long Term Depression" (LTD), processi essenziali per il mantenimento della plasticità sinaptica [38-41]; è il precursore di eicosanoidi e leucotrieni, importanti nella trasmissione sinaptica [42]; infine è coinvolto nel riciclo delle vescicole alla terminazione pre-sinaptica [35]. Attualmente è difficile stabilire se e quale di queste ipotesi sia corretta.

Poiché pazienti con mutazioni in *ACSL4* presentano principalmente un difetto cognitivo potrebbe essere la completa assenza della proteina nel cervello ad avere rilevanza patogenetica. Ad oggi non è stato ancora definito se la proteina sia essenziale per la funzione o per lo sviluppo cerebrale o per entrambi. Data l'esistenza di una isoforma di *ACSL4* espressa specificatamente nel tessuto cerebrale si può ipotizzare che le due isoforme svolgano delle funzioni specifiche e distinte e che sia l'assenza dell'isoforma neuro-specifica a causare ritardo mentale. La localizzazione sub-cellulare delle due isoforme non è attualmente nota. La presenza di una coda N-terminale altamente idrofobica nell'isoforma neuro-specifica suggerisce che essa possa avere una diversa localizzazione sub-cellulare rispetto alla forma ubiquitaria. Un'analisi *in silico* con il programma di previsione PSORT ha fornito risultati contraddittori. Una prima analisi con la versione originale del programma (PSORT; <http://psort.nibb.ac.jp/>) indicava infatti una possibile localizzazione nel citoplasma per la forma ubiquitaria e

nel reticolo endoplasmico per la forma neuro-specifica [31]. Tuttavia, una seconda analisi con una nuova versione aggiornata del programma (PSORT II; <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) ha successivamente indicato che entrambe le isoforme sono probabilmente localizzate nel citoplasma.

Alla luce di questi dati, ad oggi è difficile predire l'esatta funzione di *ACSL4*. La proteina non sembra essere coinvolta in nessuno dei pathway alterati da mutazioni negli altri geni implicati nel ritardo mentale identificati finora, anche se tale coinvolgimento non potrà essere del tutto escluso solo quando verrà chiarito l'esatto ruolo della proteina nella cellula. Alternativamente è possibile che *ACSL4* possa essere coinvolto in un nuovo pathway patogenetico dovuto all'alterazione del metabolismo dei lipidi. Infine, dal momento che l'acido arachidonico sembra essere implicato in varie vie di segnalazione e nel riciclo delle vescicole sinaptiche, è possibile che *ACSL4* agisca a livello di una di queste vie.

Al fine di comprendere i processi molecolari che collegano mutazioni in *ACSL4* al ritardo mentale non sindromico, il mio lavoro si è concentrato su 3 obiettivi:

- 1- la caratterizzazione dell'espressione di *ACSL4*, sia a livello di mRNA che di proteina;
- 2- la definizione della localizzazione sub-cellulare delle 2 isoforme della proteina;
- 3- lo studio del ruolo di *ACSL4* nel differenziamento e nella funzionalità neuronale.

Materiali e Metodi

A Linee cellulari

1- Terreni di coltura

DMEM- Il DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) viene utilizzato per la crescita e il differenziamento della linea cellulare SH-SY5Y e per le NT2-D1. Il terreno viene acquistato in polvere (SIGMA) e sciolto in acqua sterile con il 7,5% di Bicarbonato di Sodio. Da tale soluzione stock si prepara il terreno completo tramite aggiunta di: Horse Serum al 10% (HS), Fetal Bovine Serum (FBS) al 5%, L-Glutamina 1mM, Penicillina 100U/ml e Streptomicina 100µg/ml.

RPMI 1640- Il terreno RPMI 1640 (Euroclone) è stato utilizzato per la preparazione e il mantenimento delle linee cellulari linfoblastoidi. Il terreno completo viene preparato a partire dallo stock commerciale tramite aggiunta di: FBS al 20% o al 10%, L-Glutamina 1mM, Penicillina 100U/ml e Streptomicina 100µg/ml.

2. Cellule

SH-SY5Y- Le SH-SY5Y sono una linea cellulare umana derivante da un neuroblastoma che può essere indotta a differenziare in senso neuronale. Le cellule crescono in aderenza in DMEM completo a 37°C in CO₂ al 5%. Per indurre il differenziamento in neuroni le cellule vengono incubate in DMEM completo con Acido Retinoico 10µM per 5 giorni e successivamente in terreno senza siero contenente 50ng/ml di BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) per ulteriori 5 giorni.

NT2-D1- Le NT2-D1 sono una linea cellulare umana derivante da un carcinoma del testicolo. Tali cellule crescono in aderenza a 37°C con CO₂ al 5%. Il terreno di coltura è il DMEM completo con 4,5 g/L di glucosio.

Linee cellulari linfoblastoidi- Per stabilire una linea cellulare linfoblastoide occorre innanzitutto isolare i leucociti dal sangue intero. A tale scopo, un prelievo di sangue periferico viene diluito 1:1 in terreno di coltura o soluzione fisiologica e successivamente stratificato su un volume di Ficoll (Pharmacia) pari al volume iniziale

di sangue. In seguito a centrifugazione per 30' a 1800rpm, si formano 3 fasi: uno strato superiore di siero, uno strato intermedio di Ficoll delimitato superiormente da un anello di leucociti e uno strato inferiore di globuli rossi. Una volta recuperato, l'anello di leucociti viene diluito con terreno o soluzione fisiologica e centrifugato 30' a 1800rpm. Il pellet viene lavato nuovamente con terreno o soluzione fisiologica, centrifugato ancora 30' e infine risospeso in 750µl di terreno RPMI 1640 completo con FBS al 20%; alle cellule viene infine aggiunta una forma attenuata del Virus di Epstein Barr. Le Dopo 24 ore in incubate a 37°C con CO₂ al 5% alle cellule viene aggiunta Ciclosporina A alla concentrazione finale di 20µg/µl per selezionare esclusivamente le cellule B. La coltura viene quindi trasferita nuovamente in incubatore e controllata regolarmente, aggiungendo terreno fresco quando necessario. Quando la coltura raggiunge i 10 ml circa, si aggiunge terreno con FBS al 10% invece che al 20%.

B. Immunofluorescenza

Per gli esperimenti di immunofluorescenza è stato impiegato un anticorpo policlonale generato in coniglio contro un epitopo al 5' della proteina comune ad entrambe le isoforme (sequenza: MAKRIKAKPTSDKPGSPYRS). L'anticorpo è stato gentilmente fornito dal prof. Prescott dell'Huntsman Cancer Institute di Salt Lake City (USA) [43].

Per l'immunofluorescenza, le SH-SY5Y e le NT2-D1 sono state cresciute su vetrini coprioggetto di vetro. Per favorire l'adesione delle cellule ai vetrini, questi vengono precedentemente incubati per alcune ore in una soluzione di collagene 0,5 mg/ml diluito in Acido acetico allo 0,1%. Le cellule vengono fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS 1X per 10', seguiti da "quenching" in Ammonio Cloruro 50 mM in PBS 1X per 20' e permeabilizzazione con Triton X100 allo 0.1% in PBS 1X per 10'. Tra un passaggio e l'altro i vetrini vengono sciacquati 2 volte in PBS 1X.

Per l'immunofluorescenza sui linfoblasti, le cellule sono state strisciate su vetrini coprioggetto e lasciate asciugare a 37°C per una notte. Il giorno successivo, le cellule sono state fissate con PFA 4% 30' a temperatura ambiente e permeabilizzate con Pronasi 10 ug/ml 5' a 37°C.

Per entrambi tutti e 3 i tipi cellulari l'immunofluorescenza prosegue poi nello stesso modo: i vetrini vengono incubati in Blocking solution (2% FBS, 2% BSA e 0,2% Fish Skin Gelatin in PBS 1X) per 30'. Successivamente, vengono incubati per 1h con gli anticorpi primari diluiti in PBS 1X con il 10% di Blocking solution. L'anticorpo contro ACSL4 è stato usato diluito 1:200; gli altri anticorpi diretti contro i vari marcatori cellulari sono anticorpi monoclonali commerciali prodotti in topo, di cui è stata usata la diluizione indicata in Tabella 1. Vengono effettuati 3 lavaggi di 5' ciascuno in PBS 1X. I vetrini vengono poi incubati 30' con gli anticorpi secondari (Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG per l'anticorpo primario anti-FACL4, e Alexa Fluor 568 Goat anti-mouse IgG per gli altri anticorpi primari) diluiti 1:5000 in PBS 1X con il 10% di Blocking solution, oppure con la Falloidina diluita 1:1000, che si lega ai filamenti di actina della cellula colorandoli di rosso. Infine i vetrini vengono lavati 3 volte (per 5') in PBS 1X e montati con Mowiol su un vetrino portaoggetti. I vetrini vengono lasciati asciugare a temperatura ambiente per 1-2 h e osservati con un microscopio a fluorescenza Zeiss Axioskop 40 FL connesso ad un computer ad un ingrandimento pari a 130X. Per l'acquisizione e l'analisi delle immagini viene usato il programma ISIS version 5.0.

Tabella 1: Markers tested to identify ACSL4 sub-cellular localization

Antibody	Cellular compartment	Antibody dilution
Calnexin	Smooth and rough Endoplasmic reticulum	1:25
BIP	Smooth and rough endoplasmic reticulum	1:25
GM130	Golgi Cis	1:50
TGN38	Trans Golgi Network	1:50
Giantin	Golgi Cis and medium	1:50
Catalase	Peroxisomes	1:100
EEA1	Early Endosomes	1:100
MTOC1	Mitochondria	1:50
LAMP1	Lisosomi	1.10

C. Western blot

Il Western blot è una tecnica che consente di identificare una specifica proteina all'interno di una miscela mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato la metodica l'"SDS-PAGE", una corsa elettroforetica su gel di acrilammide in presenza di SDS (Sodio Dodecil Solfato). L' SDS maschera la carica effettiva delle proteine fornendo un eccesso di carica negativa. In questo modo le proteine avranno tutte la stessa carica e quindi migreranno solo in base al proprio peso molecolare.

Per il Western blot sono state utilizzate:

1. proteine commerciali isolate da cervello totale e ippocampo umano (USBioLogicals).
2. estratti proteici prodotti da noi a partire da linee cellulari linfoblastoidi. A tale scopo, il pellet di cellule viene risospeso in PBS1X/saccarosio 9%. Si aggiunge quindi 0,25M di PMSF, un'inibitore delle proteasi, e successivamente si centrifuga 10' a 2500rpm. Infine, si recupera il sovrantante che rappresenta l'estratto proteico totale che viene conservato a -80°C fino all'uso.

Prima di essere caricati sul gel i campioni vengono diluiti 1:1 in Laemli Buffer 2X (Tris 0,1M pH 6,8, SDS 1mM, Ditiotritolo (DTT) 400mM, Blue di Bromofenolo 0,03M, Glicerolo 20%) e bolliti 5' a 95°C. Il DTT presente nel Laemli ha la funzione di denaturare le proteine.

I gel di acrilammide sono composti da due porzioni: lo Stacking gel (Acrilammide al 5%, Tris 0,125M pH6,8, SDS 0,1%, Ammonio Persolfato (APS) 0,1% e Temed 5,2mM) che serve ad "impaccare" le proteine così che partano tutte insieme una volta avviata la corsa; e il Separating gel (Acrilammide in % variabile, Tris 0,39M pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,1% e Temed 5,2mM) che ha la funzione di separare le proteine in base alle loro dimensioni. Per i nostri esperimenti sono stati utilizzati Separating gel con percentuali di acrilammide dal 5 al 12%. La corsa elettroforetica viene effettuata in tampone di corsa (Tris 0,025M, Glicina 0,2M, SDS 0,1%) a 150V per circa 1h e 30'. Al termine della corsa si procede con il trasferimento delle proteine dal gel su membrana di nitrocellulosa in tampone di trasferimento (Tris 0,5M, Glicina 0,4M, Metanolo 0,5%) per 1h a 250mA. Dopo il trasferimento la membrana di nitrocellulosa viene colorata con Rosso Ponceau, che lega le proteine e consente così di

visualizzarle e verificare che il trasferimento sia avvenuto correttamente. Successivamente la membrana viene incubata un'ora in agitazione in Blocking Solution (PBS 1X, 5% latte in polvere, 0,05% Tween 20), quindi ibridata per una notte con anticorpo anti-ACSL4 diluito 1:2000 in Blocking Solution. Dopo tre lavaggi di 10' in agitazione in PBS-T (PBS 1X, 0,05% Tween 20) la membrana viene successivamente incubata per un'ora con l' anticorpo secondario diluito 1:5000 in Blocking Solution coniugato con una perossidasi. Infine, viene effettuata una rivelazione chemiluminescente del segnale.

D. Analisi di espressione

1. Estrazione dell'RNA

L'estrazione di RNA è stata effettuata utilizzando il Kit "Rneasy Midi" della Qiagen seguendo il protocollo indicato dal produttore. L'RNA è stato eluito in un volume finale di 100/150µl di acqua Rnase-free.

2. Analisi della qualità dell'RNA

Quantizzazione: L'RNA è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260nm per determinarne la concentrazione. E' stata inoltre determinata l'assorbanza del campione a 280 nm (lunghezza d'onda a cui assorbono le proteine): il valore del rapporto dell'assorbanza a 260nm e 280nm permette di stabilire la presenza di proteine nel campione. Il rapporto ottimale 260/280 è tra 1,8 e 2.

Valutazione della qualità: E' possibile valutare la qualità dell'RNA tramite corsa elettroforetica a basso voltaggio (60V) su gel di agarosio all'1% in Running Buffer 1X (0,1M MOPS, 40mM Sodio Acetato, 5mM EDTA) e formaldeide 2,2M. I campioni vengono preparati per la corsa in una mix composta da Running Buffer 1X, formaldeide 2,2M e formamide 0,5M. I campioni così preparati vengono incubati 15' a 65°C, trasferiti in ghiaccio, centrifugati alcuni secondi e, infine, caricati sul gel dopo aver aggiunto 1µl di Loading Buffer (50% Glicerolo, 1mM EDTA pH8,

0,25% Bromofenolo Blue, 0,25M Xilene Cianolo). Per tutte le soluzioni viene usata acqua con lo 0,1% di DEPC.

Al termine della corsa il gel viene colorato 30 minuti in Ammonio acetato 0,1M contenente lo 0,03% di Bromuro di Etidio e successivamente decolorato in Ammonio acetato 0,1M. Dopo la decolorazione sul gel sarà possibile identificare una strisciata (corrispondente ad RNA di diverso peso molecolare) e due bande a diversa altezza che corrispondono alle due forme principali di RNA ribosomiale: 28S e 18S. Se l'RNA non è degradato, il rapporto dell'intensità di queste 2 bande dovrebbe essere circa 2:1 (28S/18S). Il rapporto reale osservato ci dà quindi un'idea dell'integrità del nostro RNA. Tale rapporto è stato determinato tramite analisi quantitativa dell'immagine del gel utilizzando il software "Scion Image".

3. RT-PCR

Retrotrascrizione: La retrotrascrizione dell' RNA in cDNA è stata effettuata utilizzando l'"High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" dell'Applied Biosystems. Il Kit utilizza primers a sequenza casuale (random primers) che garantiscono che la retrotrascrizione abbia luogo a partire da tutte le specie di molecole di RNA presenti. La retrotrascrizione è stata effettuata come da protocollo del kit utilizzando RNA ad una concentrazione finale di 100 ng/μl. La reazione viene incubata a 25°C per 10', a 37°C per 120', per consentire alla retrotrascrittasi di copiare tutti gli RNA in cDNA, e infine a 85°C per 5'', in modo da inattivare la retrotrascrittasi. Il cDNA così ottenuto viene conservato a -20°C fino all'utilizzo. Partendo dal presupposto che l'efficienza della reazione sia del 100%, il risultante cDNA avrà una concentrazione di 100ng/μl.

PCR: Per lo studio delle diverse varianti di splicing di *ACSL4* sono stati utilizzati i seguenti primers:

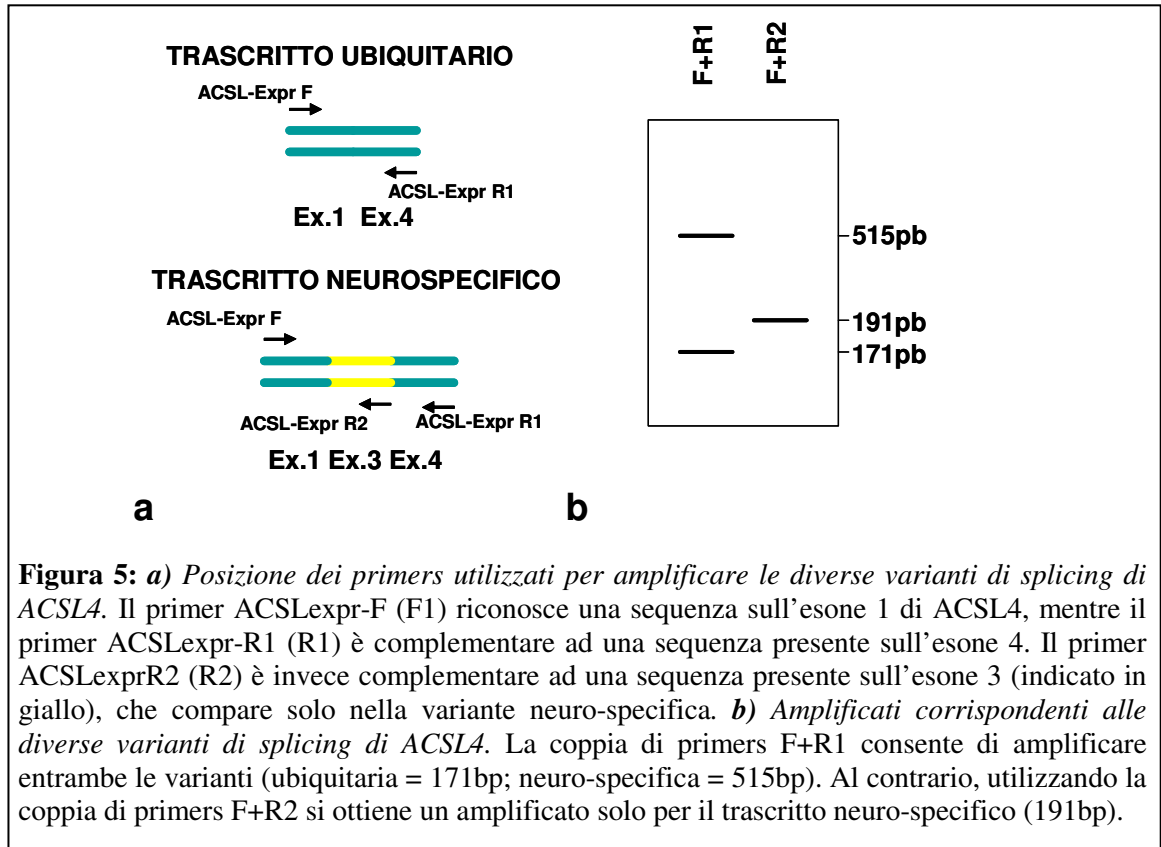
ACSLexpr-R1: 5' – TTG TCT GAA GTG GGC TTA GC – 3'

ACSLexpr-R2: 5' – AAG GCA GTT CAA TCT TAG TG – 3'

ACSLexpr-F: 5' – GTT CCT TTT TGC GAG CTT TC – 3'

Il primer ACSLexpr-F riconosce una sequenza sull'esone 1 di *ACSL4* ed è quindi comune a tutte le varianti di splicing. Il primer ACSLexpr-R1 è complementare ad una sequenza presente sull'esone 4. Usando questa coppia di primers è possibile

amplificare tutte le varianti di splicing di *ACSL4*, che potranno essere distinte in base alle dimensioni (171 bp per la variante ubiquitaria e 515 bp per quella neurospecifica) (Figura 5). Il primer ACSLexpr-R2 riconosce invece una sequenza presente



sull'esone 3; quindi la coppia di primers ACSL-exprF/ACSLexprR2 consente di amplificare solo la variante neuro-specifica (191bp) (Figura 5).

Per ogni campione è stata effettuata una reazione di PCR standard con 100ng di cDNA in un volume finale di 25µl. Il programma di amplificazione consiste in una denaturazione iniziale a 95°C per 5' seguita da 35 cicli costituiti da:

- ❖ Denaturazione a 95°C per 1'.
- ❖ Appaiamento dei primers al DNA per 1'; la temperatura di questa fase varia in base alla composizione in basi dei primers (4°C per ogni G e C e 2°C per ogni A e T). In particolare è stata utilizzata una temperatura di 54°C per la coppia ACSLexprF/ACSLexprR1 e di 57°C per ACSLexprF/ACSLexprR2;
- ❖ Estensione a 72°C per 45''.

Infine, viene effettuata un'estensione finale a 72°C per 5'.

Al termine della reazione di PCR viene effettuata una corsa elettroforetica in tampone TAE 1X (Tris acetato 40mM, EDTA 250 mM) per 20' a 90V al fine di verificare che la reazione sia avvenuta correttamente. A tale scopo, 3µl di ogni campione vengono corsi su un gel di Agarosio al 2% con Bromuro di Etidio allo 0,006%. Un marker di peso molecolare (Marker VI, Roche) viene utilizzato per determinare la lunghezza del prodotto di PCR.

4. Real Time PCR

Principio generale. La Real Time PCR è una tecnica che consente un'analisi quantitativa dell'espressione genica. In particolare, abbiamo utilizzato la chimica TaqMan (Applied Biosystems) su un apparecchio ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. I saggi TaqMan utilizzano una sonda di 20-25 bp, con sequenza complementare alla regione d'interesse. La sonda presenta un fluorocromo (reporter) in posizione 5' e un "quencher" in posizione 3'; finchè la sonda è intatta la vicinanza del *quencher* al *reporter* determina una soppressione della fluorescenza di quest'ultimo (Figura 6 a). Oltre alla sonda, per l'esperimento si usa una coppia di primers complementari alle regioni adiacenti alla sonda stessa. Durante la reazione di PCR i primers e la sonda si legano alla sequenza di cDNA complementare e ha inizio la

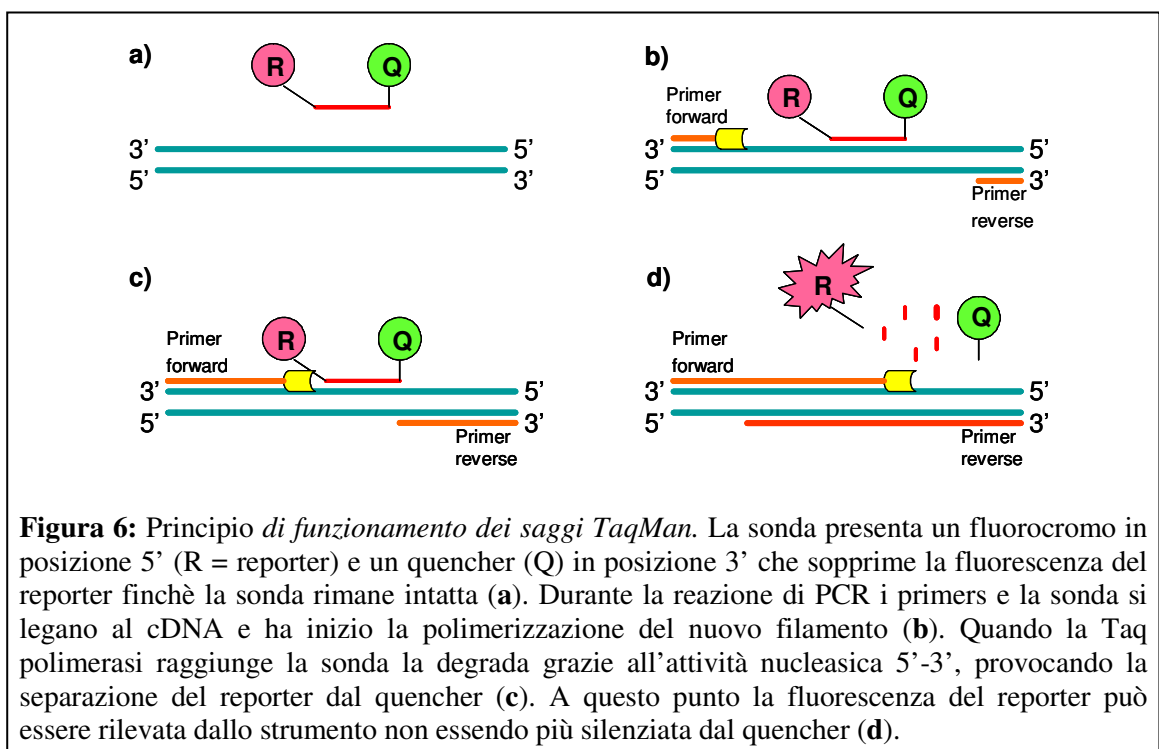


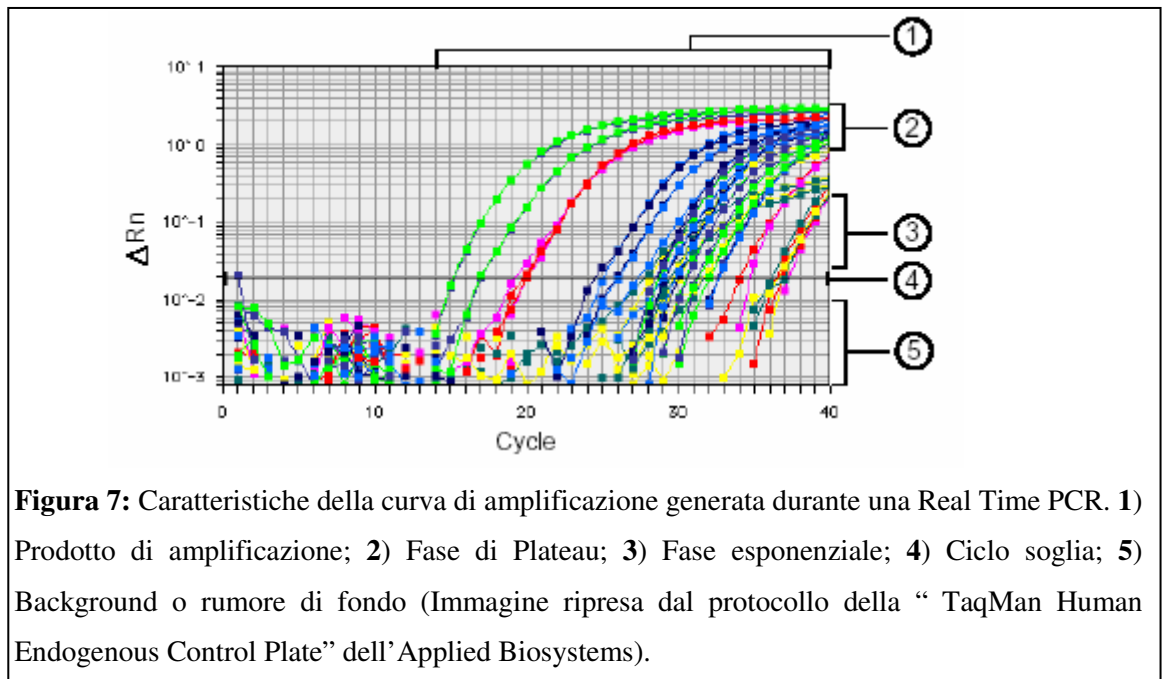
Figura 6: Principio di funzionamento dei saggi TaqMan. La sonda presenta un fluorocromo in posizione 5' (R = reporter) e un quencher (Q) in posizione 3' che sopprime la fluorescenza del reporter finchè la sonda rimane intatta (a). Durante la reazione di PCR i primers e la sonda si legano al cDNA e ha inizio la polimerizzazione del nuovo filamento (b). Quando la Taq polimerasi raggiunge la sonda la degrada grazie all'attività nucleasica 5'-3', provocando la separazione del reporter dal quencher (c). A questo punto la fluorescenza del reporter può essere rilevata dallo strumento non essendo più silenziata dal quencher (d).

polimerizzazione del nuovo filamento (Figura 6 b). Poichè la Taq polimerasi è modificata in modo da avere attività nucleasica 5'-3', quando incontra la sonda la degrada, provocando la separazione di reporter e quencher; ciò causa un'emissione di fluorescenza da parte del reporter, non più silenziato, che viene rilevata dallo strumento (Figura 6 c-d). L'incremento di fluorescenza è quindi direttamente correlato al livello di amplificazione del target durante la reazione di PCR: il fluorocromo emette un segnale ogni volta che viene sintetizzato un nuovo filamento, per cui si ha una proporzionalità diretta tra quantità di segnale e quantità di molecole sintetizzate, che a sua volta dipende dalla quantità di molecole di partenza, e quindi dal livello di espressione di un gene. Al fine di determinare se differenze di fluorescenza tra più campioni siano dovute ad eventuali errori di pipettatura o a reali differenze di espressione del gene d'interesse, la fluorescenza di quest'ultimo viene di solito normalizzata rispetto a quella di un gene di controllo (reference) comunemente espresso a livelli simili in qualsiasi campione.

Il saggio può essere effettuato sia in Duplex che in Singleplex. Nel primo caso entrambi i saggi (gene da testare + reference) vengono aggiunti allo stesso tubo di reazione; il profilo di amplificazione dei due geni viene distinto grazie alla diversa lunghezza d'onda a cui emettono i relativi fluorocromi. Nel caso della Singleplex invece vengono preparate due reazioni in tubi separati, una per il gene da testare e una per il reference. Il vantaggio della reazione Duplex è che i due saggi agiscono contemporaneamente sullo stesso cDNA, per cui viene ridotta la variabilità legata alla quantità di cDNA iniziale, che invece si avrebbe aggiungendo il cDNA a due mix separate. Lo svantaggio però è che, utilizzando insieme i due saggi, possono crearsi fenomeni di competizione in grado di alterare il funzionamento di uno dei due saggi.

L'apparecchio ABI PRISM 7000 Sequence Detection System permette di rilevare in tempo reale l'accumularsi del prodotto durante il processo di PCR tramite il monitoraggio della fluorescenza emessa. Durante ciascun ciclo di PCR vengono collezionate immagini multiple dell'intera piastra da 96 pozzetti, rappresentate attraverso un diagramma in cui sulle ascisse è riportato il numero di cicli, sulle ordinate l'intensità di fluorescenza (dRn). Dal momento che sono necessari numerosi cicli affinché la quantità di prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza rispetto al numero dei cicli mostra un andamento sigmoide (Figura 7). Durante i cicli iniziali il segnale emesso rappresenta solo una fluorescenza non specifica della reazione che può essere determinata dal non corretto spegnimento del *reporter* da parte del *quencher*. Tale segnale, definito "Background" o "Spectral Noise" (rumore di fondo), viene

matematicamente rimosso dal software durante la corsa. Durante l'amplificazione il segnale di fluorescenza aumenta in modo esponenziale; siamo nella fase esponenziale, ovvero nella fase in cui la curva è lineare. Nei cicli finali i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi; siamo nella fase di Plateau (Figura 7). Il punto sulla curva in cui la quantità di



fluorescenza comincia ad aumentare in modo esponenziale è definito “ciclo soglia” (Ct). Tale valore cambia al variare della quantità di cDNA di partenza. Il Ct può quindi essere usato per valutare il livello di espressione genica tramite il metodo della comparazione del Ct (Comparative Ct method; [44]). In particolare, per tale metodo si utilizza non direttamente il Ct del campione ma il dCt, cioè il ciclo soglia del gene da testare normalizzato rispetto a quello del reference. Le differenze osservate nel valore di dCT tra diversi campioni danno una stima della differenza di espressione del gene in analisi in tali campioni. Affinché sia possibile utilizzare il metodo della comparazione del Ct per confrontare il livello di espressione del gene in esame tra campioni diversi è necessario che l'efficienza di amplificazione per il gene da testare e per il reference sia approssimativamente uguale. In assenza di tale condizione, non è possibile utilizzare questo metodo. In alternativa, è possibile utilizzare una versione modificata dell'equazione matematica impiegata con il metodo della comparazione del Ct, che tenga conto delle diverse efficienze di amplificazione del gene da testare e del reference

[45]. L'efficienza di amplificazione di ogni saggio può essere determinata tramite la costruzione di una "curva standard" (vedi analisi dei dati).

Preparazione e corsa della reazione di Real Time PCR. Per ogni campione vengono effettuate 3-5 repliche del volume finale di 50 µl ciascuna. Per ognuno, viene preparata una Mix per una replica in più al fine di compensare la perdita di reagenti durante la pipettatura. La mix ha la seguente composizione:

Taqman Universal PCR Master Mix 1X, contenente Taq polimerasi, desossinucleotidi e buffer di reazione.

- Assay Mix 1X, contenente i primers e la sonda specifici.
- cDNA in quantità appropriata.
- Acqua fino a volume

La mix viene aliquotata su una piastra da Real Time da 96 pozzetti, che viene centrifugata 5' a 3500 rpm per eliminare eventuali bolle d'aria. La piastra viene successivamente caricata sull'apparecchio "ABI PRISM 7000 Sequence Detection System" e viene effettuato il seguente programma di PCR:

- 50°C 2'
 - 95°C 10'
- E 40 cicli di:
- 60°C 1'
 - 95°C 15'

Calcolo dell'efficienza: Per calcolare l'efficienza dei singoli saggi dobbiamo costruire per ognuno una "curva standard". A tale scopo viene effettuato un esperimento di Real Time con quantità scalari di cDNA. I valori di Ct risultanti da tale esperimento vengono utilizzati per costruire la curva standard, una retta che riporta l'andamento del Ct in funzione del logaritmo in base 10 della quantità di cDNA di partenza espressa in ng. Il coefficiente angolare di tale retta (slope=s) viene utilizzato per calcolare l'efficienza E del saggio, secondo l'equazione:

$$E = 10^{(-1/s)}$$

Tale valore può essere utilizzato per la successiva analisi dei dati.

Analisi dei dati. Alla fine della PCR, i dati possono essere esportati sotto forma di un file Excel per essere analizzati. Tale file contiene, per ogni posizione della piastra, il nome del campione, la sonda utilizzata, il valore di Ct e la deviazione standard relativa. Per l'analisi si determina, per ogni campione, la media tra i valori di Ct per il gene da testare e per il reference. A questo punto, per il confronto dei livelli di espressione del test in campioni diversi dobbiamo scegliere un campione che farà da "calibratore", al cui livello di espressione viene arbitrariamente assegnato il valore 1. Una volta scelto il calibratore si calcola, sia per il gene da testare (test) che per il reference, il dCt dato da: Ct campione X - Ct calibratore. Per il calibratore stesso tale valore risulterà pari a zero. Il livello di espressione dei campioni in esame rispetto al calibratore viene determinato tramite la formula matematica [45]:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{test}})^{-dCt(X-\text{calib})}}{(E_{\text{ref}})^{-dCt(X-\text{calib})}}$$

Da tale formula risulta per il calibratore stesso un valore di espressione pari a 1; il valore numerico che esprime il livello di espressione degli altri campioni indica quante volte essi sono espressi più o meno rispetto al calibratore. La deviazione standard per il ddCt ratio viene calcolata in base ad una apposita formula matematica[44]. I dati così ottenuti possono infine essere visualizzati tramite un istogramma. Per determinare se eventuali differenze di espressione siano statisticamente significative è stato usato il test t di Student. Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati significativi.

Set primers/sonda per il gene ACSL4. Per valutare i livelli di espressione del gene *ACSL4* nei diversi campioni, sono stati utilizzati tre set di primers/sonda, uno per ogni variante di splicing del gene. Tutte le sonde hanno come reporter il fluorocromo FAM (6-carboxy-fluoresceina), che emette fluorescenza alla lunghezza d'onda di 518nm, e presentano all'estremità 3' un quencher non fluorescente.

Il saggio per l'isoforma ubiquitaria (FACL4_UB) è stato disegnato e validato dall'Applied Biosystems con la sonda a cavallo tra esone 2 ed esone 4 (codice Hs01552631_m1) (Figura 8). Il saggio per l'isoforma neurospecifica di FACL4 (FACL4_BS1) è stato invece disegnato su nostra indicazione tramite il programma "File Builder 3.1" scaricabile dal sito dell'Applied Biosystems. Tale programma consente, con una procedura guidata, di inserire la sequenza d'interesse e selezionare la

la regione precisa a livello della quale disegnare la sonda (in genere a cavallo tra due esoni). Questo file viene poi caricato su un'apposita pagina del sito dell'Applied Biosystems, che si occupa di disegnare e testare primers e sonda. E' stata creata una coppia di primers/sonda a cavallo tra esone 2 ed esone 3, in modo che il saggio sia in

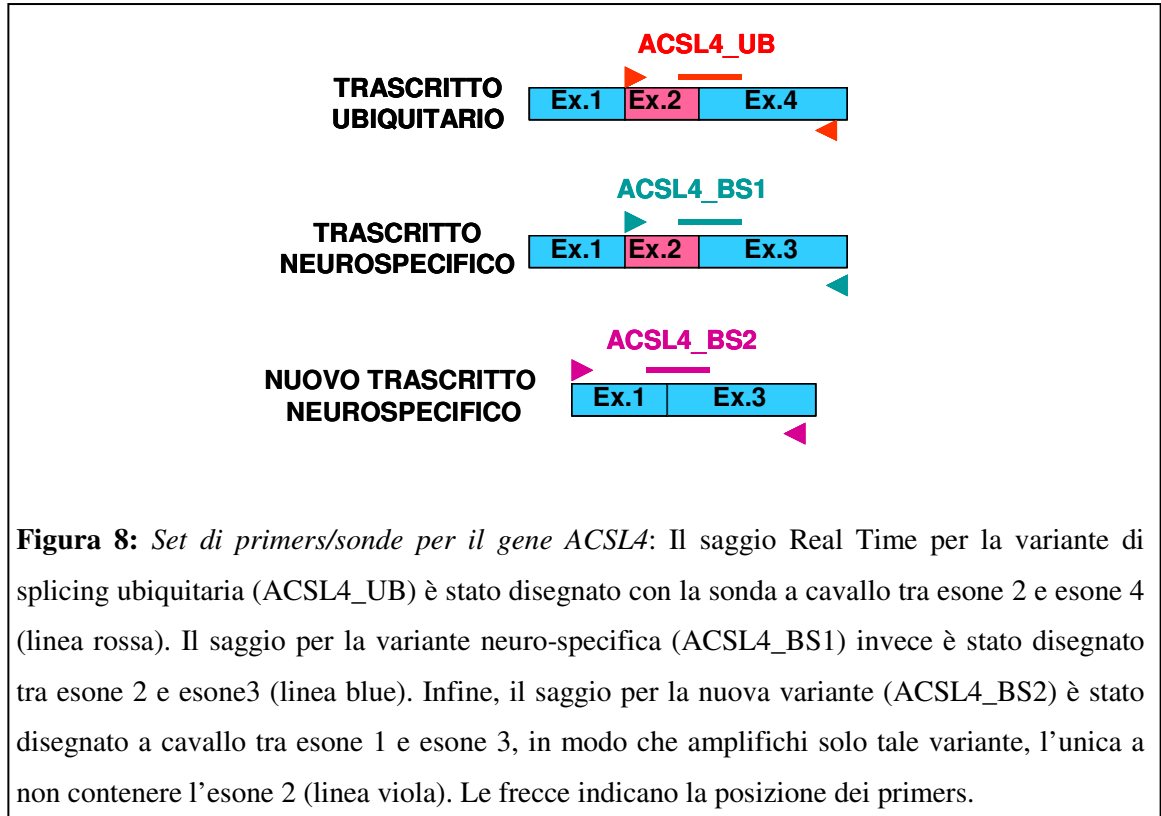


Figura 8: Set di primers/sonde per il gene ACSL4: Il saggio Real Time per la variante di splicing ubiquitaria (ACSL4_UB) è stato disegnato con la sonda a cavallo tra esone 2 e esone 4 (linea rossa). Il saggio per la variante neuro-specifica (ACSL4_BS1) invece è stato disegnato tra esone 2 e esone3 (linea blue). Infine, il saggio per la nuova variante (ACSL4_BS2) è stato disegnato a cavallo tra esone 1 e esone 3, in modo che amplifichi solo tale variante, l'unica a non contenere l'esone 2 (linea viola). Le frecce indicano la posizione dei primers.

grado di amplificare solo la variante neuro-specifica, che è l'unica contenente l'esone 3 (Figura 8). In seguito all'identificazione della terza variante di splicing è stato disegnato un ulteriore saggio, ACSL4_BS2. Il saggio è stato disegnato e validato dall'Applied Biosystems con la sonda a cavallo tra esone 1 e esone 3 (Figura 8).

Analisi di espressione su tessuto cerebrale: Per l'analisi di espressione su tessuto cerebrale sono stati utilizzati RNA commerciali (Clontech) ottenuti da cervello fetale, cervello totale adulto e da quattro regioni specifiche (cervelletto, ippocampo, lobo frontale, lobo temporale). Ogni RNA di tessuto adulto proviene da un pool di tessuti di individui di età compresa tra 32 e 70 anni. L'RNA di cervello fetale proviene invece da un pool di 21 tessuti fetali di età gestazionale compresa tra le 26 e le 40 settimane. Per ogni campione in analisi sono stati usati 10ng di cDNA per ogni replica. Come gene reference è stato usato il *GAPDH* (Gliceraldeide 3 Fosfato Deidrogenasi), f), che viene fornito come kit già pronto dall'Applied

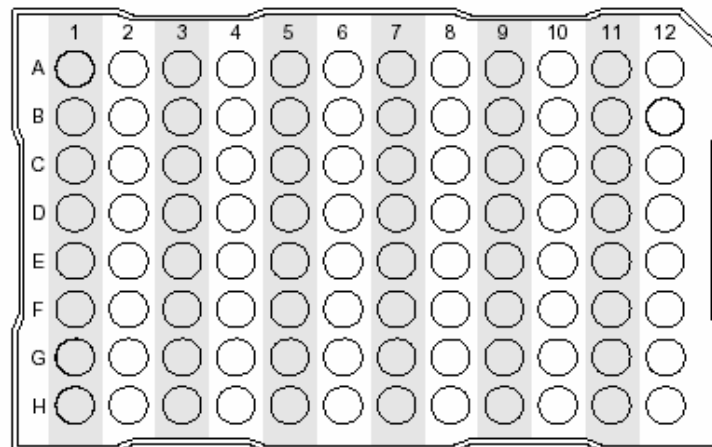
Biosystems (codice 4326317E). In questo caso il reporter è VIC ed emette fluorescenza alla lunghezza d'onda di 554nm. I campioni sono stati amplificati in Singleplex (test e reference in diversi tubi di reazione) in 5 repliche. Per l'analisi di ogni singola variante è stato utilizzato come calibratore il livello di espressione nel cervello totale adulto.

Analisi di espressione nelle SH-SY5Y: Al fine di identificare un controllo endogeno appropriato da utilizzare come reference è stata utilizzata la "TaqMan Human Endogenous Control Plate" prodotta dall'Applied Biosystems. Questa piastra permette di valutare simultaneamente l'espressione di 11 geni housekeeping selezionati. Essa è divisa in 12 colonne, una per ciascun gene più una per l'IPC, ognuna delle quali consiste di otto pozzetti identici contenenti primers e sonda liofilizzati. In corrispondenza della prima colonna la piastra presenta l'IPC (Internal Positive Control), ovvero un controllo interno che permette di verificare la presenza di inibitori della PCR nel nostro cDNA. In assenza di inibitori, l'IPC è co-amplificato con il cDNA target e produce un segnale consistente. Se sono presenti inibitori, il segnale generato dall'IPC diminuisce sensibilmente o è assente. Le altre 11 colonne contengono primers e sonda per gli 11 geni Housekeeping (Figura 9).

Data la composizione della piastra, la preparazione dei campioni da utilizzare durante l'esperimento è diversa da quanto avviene per una reazione di Real Time PCR tradizionale. Infatti, poiché primers e sonde sono già presenti nei pozzetti, occorre aggiungere solo la TaqMan Universal Master Mix 1X e il cDNA alla concentrazione desiderata. La reazione è del tutto analoga ad una Real Time PCR tradizionale. L'Applied Biosystems raccomanda di analizzare in duplicato tre campioni più un quarto campione che serve da calibratore e verrà utilizzato come riferimento durante l'analisi dei risultati. Al termine della reazione di PCR, i valori di Ct ottenuti vengono esportati su un foglio Excel per essere analizzati. L'analisi consiste nel calcolare il valore del ΔCt per ciascun campione, ossia la differenza tra i valori di Ct del calibratore e quelli del campione da analizzare:

$$\Delta Ct_{(\text{Campione})} = \text{Media}Ct_{(\text{Calibratore})} - \text{Media}Ct_{(\text{Campione})}$$

In questo modo il valore di Ct del calibratore viene utilizzato per valutare i livelli di espressione genica di ciascun campione. Campioni con una concentrazione iniziale più



Column	Control Assay	Abbreviation
1	Internal Positive Control	IPC
2	18S rRNA	18S
3	Acidic ribosomal protein	huPO
4	Beta-actin	huβA
5	Cyclophilin	huCYC
6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	huGAPDH
7	Phosphoglycerokinase	huPGK
8	β ₂ -Microglobulin	huβ2m
9	β-Glucuronidase	huGUS
10	Hypoxanthine ribosyl transferase	huHPRT
11	Transcription factor IID, TATA binding protein	huTBP
12	Transferrin receptor	huTfR

Figura 9: Configurazione della “Human Endogenous Control Plate”. La tabella mostra la posizione sulla piastra dell’IPC e degli 11 geni housekeeping.

elevata rispetto al calibratore avranno un valore di Ct più basso producendo un ΔCt positivo, mentre campioni con concentrazione iniziale più bassa del calibratore presenteranno un Ct maggiore producendo un ΔCt negativo. Al termine dell’analisi è possibile visualizzare i dati ottenuti con un istogramma. Il reference migliore sarà rappresentato dal gene i cui valori di ΔCt si discostano meno dallo zero e variano in misura minore tra un campione e l’altro.

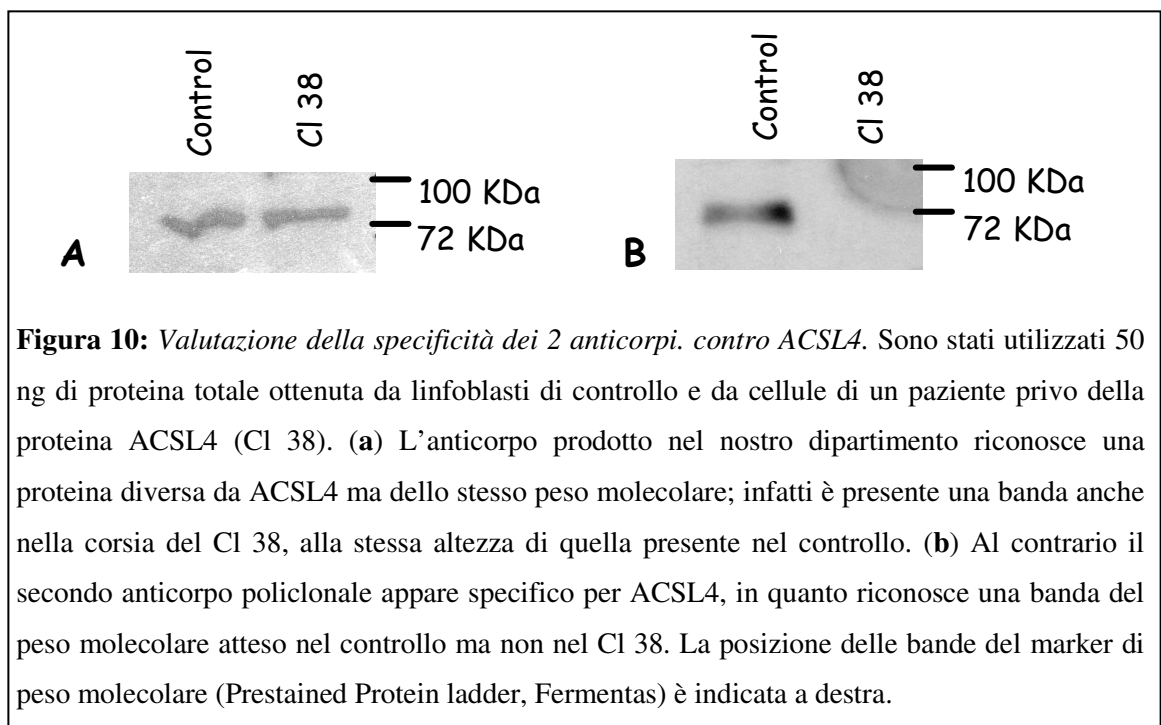
Nell’esperimento è stato utilizzato cDNA estratto dalle SH-SY5Y non differenziate e a tre stadi di differenziamento: 5 giorni in RA, 5 giorni in RA + 2 in BDNF, 5 giorni in RA + 5 giorni in BDNF. Per ogni campione sono stati impiegati 100ng di cDNA.

Risultati

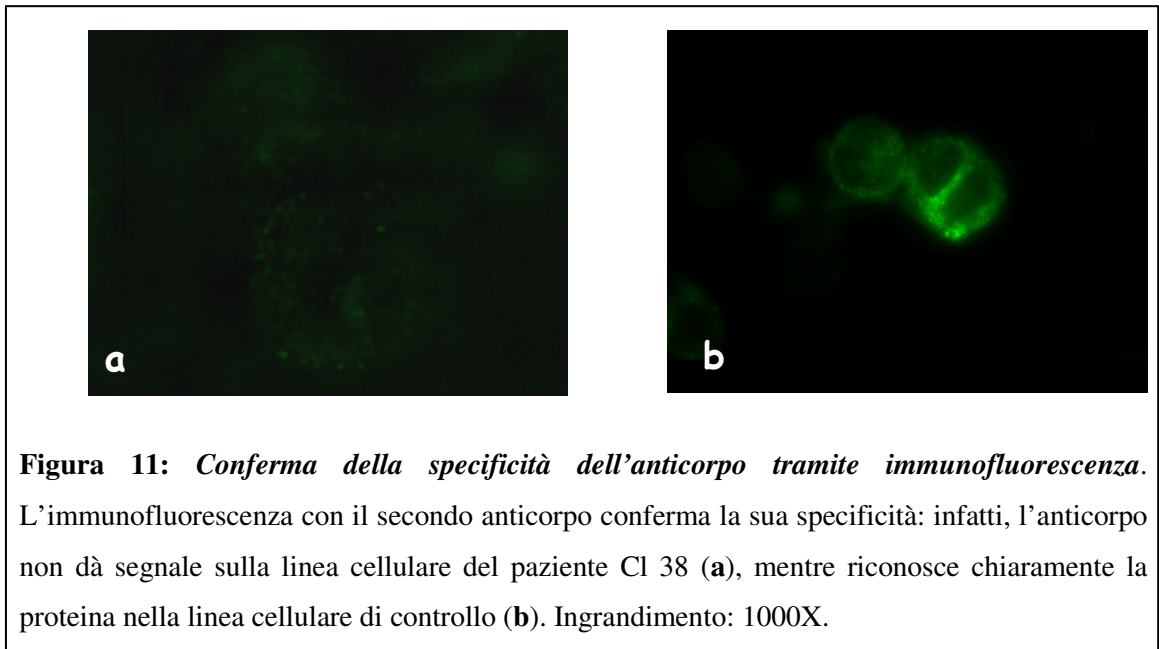
Analisi della proteina

Conferma della specificità dell'anticorpo

Inizialmente per i nostri esperimenti avevamo programmato di utilizzare un anticorpo policlonale di coniglio prodotto in collaborazione con la prof.ssa Luisa Bracci del Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università degli Studi di Siena. Per verificare la specificità del nostro anticorpo abbiamo effettuato un western blot su proteine estratte da una linea linfoblastoide di controllo e dalla linea linfoblastoide di uno dei pazienti con delezione completa del gene ACSL4 e quindi privo della proteina (Cl 38). Sfortunatamente, l'esperimento ha dimostrato che il nostro anticorpo riconosce anche una proteina diversa da ACSL4 ma dello stesso peso molecolare (Figura 10 a). Abbiamo quindi chiesto una aliquota di un secondo anticorpo ad un laboratorio americano che lavora su ACSL4 e aveva sintetizzato un anticorpo policlonale che riconosce un epitopo della proteina leggermente diverso da quello riconosciuto dal nostro anticorpo. Un western blot con tale anticorpo ha dimostrato che questo secondo anticorpo è specifico per ACSL4, in quanto riconosce una proteina del peso molecolare atteso nel controllo ma non nel Cl 38 (Figura 10 b). Per confermare ulteriormente la specificità di questo secondo anticorpo abbiamo inoltre effettuato un'immunofluorescenza sulla linea cellulare linfoblastoide di controllo e su quella del paziente Cl 38. Come atteso, il segnale è assente nel paziente (Figura 11 a), mentre è



presente sulla linea di controllo (Figura 11 b). Questo secondo anticorpo è stato quindi utilizzato per tutti gli esperimenti successivi.

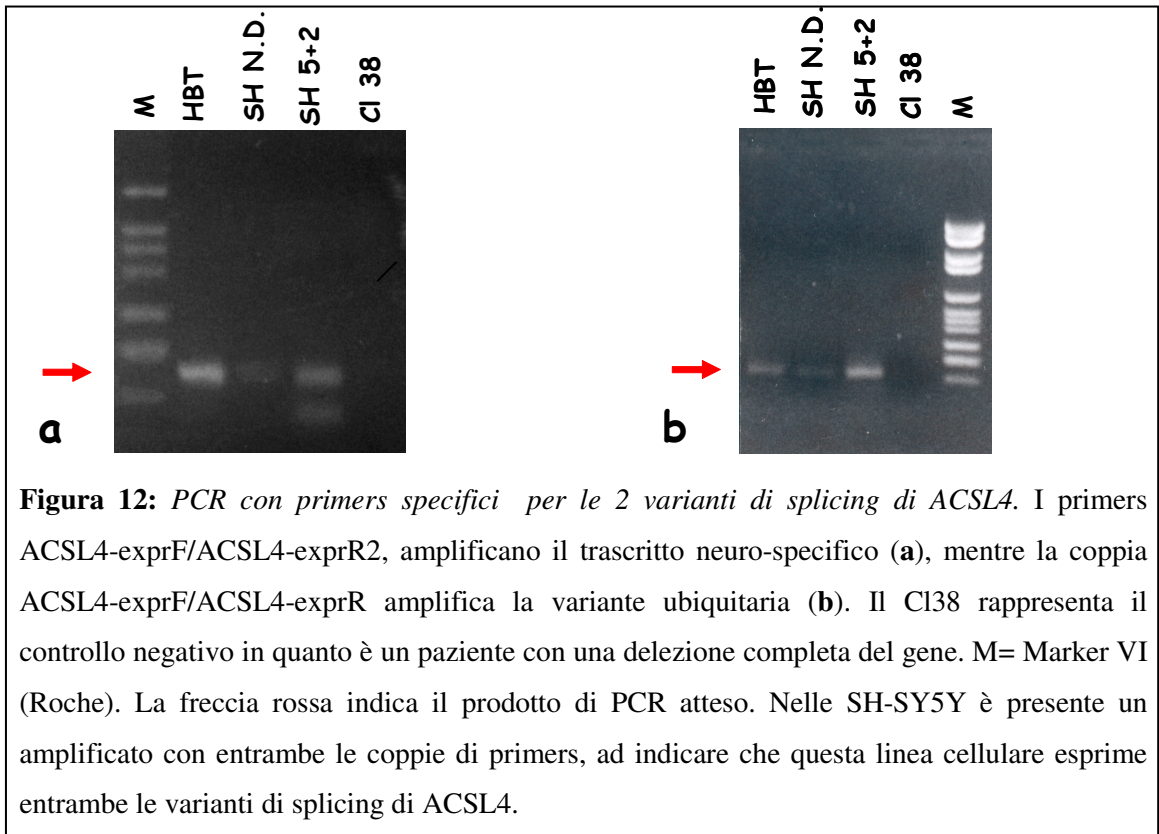


Localizzazione sub-cellulare di ACSL4

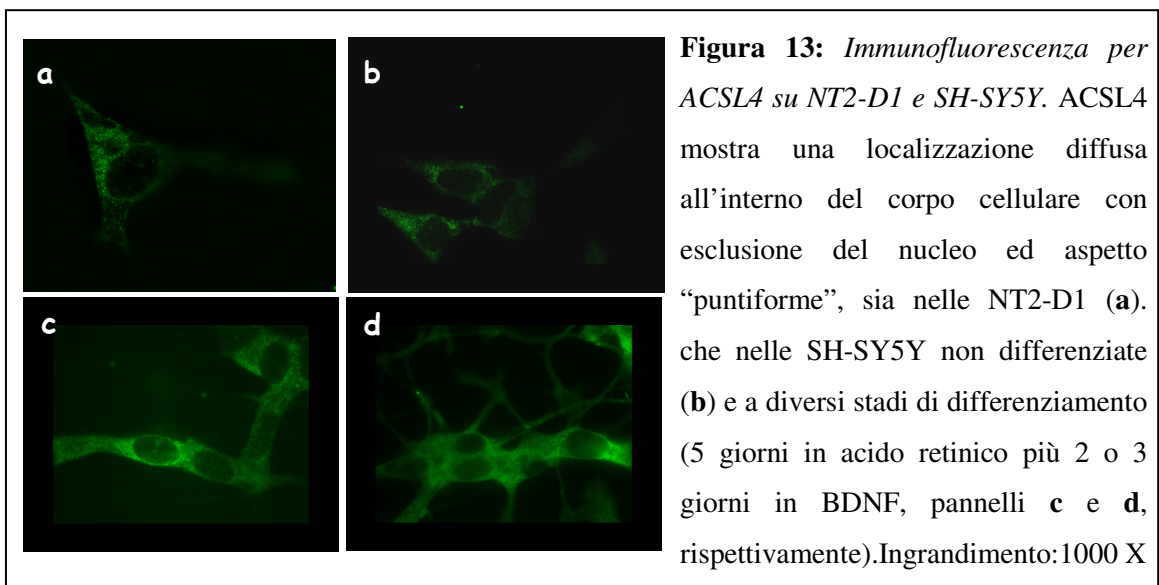
Volendo utilizzare le SH-SY5Y per studiare la localizzazione sub-cellulare di ACSL4 abbiamo innanzitutto determinato quale delle due isoforme esprimessero queste cellule. A tal fine è stato retrotrascritto l'RNA totale sia di un'aliquota non differenziata che di un'aliquota differenziata 5 giorni in acido retinoico e 2 giorni in BDNF. Tale cDNA è stato successivamente amplificato con i primers ACSLexpr-F/ACSLexpr-R1, che amplificano in teoria entrambi i trascritti di ACSL4, e ACSLexpr-F/ACSLexpr-R2, che amplificano solo il trascritto neuro-specifico. Da tale esperimento risulta che le SH-SY5Y esprimono entrambe le isoforme di ACSL4 (Figura 12). Abbiamo quindi testato un'altra linea cellulare, le NT2-D1 (una linea cellulare derivante da un carcinoma del testicolo), ma anche questa esprimeva entrambe le isoforme della proteina (dati non mostrati). Abbiamo quindi deciso di utilizzare comunque le SH-SY5Y per i nostri esperimenti e di studiare separatamente le due isoforme in un momento successivo, tramite sovra-espressione in COS-7.

Da un primo esperimento di immunofluorescenza è emerso che nelle SH-SY5Y ACSL4 è presente in tutto il corpo cellulare, escluso il nucleo, con un aspetto "puntiforme", sia nelle cellule non differenziate che a diversi stadi di differenziamento (Figura 13 b, c, d). In parallelo un'esperimento di immunofluorescenza è stato effettuato

anche sulle NT2-D1. Anche in questo caso la colorazione esclude il nucleo e si presenta estesa, con alcune zone più intense e andamento “puntiforme”, come nelle SH-SY5Y (Figura 13 a). Successivamente, al fine di determinare la localizzazione sub-cellulare di ACSL4, abbiamo effettuato esperimenti di doppia immunofluorescenza utilizzando



l’anticorpo anti-ACSL4 insieme ad anticorpi diretti contro marcatori specifici di diversi compartimenti cellulari, sia sulle SH-SY5Y che sulle NT2-D1. In particolare, sono stati



testati 9 diversi marcatori localizzati in vari compartimenti, in modo da poterne verificare un'eventuale co-localizzazione con ACSL4 (Tabella 1). Alcuni esempi di tali esperimenti sono riportati in figura 14. Nessuno dei marcatori testati fino ad ora co-localizza con ACSL4 (Tabella 1 e Figura 14), escludendo una sua localizzazione in reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, endosomi, lisosomi, perossisomi e mitocondri. Sono attualmente in corso analisi con ulteriori marcatori al fine di determinarne la localizzazione sub-cellulare.

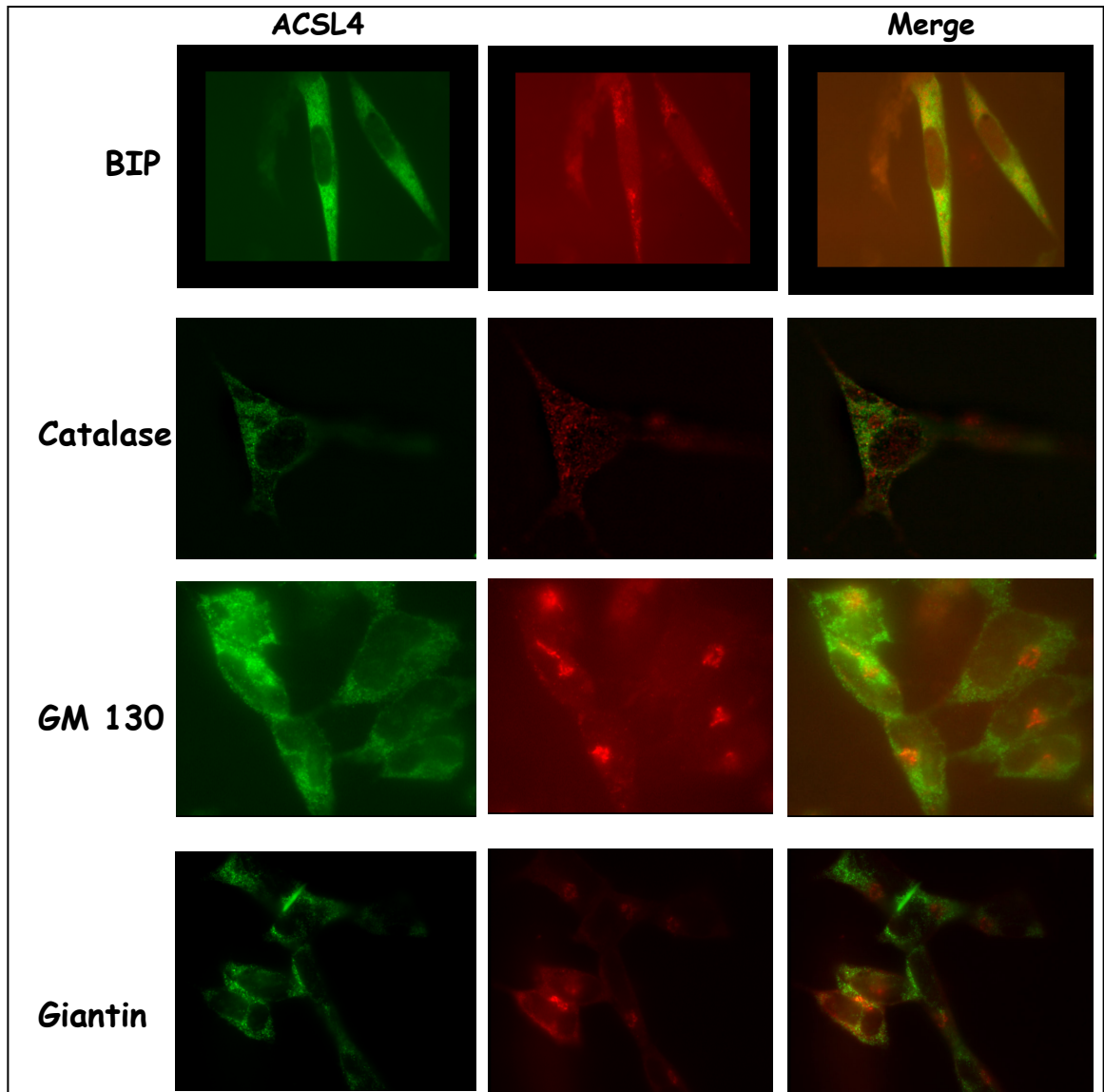


Figura 14: Alcuni esempi di esperimenti di doppia immunofluorescenza. La figura presenta alcuni degli esperimenti di doppia immunofluorescenza effettuati per determinare la possibile localizzazione sub-cellulare di ACSL4 (in verde). In particolare sono riportati i marcatori (in rosso) per i seguenti compartimenti cellulari: reticolo endoplasmatico (BIP), Perossisomi (Catalasi), Golgi Cis (GM130) e Golgi Cis e Medio (Giantin). Come si può vedere dalla sovrapposizione delle due colorazioni (merge) nessuno dei marcatori co-localizza con ACSL4. Ingrandimento 1000X.

Analisi di espressione mediante Western blot

Al fine di confrontare l'espressione delle due isoforme di ACSL4 a livello proteico abbiamo cercato di mettere a punto le condizioni di Western blot che ci consentissero una separazione efficiente. In base al peso molecolare teorico, calcolato a partire dalla sola sequenza aminoacidica (senza tenere conto di eventuali modificazioni post-traduzionali la cui presenza non è al momento nota), le due isoforme differiscono di solo circa 5KDa: 74 KDa per l'isoforma ubiquitaria e 79 KDa per l'isoforma neurospecifica. Al fine di ottimizzare la separazione, abbiamo effettuato una serie di gel aumentando progressivamente la concentrazione di acrilammide dal 5 al 12% nonché alcuni esperimenti con gel in gradiente (BIORAD; gradiente 4-12%). Per tali esperimenti sono stati utilizzati estratti proteici commerciali da cervello umano nonché estratti da linee cellulari linfoblastoidi wild type e del paziente con delezione ACSL4. In nessuna delle condizioni testate siamo riusciti a separare le due isoforme: in tutti i casi visualizziamo una sola banda molto intensa di circa 75KDa (Figura 15). In molti esperimenti inoltre è presente una banda di circa 100KDa. Poiché tale banda è in genere presente anche nel campione con completa delezione di ACSL4 (CI38), essa è stata da considerata un segnale aspecifico.

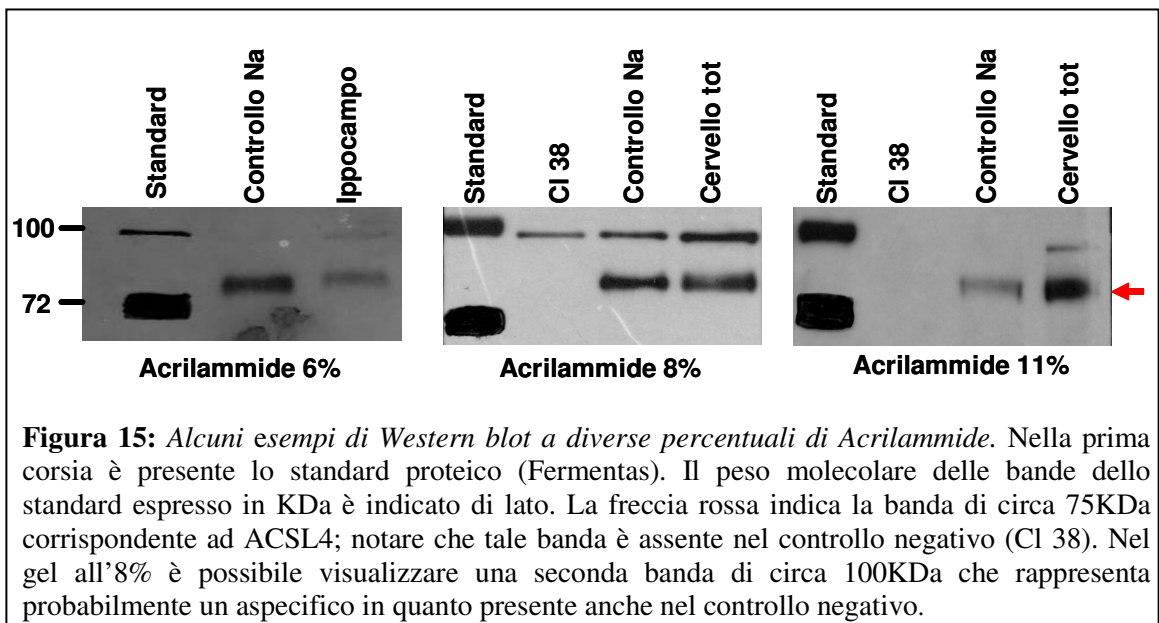


Figura 15: Alcuni esempi di Western blot a diverse percentuali di Acrilammide. Nella prima corsia è presente lo standard proteico (Fermentas). Il peso molecolare delle bande dello standard espresso in KDa è indicato di lato. La freccia rossa indica la banda di circa 75KDa corrispondente ad ACSL4; notare che tale banda è assente nel controllo negativo (CI 38). Nel gel all'8% è possibile visualizzare una seconda banda di circa 100KDa che rappresenta probabilmente un aspecifico in quanto presente anche nel controllo negativo.

Analisi dell'mRNA

Identificazione della terza variante di splicing di *ACSL4*

L'analisi dell'espressione delle 2 varianti di splicing di *ACSL4* con le coppie di primers *ACSLexpr-F/ACSLexprR1* (che amplifica entrambe le varianti) e *ACSLexpr-F/ACSLexprR2* (che amplifica solo il trascritto neurospecifico), effettuata sia sulle SH-SY5Y (vedi paragrafo "localizzazione sub-cellulare di *ACSL4*") che su RNA commerciali umani (cervello totale adulto, cervello fetale, ipocampo, cervelletto, lobo frontale e lobo temporale) aveva evidenziato in tutti i casi l'espressione di entrambe le isoforme di *ACSL4*. Tuttavia, separando su gel di Agarosio al 2% l'amplificato ottenuto con i primers *ACSLexpr-F/ACSLexprR2* avevamo notato la presenza costante di una banda di circa 150bp in aggiunta alla banda attesa di 191pb (Figura 16). Inizialmente tale banda è stata considerata un amplificato aspecifico; tuttavia, nonostante vari tentativi di eliminarla variando le condizioni di PCR, la banda continuava ad essere presente. Abbiamo quindi deciso di procedere con un'analisi di sequenza al fine di verificarne l'identità. Tale analisi ha dimostrato che la banda più bassa non è un aspecifico, bensì corrisponde a una forma di *ACSL4* che, rispetto all'mRNA dell'isoforma neurospecifica già nota, è privo di 53bp. Tali 53 nucleotidi corrispondono all'esone 2 del gene. I dati precedenti indicavano che l'esone 2 fosse

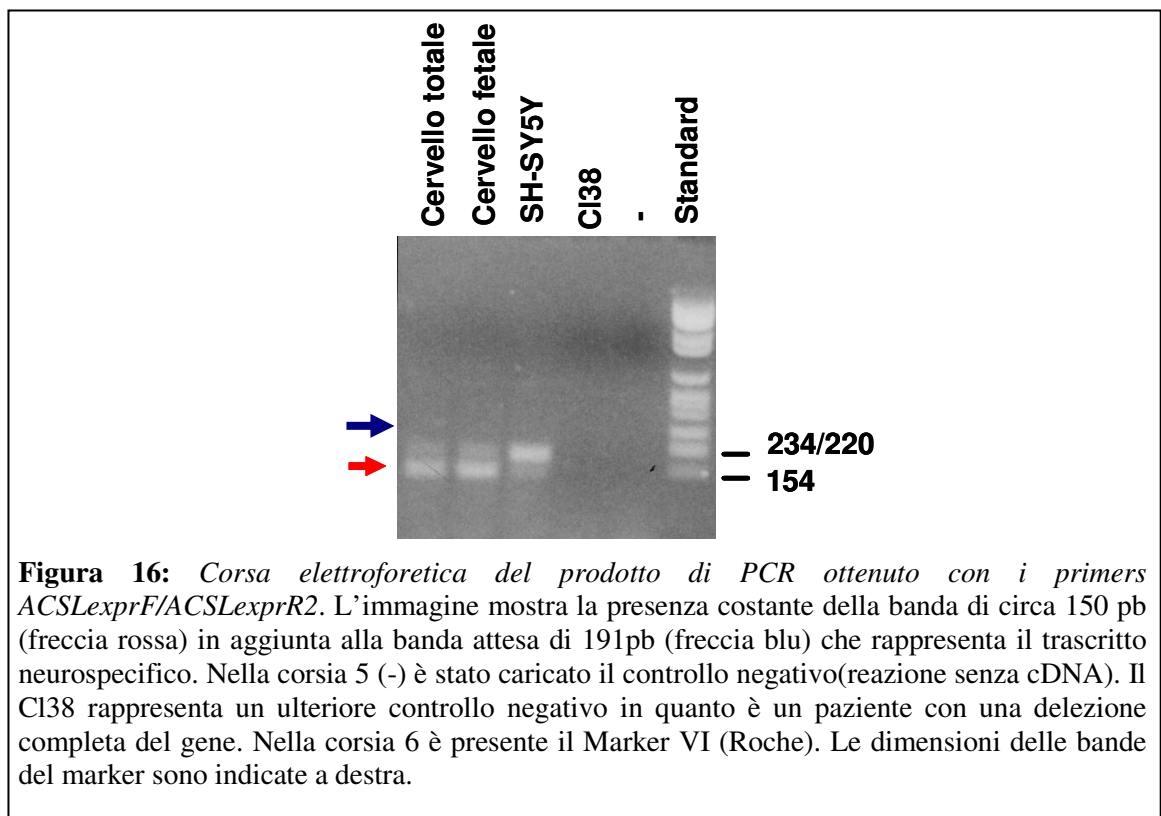


Figura 16: Corsa elettroforetica del prodotto di PCR ottenuto con i primers *ACSLexprF/ACSLexprR2*. L'immagine mostra la presenza costante della banda di circa 150 pb (freccia rossa) in aggiunta alla banda attesa di 191pb (freccia blu) che rappresenta il trascritto neurospecifico. Nella corsia 5 (-) è stato caricato il controllo negativo(reazione senza cDNA). Il C138 rappresenta un ulteriore controllo negativo in quanto è un paziente con una delezione completa del gene. Nella corsia 6 è presente il Marker VI (Roche). Le dimensioni delle bande del marker sono indicate a destra.

sempre presente nei trascritti di *ACSL4*. I nostri risultati suggeriscono invece che esiste un ulteriore mRNA neurospecifico per *ACSL4*, privo dell'esone 2.

Analisi di espressione tramite Real Time RT-PCR

I livelli di espressione delle 3 varianti di splicing di *ACSL4* sono stati valutati tramite Real Time RT-PCR su RNA isolato sia da cervello umano che dalla linea cellulare SH-SY5Y a diversi stadi di differenziamento.

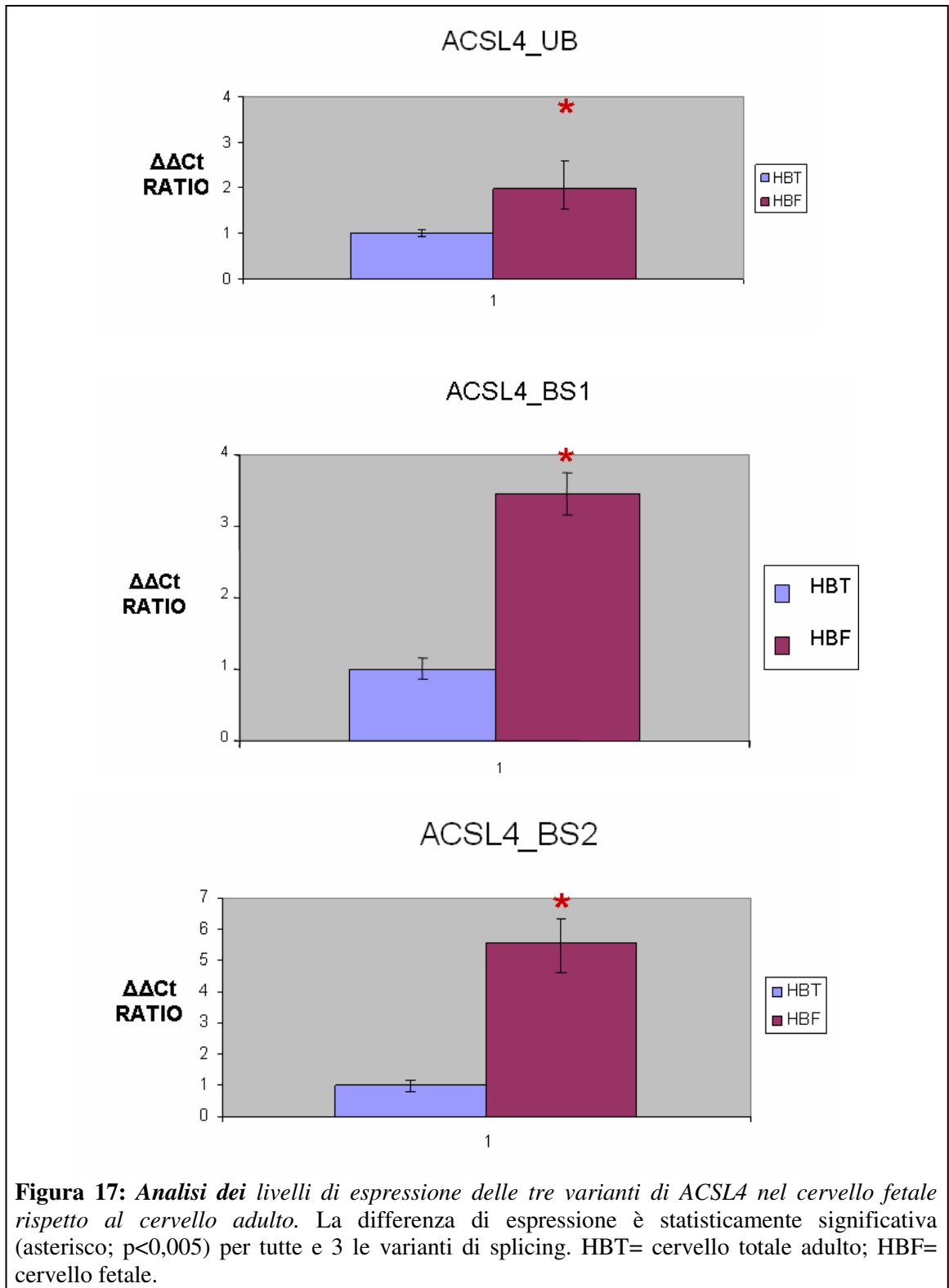
1- Analisi su tessuto cerebrale. È stata analizzata l'espressione delle singole varianti di splicing di *ACSL4* su cDNA estratto da: cervello fetale, cervello totale adulto, cervelletto, ippocampo, lobo frontale e lobo temporale. Per tutti e tre i trascritti l'espressione è più alta nel cervello fetale rispetto al cervello adulto (Figura 17). In particolare la discrepanza maggiore si osserva per la nuova variante da noi identificata, *ACSL4_BS2*, la cui espressione risulta essere quasi 6 volte più alta nel cervello fetale (Figura 17). Inoltre, il confronto dei livelli di espressione nelle diverse regioni di cervello adulto prese in considerazione ha evidenziato per le singole varianti pattern di espressione distinti (Figura 18). In particolare si osserva che:

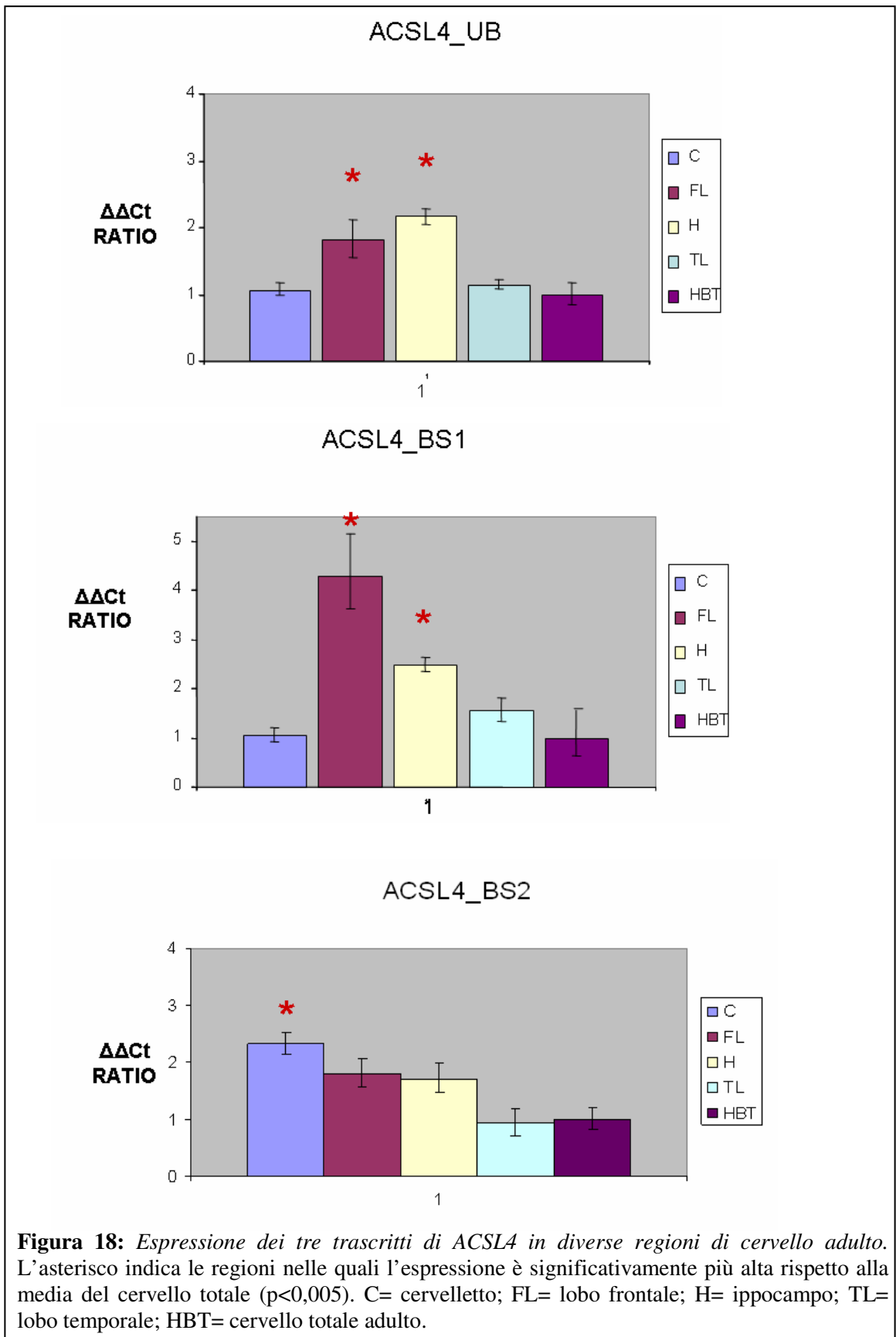
- ❖ **Trascritto ubiquitario (*ACSL4_UB*):** i livelli di espressione risultano significativamente più alti nel lobo frontale e nell'ippocampo.
- ❖ **Trascritto neuro-specifico *ACSL4_BS1* (il trascritto precedentemente identificato):** anche in questo caso l'espressione è significativamente più alta nel lobo frontale e nell'ippocampo. In particolare, in questi ultimi due tessuti l'espressione è rispettivamente circa 4 e 2,5 volte più alta rispetto alla media del cervello totale.
- ❖ **Trascritto neuro-specifico *ACSL4_BS2* (la nuova variante di *ACSL4* da noi identificata):** per questa variante i livelli di espressione sono significativamente più alti nel cervelletto.

2- Analisi su SH-SY5Y. È stato estratto l'RNA totale dalle SH-SY5Y non differenziate e a quattro diversi stadi di differenziamento: 3 giorni in acido retinoico (RA), 5 giorni in RA, 5 giorni in RA + 2 in BDNF e cellule completamente differenziate (5 giorni in RA + 5 in BDNF). L'analisi preliminare della qualità di tale RNA ha dimostrato che esso non era degradato ed era amplificabile.

Affinché i dati ottenuti tramite Real Time PCR siano affidabili, è essenziale che il gene reference utilizzato per la normalizzazione sia espresso a livelli paragonabili in tutti i

campioni in esame. Poiché i nostri dati indicavano che GAPDH (utilizzato per l'analisi su tessuto cerebrale) non rispondeva a tale fondamentale caratteristica nel caso delle SH-SY5Y, abbiamo innanzitutto cercato un gene reference appropriato da utilizzare per la normalizzazione. A tale scopo è stata utilizzata la “TaqMan Human Endogenous Control Plate”, una piastra che consente di valutare simultaneamente 11 geni





housekeeping selezionati in modo da identificare quelli con espressione più omogenea. L'analisi dei dati ottenuti dall'esperimento ha dimostrato che tra gli 11 geni l'rRNA

(18S), la Ciclofilina (CYC) e la Fosfoglicerochinasi (PGK) sono quelli che mantengono un livello di espressione più omogeneo (Figura 19). Tra i 3, l'RNA 18S è quello che presenta una minore variabilità; tuttavia non può essere utilizzato come reference per i nostri esperimenti perché essendo fortemente espresso ha un valore di Ct molto inferiore rispetto a quello del gene ACSL4; è infatti consigliabile utilizzare un controllo avente un valore di Ct il più possibile simile al gene in analisi. Abbiamo quindi deciso di utilizzare come reference per gli esperimenti successivi la Ciclofilina in quanto presenta un profilo di espressione genica maggiormente stabile rispetto alla Fosfoglicerochinasi (Figura 19).

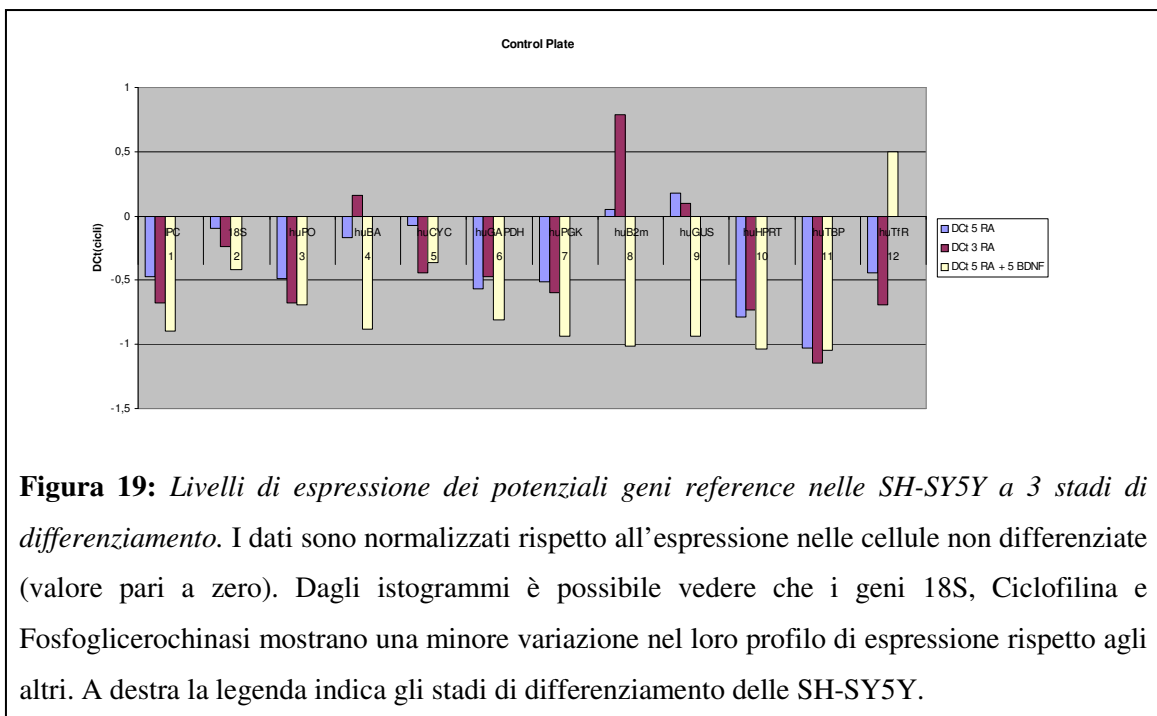


Figura 19: Livelli di espressione dei potenziali geni reference nelle SH-SY5Y a 3 stadi di differenziamento. I dati sono normalizzati rispetto all'espressione nelle cellule non differenziate (valore pari a zero). Dagli istogrammi è possibile vedere che i geni 18S, Ciclofilina e Fosfoglicerochinasi mostrano una minore variazione nel loro profilo di espressione rispetto agli altri. A destra la legenda indica gli stadi di differenziamento delle SH-SY5Y.

Utilizzando la Ciclofilina come reference, abbiamo analizzato l'espressione delle tre varianti di splicing di ACSL4 nelle SH-SY5Y non differenziate e ai quattro stadi di differenziamento riportati sopra (3 giorni in RA, 5 giorni in RA, 5 giorni in RA + 2 in BDNF e 5 giorni in RA + 5 in BDNF). Per tutte e 3 le varianti si nota una certa variabilità tra i diversi campioni; tuttavia tale oscillazione non risulta essere statisticamente significativa, con l'eccezione di un picco di espressione per la variante ACSL4_BS1 nelle cellule differenziate 5 giorni in RA e 3 giorni in BDNF (Figura 20).

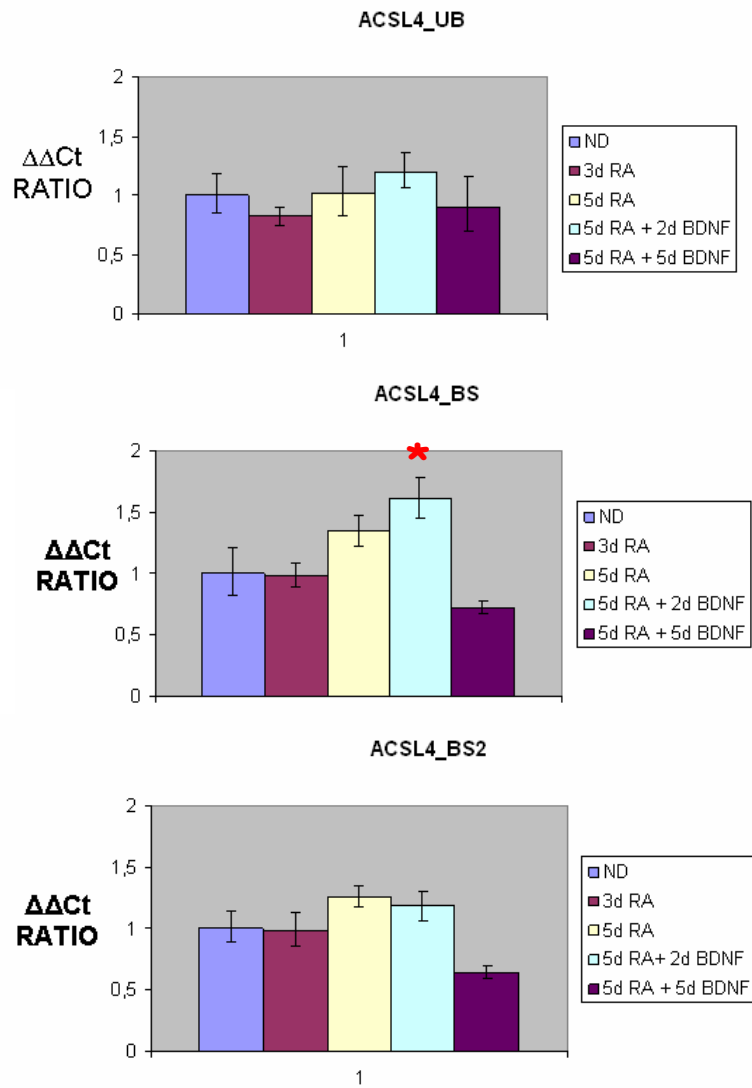


Figura 20: Analisi dei livelli di espressione delle tre varianti di ACSL4 nelle SH-SY5Y a vari stadi di differenziamento rispetto alle cellule non differenziate. Per tutte e 3 le varianti si nota una certa oscillazione nei livelli di espressione al procedere del differenziamento; tuttavia tale oscillazione non risulta essere statisticamente significativa, con l'eccezione di un picco di espressione per la variante ACSL4_BS1 nelle cellule differenziate 5 giorni in RA e 3 giorni in BDNF (asterisco).

Discussione

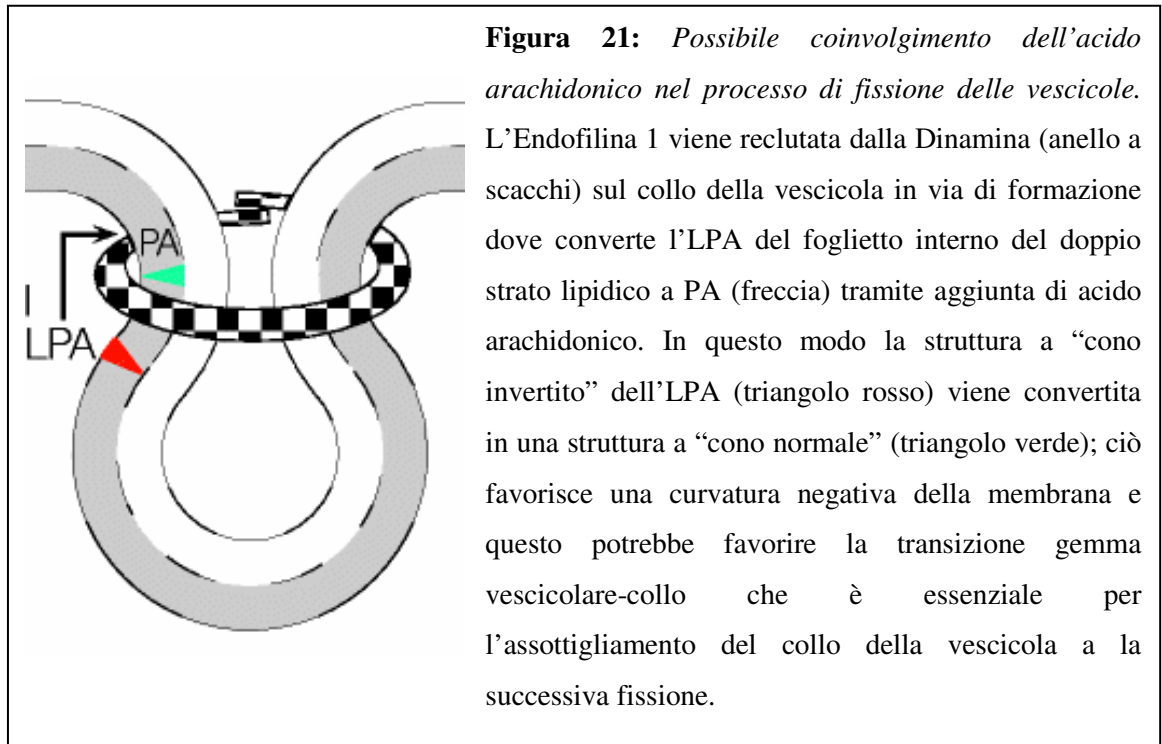
Mutazioni nel gene *ACSL4* causano ritardo mentale X-linked non sindromico. Tuttavia, attualmente è difficile stabilire quali meccanismi molecolari colleghino tali mutazioni all'insorgenza del ritardo mentale. *ACSL4* codifica per un Acil CoA sintetasi che converte gli acidi grassi in acil-CoA in presenza di ATP e CoA. In particolare, il substrato di *ACSL4* è l'acido arachidonico, un acido grasso poliinsaturo (PUFA) a catena lunga abbondante nei fosfolipidi di membrana del cervello [33]. Il sistema nervoso centrale usa gli acidi grassi poliinsaturi durante diversi processi cellulari (differenziamento, sinaptogenesi, riciclo delle vescicole sinaptiche, etc.). Attualmente è difficile ipotizzare come la ridotta produzione di arachidonil CoA o il possibile accumulo di acido arachidonico in seguito all'assenza di *ACSL4* possa causare ritardo mentale. In base alle conoscenze attuali la proteina non sembra essere direttamente coinvolta in nessuno dei pathways alterati da mutazioni negli altri geni noti implicati nel ritardo mentale; tuttavia, finché non verrà chiarito il suo esatto ruolo all'interno della cellula, non è possibile escludere che essa intervenga a qualche livello in uno di tali pathways. Alternativamente *ACSL4* potrebbe essere implicato in un nuovo pathway di MR dovuto all'alterazione di uno dei molti processi nei quali sono coinvolti il suo substrato (l'acido arachidonico) e il suo prodotto di reazione, l'arachidonil CoA. La proteina *ACSL4* è espressa in tutti i tessuti, con l'eccezione del fegato; tuttavia pazienti con mutazioni in *ACSL4* presentano principalmente un difetto cognitivo; si può quindi ipotizzare che sia l'assenza della proteina nel cervello ad avere rilevanza patogenetica; essa potrebbe quindi svolgere qualche ruolo specifico essenziale per la funzione e/o lo sviluppo cerebrale. Il gene *ACSL4* codifica per due isoforme distinte della proteina: un'isoforma ubiquitaria e una neuro-specifica. Questo suggerisce che possa essere la specifica assenza dell'isoforma neuro-specifica a causare l'insorgenza del MR.

Al fine di chiarire il ruolo di *ACSL4* nel cervello, abbiamo innanzitutto cercato di determinare la localizzazione sub-cellulare della proteina. Infatti, sapere in quale compartimento la proteina è localizzata potrebbe darci una prima indicazione della sua possibile funzione nella cellula neuronale. La famiglia proteica delle Acil CoA Sintetasi (LACS), a cui appartiene *ACSL4*, è coinvolta nel metabolismo degli acidi grassi; in particolare, le proteine LACS convertono gli acidi grassi ad Acil-CoA, attivandoli per le reazioni successive e regolando il pool di acidi grassi liberi. In tal modo le LACS sono coinvolte in molti processi cellulari diversi, tra cui la trasduzione del segnale e la regolazione del traffico di membrana, dei flussi ionici, dell'attività della protein chinasi

C e dell'espressione genica [25-27]. In accordo con tali molteplici ruoli, l'attività delle proteine LACS è stata riscontrata in diversi compartimenti cellulari, quali mitocondri, perossisomi e reticolo endoplasmatico. ACSL4 presenta un'isoforma neuro-specifica che contiene 41 amminoacidi addizionali all'N-terminale altamente idrofobici; in tale regione non è presente nessuna sequenza segnale nota, tuttavia la sua elevata idrofobicità suggerisce che potrebbe mediare un inserimento in qualche membrana e quindi causare un cambiamento di localizzazione sub-cellulare rispetto all'isoforma ubiquitaria. In effetti un'analisi *in silico* con la prima versione del programma di previsione PSORT indicava una possibile localizzazione nel citoplasma per la forma ubiquitaria e nel reticolo endoplasmatico per la forma neuro-specifica [31]. Tuttavia, una seconda analisi con una nuova versione dello stesso programma ha successivamente indicato che entrambe le isoforme sono probabilmente localizzate nel citoplasma. Al fine di individuare la reale localizzazione sub-cellulare di ACSL4 abbiamo quindi deciso di studiare le SH-SY5Y e le NT2-D1, due linee cellulari derivanti rispettivamente da un neuroblastoma e da un carcinoma del testicolo che possono essere indotte a differenziare in senso neuronale. L'origine neuronale di queste cellule ci faceva ipotizzare che esse esprimessero l'isoforma neuro-specifica di ACSL4; tuttavia un'analisi tramite RT-PCR ha dimostrato che entrambe esprimono tutte e 2 le isoforme. Abbiamo comunque deciso di procedere con l'analisi su queste 2 linee. Una prima analisi di immunofluorescenza su cellule non differenziate ha evidenziato una distribuzione diffusa della proteina all'interno delle cellule con aspetto "puntiforme". Nella maggior parte dei casi inoltre il segnale sembra più intenso in prossimità del nucleo. La distribuzione di ACSL4 non cambia con il procedere del differenziamento in senso neuronale. Tale distribuzione sembra suggerire una localizzazione della proteina all'interno di un compartimento cellulare. Al fine di determinare l'esatta localizzazione sub-cellulare della proteina abbiamo quindi effettuato esperimenti di doppia immunofluorescenza confrontando la localizzazione di ACSL4 con quella di marcatori specifici di vari compartimenti cellulari. Il programma PSORT suggeriva una possibile localizzazione nel reticolo endoplasmatico per l'isoforma neuro-specifica. Questo risultato appariva interessante alla luce del fatto che in tale compartimento ha luogo la sintesi dei lipidi necessari per costruire e riparare tutte le membrane della cellula. Abbiamo quindi verificato innanzitutto la co-localizzazione di ACSL4 con due marcatori del reticolo endoplasmatico: BIP, una proteina del lume, e la Calnexina, una proteina intrinseca di membrana. La mancata co-localizzazione con ACSL4 esclude che

la nostra proteina risieda nel reticolo endoplasmatico. Un'altra localizzazione plausibile, in base alle nostre conoscenze sull'attività enzimatica di ACSL4 e ai dati relativi ad altri membri della famiglia proteica delle LACS, erano i perossisomi. In questi organelli infatti ha luogo la β -ossidazione degli acidi grassi, ossia la loro degradazione attraverso una serie di reazioni cicliche con produzione di acetyl-CoA; poichè per tale processo è necessaria l'attivazione degli acidi grassi ad acil-CoA, e ACSL4 è una delle proteine che svolgono tale funzione, era ipotizzabile una sua localizzazione nei perossisomi. Inoltre è noto che l'attività di altre proteine LACS è stata riscontrata in tali organelli [28]. Anche questa ipotesi si è però rivelata errata. Di conseguenza l'indagine sulla localizzazione sub-cellulare di ACSL4 è stata estesa agli altri compartimenti cellulari: l'apparato di Golgi, i lisosomi, i mitocondri e gli endosomi. Apparentemente ACSL4 non è localizzato in nessuno di tali compartimenti; attualmente quindi non conosciamo la localizzazione sub-cellulare della proteina. L'aspetto diffuso e "puntiforme" del segnale di ACSL4 suggerisce una possibile localizzazione a livello di qualche tipo di vescicola. Questa ipotesi appare particolarmente intrigante alla luce dei risultati di alcuni lavori che dimostrano che l'arachidonil-CoA, il principale prodotto dell'attività di ACSL4, è coinvolto nel processo di formazione delle vescicole sinaptiche tramite una modulazione della curvatura della membrana [35]. Per tale processo è necessaria l'aggiunta, da parte dell'acil-transferasi Endofilina A1, di arachidonil-CoA all'acido lisofasfatidico (LPA), che viene così convertito ad acido fosfatidico (PA). Mentre infatti l'LPA è un lipide a forma di "cono invertito", che promuove la curvatura positiva della membrana in cui è inserito, il PA ha la forma di "cono normale" e promuove quindi la curvatura negativa della membrana, condizione essenziale per l'assottigliamento del collo della vescicola in formazione e la successiva fissione (Figura 21). E' stato inoltre dimostrato che sostituendo il palmitoil-CoA all'arachidonil-CoA tale processo non avviene, indicando il ruolo essenziale dell'arachidonil-CoA. In questo scenario, è plausibile ipotizzare che una diminuzione della quantità di arachidonil-CoA disponibile potrebbe alterare la quantità di molecole di LPA che vengono convertite in PA, e ciò potrebbe causare alterazioni nel processo di formazione delle vescicole sinaptiche. Dal momento che l'Arachidonil-CoA è il principale prodotto di ACSL4, mutazioni in tale proteina potrebbero causare una riduzione del pool di arachidonil-CoA disponibile e quindi una alterazione del meccanismo di riciclo delle vescicole sinaptiche alla terminazione pre-sinaptica. E' noto che in tale processo sono implicati altri geni di ritardo mentale X-

linked (*SLC6A8*, *NLGN4*, *DLG3*, *GDII*, *ILIRAPL1* e *APIS2*), sottolineando ulteriormente la sua importanza [14,18,46]. La determinazione dell'esatta localizzazione sub-cellulare della proteina ci permetterà di determinare se effettivamente essa sia localizzata a livello vescicolare e se sia coinvolta nelle dinamiche delle vescicole sinaptiche.



Studi precedenti avevano dimostrato che le 2 isoforme di ACSL4 derivano da uno splicing alternativo che dà luogo a 2 trascritti [31]: ubiquitario (ACSL4_UB) e neuro-specifico (ACSL4_BS1). Nel trascritto codificante la proteina ubiquitaria l'esone 3 viene eliminato durante lo splicing e quindi non compare nell'mRNA maturo. Nel cervello avviene invece un splicing alternativo in seguito al quale l'esone 3 viene mantenuto nell'mRNA maturo e viene quindi utilizzato il codone ATG presente su tale esone dando luogo ad una proteina con 41 amminoacidi in più all'estremità N-terminale (Figure 3 e 4). Le nostre analisi preliminari tramite RT-PCR standard hanno tuttavia dimostrato che esiste una terza variante di splicing che dà luogo ad un ulteriore trascritto neuro-specifico privo di 53pb corrispondenti all'esone 2 del gene (ACSL4_BS2). L'esone 2 fa parte del 5' non tradotto e quindi non codifica per una sequenza aminoacidica. Perciò, tale nuovo trascritto codifica per una proteina identica all'isoforma neuro-specifica nota. Non è quindi attualmente chiaro quale sia il significato funzionale della presenza/assenza di queste 53pb; un'analisi bioinformatica preliminare suggerisce la presenza in tale sequenza di un possibile sito di legame per 3

distinti microRNA. Ciò potrebbe quindi far pensare che questa regione sia coinvolta nella regolazione post-trascrizionale dei livelli di espressione di ACSL4. Studi ulteriori sono tuttavia necessari al fine di confermare il dato e di studiare l'eventuale ruolo di tali microRNA nella regolazione dell'espressione di ACSL4.

Non è attualmente chiaro se la presenza di ACSL4 sia essenziale per lo sviluppo del sistema nervoso oppure per la sua funzionalità durante la vita adulta o per entrambi i processi, e se sia solo l'isoforma neuro-specifica della proteina a rivestire particolare importanza in tali meccanismi, come suggerito dal fatto che il fenotipo dei pazienti è esclusivamente cognitivo nonostante il gene sia espresso in tutti i tessuti. È stato dimostrato che nel cervello sono espresse entrambe le isoforme, mentre negli altri tessuti sembra essere espressa in modo prevalente la forma ubiquitaria. Non è tuttavia noto quale sia il livello di espressione delle due forme nel cervello. Determinare quale isoforma risulti maggiormente espressa e se nel corso dello sviluppo il rapporto quantitativo tra le due forme vari o resti costante potrebbe permetterci di ipotizzare quale forma sia importante per il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale e a quale livello l'assenza di ACSL4 risulti dannosa. Potrebbe essere inoltre interessante determinare quale sia il rapporto di espressione delle 2 varianti di splicing neuro-specifiche, che codificano per la stessa proteina e la cui "ridondanza" non ha attualmente una spiegazione. Per rispondere a queste domande abbiamo quindi deciso di mettere a punto un saggio di Real Time PCR per valutare il livello di espressione delle tre varianti di splicing di ACSL4. Da tale analisi è emerso che l'espressione delle singole varianti di splicing varia sia tra cervello fetale e adulto che, nel cervello adulto, tra le diverse regioni prese in esame (Figure 17 e 18). L'analisi su cervello adulto ha infatti dimostrato che sia l'isoforma ubiquitaria che la neuro-specifica ACSL4_BS1 hanno un'espressione significativamente più alta nel lobo frontale e nell'ippocampo rispetto alle altre regioni analizzate. Tuttavia, il trascritto ubiquitario risulta essere più espresso nell'ippocampo mentre il trascritto neuro-specifico ACSL4_BS1 ha l'espressione maggiore al livello del lobo frontale. L'espressione del nuovo trascritto neuro-specifico ACSL4_BS2 risulta invece essere significativamente più alta nel cervelletto rispetto alle altre regioni analizzate. Questo dato conferma ed espande quanto precedentemente riportato da altri gruppi, che avevano messo in evidenza un'espressione particolarmente elevata in ippocampo e cervelletto senza tuttavia discriminare tra le singole varianti di splicing. Inoltre, la presenza di un profilo di espressione diverso tra le 2 varianti di splicing neuro-specifiche (ACSL4_BS1 e

ACSL4_BS2) rafforza l'ipotesi che l'esistenza di queste 2 varianti non rappresenti una ridondanza ma abbia un significato funzionale ben preciso.

Tutte e 3 le varianti di splicing sono fortemente espresse nel cervello fetale; in particolare la nuova variante di splicing da noi identificata (ACSL4_BS2) presenta un livello di espressione circa 6 volte più alto rispetto al cervello adulto mentre l'altro trascritto neuro-specifico ha un'espressione circa 4 volte più alta. L'RNA di cervello fetale utilizzato per i nostri esperimenti è un RNA commerciale ottenuto da un pool di 21 tessuti di età gestazionale compresa tra le 26 e le 40 settimane (3° trimestre). Questa fase dello sviluppo fetale rappresenta il periodo in cui avviene la sinaptogenesi e durante il quale si ha un sensibile aumento del processo di arborizzazione e rimodellamento neuronale. L'elevata espressione di ACSL4, e in particolare dei trascritti neuro-specifici, durante questa fase di sviluppo fetale suggerisce un possibile coinvolgimento della proteina in tale processo. Tuttavia, questi dati non ci permettono di confermare né escludere un possibile ruolo di ACSL4 durante l'intero processo di differenziamento e maturazione neuronale. Al fine di verificare se la proteina potesse essere coinvolta anche nelle fasi iniziali dello sviluppo delle cellule neuronali abbiamo quindi analizzato la sua espressione mediante Real Time PCR sulle SH-SY5Y a vari stadi di differenziamento. Le SH-SY5Y sono una linea cellulare derivante da un neuroblastoma umano e sono considerate un buon modello per lo studio del differenziamento neuronale in quanto possono essere indotte a differenziare in senso neuronale tramite opportuni trattamenti. I nostri studi su cellule a diversi stadi di differenziamento non hanno evidenziato differenze significative di espressione genica in nessuno stadio per nessuna delle varianti di splicing, a parte un possibile picco di espressione per la variante ACSL4_BS1 nelle cellule differenziate 5 giorni in RA e 3 giorni in BDNF, che potrebbe però essere un artefatto. Questi dati sembrano confermare l'ipotesi che ACSL4 sia coinvolto nelle fasi finali della maturazione neuronale. Infatti le SH-SY5Y sono un buon modello per lo studio del differenziamento, ma non permettono di studiare la fase finale di maturazione; tale fase dipende da un complesso sistema di interazioni che coinvolge oltre ai neuroni anche le cellule gliali e non è riproducibile tramite un sistema "semplice" quale la coltura di una linea neuronale.

É noto che i livelli di espressione dell' mRNA non riflettono necessariamente quelli della proteina [47]. Abbiamo quindi deciso di studiare l'espressione di ACSL4 anche a livello proteico tramite Western blot su tessuto cerebrale. In particolare,

abbiamo innanzitutto cercato di mettere a punto le condizioni sperimentali che ci consentissero di distinguere le due isoforme della proteina (ubiquitaria e neuro-specifica) che hanno una differenza di peso molecolare di circa 5KDa. Tuttavia, in nessuno dei nostri esperimenti siamo riusciti a visualizzare le due bande; in tutti i casi vediamo una banda di circa 75KDa. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la differenza di peso molecolare tra le due isoforme potrebbe non essere sufficiente per consentire una efficiente separazione. Il peso molecolare delle due isoforme è stato infatti stimato solo sulla base della composizione aminoacidica e non è noto se una o entrambe le isoforme vadano incontro ad eventuali modifiche post-traduzionali. Per tali motivi la differenza teorica di 5KDa potrebbe essere sovrastimata e il peso molecolare reale delle due isoforme potrebbe essere più simile di quanto atteso impedendo quindi di separare efficientemente le due bande tramite Western blot. Alternativamente è possibile che il livello di espressione di una delle due isoforme sia talmente basso da non permetterne la visualizzazione mediante Western blot. Tuttavia i risultati ottenuti dagli esperimenti di Real Time PCR rendono improbabile tale ipotesi poiché indicano che le isoforme di *ACSL4* presentano livelli di espressione paragonabili nel cervello totale adulto. Infine, una possibile ipotesi è che la banda di circa 100KDa presente in molti dei nostri esperimenti e che abbiamo considerato essere un aspecifico (in quanto presente nel paziente con delezione di *ACSL4*) potrebbe mascherare una banda reale che si trova alla stessa altezza e che potrebbe corrispondere all'isoforma neuro-specifica. Ad oggi non sappiamo quale sia l'ipotesi corretta. Per cercare di chiarirlo, è in corso un esperimento di elettroforesi bidimensionale in collaborazione con il prof. Luca Bini del Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università degli Studi di Siena; dati preliminari sembrano confermare la presenza di entrambe le isoforme. Inoltre, al fine di chiarire l'esatto peso molecolare delle due isoforme ci proponiamo di sovraesprimerle separatamente in una linea cellulare umana. L'analisi tramite Western blot delle proteine isolate ci permetterà di visualizzare le due isoforme singolarmente, verificando quale sia il loro effettivo peso molecolare.

In conclusione, i risultati descritti in questa tesi evidenziano che la proteina *ACSL4* è probabilmente localizzata a livello vescicolare, anche se resta da determinare con certezza quali siano le vescicole coinvolte e se entrambe le isoforme abbiano la stessa localizzazione sub-cellulare. E' stata inoltre identificata una nuova variante di splicing di *ACSL4* che, insieme ad una delle varianti già note, codifica per l'isoforma

neuro-specifica della proteina; resta da chiarire il significato funzionale della presenza di 2 diverse varianti di splicing che codificano per una stessa proteina. Lo studio dei livelli di espressione delle singole varianti nel cervello fetale e in varie regioni del cervello adulto ha evidenziato una espressione elevata a livello fetale e, nel cervello adulto, in cervelletto e ippocampo. Particolarmente rilevante sembra l'elevata espressione a livello dell'ippocampo che è coinvolto nei processi di apprendimento e di memoria e a livello del quale sono state riportate alterazioni in diversi modelli murini di geni di ritardo mentale X-linked. L'elevata espressione nel cervello fetale induce a ipotizzare che ACSL4 svolga un ruolo essenziale nei processi maturativi del sistema nervoso centrale. È quindi probabile che la nostra proteina sia essenziale sia per la formazione che per il successivo funzionamento del sistema nervoso centrale.

La determinazione dell'esatta localizzazione sub-cellulare delle due isoforme e lo studio del differenziamento neuronale in un modello di cellule primarie, ad esempio i neuroni ippocampali o corticali di ratto, sarà essenziale al fine di chiarire quale sia la funzione di ACSL4 a livello neuronale e quindi come la sua assenza porti all'insorgenza di ritardo mentale.

Referenze

- [1] J. Chelly, J. Mandel, Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2001;2:669-680.
- [2] A. Renieri, C. Pescucci, I. Longo, F. Ariani, F. Mari, I. Meloni, Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol* 2005;204:8-20.
- [3] M. Chechlac, J.G. Gleeson, Is mental retardation a defect of synapse structure and function? *Pediatr Neurol* 2003;29:11-17.
- [4] S.J. Knight, R. Regan, A. Nicod, S.W. Horsley, L. Kearney, T. Homfray, et al., Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999;354:1676-1681.
- [5] S.G. Frints, G. Froyen, P. Marynen, J.P. Fryns, X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet* 2002;62:423-432.
- [6] B. Kerr, G. Turner, J. Mulley, A. Gedeon, M. Partington, Non-specific X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991;28:378-382.
- [7] J.C. Mulley, B. Kerr, R. Stevenson, H. Lubs, Nomenclature guidelines for X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* 1992;43:383-391.
- [8] G.K. Suthers, G. Turner, J.C. Mulley, A non-syndromal form of X-linked mental retardation (XLMR) is linked to DXS14. *Am J Med Genet* 1988;30:485-491.
- [9] A. Hall, Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
- [10] G.J. Ramakers, Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002;25:191-199.
- [11] M. Feder, J. Pas, L.S. Wyrwicz, J.M. Bujnicki, Molecular phylogenetics of the RrmJ/fibrillarin superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene* 2003;302:129-138.
- [12] K. Freude, K. Hoffmann, L.R. Jensen, M.B. Delatycki, V. des Portes, B. Moser, et al., Mutations in the FTSJ1 gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75:305-309.
- [13] F. Mari, S. Azimonti, I. Bertani, F. Bolognese, E. Colombo, R. Caselli, et al., CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible

- for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005;14:1935-1946.
- [14] P.S. Tarpey, C. Stevens, J. Teague, S. Edkins, S. O'Meara, T. Avis, et al., Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2006;79:1119-1124.
- [15] P. Chiurazzi, B.C.J. Hamel, G. Neri, XLMR genes: update 2000. *Eur J Hum Genet* 2001;9:71-81.
- [16] J. Chelly, Breakthroughs in molecular and cellular mechanisms underlying X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 1999;8:1833-1838.
- [17] D. Toniolo, P. D'Adamo, X-linked non-specific mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:280-285.
- [18] P. D'Adamo, H. Welzl, S. Papadimitriou, M. Raffaele di Barletta, C. Tiveron, L. Tatangelo, et al., Deletion of the mental retardation gene *Gdi1* impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:2567-2580.
- [19] J. Jonsson, A. Renieri, P. Gallagher, C.E. Kashtan, E.M. Cherniske, M. Bruttini, et al., Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia, and elliptocytosis: a new X-linked contiguous gene deletion syndrome? *J Med Genet* 1998;35:273-278.
- [20] I. Meloni, F. Vitelli, L. Pucci, B. Lowry, R. Tonlorenzi, E. Rossi, et al., Alport syndrome and mental retardation: clinical and genetic dissection of the contiguous gene deletion syndrome in Xq22.3 (ATS-MR). *J Med Genet* 2002;39:359-365.
- [21] I. Meloni, M. Muscettola, M. Raynaud, I. Longo, M. Bruttini, M. Moizard, et al., *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat Genet* 2002;30:436-440.
- [22] I. Longo, S.G. Frints, J.P. Fryns, I. Meloni, C. Pescucci, F. Ariani, et al., A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (*FACL4*) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients. *J Med Genet* 2003;40:11-17.
- [23] W. Cleland, The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta* 1963;67:104-137.

- [24] I. Singh, O. Lazo, G. Dhaunsi, M. Contreras, Transport of fatty acids into human and rat peroxisomes. *J Biol Chem* 1992;1992:13306-13313.
- [25] M. Bronfman, M.N. Morales, A. Orellana, Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long chain acyl-CoA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1988;159:1026-1031.
- [26] N.J. Faergeman, J. Knudsen, Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. *Biochem J* 1997;323:1-12.
- [27] R. Schneiter, S.D. Kohlwein, Organelle, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* 1997;88:431-434.
- [28] W. Lageweg, R. Wanders, J. Tager, Long-chain-acyl-CoA synthetase and very Long-chain-acyl-CoA synthetase activities in peroxisomes and microsomes from rat liver. *Eur J Biochem* 1991;196:519-523.
- [29] M.-J. Kang, T. Fujino, H. Sasano, H. Minekura, N. Yabuki, H. Nagura, et al., A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary and testis. *PNAS* 1997;94:2880-2884.
- [30] A. D'Arrido, E. Manera, R. Longhi, N. Borgese, The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem* 1993;268:2802-2808.
- [31] M. Piccini, F. Vitelli, M. Bruttini, B. Pober, J.J. Jonsson, M. Villanova, et al., *FACL4*, a new gene encoding Long Chain Acyl-CoA Synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis and mental retardation. *Genomics* 1998;47:350-358.
- [32] P. Black, Q. Zhang, J. Weimar, C. DiRusso, Mutational analysis of a fatty Acyl-Coenzyme A Synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *Biol Chem* 1997;272:4896-4903.
- [33] Y. Cao, E. Traer, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (*FACL4*). *Genomics* 1998;49:327-330.
- [34] Y. Cao, A.T. Pearman, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:11280-11285.
- [35] A. Schmidt, M. Wolde, C. Thiele, W. Fest, H. Kratzin, A.V. Podtelejnikov, et al., Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 1999;401:133-141.

- [36] A. Farooqui, L. Horrocks, T. Farooqui, Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lip* 2000;106:1-29.
- [37] L. Horrocks, Metabolism and function of fatty acids in brain. In: J. Eichberg (Ed.), *Phospholipids in nervous tissues*, Wiley, New York, 1985, pp. 173-199.
- [38] A. Lapillonne, S.D. Clarke, W.C. Heird, Plausible mechanisms for effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on growth. *J Pediatr* 2003;143:S9-16.
- [39] Y. Izumi, A.R. Zarrin, C.F. Zorumski, Arachidonic acid rescues hippocampal long-term potentiation blocked by group I metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuroscience* 2000;100:485-491.
- [40] D.S. Martin, P. Spencer, D.F. Horrobin, M.A. Lynch, Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67:121-130.
- [41] S.J. Feinmark, R. Begum, E. Tsvetkov, I. Goussakov, C.D. Funk, S.A. Siegelbaum, et al., 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. *J Neurosci* 2003;23:11427-11435.
- [42] D. Piomelli, Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 1994;8:65-83.
- [43] Y. Cao, K.J. Murphy, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS letters* 2000;467:263-267.
- [44] K. Livak, Comparative Ct method. In: *User bulletin n°2*, 1997.
- [45] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [46] N. Bahi, G. Friocourt, A. Carrie, M.E. Graham, J.L. Weiss, P. Chafey, et al., IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum Mol Genet* 2003;12:1415-1425.
- [47] B.P. Jung, D.G. Jugloff, G. Zhang, R. Logan, S. Brown, J.H. Eubanks, The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol* 2003;55:86-96.