

SARITA BADIGLIAN ASCENÇO REIS

**MUTAÇÃO NO GENE *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA MENTAL DE
HERANÇA LIGADA AO X**

São Paulo

2009

SARITA BADIGLIAN ASCENÇO REIS

**MUTAÇÃO NO GENE *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA MENTAL DE
HERANÇA LIGADA AO X**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Angela M Vianna Morgante

São Paulo

2009

REIS, SARITA BADIGLIAN ASCENÇO

**MAPEAMENTO E BUSCA DE GENE MUTADO QUE
CAUSA DEFICIÊNCIA MENTAL COM HERANÇA LIGADA AO
CROMOSSOMO X. 57PP**

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Deficiência Mental Ligada ao X. 2. Gene *ACSL4*

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Angela M Vianna Morgante

Dedico cada minuto deste trabalho à minha mãe Vanda, que cuidou do meu filho como se fosse seu. Seu esforço foi o meu maior estímulo. Inúmeras vezes substituiu seu trabalho e lazer pelas extensas horas cuidando do neto. Não tenho como descrever minha gratidão, mas deixo nesta página uma reflexão para cada um de nós pensarmos no valor real de nossas mães. Mãe, seu valor é inestimável.

"Procure ser um homem de valor em vez de ser um homem de sucesso."

Albert Einstein

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (CEPID – 98/14254-2, Centro de Estudos do Genoma Humano; Bolsa de Mestrado 06/58350-3).

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde esta pesquisa foi realizada.

À Professora Angela Vianna Morgante, que desde o início acreditou, confiou no meu trabalho e cedeu seu espaço e tempo para a minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, que cedeu o espaço do seu laboratório para a elaboração do ensaio de complementação funcional com levedura.

À Rafaella, que me ensinou tantas técnicas e me ajudou com seu conhecimento científico.

À Gisele Monteiro, que me ajudou com muita paciência a executar os ensaios de complementação funcional com levedura.

À Silvia, que sempre esteve pronta para me ajudar com muito bom humor e agilidade.

À Lilian, Tereza, Luiz, Karen, Juliana, Fernando, Ana Carla, Leonardo, Larissa, Renata, Fátima, Paulo Rogério, Fernando, professora Luciana Haddad, que de alguma forma me ajudaram no cotidiano da pesquisa.

À Nathália, que se mostrou uma pessoa muito amiga e que me tranqüilizou em momentos de decepções.

À Maraísa, que sempre me ajudou com as papeladas burocráticas e compra de materiais, principalmente com as compras de primers (cerca de 200!) com muita paciência e dedicação.

À família estudada, por colaborarem e permitirem realizar essa pesquisa.

Aos meus pais, Vanda e Levon, que me criaram com liberdade e responsabilidades. Sempre me deram todas as oportunidades de estudos para chegar até aqui sem nunca pressionar ou exigir retorno. No entanto, hoje apresento todo meu aprendizado espelhado neste trabalho. Muito obrigada.

Ao meu marido Eduardo, que só traz felicidade à minha vida. Não sei como agradecer tudo o que você faz por mim. Sempre me apóia, me ouve, incentiva e acima de tudo dá valor a tudo que faço. Nunca reclamou da minha ausência em todos esses meses em que precisei estudar ou escrever durante noites ou finais de semana. Ainda precisou ser pai e mãe com uma dedicação exemplar. Deixo aqui minha imensa gratidão pelo marido e pai maravilhoso que sempre foi.

Aos meus sogros, Maria e Oswaldo, que sempre estiveram prontos para ajudar a cuidar de meu filho quando mais precisei, quase sempre avisados em cima da hora.

À minha tia Sônia, que ajudou a cuidar do meu filho com muito carinho diversas vezes em que precisei. Aí está a grande importância da família na minha vida...

À minha tia Siran, que cuidou do meu filho por apenas um dia, pouco tempo, mas o suficiente para minha ida ao laboratório.

Aos meus irmãos, Leandro e Levon, que de alguma forma me proporcionam dias mais felizes.

À minha avó Sara, que é o meu maior exemplo de vida. Passou pela guerra, cuidou de quatro filhos sozinha, passou por diversas cirurgias e continua mais forte do que nunca...

Ao meu filho, Dudu, que mantém cada dia da minha vida leve e sereno. Seu sorriso basta para lembrar que a vida é muito mais que genes expressos. A ciência está muito longe de explicar o amor por um filho...

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO

| | |
|--|---|
| I.1-A deficiência mental | 1 |
| I.2-A deficiência mental ligada ao cromossomo X | 2 |
| I.3-Identificação de genes do cromossomo X associados a deficiência mental | 5 |
| I.4-A inativação do cromossomo X e mutações que causam deficiência mental | 8 |

II- OBJETIVO 10

III- PACIENTES E MÉTODOS

| | |
|---|----|
| III.1- Casuística | 11 |
| III.2- Métodos | |
| III.2.1- Investigação do padrão de inativação do cromossomo X | 12 |
| III.2.2- Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X | 14 |
| III.2.3- Análise de genes candidatos | 16 |
| III.2.4 Busca da mutação em indivíduos controle | 21 |
| III.2.5- Ensaio de complementação funcional em levedura | 21 |

IV- RESULTADOS

| | |
|--|----|
| IV.1- Investigação do padrão de inativação do cromossomo X | 29 |
| IV.2- Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X | 29 |
| IV.3- Análise de genes candidatos | 32 |
| IV.4- Busca da mutação em indivíduos controle | 34 |
| IV.5- Ensaio de complementação funcional em levedura | 34 |

V- DISCUSSÃO 39

VI- SUMÁRIO E CONCLUSÕES 48

VII- ABSTRACT 50

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52

SARITA BADIGLIAN ASCENÇO REIS

**MUTAÇÃO NO GENE *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA MENTAL DE
HERANÇA LIGADA AO X**

São Paulo

2009

I - INTRODUÇÃO

I.1 - A deficiência mental

A Deficiência Mental (DM) caracteriza-se por limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo do indivíduo, originadas antes dos dezoito anos de idade (*American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, AAID*). Afeta 2-3% da população geral e está freqüentemente associada a outros sintomas neurológicos, deficiências metabólicas e malformações. A DM é classificada de acordo com o Quociente Intelectual (QI), cuja distribuição segue a curva normal, com o QI médio correspondendo a 100. A DM é convencionalmente considerada leve (QI de 69 a 50), moderada (QI de 49 a 35), grave (QI de 34 a 20) e profunda (QI menor que 20) (revisão em Raymond, 2006).

Estima-se que a DM leve esteja presente em 84% dos afetados e que 3% apresentem DM grave ou profunda (*World Health Organization, WHO*). Como a DM é condição multifatorial, com causas genéticas e ambientais, esses números variam de acordo com o nível de desenvolvimento sócio-econômico da população. Entre os mais pobres, fatores ambientais como nascimento prematuro, problemas no momento do parto, infecções pré- e pós-natais, subnutrição da gestante ou da criança contribuem fortemente, em especial para a DM leve; já a deficiência mental de causa predominantemente genética tem freqüência semelhante nos diversos níveis sócio-econômicos (Frota-Pessoa, 1983; Inlow e Restifo, 2004). As alterações cromossômicas numéricas e estruturais aparecem como causa importante de DM e a trissomia do cromossomo 21, que afeta uma a cada mil crianças nascidas vivas é a principal causa genética de DM. A DM monogênica pode ter herança autossômica ou ligada ao X e as mutações mitocondriais também contribuem para a DM.

Classicamente, considera-se a DM como sindrômica e não sindrômica. Nas formas sindrômicas, a DM está associada a outras características clínicas, físicas, neurológicas ou metabólicas. Já nos casos não-sindrômicos, não existem outras manifestações fenotípicas além da própria deficiência mental. Essa classificação poder ser adequada para fins práticos no diagnóstico clínico, mas a identificação do mecanismo genético frequentemente leva à caracterização do quadro clínico como sindrômico, pois características antes não notadas são reconhecidas; deve-se levar em conta também que um mesmo gene pode estar mutado como causa de DM sindrômica e não sindrômica (Frints e col., 2002 e Renieri e col., 2005).

Quanto mais grave a DM, geralmente maior número de características clínicas aparece associado a ela, o que facilita o diagnóstico. No entanto, 20-50% dos pacientes com DM moderada a grave e até 80% dos casos de DM leve permanecem sem diagnóstico (Frints e col., 2002).

1.2 - A deficiência mental ligada ao cromossomo X

O cromossomo X possui cerca de 155 milhões de pares de bases e contém aproximadamente 1155 genes, dos quais 868 codificam proteínas (*Ensembl*, março/2009); correspondem a cerca de 5% dos genes do genoma humano (revisão em Inlow e Restifo, 2004). Estudos tanto em camundongos como no homem indicam que genes do cromossomo X não somente influenciam a inteligência como também afetam o controle emocional e a cognição social (Skuse, 2005). Cerca de 16% dos genes, que quando mutados causam DM, encontram-se no cromossomo X (revisão em Inlow e Restifo, 2004). As proteínas codificadas possuem diversas funções e participam principalmente da regulação da transcrição de outros genes e da transdução de sinais; a maioria atua no núcleo e no citoplasma, porém podem

permanecer em organelas, membrana plasmática e no meio extracelular (revisão em Chiurazzi e col., 2008).

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF; MIM #300624) é a principal causa de DM herdada e compreende 25% dos casos de DM ligada ao X (DMLX) (Fishburn e col., 1983). Afeta 1/4000-6000 homens e 1/8000-9000 mulheres (Crawford e col., 2001). Resulta de mutação de perda de função no gene *FMR1* (*Fragile-X Mental Retardation 1*) em Xq27.3, que codifica a proteína FMRP (*Fragile-X Mental Retardation Protein*). Esse gene apresenta uma repetição de trinucleotídeos (CGG)_n na região 5' não traduzida. Nos alelos normais, a repetição tem entre seis e cerca de 55 trincas de pares de bases. Alelos contendo repetições com 55 a 200 trincas de bases são pré-mutados, pois, apesar de funcionais, são instáveis e podem expandir-se para alelos mutados com repetições de 200 ou mais trincas, que são transcritos, porém não são traduzidos. A ausência da proteína FMRP leva à síndrome do cromossomo X frágil.

O excesso de 30-40% de homens com DM em relação às mulheres é reconhecido desde a metade do século XX e, diante da documentação de DM de herança ligada ao X (DMLX), foi atribuído a mutações no cromossomo X. (revisão em Chiurazzi e col., 2000). Porém, as mutações no cromossomo X explicam menos da metade do excesso de homens afetados. Com base na frequência de 25% da síndrome do X-frágil entre famílias com DMLX e de 2,5% entre homens, casos isolados de DM, a frequência de DMLX em homens foi estimada em 10% (Ropers e Hamel, 2005). Mandel e Chelly (2004) chegaram a estimativa semelhante, levando em conta a frequência de mutações do gene *ARX* (*Aristaless X*) entre famílias com DMLX e casos isolados de DM, abaixo, portanto, dos 23% necessários para explicar um excesso de 30% de homens afetados em relação a mulheres; os autores sugerem que a diferença entre os sexos possa decorrer (a) de diferenças no desenvolvimento fetal do cérebro, tornando o cérebro do homem mais susceptível a danos precoces ou (b)

da presença de polimorfismos no cromossomo X, que teriam efeitos sutis sobre as habilidades cognitivas na maioria dos portadores, mas resultariam em DM, quando associados a certos alelos autossômicos ou ligados ao X ou ainda a fatores ambientais.

Por outro lado, os genes do cromossomo X já relacionados a DM não explicam os 10% estimados de DMLX. Com a notável exceção do gene *FMR1*, mutações nos demais genes já identificados ocorrem com frequências muito baixas. Quando se exclui a síndrome do X frágil, as mutações em genes do X explicam 42% da DM em famílias com vários afetados, 17%, em famílias com afetados em apenas uma geração e apenas 1,4% dos casos isolados de DM (De Brouwer e col., 2007). Recentemente foi realizado um grande esforço para identificar genes mutados em famílias em que a DM aparecia como ligada ao X, pelo seqüenciamento direto de 718 genes do cromossomo X codificadores de proteína, cobrindo em média 75% da região codificadora (Tarpey e col., 2009). No total 25% das famílias tiveram a causa da DM estabelecida, quando se juntou ao esforço de seqüenciamento a investigação de variação no número de cópias de segmentos cromossômicos por CGH. O número relativamente pequeno de mutações consideradas patogênicas detectadas pode ter várias explicações: a não detecção de microduplicações, a ocorrência da mutação em região não codificadora dos genes, a presença de mutações nas regiões não estudadas ou mesmo a inclusão na amostra de famílias em que a DM não era ligada ao X (Tarpey e col., 2009).

A aplicação da técnica de hibridação genômica comparativa baseada em *array* (*array-CGH*) ao estudo da DMLX tem mostrado que microduplicações e microdeleções no cromossomo X, abrangendo em geral vários genes, podem ser causa de DMLX. Rosenberg e col., (2006), verificaram que dois de 46 pacientes do sexo masculino afetados por DM possuíam rearranjos do cromossomo X, que segregavam em suas famílias com a DM. Microdeleções e microduplicações aparentemente patogênicas

maiores do que 100 kb foram identificadas em cerca de 5% das mais de 400 famílias catalogadas no European MRX Consortium; a mais comum dessas alterações é a microduplicação do gene *MECP2* (Van Esch e col., 2005; Lugtenberg e col., 2007). Esses rearranjos podem, portanto, explicar parte da DMLX e estudos em coortes de pacientes do sexo masculino, casos isolados, estão indicados para avaliar sua contribuição.

I.3 - Identificação de genes do cromossomo X associados a deficiência mental

Até o momento, foram identificados 87 genes do cromossomo X que aparecem mutados como causa de deficiência mental (DM) (*Greenwood Genetic Center, GGC, XLMR Update* - maio/2009). Dezessete desses genes quando mutados causam DM não sindrômica (DM-NS) e 70 DM sindrômica (DM-S), dos quais 17 estão associados a ambos os tipos de DM.

Estudos de ligação, usando marcadores moleculares polimórficos em famílias com DM de herança ligada ao X levaram ao mapeamento da doença e subsequentemente o teste de genes candidatos no segmento delimitado permitiu a identificação de 39 genes diferentes mutados, em geral, em famílias com grande número de afetados em mais de uma geração. Em algumas famílias pequenas, o uso de marcadores moleculares, permitindo a exclusão de segmentos do X não associados à doença, também tem permitido a identificação do gene mutado. Este foi o caso do estudo que levou à identificação de mutação no gene *UBE2A* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2A*) como causa de nova síndrome de DMLX (Nascimento e col., 1996).

Rearranjos do cromossomo X presentes em afetados contribuíram para a identificação de 30 novos genes associados a DM. Os pontos de quebra de rearranjos

equilibrados podem ter alterado genes. Por exemplo, ao estudar um quadro de deficiência mental grave presente em uma menina com translocação equilibrada t(X;15)(q13.3;cen), Mansouri e col., (2005) demonstraram que o gene *ZDHHC15*, localizado no ponto de quebra do cromossomo X perdeu sua função. Mutações nesse gene foram posteriormente identificadas como causa de DMLX não síndrômica (*GGC, XLMR Update* - maio/2009). Os genes mapeados nos segmentos abrangidos por microduplicações e microdeleções detectadas em pacientes com DM também são candidatos. A duplicação do gene *MECP2*, responsável por cerca de 1% da DMLX, foi identificado por esse caminho (Van Esch e col., 2005). Outras vezes mais de um gene contido no segmento parecem contribuir para a DM, como no caso das microduplicações do cromossomo X, abrangendo os genes *HSD17B10* (*17-@beta-hydroxysteroid dehydrogenase X*) e *HUWE1* (*HECT, UBA, and WWE domains-containing protein 1*; Froyen e col., 2008).

Recentemente, nove genes do cromossomo X foram relacionados pela primeira vez a DM, em estudo de seqüenciamento direto de genes do cromossomo X, em 208 famílias com DMLX, independentemente de mapeamento prévio (Tarpey e col., 2009). As dificuldades na avaliação do significado patogênico de uma substituição de par de bases detectada nesse estudo de seqüenciamento em larga escala foram discutidas por Raymond e col. (2009). Por exemplo, grande parte das mutações *nonsense* não pôde ser relacionada com a DM por não segregarem com a doença na família ou por estarem presentes em indivíduos da amostra controle; assim cerca de 1% dos genes do cromossomo X podem aparentemente perder a função e não ter efeito fenotípico claro, em hemizigose. No caso das mutações *missense*, a situação é mais complexa e a decisão sobre a natureza patogênica fica ainda mais difícil. Tarpey e col. (2009) usaram critérios rígidos para buscar a relação com a DM das 983 substituições diferentes que encontraram: além do estudo de segregação nas famílias, investigaram amostras controle, que em muitos casos incluiu mais de 1000 indivíduos;

ainda, classificaram essas substituições de base de acordo com um escore de conservação evolutiva; outra estratégia baseou-se no número de variantes do gene que, se maior do que sua taxa de evolução prediz, é indicativo de seleção positiva e numa amostra de indivíduos com DM incluiria também aqueles genes com excesso de variantes causadoras da doença. As lições desse estudo aplicam-se a outras estratégias para a detecção de causas genéticas de DM. Por exemplo, na avaliação do significado patogênico de variações no número de cópias de segmentos genômicos.

Em alguns poucos casos, a avaliação de vias metabólicas que estariam comprometidas levou à detecção do gene mutado. Salomons e col., (2001) identificaram mutação no gene do transportador de creatina *SLC6A8* em Xq28 como causa de DM em um menino, único afetado na família, que apresentava DM e hipotonia. A análise por espectroscopia de prótons por ressonância magnética de seu cérebro indicou ausência de creatina, que estava em níveis elevados na urina e no plasma. Como a creatina é sintetizada principalmente no fígado, rins e pâncreas, seu transporte pela proteína *SLC6A8* é essencial para seu metabolismo nos outros tecidos em que a biossíntese não ocorre. A hipótese dos pesquisadores, portanto, foi que uma mutação nesse gene fosse responsável pela DM, o que foi comprovado. A mutação foi detectada em heterozigose na mãe do afetado.

1.4 - A inativação do cromossomo X e mutações que causam deficiência mental

Nas mulheres, um dos cromossomos X está sempre inativo como mecanismo de compensação de dose dos seus genes em relação aos do único cromossomo X dos homens (revisão em Boumil e Lee, 2001). A inativação é um processo aleatório que ocorre em cada célula no início do desenvolvimento embrionário, mantendo-se

inativo o mesmo cromossomo X nas divisões celulares subsequentes. Assim sendo, as mulheres são mosaicos com duas populações de células e se distribuem de acordo com uma curva normal quanto à percentagem de células com o cromossomo X materno ou paterno inativos. Em média, metade de suas células tem o cromossomo X herdado do pai como o inativo e a outra metade com o cromossomo X materno inativo. No entanto, podem ocorrer desvios não aleatórios no padrão de inativação do cromossomo X, decorrentes de mutações gênicas ou cromossômicas que levam à seleção contra as células portadoras. Amos-Ladgraf e col. (2006) mostraram que apenas 1,7% das mulheres da população têm desvios de inativação extremos ($\geq 95\%$) e concluíram que uma mulher que apresente tal padrão de inativação é muito provavelmente portadora de mutação no cromossomo X que afeta a razão de inativação, justificando a investigação de patologias de herança ligada ao X.

Willard e col. (2000) verificaram que mutações do cromossomo X que causam deficiência mental aparecem freqüentemente associadas a desvios extremos no padrão de inativação do cromossomo X, detectados em células do sangue periférico de mulheres portadoras. Ao analisar o padrão de inativação do cromossomo X em 155 portadoras certas de mutação causadora de DMXL, Plenge e col. (2002) demonstraram que cerca de metade delas apresentavam grande desvio de inativação ($\geq 80:20$) e apenas 10% das mulheres controle apresentavam tal desvio. Assim, a presença de desvios extremos de inativação em mães de meninos com deficiência mental pode ser tomada como indicativa de mutação em gene no cromossomo X como causa da doença.

Encontrar novas mutações no cromossomo X que causam deficiência mental e relacioná-las com os fenótipos tem sido o objetivo da pesquisa de muitos laboratórios, utilizando diferentes estratégias. Não somente se busca explicação para o excesso de homens afetados e para grande parte dos 10% estimados de DMLX, mas compreender a ação desses genes no sistema nervoso central e suas implicações no

desenvolvimento da inteligência e de habilidades cognitivas e sociais. Além da contribuição para a pesquisa básica, identificar tais genes vem auxiliar no diagnóstico de inúmeras formas de deficiência mental de causa desconhecida. Determinar a mutação causadora de DM numa família tem importância para o aconselhamento genético, a identificação de portadoras e o diagnóstico pré-natal.

II - OBJETIVO

Visando contribuir para o conhecimento de genes do cromossomo X que contribuem para a deficiência mental, o objetivo desta pesquisa foi identificar o gene mutado que condiciona a deficiência mental em uma família com cinco afetados, num padrão de ocorrência compatível com a herança ligada ao X.

VI – SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Estudamos uma família com cinco homens (dois falecidos) afetados por deficiência mental (DM) não-sindrômica em duas gerações, num padrão de herança ligada ao cromossomo X. A análise do padrão de inativação do cromossomo X, com base na metilação do gene *AR*, evidenciou que a mulher portadora obrigatória tinha desvio completo de inativação nos leucócitos, uma característica freqüente em portadoras de mutações do cromossomo X relacionadas com DM. Para o mapeamento da DM, genotipamos 28 locos de microssatélites ao longo do cromossomo X e delimitamos um segmento de cerca de 32 Mb, entre os marcadores DXS986 e DXS8067, compartilhado pelos afetados e pela portadora obrigatória, mas não pelo homem normal ou pelas possíveis portadoras que não tinham desvio do padrão de inativação do cromossomo X. Na busca do gene mutado, analisamos, por seqüenciamento direto, genes mapeados no intervalo compartilhado e já relacionados a DM ou que tivessem expressão em cérebro e leucócitos. Nos afetados e na portadora obrigatória, encontramos a mutação c.845C→T no gene *ACSL4*, que resulta na substituição do aminoácido histidina, conservado na família de sintetases de acil-CoA humanas e em diversos outros organismos, por tirosina (p.H323Y da isoforma cérebro-específica). Tratando-se de mutação que altera um aminoácido evolutivamente conservado em gene já relacionado com DM, que segregava com a DM na família, não tendo sido encontrada em amostra controle de 160 indivíduos do sexo masculino, concluímos que era a causa da DM na família. Mutações de ponto no gene *ACSL4* foram relacionadas com a DM não-sindrômica em três famílias descritas na literatura. O gene *ACSL4* codifica a acil-coA sintetase 4 da família das sintetases de cadeia longa, que catalisa a formação de ésteres acil-coA a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Sua expressão já foi documentada em vários tecidos, incluindo o cérebro e dados recentes mostraram que a proteína é essencial para a formação normal de espinhos dendríticos.

A nova mutação do gene *ACSL4* que descrevemos como causa de DM vem reforçar a relação alterações desse gene e a DM de herança ligada ao X. O padrão de inativação do X totalmente desviado foi mais uma vez observado em mulher portadora da mutação, indicando a importância da expressão desse gene em leucócitos. A presença de dificuldades de aprendizado na portadora da mutação concorda com o observado nas três famílias da literatura em que o estudo das portadoras foi relatado, indicando o efeito de mutações do gene *ACSL4* sobre a função intelectual mesmo em heterozigose. A ausência de correlação entre o padrão de inativação do cromossomo X em células do sangue periférico e o comprometimento intelectual foi confirmada. Na família estudada, a identificação da mutação permitiu o aconselhamento genético.

VII – ABSTRACT

We studied a family with five men (two of them deceased) affected by non-syndromic mental retardation in two generations, in a pattern of X-linked inheritance (MRX). The study aimed at identifying the causative mutation. The obligate female carrier showed completely skewed inactivation of the X chromosome, based on the methylation status of the *AR* gene in peripheral blood in leukocytes, a common feature in carriers of X-linked mutations that cause mental retardation. We genotyped 28 microsatellite loci mapped throughout the X chromosome and delimited a 32 Mb segment, between markers DXS986 and DXS8067, that was shared by the affected males and obligate carrier, but was not present in a normal man or in two women who did not show skewed X-inactivation. We searched for the causative mutation by sequencing genes mapped to this candidate interval that had been associated with MR and/or were expressed in brain and leukocytes. In the affected men and obligate carrier, we found a c.845C→T mutation in the *ACSL4* gene, resulting in the amino acid tyrosine substituting for a histidine (p.H323Y in brain isoform), which is conserved in the acyl-CoA synthetase family in humans and others organisms. This mutation was not found in a control sample of 160 men. Previously, point mutations in the *ACSL4* gene had been identified as the cause of MRX in three families. *ACSL4* encodes the acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, which catalyzes the formation of acyl-CoA esters from long-chain fatty acids. It is expressed in several tissues, and in brain it is essential for the normal formation of dendritic spines.

The novel mutation here described confirmed the causal association of *ACSL4* mutations with non-syndromic mental retardation. The completely skewed X-inactivation, also observed in the previously described carriers, supported a functional role for this gene in peripheral blood leukocytes. The intellectual impairment present in the carrier in the family here reported is in accordance with previous findings pointing

to the effect on intellectual abilities of *ACSL4* mutations in heterozygosis. The absence of correlation between the pattern of X-inactivation in leukocytes and mental status was confirmed.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW – Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** 51:1229-1239,1992.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA - PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. **Nature Genet** 20:25-30,1998.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF - X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **Am J Hum Genet** 79:493-499, 2006.
- Boumil RM, Lee JT – Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. **Hum Mol Genet** 10: 2225-2232, 2001.
- Calhoun DH, Bishop DF, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ - Fabry disease: isolation of a cDNA clone encoding human alpha-galactosidase A. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 82:7364-7368, 1985.
- Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM – Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). **Genomics** 49:327-330, 1998.
- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM - Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. **PNAS** 97:11280-11285, 2000.
- Chiurrazzi P, Oostra BA – Genetics of Mental Retardation. **Curr Opin Pediatr** 12: 529-535, 2000.
- Chiurrazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G – XLMR genes: update 2007. **Eur J Hum Genet** 18:1-13, 2008.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL – FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genet Med** 3:359-371, 2001.
- De Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB, van Bokhoven H, Van Esch H, Frints SG, Froyen G, Fryns JP, Raynaud M, Moizard MP, Ronce N, Bensalem A, Moraine C, Poirier K, Castelnau L, Saillour Y, Bienvenu T, Beldjord C, des Portes V, Chelly J, Turner G, Fullston T, Gecz J, Kuss AW, Tzschach A, Jensen LR, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH, Hamel BC -

Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. **Hum Mutat** 28:207-208, 2007.

Faergeman NJ, and Knudsen J- Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. **Biochem J** 323:1-12, 1997.

Fernandez-Moreira D, Ugalde C, Smeets R, Rodenburg RJ, Lopez-Laso E, Ruiz-Falco ML, Briones P, Martin MA, Smeitink JA, Arenas J- X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. **Ann Neurol** 61:73-83, 2007.

Fishburn J, Turner G, Daniel A, Broowell R - The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. **Am J Med Genet** 14:713-724, 1983.

Frints SGM, Froyen G, Marynen P, Fryns J-P – X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. **Clin Genet** 62:423-432, 2002.

Frota-Pessoa O – Genética da deficiência mental. *In* Krinski S, Novos rumos do retardo mental. Sarvier, São Paulo, pp 13-26, 1983.

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, et al - Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. **Am J Hum Genet.** 82:432-443, 2008.

Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N - X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. **J Neurochem** 109:1-14, 2009.

Inlow JK, Restifo, LL – Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics** 166: 835-881, 2004.

Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE , Gordon JI - *Saccharomyces cerevisiae* contains four Fatty Acid Activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. **J Cell Biol** 127:751-762, 1994.

Knoll LJ, Johnson DR, Gordon JI – Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing Fatty Acid Activation gene (FAA) deletions with a mammalian Acyl-CoA Synthetase. **J Bio Chem** 270: 10861-10867, 1995.

- Lau AW, Brown CJ, Peñaherrera M, Langlois S, Kalousek DK, Robinson WP- Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. **Am J Hum Genet** 61:1353-1361, 1997.
- Longo I, Frints SGM, Fryns JP, Meloni I, Pescucci C, Ariana F, *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** 40:11-17, 2003.
- Lugtenberg D, Veltman JA, van Bokhoven H - High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. **Genet Med** 9:560–565, 2007.
- Mandel JL, Chelly J – Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **Eur J Hum Genet** 12:689-693, 2004.
- Mansouri MR, Marklund L, Gustavsson P, Davey E, Carlsson B, Larsson C, White I, Gustavson KH, Dahl N- Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. **Eur J Hum Genet** 13:970-977, 2005.
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, *et al* – FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. **Nat Genet** 30:436-440, 2002.
- Meloni I, Parri V, De Filippis R, Ariani F, Artuso R, Brutini M, Katzaki E, Longo I, Mari F, Bellan C, Dotti CG, Renieri A- The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. **Neuroscience** 159:657-669, 2009.
- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer APM, Vianna-Morgante AM - UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-555, 2006.
- Nielsen JB, Henriksen KF, Hansen C, Silahatoglu A, Schwartz M, Tommerup N - MECP2 mutations in Danish patients with Rett syndrome: high frequency of mutations but no consistent correlations with clinical severity or with the X chromosome inactivation pattern. **Eur J Hum Genet** 9:178-184, 2001.
- Nodé-Langlois R, Muller D, Boda B - Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. **J Cell Sci** 119:4986-4993, 2006.
- Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, *et al* – FACL4, a new gene encoding acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport Syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. **Genomics** 47:350-358, 1998.

- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF – Skewed X-Chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **Am J Hum Genet** 71:168-173, 2002.
- Raymond FL - X linked mental retardation: a clinical guide. **J Med Genet** 43:193-200, 2006.
- Raymond FL, Whibley A, Stratton MR, Gecz J - Lessons learnt from large-scale exon re-sequencing of the X chromosome. **Hum Mol Genet** 15:18:60-64, 2009.
- Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I – Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. **J Cell Physiol** 204: 8-20, 2005.
- Roessler BJ, Nosal JM, Smith PR, Heidler AS, Palella TD, Switzer RL, Becker MA - Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the PRPS1 gene. **J Biol Chem** 268: 26476-26481, 1993.
- Ropers HH, Hamel BC – X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 6:46-57, 2005.
- Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, Valenti MP e col.- SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. **Hum Mol Genet** 15:1195-1207, 2006.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ - Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet** 43:180-186, 2006.
- Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C - X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. **Am J Hum Genet** 68:1497-1500, 2001.
- Santos FR, Pena SD, Epplen JT – Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphisms with a simple non-isotopic technique. **Hum Genet** 90:655-656, 1993.
- Skuse DH – X-linked genes and mental functioning. **Hum Mol Genet** 14: 27-32, 2005.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, e col. - Mutations in CUL4B, which

encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. **Am J Hum Genet** 80:345-352, 2007a.

Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, Rodriguez J, Hackett A, Vandeleur L, Smith R e col.- Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. **Nat Genet.** 39:1127-1133, 2007b.

Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, e col.- A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-543, 2009.

Tominaga K, Leung JK, Rookard P, Echigo J, Smith JR, Pereira-Smith OM- MRGX is a novel transcriptional regulator that exhibits activation or repression of the B-myb promoter in a cell type-dependent manner. **J Biol Chem.** 278:49618-49624, 2003.

Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvu T, Jensen LR *et al.*, - Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. **Am J Hum Genet** 77:442-453, 2005.

Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat, X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK - AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. **Science** 296:2401-2403, 2002.

Willard HF – The sex chromosomes and X chromosome inactivation, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B - The metabolic and molecular bases of inherited Disease. **Brain Dev** 12:131-135, 2000.

Yadav J, Muend S, Zhang Y, Rao R - A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the Golgi. **Mol Biol Cell** 18:1480-9, 2007.

Zou Y, Liu Q, Chen B, Zhang X, Guo C, Zhou H, Li J, Gao G, Guo Y, Yan C, Wei J, Shao C, Gong Y - Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet.** 80:561-566, 2007.

RECURSOS DE INTERNET

American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD) -
<http://www.aamr.org> (nov/2008)

Ensembl –
<http://www.ensembl.org> (maio/2008)

GENATLAS –
<http://www.genatlas.gov> (dez/2006)

Greenwood Genetic Center (GGC) – X-linked Mental Retardation Update,
<http://www.ggc.org/xlmr.htm> (nov/2006 para busca de genes candidatos, maio/2009 para dados atualizados)

National Center for Biotechnology Information (NCBI)
<http://www.ncbi.nih.gov> (ago/2006, análise de marcadores de microssatélites; dez/2006, desenho de *primers* dos genes candidatos)

NETPRIMER
<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> (jan/2009)

PRIMER3
<http://frodo.wi.mit.edu/> (dez/2006)

University of California, Santa Cruz (UCSC)
<http://genome.ucsc.edu/> (dez/2006)

WebCutter
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (jan/2009, testes controle; maio/2009, ensaio de complementação em levedura.)

World Health Organization (WHO)
<http://www.who.int/en/> (jun/2009)