

Perturbazioni specifiche del sesso nello sviluppo neuronale causate da mutazioni nel gene di rischio per l'autismo DDX3X

Ricevuto: 6 maggio 2024

Accettato: 29 aprile 2025

Published online: 15 May 2025

 Controlla gli aggiornamenti

Adele Mossa^{1,2,3,4,5}, Lauren Dierdorff^{1,2,3,4,5,10}, Jeronimo Lukin^{2,3,4,5,10}, Marta Garcia-Forn^{1,2,3,4,5}, Wei Wang⁶, Fatemeh Mamashli⁷, Parco Yeaji^{1, 2, 3, 4, 5}, Chiara Fiorenzani^{1,2,3,4,5}, Zeynep Akpinar^{1,2,3,4,5,8}, Janine Kamps¹⁰, Jörg Tatzelt^{7,9}, Zhuhao Wu¹⁰ & Silvia De Rubeis^{1,2,3,4,5} ✉

DDX3X è un'RNA elicasi legata al cromosoma X che sfugge all'inattivazione del cromosoma X ed è espressa a livelli più elevati nel cervello femminile. Le mutazioni in DDX3X sono associate a disabilità intellettiva (DI) e disturbo dello spettro autistico (ASD) e sono identificate prevalentemente nelle femmine (sindrome DDX3X). Utilizzando modelli cellulari e murini, dimostriamo che Ddx3x media i dimorfismi sessuali nello sviluppo cerebrale a livello molecolare, cellulare e comportamentale. Durante lo sviluppo neuronale corticale, Ddx3x mantiene una firma tipicamente femminile di aumentata biogenesi ribosomiale e metabolismo dell'mRNA. Rispetto ai neuroni maschili, i neuroni femminili presentano nucleoli più grandi, una maggiore espressione di un insieme di proteine ribosomiali e un rapporto citoplasma-nucleo di RNA ribosomiale più elevato. Tutti questi dimorfismi sessuali vengono annullati dalla perdita di Ddx3x. Ddx3x regola la complessità dell'arborizzazione dendritica in modo sesso-dipendente e dose-dipendente nei neuroni sia femminili che maschili. Ddx3x modula lo sviluppo delle spine dendritiche, ma solo nei neuroni femminili. Inoltre, l'ablazione condizionata di Ddx3x nei neuroni del proencefalo è sufficiente a produrre cambiamenti sesso-specifici negli esiti dello sviluppo e nella funzione motoria. Insieme, questi risultati presentano Ddx3x come mediatore della differenziazione sessuale durante il neurosviluppo e aprono nuove strade per comprendere le differenze di genere in salute e malattia.

La variazione genetica nel gene legato al cromosoma X DDX3X è una delle principali cause di disabilità intellettiva (DI) e disturbo dello spettro autistico (ASD)^{1–6} (sindrome DDX3X). Oltre il 95% degli individui con mutazioni DDX3X sono di sesso femminile e presentano mutazioni de novo con perdita di funzione che portano ad aploinsufficienza o mutazioni missense^{2,3,5,7}. I pochi maschi identificati

presentano varianti missenso tipicamente ereditate da madri apparentemente asintomatiche e si ritiene che agiscano come **alleli** ipomorfici^{2,3,5,8}. Dato che ASD e ID sono diagnosticati e studiati in modo sproporzionato nei maschi⁹, la sindrome DDX3X offre una finestra unica sulle differenze di genere nello sviluppo neurologico.

¹Seaver Autism Center for Research and Treatment, Icahn School of Medicine presso il Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

²Dipartimento di Psichiatria, Icahn

Facoltà di Medicina presso il Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

³Il Mindich Child Health and Development Institute, Icahn School of Medicine al Mount Sinai,

New York, NY 10029, Stati Uniti. ⁴Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine presso il Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

⁵Centro Alper per la neurologia

Sviluppo e rigenerazione Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine presso il Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

⁶Malattia di Alzheimer di Appel

Istituto di ricerca, Feil Family Brain and Mind Research Institute, Weill Cornell Medicine, New York NY10021, USA. Malattie genetiche, Istituto di biochimica e patobiochimica, Università della Ruhr di Bochum, Bochum, Germania.

⁷Dipartimento di Biochimica dei Neurodegenerati

Università, Facoltà di Arti e Scienze, New York, NY 10003, USA.

⁹of Excellence RESOLV, Bochum, Germania. ¹⁰Questi autori hanno contribuito in egual misura:

Lauren Dierdorff, Jeronimo Lukin.

✉ e-mail: silvia.derubeis@mssm.edu

DDX3X codifica per un'RNA elicasi DEAD-box ATP-dipendente con ampie funzioni nel metabolismo dell'RNA^{3,10–14}, tra cui la regolazione della traduzione dell'mRNA^{10,11} e la produzione di condensati e granuli contenenti RNA tramite separazione di fase liquido-liquido (LLPS)^{15–19}. Complessi meccanismi di traduzione dell'mRNA accompagnano e modellano lo sviluppo cerebrale^{20–23}. Le funzioni di DDX3X nel cervello stanno appena iniziando a [emergere^{3,12,24,25}](#).

Mentre i topi Ddx3x nulli muoiono in [utero^{24,26}](#), le femmine con aploinsufficienza Ddx3x presentano ritardi nel raggiungimento delle tappe postnatali, seguiti da deficit neurologici e comportamentali in età adulta²⁴. Prove in questo e altri modelli murini indicano che Ddx3x è indispensabile per lo sviluppo del rombencefalo²⁵ e del proencefalo^{3,12,24}. La neocorteccia è particolarmente vulnerabile, come dimostrato dalle malformazioni cerebrali congenite spesso diagnosticate in individui con sindrome DDX3X^{2,3,5}, e dalle prove sperimentali che mostrano che la nascita^{3,12} e la specificazione del sottotipo laminare²⁴ dei neuroni glutamatergici corticali richiedono Ddx3x. Oltre a queste funzioni radicate nello sviluppo prenatale, prove precedenti suggeriscono che Ddx3x regoli anche la morfogenesi neuronale²⁷, il che potrebbe ulteriormente alterare l'integrazione dei neuroni glutamatergici corticali nei circuiti locali.

DDX3X sfugge all'inattivazione del cromosoma X ed è espresso da entrambi gli alleli nelle [donne^{28–30}](#) e nei [topi femmina^{24,31}](#), incluso nel cervello. Nonostante solo pochi geni ancestrali siano sopravvissuti sul cromosoma Y, DDX3X ha mantenuto un gene omologo di Y (DDX3Y) [32–34](#). Pertanto, DDX3X appartiene a una classe di geni legati al cromosoma X con un potenziale unico di guidare la differenziazione sessuale, attraverso un'espressione sbilanciata e/o funzioni divergenti dell'omologo di Y ^{33,35}. Tuttavia, l'interazione tra DDX3X e DDX3Y rimane poco compresa. Nei modelli murini brain-conditional, le femmine Ddx3x null presentano anomalie della citoarchitettura cerebrale più pronunciate rispetto ai [maschi Ddx3x null^{12,25}](#), che mostrano anche un mRNA di Ddx3y sovraregolato^{12,25}, suggerendo meccanismi di compensazione. Tuttavia, l'ablazione di DDX3X nei maschi è incompatibile con la vita negli esseri umani e nei [topi^{5,24,26}](#). Inoltre, le delezioni di DDX3Y causano subfertilità/infertilità^{36–38}, non disturbi cerebrali, in linea con l'evoluzione delle regioni regolatrici che limitano i testicoli in questo gene nei primati³⁹.

Il gene DDX3X si trova all'intersezione tra la biologia del cromosoma X, la differenziazione sessuale e il rischio di disabilità intellettiva/disturbi dello spettro autistico (DSA), eppure nessuno studio ha esaminato l'effetto differenziale della perdita di Ddx3x nel cervello femminile e maschile. Qui, colmiamo questa lacuna esaminando l'influenza del sesso, del dosaggio del gene Ddx3x e della loro interazione sullo sviluppo neuronale e sugli esiti comportamentali rilevanti a livello traduzionale per le mutazioni di DDX3X associate a disabilità intellettiva e disturbo dello spettro autistico (DSA). Dimostriamo che Ddx3x media i dimorfismi sessuali durante lo sviluppo cerebrale e che le perturbazioni di Ddx3x alterano lo sviluppo e la funzione dei neuroni glutamatergici corticali in modo specifico

Risultati

Ddx3x definisce la complessità dell'arborizzazione dendritica in modo dipendente dal dosaggio e dal sesso Per studiare l'influenza del sesso e del dosaggio allelico di Ddx3x sullo sviluppo neuronale, abbiamo incrociato femmine Ddx3x+/flox²⁴ con maschi di tipo selvatico (Ddx3x+/y) per ottenere embrioni di quattro genotipi: femmine di controllo (Ddx3x+/+), femmine eterozigoti floxed (Ddx3x+/flox), maschi di controllo (Ddx3x+/y) e maschi floxed (Ddx3xflox/y). Incrociando femmine Ddx3x+/flox con maschi Ddx3xflox/y, abbiamo anche ottenuto femmine omozigoti floxed (Ddx3xflox/flox). I neuroni corticali sono stati isolati dagli embrioni al 15° giorno embrionale (E) e trasfettati con un costrutto bicistrone contenente mCherry e CRE (pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre) al momento della semina (giorno in vitro 0, DIV0) (Fig. 1A). I neuroni sono stati quindi coltivati per 9 giorni, fissati e visualizzati (Fig. 1A, B). Come previsto, questa manipolazione genetica ha prodotto neuroni femminili di controllo mCherry+ scarsamente marcati (Ddx3x+/+), neuroni femminili aploinsufficienti (Ddx3x+/-), neuroni femminili nulli (Ddx3x/-), neuroni maschili di controllo (Ddx3x+/y) e neuroni maschili nulli (Ddx3x-/y) (Fig. 1A–C).

In linea con i dati precedenti secondo cui l'abbattimento di Ddx3x mediato da siRNA altera la crescita dei neuriti²⁷, la carenza di Ddx3x riduce la crescita dendritica

complessità: i neuroni Ddx3x+/-, Ddx3x/- e Ddx3x-/y presentavano arborizzazioni dendritiche semplificate (Fig. 1B–D–H) e una lunghezza ridotta dell'arborizzazione dendritica complessiva (Fig. 1I). Questi deficit cellulari erano dipendenti sia dal dosaggio che dal sesso. I neuroni Ddx3x+/- e Ddx3x/- femminili differivano, indicando un effetto del dosaggio genico (Fig. 1D, Fig. 1F–I). I neuroni Ddx3x+/- femminili e Ddx3x+/y maschili presentavano un'espressione monoallelica di Ddx3x e tuttavia erano dissimili (Fig. 1D–G–I). I neuroni nulli Ddx3x/- femminili e Ddx3x-/y maschili non hanno mostrato differenze evidenti nella loro arborizzazione dendritica (Fig. 1D), ma i neuroni Ddx3x/- avevano significativamente meno dendriti secondari e terziari rispetto ai neuroni Ddx3x-/y (Fig. 1F, G).

Per corroborare questi risultati in vivo, abbiamo sfruttato il nostro modello di topo Sox2-Ddx3x²⁴ e abbiamo confrontato la morfologia dendritica dei neuroni corticali dei cervelli adulti Sox2-Ddx3x+/- e Sox2-Ddx3x+/+.

A tal fine, i neuroni piramidali dello strato V sono stati marcati in vivo iniettando particelle virali adeno-associate (AAV) retrograde trasportanti GFP (rAVV-CAG-GFP) nel nucleo reticolare pontino ed eseguendo la purificazione del tessuto cerebrale e la microscopia a foglio luminoso tre settimane dopo l'intervento chirurgico (vedi Metodi). Abbiamo dato priorità a questo sottotipo corticale sulla base dell'evidenza di alterazioni dei neuroni dello strato V e di deficit motori nei topi Sox2-Ddx3x+/-²⁴ e di osservazioni cliniche di ipoplasia pontina in individui con mutazioni DDX3X^{3,40}. Il tracciamento virale retrogrado ha portato a una robusta marcatura dei neuroni piramidali sia controlaterali che ipsilaterali (Fig. 2A). Utilizzando l'analisi di Sholl e concentrandoci sui neuroni i cui somi risiedono nella corteccia motoria, non abbiamo riscontrato evidenti cambiamenti genotipici nell'arborizzazione dendritica complessiva, ma i neuroni Sox2-Ddx3x+/- presentavano significativamente meno intersezioni a 600–700 μm dal soma (Fig. 2A, B). Abbiamo anche quantificato la lunghezza del dendrite apicale prossimale e del tratto dendritico rimanente che ricopre il dendrite apicale distale e il ciuffo terminale (vedi Metodi). Abbiamo scoperto che i neuroni Sox2-Ddx3x+/- presentavano un dendrite apicale prossimale più lungo a scapito del dendrite apicale distale e del ciuffo (Fig. 2C, D). Inoltre, i neuroni Sox2-Ddx3x+/- presentavano ciuffi terminali più semplici (Fig. 2E, F).

In sintesi, Ddx3x è indispensabile per lo sviluppo di una corretta arborizzazione dendritica in modo cellula-autonomo sia nei neuroni femminili che in quelli maschili, e questa funzione dipende dal dosaggio e dal sesso.

Il gene endogeno Ddx3y non è in grado di compensare completamente la funzione di Ddx3x nella morfogenesi neuronale. Inoltre, l'aploinsufficienza di Ddx3x altera l'arborizzazione dendritica dei neuroni corticopontini residenti nella corteccia motoria, con il maggiore impatto sui processi che si estendono agli strati superiori, perturbando plausibilmente i circuiti locali.

Ddx3x regola lo sviluppo delle spine dendritiche in modo sesso-dipendente.

Seguendo il ragionamento

precedente, abbiamo cercato di discriminare l'effetto del sesso e del dosaggio di Ddx3x sulla formazione e la maturazione delle spine dendritiche. Abbiamo adottato la stessa strategia di ricombinazione Cre descritta sopra. Per isolare la funzione discreta di Ddx3x in questo processo, sono state eseguite trasfezioni sparse a DIV9 e i neuroni sono stati esaminati a DIV14 (Fig. 3A, B). In questo modo, la dendritogenesi è proceduta indisturbata fino all'inizio della sinaptogenesi, e quindi i fenotipi sinaptici non sono stati confusi da difetti pregressi nello sviluppo dendritico. Segmenti lunghi 10 μm , distanti almeno 30 μm dal soma, sono stati quindi esaminati nei neuroni DIV14 mCherry+ Ddx3x+/+, Ddx3x+/y Ddx3x \dot{y} /y, Ddx3x+/y o Ddx3x \dot{y} /y (Fig. 3A). I segmenti dendritici sono stati esaminati nei dendriti primari, secondari e terziari e nei dendriti sottili e spessi (Fig. S1).

Le quantificazioni della densità dendritica hanno rivelato che l'espressione intatta di Ddx3x è indispensabile per la formazione delle spine nelle femmine ma non nei maschi: i neuroni Ddx3x \dot{y} /y ma non Ddx3x+/y o Ddx3x \dot{y} /y, avevano più spine dendritiche rispetto ai neuroni di controllo (Fig. 3B, C).

Misurando la densità delle spine in funzione della distanza dal soma, abbiamo notato che l'aumento del numero di spine nei neuroni Ddx3x/- era più evidente a 60–70 μm dal soma (Fig. 3D). Coerentemente, valutando la densità delle spine in base alla gerarchia o al diametro dei dendriti, abbiamo osservato che la sovraesuberanza

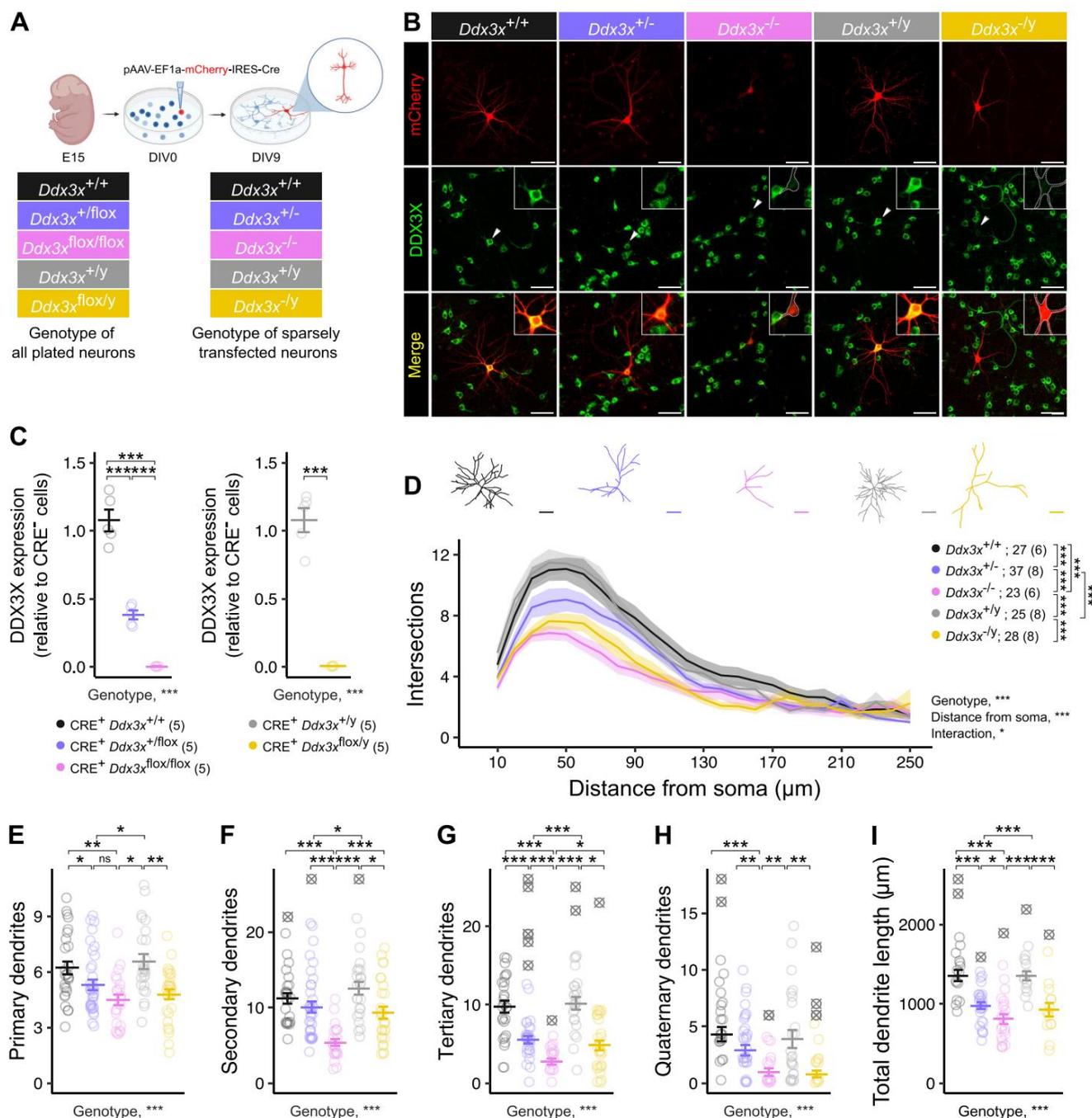


Fig. 1 | Ddx3x regola la dendritogenesi. Disegno sperimentale. I neuroni corticali vengono isolati da embrioni $Ddx3x^{+/+}$, $Ddx3x^{+/flox}$, $Ddx3xflox/flox$, $Ddx3x^{+/y}$ o $Ddx3xflox/y$ E15. Il giorno della semina (DIV0), i neuroni vengono trasfettati con un costrutto contenente mCherry e CRE, ottenendo neuroni femminili di controllo scarsamente marcati ($Ddx3x^{+/+}$, neri), neuroni femminili aploinsufficienti ($Ddx3x^{+/y}$, viola), neuroni femminili nulli ($Ddx3x^{flox/flox}$, rosa), neuroni maschili di controllo ($Ddx3x^{+/y}$, grigi) o neuroni maschili nulli ($Ddx3x^{flox/y}$, gialli). Le analisi vengono eseguite al DIV9. Creato in BioRender103. B–C Validazione delle manipolazioni $Ddx3x$ nelle colture neuronali.

B Immagini confocali di neuroni corticali DIV9 immunocolorati per mCherry (rosso) e DDX3X (verde). Barra di scala, 50 μm . C Espressione di DDX3X nei neuroni DIV9 CRE⁺ mCherry⁺ da embrioni $Ddx3x^{+/+}$, $Ddx3x^{+/flox}$, $Ddx3xflox/flox$, $Ddx3x^{+/y}$ o $Ddx3xflox/y$ scarsamente trasfettati a DIV0 (come in B), confrontati con neuroni non trasfettati adiacenti (CRE⁺mCherry⁻) all'interno dello stesso coprioggetto. L'espressione è mostrata in relazione alle cellule CRE⁺mCherry⁻, separatamente per i neuroni femminili (pannello sinistro) e maschili (pannello destro). D La perdita di $Ddx3x$ causa un arborismo dendritico semplificato. Il grafico

mostra il numero di punti di ramificazione in funzione della distanza dal soma nei neuroni DIV9 nei cinque genotipi descritti in A e mostrati in B.

Le tracce rappresentative sono mostrate nella parte superiore del grafico. Barra di scala, 50 μm . E–H La perdita di $Ddx3x$ causa una riduzione del numero di dendriti. Il grafico mostra il numero di dendriti primari (E), secondari (F), terziari (G) e quaternari (H) dei neuroni corticali DIV9 nei cinque genotipi descritti in A. La perdita di $Ddx3x$ riduce la lunghezza dei dendriti. Il grafico mostra la lunghezza totale dei dendriti dei neuroni corticali DIV9 nei cinque genotipi descritti in A. Statistiche: Pannelli C e I, ANOVA a una via, seguita dal test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannello D, ANOVA a misure ripetute, seguita dal test di Tukey con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannello E–H, test di Kruskal-Wallis, seguito dal test di Wilcoxon con correzione di Benjamini-Hochberg. In tutti i pannelli, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto al genotipo e al sesso; n è mostrato nella legenda come numero di neuroni (e numero di embrioni); media \pm errore standard (SEM); valori anomali (mostrati come \ddot{y}), *valore $P < 0,05$, **valore $P < 0,01$, ***valore $P < 0,001$. I dati sorgente sono forniti come file di dati sorgente.

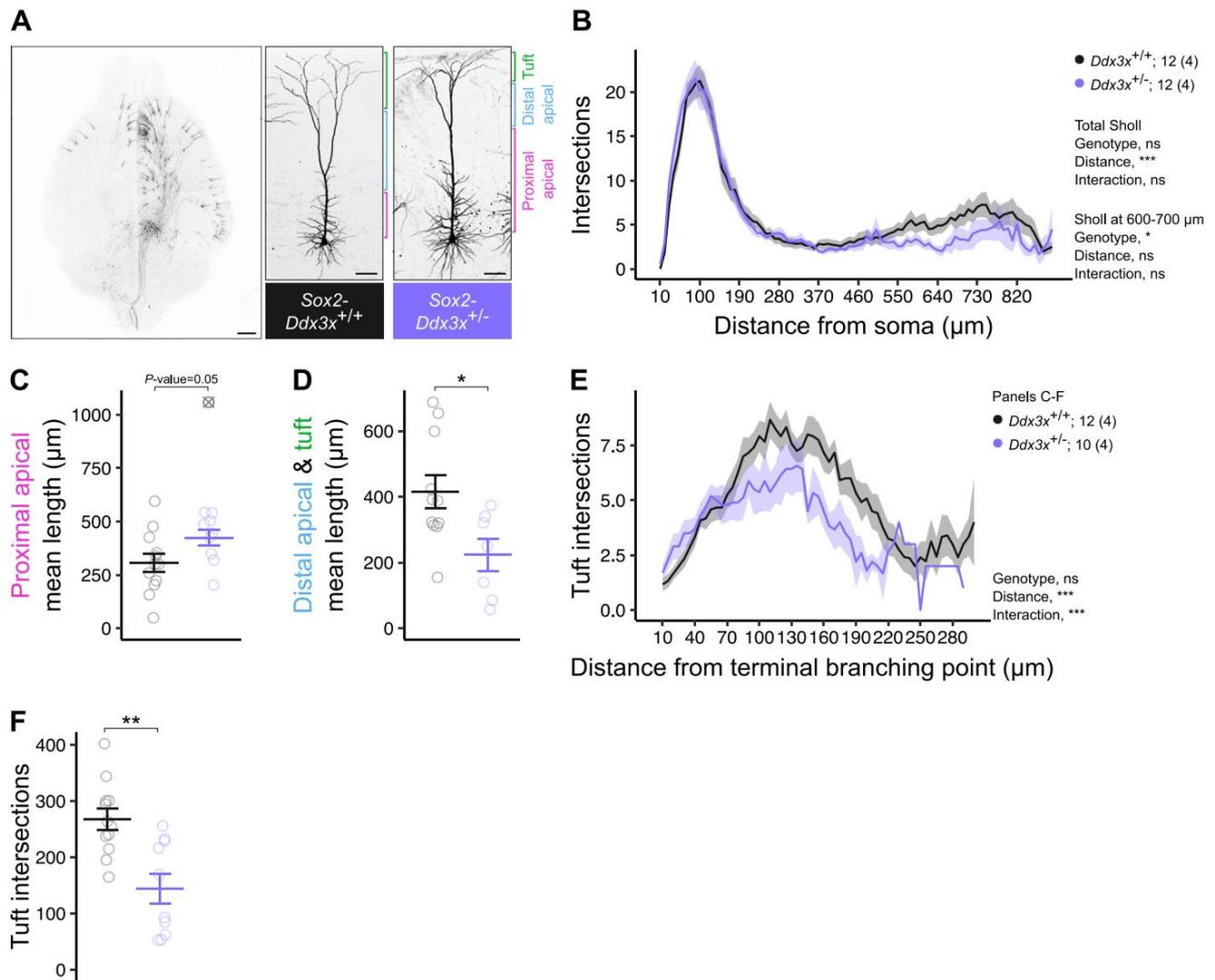


Fig. 2 | I neuroni corticopuntini di topi aploinsufficienti per *Ddx3x* presentano arborizzazioni dendritiche semplificate. **A** Neuroni corticopuntini marcati in vivo in topi femmina di controllo e aploinsufficienti per *Ddx3x*. A sinistra, vista 3D orizzontale di un cervello sottoposto a iDISCO clearing dopo marcatura retrograda in vivo dei neuroni corticopuntini. Barra di scala, 1 mm. A destra, neuroni corticopuntini GFP+ rappresentativi di *Sox2-Ddx3x+/+* (nero) o cervelli *Sox2-Ddx3x+/y* (viola). Barra di scala, 100 μm . L'aploinsufficienza di *Ddx3x* influenza la complessità del dendrite apicale distale. Il grafico mostra il numero di punti di ramificazione in funzione della distanza dal soma in GFP+ Neuroni corticopuntini provenienti da cervelli *Sox2-Ddx3x+/+* o *Sox2-Ddx3x+/y*. I neuroni C *Ddx3x* apicalmente insufficienti tendono ad avere dendriti apicali prossimali più lunghi. Il grafico mostra la lunghezza dei dendriti apicali prossimali nei neuroni corticopuntini GFP+ da Cervelli *Sox2-Ddx3x+/+* o *Sox2-Ddx3x+/y*. I neuroni aploinsufficienti D *Ddx3x* hanno

tratti dendritici più corti che ricoprono i dendriti apicali distali e il ciuffo. La trama mostra la lunghezza dei tratti dendritici che ricoprono i dendriti apicali distali e la ciuffo nei neuroni corticopuntini GFP+ dai cervelli *Sox2-Ddx3x+/+* o *Sox2-Ddx3x+/y*.

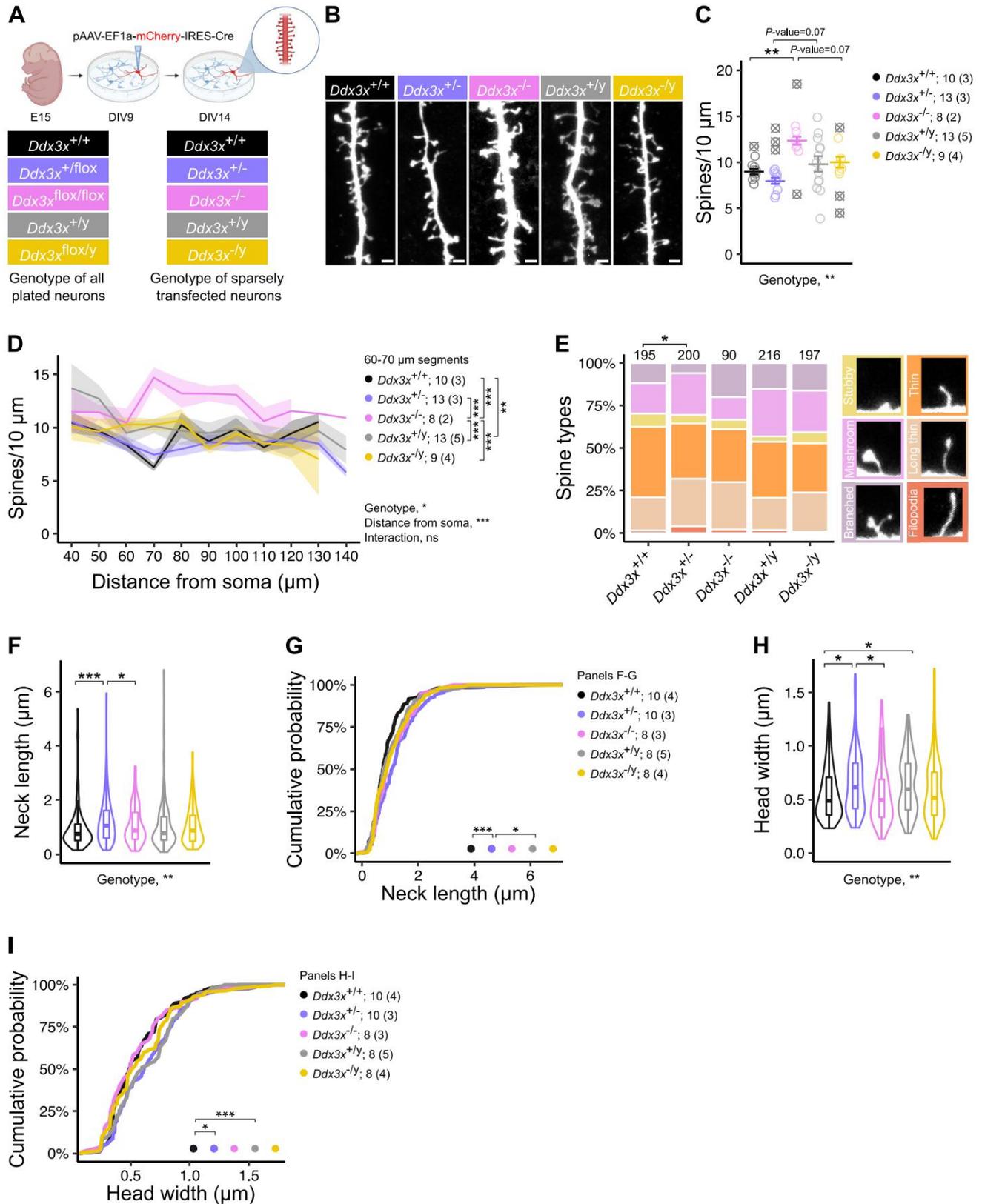
E, F I neuroni aploinsufficienti *Ddx3x* hanno ciuffi terminali semplificati, come mostrato da numero di intersezioni dei ciuffi come distanza dal punto di ramificazione terminale dove l'apicale distale si arborizza nel ciuffo (**E**) e il numero totale di intersezioni in il ciuffo (**F**) nei neuroni corticopuntini GFP+ da *Sox2-Ddx3x+/+* o *Sox2-Ddx3x+/y* cervelli. Statistiche: Pannelli B ed E, ANOVA a misure ripetute; Pannelli C, D e F, test t di Student. In tutti i panel, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto al genotipo e al sesso; n è mostrato nella legenda come numero di neuroni (e numero di topi); media \pm SEM; valori anomali mostrato come \bar{y} ; *Valore $P < 0,05$, ***Valore $P < 0,001$. I dati sorgente sono forniti come File di dati di origine.

spine dendritiche nei neuroni *Ddx3x*^{-/-} raggruppati in secondari e/o dendriti sottili (Fig. S2).

Per esaminare le caratteristiche morfologiche, abbiamo misurato il collo lunghezza e larghezza della testa delle singole spine dendritiche. *Ddx3x*^{-/-} femmina i neuroni hanno mostrato un aumento della lunghezza del collo (Fig. 3F, G) e un aumento larghezza della testa (Fig. 3H, I), rispetto a *Ddx3x*^{+/+} o *Ddx3x*^{-/-} femmina neuroni. Utilizzando le misure della lunghezza del collo e della larghezza della testa, abbiamo quindi classificato le spine dendritiche in sei tipi morfologici: ramificate, fungo, tozzo, sottile, lungo e sottile e filopodi (Fig. 3E) (vedi Metodi). Considerando le spine cumulativamente, solo *Ddx3x*^{-/-} femmina i neuroni avevano un profilo distinto, con un surplus di cellule simili a funghi e spine lunghe e sottili a scapito di spine sottili (Fig. 3E). Notiamo che questi dati sono in contrasto con le osservazioni precedenti di riduzione della colonna vertebrale

densità, eccesso di spine fungine e aumento dei filopodi dopo l'abbattimento acuto di *Ddx3x*, ancora una volta senza considerare le variabili di sesso e dosaggio allelico²⁷.

I nostri dati indicano che *Ddx3x* influenza lo sviluppo delle spine dendritiche in modo cellula-autonomo. Questa regolazione è specifica per le femmine, poiché i neuroni maschili *Ddx3x* nulli non sono influenzati. L'effetto di il dosaggio nei neuroni femminili è complesso, poiché l'aploinsufficienza colpisce morfologia delle spine ma non densità, e la perdita completa influisce sulla densità ma non la morfologia. Queste osservazioni suggeriscono che *Ddx3x* sia necessario sia per la formazione che per la maturazione delle spine dendritiche: *Ddx3x* l'espressione monoallelica è sufficiente a reprimere la formazione eccessiva di spine in una fase precoce e/o a facilitare la potatura in una fase successiva, ma l'espressione biallelica è necessaria durante tutta la maturazione della spina.



Ddx3x controlla l'espressione, a predominanza femminile, delle proteine ribosomiali e dei regolatori della traduzione dell'mRNA. Abbiamo poi studiato i cambiamenti molecolari che accompagnano i fenotipi cellulari derivanti da mutazioni di Ddx3x. A tal fine, abbiamo prima trasdotto neuroni corticali DIV0 da embrioni Ddx3x^{+/+}, Ddx3x^{+/flox}, Ddx3x^{+/y} o Ddx3x^{flox/y} con particelle virali AAV8-Ef1a-mCherry-IRES-Cre.

(Fig. 4A). Con questa strategia, abbiamo ottenuto popolazioni omogenee di neuroni Ddx3x^{+/+} e Ddx3x^{-ly}, e i rispettivi controlli (Fig. 4A). Abbiamo quindi eseguito analisi proteomiche quantitative con marcatori al DIV9, limitando le analisi alle proteine identificate con almeno due peptidi univoci (vedi Metodi), e abbiamo proceduto all'identificazione delle proteine sovraregolate e sottoregolate (indicate nella figura e di seguito con i rispettivi nomi genici, Fig. 4B–D).

Fig. 3 | Ddx3x regola la formazione e lo sviluppo delle spine dendritiche.

A Disegno sperimentale. I neuroni corticali sono isolati da embrioni Ddx3x^{+/+}, Ddx3x^{+/flox}, Ddx3x^{flox/flox}, Ddx3x^{+/y} o Ddx3x^{flox/y} E15. Al DIV9, i neuroni vengono transfettati con il costrutto che trasporta mCherry e CRE, ottenendo neuroni scarsamente marcati Ddx3x^{+/+} (nero), Ddx3x^{+/y} (viola), Ddx3x^{-/-} (rosa), Ddx3x^{+/y} (grigio) o Ddx3x^{-/y} (giallo). Le analisi vengono eseguite al DIV14. Creato in BioRender103. B Il dosaggio di Ddx3x influenza la densità delle spine dendritiche. Immagini confocali di segmenti dendritici di 10 μm a 50 μm di distanza dal soma, che mostrano fusti e spine dendritiche che esprimono mCherry. Barra di scala, 1 μm . C La perdita di Ddx3x nei neuroni femminili (ma non maschili) altera la densità delle spine. Il grafico mostra il numero di spine dendritiche in 10 μm . D La densità dendritica varia in funzione della distanza dal soma. Il grafico mostra il numero di spine dendritiche in 10 μm in funzione della distanza dal soma (i valori sull'asse X rappresentano il limite superiore del segmento, ad esempio, 50 μm indicano il segmento 40-50 μm). E L'aploinsufficienza di Ddx3x altera l'equilibrio dei sottotipi di spine.

Il grafico mostra la proporzione di spine dendritiche nei sei sottotipi di spine, definiti come indicato nella sezione Metodi (n spine sopra ogni barra). F, G L'aploinsufficienza Ddx3x determina un aumento della lunghezza del collo della spina, come mostrato dalla lunghezza media del collo della spina (F) e dalla funzione di distribuzione cumulativa empirica delle misure di lunghezza del collo della spina (G). H, I L'aploinsufficienza Ddx3x determina un aumento della larghezza della testa della spina, come in F, G ma per la larghezza della testa della spina. Statistiche: Pannello C, ANOVA a un fattore, seguito da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannello D, ANOVA a misure ripetute, seguito da test di Tukey con correzione di Benjamini-Hochberg a segmenti di 60-70 μm . Pannello E, test del Chi-quadrato. Pannelli F e H, test di Kruskal-Wallis, seguito da test di Wilcoxon con correzione di Benjamini-Hochberg. Pannelli G e I, test di Kolmogorov-Smirnov. In tutti i pannelli, i dati sono stati raccolti senza considerare il genotipo e il sesso; n è mostrato nella legenda come numero di neuroni (e numero di embrioni); media \pm SEM; valori anomali mostrati come \ddot{y} ; *valore $P < 0,05$, **valore $P < 0,01$, ***valore $P < 0,001$. I dati sorgente sono forniti come file dati sorgente

Confrontando i genotipi Ddx3x^{+/+} e Ddx3x^{+/y}, abbiamo trovato 193 proteine disregolate (Dati supplementari 1A), in particolare 114 proteine con un'espressione più elevata nei neuroni femminili rispetto a quelli maschili, e 79 proteine con un'espressione orientata al sesso opposto (Fig. 4B). Ddx3x è risultata una delle proteine con l'espressione più differenziata in base al sesso (Fig. 4B, Dati supplementari 1A), in accordo con i nostri dati precedenti²⁴ e con i dati umani (Fig. S3A). È interessante notare che l'unica altra proteina legata al cromosoma X rilevata, Ubl4a, ha mostrato anch'essa un'espressione più elevata nei neuroni femminili, suggerendo che questo gene potrebbe sfuggire all'inattivazione del cromosoma X nei neuroni murini. Tuttavia, non si osserva alcun bias di espressione legato al sesso per UBL4A nei tessuti umani²⁹ (Fig. S3A). Inoltre, l'espressione a predominanza femminile per 4 geni oltre a Ddx3x (Tufm, Scfd2, Lrpprc e Eif3i) è conservata nella corteccia umana, come mostrato dai dati trascrittomici complessi³⁰ (Fig. S3B) (vedere Nota integrativa).

Confrontando i genotipi Ddx3x^{+/+} e Ddx3x^{+/+}, abbiamo trovato 182 proteine disregolate (Dati supplementari 1B), in particolare 59 proteine sovraregolate e 123 sottoregolate (inclusa Ddx3x) (Fig. 4C).

Confrontando i genotipi Ddx3x^{-/y} e Ddx3x^{+/y}, abbiamo trovato 98 proteine disregolate (dati supplementari 1C), in particolare 39 proteine sovraregolate e 59 proteine sottoregolate (inclusa Ddx3x) (Fig. 4D). Analisi precedenti hanno rilevato l'mRNA di Ddx3y nel [cervello12,25](#). Tuttavia, poiché è stato dimostrato che DDX3Y subisce una restrizione post-trascrizionale nelle [cellule germinali maschili39,41](#), abbiamo analizzato i nostri dati proteomici alla ricerca di peptidi specifici di DDX3Y nei neuroni maschili. Abbiamo identificato un peptide specifico per DDX3Y (KPILVATAVAAR in DDX3Y, Uniprot #Q62095; SPILVATAVAAR in DDX3X, Uniprot #Q62167) esclusivamente nel dataset Ddx3x^{-/y}. Abbiamo inoltre rilevato DDX3Y nelle colture di Ddx3x^{-/y} mediante Western blot (Fig. S4A). Questi dati corroborano l'espressione di DDX3Y, seppur a bassi livelli, nei neuroni maschili dopo l'ablazione di Ddx3x.

Abbiamo quindi analizzato i processi biologici annotati in Gene Ontology (GO) con i dataset di 193 (Fig. 4B), 182 (Fig. 4C) e 98 (Fig. 4D) proteine disregolate rispettivamente nei neuroni Ddx3x^{+/+}, Ddx3x^{+/y}, Ddx3x^{-/y}. Utilizzando il test esatto di Fisher con correzione di Bonferroni, abbiamo scoperto che delle 193 proteine con un bias di espressione legato al sesso, le 114 sovraregolate nei neuroni femminili convergevano sui termini GO relativi al processamento dell'RNA e alla traduzione dell'mRNA (Fig. 4E). Curiosamente, i risultati GO delle proteine disregolate nei neuroni Ddx3x^{+/+}, confrontati con quelli dei neuroni Ddx3x^{+/+}, hanno offerto uno scenario speculare, con un arricchimento dei termini di traduzione dell'mRNA per le proteine sottoregolate nei neuroni Ddx3x^{+/+} (Fig. 4F). Ad esempio, le proteine nel termine arricchito in alto "traduzione citoplasmatica" avevano un'espressione più elevata nei neuroni femminili rispetto a quelli maschili, ma un'espressione ridotta nei neuroni femminili con aploinsufficienza Ddx3x rispetto ai neuroni femminili di controllo (Fig. 4E, F).

Tra le proteine con espressione ridotta nei neuroni Ddx3x^{+/+} rispetto ai neuroni Ddx3x^{+/+}, c'erano 5 tRNA sintetasi, 5 proteine ribosomiali della subunità piccola 40S, 3 fattori di inizio, 8 proteine ribosomiali della subunità grande 60S (Fig. 4G) e 5 proteine coinvolte nella traduzione mitocondriale (Mrps18b, Mrpl24, Tufm, Mrps26, Mrps30). La ridotta

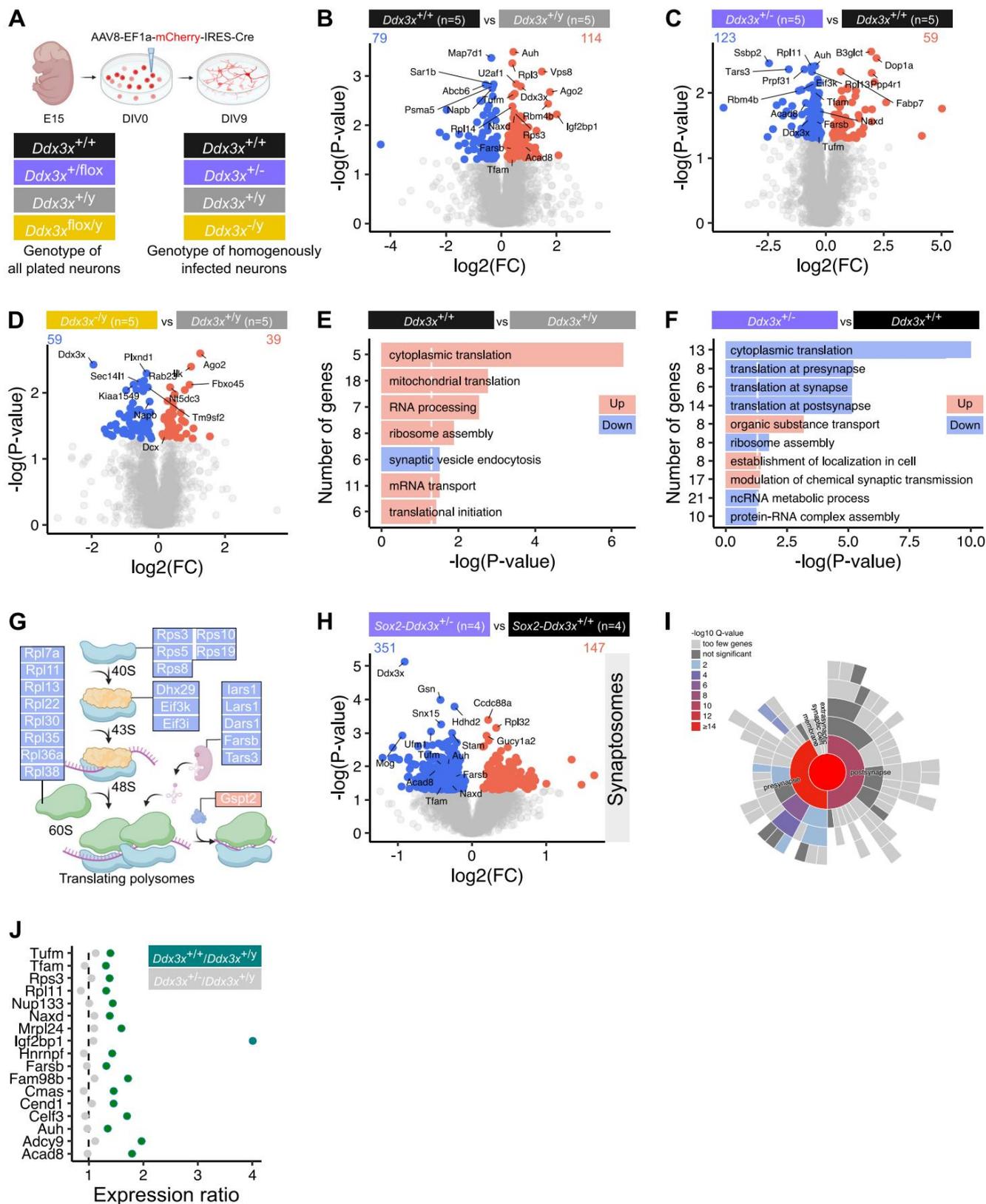
L'espressione di due proteine ribosomiali della subunità maggiore (Rpl36a; Rpl11), di una proteina della subunità minore (Rps5) e di un fattore di inizio della traduzione (Eif3k) nei neuroni Ddx3x^{+/+} è stata convalidata anche mediante Western blot (Fig. S4B, C). La forma specifica del fattore di terminazione della traduzione eRF342, ERF3B (codificata da Gspt2), presentava un'espressione aumentata nei neuroni Ddx3x^{+/+} (Fig. 4G). La riduzione osservata delle proteine ribosomiali è in linea con i risultati di un modello di knockdown di DDX3X in linee cellulari di linfoma43. Sorprendentemente, 7 delle 13 proteine ribosomiali ridotte nei neuroni Ddx3x^{+/+} sono codificate da mRNA che, sulla base dei dati iCLIP nelle linee cellulari del linfoma (ad esempio Rps3, Rps5, Rps8, Rps19, Rpl11, Rpl13, Rpl30), hanno mostrato di interagire con DDX3X, mentre 5 hanno mostrato di avere un'efficienza traslazionale ridotta nel modello di linfoma con knockdown DDX3X43 (ad esempio Rps3, Rps5, Rps19, Rpl11, Rpl13).

Questi dati suggeriscono che nei neuroni corticali Ddx3x regola l'espressione dei componenti principali del meccanismo di sintesi proteica.

Al contrario, non abbiamo riscontrato alcun arricchimento significativo per le 98 proteine disregolate nei neuroni Ddx3x^{-/y} rispetto ai neuroni Ddx3x^{+/y}. Diverse delle proteine trovate disregolate sono indispensabili per il corretto sviluppo dendritico, ad esempio Dcx44 e Plxn145, o per la migrazione neuronale, ad esempio Rab2346 e Fbxo4547. Ciò suggerisce che i difetti di morfogenesi sovrapposti osservati nei neuroni Ddx3x^{+/+} e Ddx3x^{-/y} (Fig. 1) derivino da meccanismi molecolari distinti. Inoltre, le proteine differenzialmente espresse nei neuroni Ddx3x^{-/y} (ma non quelle disregolate nei neuroni Ddx3x^{+/+}) erano arricchite per proteine codificate da bersagli di due proteine leganti l'RNA associate a ID/ASD, FMRP e RBFOX (Fig. S3D).

Per ottenere informazioni sulla rilevanza patologica dei nostri set di dati (Fig. 4B–D), abbiamo esaminato l'intolleranza alla variazione genetica della perdita di funzione nei loro orologi umani utilizzando le metriche consolidate della frazione limite superiore osservata/attesa della perdita di funzione (LOEUF)⁴⁸ (Nota supplementare). Gli orologi umani delle proteine con bias sessuale e delle proteine disregolate nei neuroni mutanti Ddx3x, sia femminili che maschili, mostravano tutti una distribuzione asimmetrica verso i decili LOEUF inferiori (Fig. S3C), in linea con gli elevati vincoli genomici per i geni espressi nel cervello. Inoltre, gli orologi umani delle proteine con bias sessuale includevano geni associati a gravi disturbi dello sviluppo neurologico (geni DDG2P49), geni di rischio per ASD (geni ASC50) e/o epilessia (geni EPI51–53), sebbene senza arricchimenti statisticamente significativi.

Ad esempio, 18 proteine codificate dai geni DDG2P avevano un'espressione più elevata nei neuroni femminili (ad esempio, Ddx3x, Auh, Tufm) e altre 8 avevano un'espressione più elevata nei neuroni maschili (ad esempio, Napb, Shank2, Ank2) (Dati supplementari 1). 5 proteine codificate dagli orologi del gene ASC presentavano un bias di espressione legato al sesso, e tutte presentavano un'espressione più elevata nei neuroni maschili (Adcy5, Coro1a, Ank2, Shank2, Cul3) (Dati supplementari 1). 30 proteine codificate dagli orologi del gene DDG2P presentavano un'espressione alterata nei neuroni Ddx3x^{+/+}, in particolare 10 proteine sovraregolate (ad esempio, Shank2, Nrnx3) e 20 proteine sottoregolate (ad esempio, Auh, Ccdc88a, Tufm). 13 proteine codificate dagli orologi del gene DDG2P presentavano un'espressione alterata nei neuroni Ddx3x^{-/y}, in particolare 7 sovraregolate



proteine (ad esempio, Dcx, Adsl, Shank1) e 6 proteine sottoregolate (ad esempio, Rab23, Napb).

Per esplorare i correlati molecolari delle spine dendritiche alterate nei neuroni *Ddx3x*^{+/-}, abbiamo delineato il profilo proteomico dei sinaptosomi corticali purificati da topi femmina *Sox2-Ddx3x*^{+/-} e *Sox2-Ddx3x*^{+/+} al 21° giorno postnatale, un picco per la sinaptogenesi. Come per i dati precedenti

esperimenti, abbiamo limitato le analisi alle proteine identificate con almeno due peptidi unici (vedi Metodi) e abbiamo proceduto all'identificazione di proteine sovregolate e sottoregolate (indicate nella figura e sotto con i nomi dei geni, Fig. 4H). Confrontando i sinaptosomi *Ddx3x*^{+/+} e *Ddx3x*^{+/-}, abbiamo trovato 498 proteine disregolate (Dati Supplementari 2), in particolare 147 proteine sovregolate e 351 sottoregolate in

Fig. 4 | Ddx3x regola il proteoma neuronale e sinaptico. A Disegno sperimentale. I neuroni corticali vengono isolati da embrioni E15 e trasdotti a DIV0 con AAV che esprime mCherry e CRE, dando origine a neuroni Ddx3x+/+ (nero), Ddx3x+/- (viola), Ddx3x+/y (grigio) o Ddx3x-/y (giallo). Le analisi vengono eseguite a DIV14. Creato in BioRender103. B Il sesso influenza il proteoma neuronale. Grafici a vulcano dei dati proteomici che mettono a confronto i neuroni Ddx3x+/+ e Ddx3x+/y. FC, variazione di piega; linea tratteggiata grigia, valore P = 0,05. Vedi Dati supplementari 1. C L'insufficienza di Ddx3x influenza il proteoma neuronale. Come in B, neuroni Ddx3x+/- e Ddx3x+/+ a confronto. Vedi Dati Supplementari 1. D L'ablazione di Ddx3x nei neuroni maschili influenza il proteoma neuronale. Come in B, neuroni Ddx3x+/- e Ddx3x+/+ a confronto. Vedi Dati Supplementari 1. E Le proteine con espressione aumentata nei neuroni femminili convergono nell'elaborazione dell'RNA e nella traduzione dell'mRNA. Termini GO arricchiti per proteine sovraregolate (rosso) o sottoregolate (blu) nei neuroni Ddx3x+/+ rispetto ai neuroni Ddx3x+/y (numero di geni in ciascun termine sull'asse Y; linea tratteggiata bianca, valore P = 0,05). F Le proteine con espressione ridotta nei neuroni Ddx3x aploinsufficienti convergono nell'elaborazione dell'RNA e nella traduzione dell'mRNA. Come in

E, per proteine sovraregolate (rosso) o sottoregolate (blu) nei neuroni Ddx3x+/- rispetto ai neuroni Ddx3x+/+ . G Le proteine disregolate nei neuroni aploinsufficienti Ddx3x sono coinvolte nella traduzione dell'mRNA. Proteine (indicate dai nomi dei geni) sottoregolate (blu) o sovraregolate (rosso) nei neuroni Ddx3x+/- rispetto ai neuroni Ddx3x+/+. Creato in BioRender104. H-I L'aploinsufficienza Ddx3x modifica il proteoma sinaptico. Grafico a vulcano (H) e grafico di arricchimento SynGO55 (I) dei dati proteomici sui sinaptosomi di topi P21 Sox2-Ddx3x+/+ o Sox2-Ddx3x+/- . FC, variazione di piega; linea tratteggiata grigia, valore P = 0,05. In tutti i pannelli, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto al genotipo e al sesso; n è mostrato nella legenda come numero di embrioni (BD) o topi P21 (H). Vedi Dati Supplementari 2. L'aploinsufficienza di Ddx3x annulla il bias femminile nell'espressione di 17 proteine. Il grafico mostra la variazione di espressione per le proteine elencate sull'asse Y confrontando i neuroni Ddx3x+/+ con quelli Ddx3x+/y o quelli Ddx3x+/- con quelli Ddx3x+/y, sulla base dei dati in B-D. Proteine indicate dai nomi dei geni; linea tratteggiata grigia, espressione di riferimento nei neuroni Ddx3x+/y. Vedi Dati Supplementari 3. I dati sorgente sono forniti come file di dati sorgente.

Sinaptosomi Ddx3x+/- (Fig. 4H). È stato riscontrato che Ddx3x è espresso nelle sinapsi in linea con un precedente set di dati proteomici sinaptici⁵⁴ e, come previsto, la sua espressione è stata ridotta nei sinaptosomi Ddx3x+/- (Fig. 4H, Dati supplementari 2). Come previsto, le proteine differenzialmente espresse sono risultate arricchite in termini sinaptici (Fig. 4I), poiché 114 delle 346 proteine disregolate nei sinaptosomi Ddx3x+/- erano proteine sinaptiche autentiche, come definito dal consorzio SynGO55. Abbiamo quindi incrociato l'elenco dei geni che codificano le 498 proteine differenzialmente espresse con i geni DDG2P49, i geni ASC50 e i geni EPI51-53, e abbiamo riscontrato un arricchimento statisticamente significativo per i geni DDG2P (Fig. S3D). 84 sono stati codificati dai geni DDG2P, 9 dai geni ASC (4 dei quali catturati anche da DDG2P: Psm12, Nr1n1, Scn2a e Plxn1) e 3 dai geni EPI (tutti e 3 catturati dai geni DDG2P: Ube3a, Eef1a2 e Scn2a). All'intersezione tra le proteine espresse in modo differenziale, i geni SynGO stabilizzati e i geni di rischio per le malattie sono regolatori critici della funzione sinaptica, tra cui Dlg3, Nr1n1, Nr1n2, Scn2a, Cntnap2 e Rac1. Incrociando l'elenco delle proteine disregolate nei sinaptosomi Ddx3x+/- (Fig. 4H) e nei neuroni (Fig. 4C), abbiamo trovato 19 proteine condivise oltre a Ddx3x, tra cui Rpl22a e Ccdc88a (nota anche come Girdin)

(Figura S3E).

Questi dati mappano i correlati molecolari dei deficit nella morfogenesi neuronale (Fig. 1, 2) e nelle spine dendritiche (Fig. 3) causati da perturbazioni in Ddx3x e mostrano che ci sono firme Ddx3x specifiche per sesso, tra cui alterazioni delle proteine ribosomiali e dei regolatori traduzionali esclusivamente nei neuroni femminili.

Ddx3x media i dimorfismi sessuali nella biogenesi dei ribosomi neuronali. Rispetto ai neuroni maschili, i neuroni femminili richiedono un dosaggio maggiore di Ddx3x, poiché si è evoluto come gene di fuga del cromosoma X24,29,31. I neuroni femminili mostrano anche una maggiore espressione di componenti del macchinario di sintesi proteica (Fig. 4B-E). I neuroni Ddx3x+/- presentano un'espressione ridotta delle proteine ribosomiali rispetto ai neuroni di controllo femminili (Fig. 4C-F). Pertanto, abbiamo ipotizzato che Ddx3x possa mediare il surplus di componenti della sintesi proteica, prevalentemente femminile.

Per testare questa ipotesi, abbiamo verificato se la maggiore espressione proteica nei neuroni femminili richieda la presenza di Ddx3x. Abbiamo iniziato intersecando le proteine con livelli alterati nei neuroni Ddx3x+/- (Fig. 4C) con quelle che mostravano un'espressione differenziale in base al sesso (Fig. 4B) e identificato 37 proteine (Dati supplementari 3). Abbiamo quindi filtrato per le proteine che presentavano un'espressione almeno del 30% superiore nei neuroni femminili rispetto a quelli maschili ($\text{ExpressionDdx3x+/-}/\text{ExpressionDdx3x+/+} > 1,3$) e identificato 20 proteine. Di queste 20, 17 presentano livelli di espressione simili confrontando i neuroni femminili aploinsufficienti con i neuroni maschili di controllo ($\text{ExpressionDdx3x+/-}/\text{ExpressionDdx3x+/+} = 1 \pm 0,15$), indicando che la carenza di Ddx3x annulla la loro inclinazione all'espressione femminile (Fig. 4J, Dati supplementari 3). Sei di queste proteine sono

downregolate nei sinaptosomi Sox2-Ddx3x+/- (Auh, Tufm, Naxd, Acad8, Farsb e Tfam). Sei proteine sono inoltre codificate da geni i cui ortologhi umani sono geni DDG2P (TUFM, TFAM, NUP133, NAXD, FARSB e AUH) e una (TUFM) mostra un'espressione maggiore nelle corteccie umane di donatori femminili rispetto ai tessuti di donatori maschili (Fig. S3B).

Le restanti tre proteine (Rbm4b, Pds5b, Ssbp1) non soddisfano questi rigorosi criteri, ma mostrano un'attenuazione della loro inclinazione al sesso (Dati Supplementari 3). Delle 17 proteine con espressione orientata al sesso femminile, cinque sono implicate nella traduzione dell'mRNA (Tufm, Rps3, Rpl11, Mrpl24, Farsb) e altre quattro sono proteine che legano l'RNA (Igf2bp1, Hnrmpf, Celf3, Auh). Rps3 e Rpl11 sono state rilevate anche in un dataset DDX3X iCLIP43.

Questi dati suggeriscono che i neuroni femminili presentano una maggiore espressione di una serie di regolatori ribosomiali e traslazionali e che questa predisposizione femminile dipende dall'espressione biallelica di Ddx3x.

Abbiamo poi cercato di verificare se questa firma si traducesse in variazioni nei tassi globali di sintesi proteica. A tal fine, abbiamo eseguito un test basato sulla puromicina adattato dalla tecnica SUnSET^{56,57}. Abbiamo trasdotti neuroni corticali DIV0 da embrioni Ddx3x+/+, Ddx3x+/flox o Ddx3x+/y E15 con particelle virali AAV8-Ef1a-mCherry-IRES-Cre. A DIV9, abbiamo eseguito un impulso con puromicina di 10 minuti seguito da un inseguimento di 30 minuti (Fig. S5A). Questo approccio si è rivelato efficace nel rilevare proteine di nuova sintesi, come dimostrato dall'incorporazione di puromicina abrogata nei neuroni trattati con l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide prima dell'impulso (Fig. S5A, B). Confrontando i tre genotipi, non abbiamo rilevato differenze significative nella marcatura con puromicina (Fig. S5B, C), il che suggerisce che con questo approccio non sono rilevabili cambiamenti evidenti nella sintesi proteica globale.

Abbiamo ipotizzato che la predisposizione femminile Ddx3x-dipendente potesse riflettere aspetti più complessi della formazione dei ribosomi, che subisce sofisticate forme di regolazione nelle cellule neurali^{21,58}. Pertanto, abbiamo misurato l'abbondanza e la distribuzione subcellulare dell'RNA ribosomiale (rRNA). Utilizzando un anticorpo monoclonale prodotto contro l'rRNA 5.8S (clone Y10b58-65), abbiamo quantificato l'rRNA nella corteccia motoria in via di sviluppo di neonati Sox2-Ddx3x+/+, Sox2-Ddx3x+/- o Sox2-Ddx3x+/y (Fig. 5A).

Sulla base di precedenti osservazioni di neuroni corticali dello strato V alterati che esprimono il fattore di trascrizione CTIP2 nelle femmine Sox2-Ddx3x+/-²⁴, abbiamo condotto analisi sia nei neuroni CTIP2+ che nelle cellule CTIP2- adiacenti (Fig. 5A-C). Indipendentemente dal genotipo, la maggior parte dell'rRNA è stata rilevata nel citoplasma (Fig. 5B, C), come in precedenti rapporti⁵⁸⁻⁶¹. Nei neuroni CTIP2+, il rapporto citoplasma-nucleo dell'rRNA era di circa l'87:13% nelle femmine Sox2-Ddx3x+/+, ma scendeva a circa il 75:25% sia nei topi Sox2-Ddx3x+/- che Sox2-Ddx3x+/y (Fig. 5B). Il rapporto è stato rilevato a circa il 75:25% nelle cellule CTIP2-, indipendentemente dal genotipo (Fig. 5C). Queste osservazioni suggeriscono che i neuroni femminili potrebbero avere un diverso tasso di maturazione ribosomiale, specificamente nei neuroni CTIP2+, e che questa differenza di genere dipenda da Ddx3x. Notiamo che Rpl11 è tra le proteine ribosomiali con maggiore espressione nei neuroni femminili, ma con livelli ridotti nei neuroni aploinsufficienti Ddx3x (Fig. 4J,

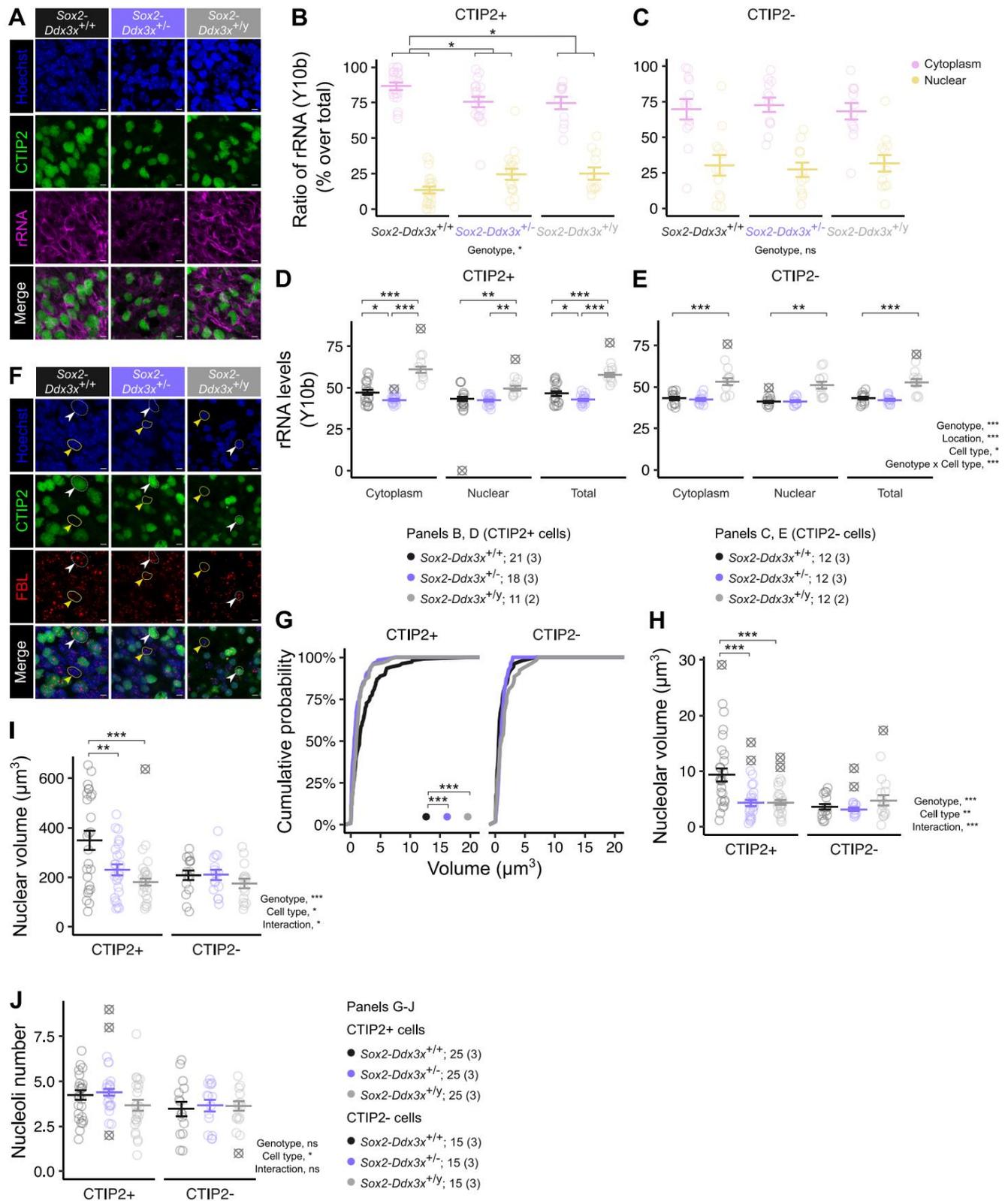


Fig. S4B, C) e che questa proteina ha un ruolo critico nell'assemblaggio pre-ribosomiale^{66,67}.

Quantificando l'espressione media di rRNA, i neuroni maschili presentavano livelli complessivamente più elevati di rRNA rispetto ai neuroni femminili, sia per le cellule CTIP2+ che CTIP2- (Fig. 5D, E). Insieme al rapporto citoplasma-nucleo, questi risultati suggeriscono differenze di genere nella biogenesi dei ribosomi, dove tassi più elevati di esportazione/maturazione dei ribosomi sono preferiti in

Neuroni CTIP2+ nelle femmine e una maggiore produzione complessiva di ribosomi sono più favorevoli nei maschi. Inoltre, i neuroni CTIP2+ dei neonati *Sox2-Ddx3x^{+/-}* presentano una riduzione netta di circa il 15% dell'rRNA (Fig. 5D). Queste osservazioni suggeriscono che le mutazioni di *Ddx3x* nei neuroni sono associate a un'espressione alterata dell'rRNA e a deficit ribosomiali.

Poiché la biogenesi canonica dei ribosomi avviene nel nucleolo, abbiamo ipotizzato che il sesso e il dosaggio di *Ddx3x* potessero alterare i nucleoli. Per testare

Fig. 5 | Ddx3x media una predisposizione femminile nella biogenesi dei ribosomi. A–E Ddx3x regola la dinamica dei ribosomi nei neuroni corticali che esprimono CTIP2. A Immagini confocali dello strato V della corteccia motoria primaria in via di sviluppo di neonati Sox2-Ddx3x+/+ (nero), Sox2-Ddx3x+/- (viola) e Sox2-Ddx3x+/- (grigio) immunocolorati per CTIP2 (verde), rRNA (magenta, anticorpo Y10b58–65) e Hoechst (blu). Barra di scala, 5 μ m. B, C I grafici mostrano la percentuale di rRNA nel citoplasma (rosa) o nel nucleo (giallo) rispetto all'rRNA totale nelle cellule CTIP2+ (B) o CTIP2- (C). D–E I grafici mostrano i livelli citoplasmatici, nucleari e totali di rRNA (come immunofluorescenza media Y10b) nelle cellule CTIP2+ (D) o CTIP2- (E). F–H Ddx3x regola le proprietà nucleolari nei neuroni corticali che esprimono CTIP2. Immagine rappresentativa dello strato V nella corteccia motoria primaria in via di sviluppo da neonati Sox2-Ddx3x+/+, Sox2-Ddx3x+/- e Sox2-Ddx3x+/- colorati per Hoechst (blu), CTIP2 (verde), fibrillarina (rosso) e sesso; media \pm errore standard (SEM); valori anomali indicati come \ddagger ; Punta di freccia bianche, esempio di neuroni CTIP2+; punte di freccia gialle, esempio di

Cellule CTIP2-. Barra di scala, 5 μ m. G–H Funzione di distribuzione cumulativa empirica del volume dei nucleoli (G) e volume totale di tutti i nucleoli per cellula (H). I I nuclei dei neuroni CTIP2+ sono più grandi nei neuroni femminili, ma non se hanno espressione monoallelica Ddx3x. Il grafico mostra il volume nucleolare totale per cellula. J Il numero di nucleoli non differisce in base al genotipo. Il grafico mostra il numero medio di nucleoli per cellula. Statistiche: Pannelli B, C, ANOVA a un fattore, seguita da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannelli D, E, ANOVA a tre fattori, seguita da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannelli G, test di Kolmogorov-Smirnov; Pannelli H, I, ANOVA a due fattori, seguita da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Panel J, test di Kruskal-Wallis, seguito da test di Wilcoxon con correzione di Benjamini-Hochberg. In tutti i panel, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto al genotipo e sesso; media \pm errore standard (SEM); valori anomali indicati come \ddagger ; *valore di $p < 0,05$, **valore di $p < 0,01$, ***valore di $p < 0,001$. I dati sorgente sono forniti come file dati

Per questa ipotesi, abbiamo esaminato il numero e il volume dei nucleoli nei neuroni corticali della corteccia motoria in via di sviluppo di neonati Sox2-Ddx3x+/+, Sox2-Ddx3x+/- e Sox2-Ddx3x+/- utilizzando il marcatore nucleolare fibrillarina59,62,68 (Fig. 5F). Rispetto alle loro controparti maschili, i neuroni femminili CTIP2+ presentavano in media nucleoli più grandi (Fig. 5G) e un volume nucleolare totale maggiore (Fig. 5H), senza variazioni nel numero di nucleoli (Fig. 5J). I neuroni femminili CTIP2+ presentavano anche nuclei più grandi rispetto ai neuroni maschili e ai neuroni femminili aploinsufficienti (Fig. 5I). La specificità di queste differenze per i neuroni CTIP2+ va di pari passo con la tendenza femminile dipendente da Ddx3x a una maggiore ripartizione dei ribosomi citoplasmatici (Fig. 5B, C), corroborando il fatto che la biogenesi dei ribosomi differisce nei neuroni femminili e maschili attraverso percorsi che dipendono dall'espressione biallelica di Ddx3x.

Abbiamo esaminato le misure nucleolari anche nei neuroni corticali coltivati in vitro, che esprimono principalmente CTIP2 (Fig. S6A). Abbiamo scoperto che la predisposizione femminile Ddx3x-dipendente si manifestava nel numero di nucleoli e che i neuroni Ddx3x-/y non mostravano variazioni nei nucleoli rispetto ai controlli maschili (Fig. S6B–F). Notiamo che, sebbene vi sia convergenza in una firma nucleolare Ddx3x-dipendente ex vivo (Fig. 5) e in vitro (Fig. S6B–F), la natura di questa firma differisce. Queste differenze potrebbero derivare dal fatto che la delezione di Ddx3x nel sistema in coltura si verifica a E15, plausibilmente in fase post-mitotica, mentre inizia alla gastrulazione (quindi anche nei progenitori neurali) nei topi Sox2-Ddx3x+/+.

Nel complesso, questi dati mostrano che l'espressione biallelica di Ddx3x nei neuroni femminili è necessaria per conferire caratteristiche di dimorfismo sessuale e che l'aploinsufficienza di Ddx3x determina deficit nelle proprietà nucleolari e nella biogenesi dei ribosomi.

DDX3X e il suo paralogo DDX3Y hanno funzioni solo parzialmente ridondanti nello sviluppo neuronale. I dati finora mostrano che Ddx3x modella la differenziazione sessuale durante lo sviluppo neuronale. Ciò potrebbe derivare da un'espressione sbilanciata con Ddx3y e/o da proprietà molecolari divergenti. Per eliminare il dosaggio come variabile e valutare formalmente la ridondanza funzionale, abbiamo espresso esogenamente DDX3X umano (hDDX3X) o DDX3Y (hDDX3Y) in neuroni Ddx3x+/y (Fig. 6A). Inoltre, per verificare che i potenziali fenotipi indotti da hDDX3X potessero essere circoscritti alle sue funzioni catalitiche, abbiamo utilizzato un mutante ATPasi-deficiente (E348Q)69–71 (Fig. 6A).

Neuroni corticali sono stati isolati da embrioni E15 Ddx3x+/y e trasferiti con pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre con o senza vettori di espressione marcati con hDDX3X, hDDX3Y o hDDX3X-E348Q (Fig. 6A). Questa manipolazione genetica ha prodotto neuroni aploinsufficienti mCherry+ sparsi (Ddx3x+/y), neuroni aploinsufficienti mCherry+ HA+ co-esprimenti hDDX3X (Ddx3x+/y/hDDX3X), neuroni aploinsufficienti mCherry+ HA+ co-esprimenti hDDX3X ATPasi-deficiente (Ddx3x+/y/E348Q), o neuroni aploinsufficienti mCherry+ FLAG+ co-esprimenti hDDX3Y (Ddx3x+/y/hDDX3Y) (Fig. 6A, B). Abbiamo poi esaminato lo sviluppo dendritico e le proprietà nucleolari, in linea con il progetto delle nostre analisi precedenti (Fig. 1, 2, 5, Fig. S6B–F).

Abbiamo scoperto che hDDX3X o hDDX3Y alleviavano i deficit dendritici osservati nei neuroni Ddx3x+/y (Fig. 6B, C). La co-espressione di hDDX3X o hDDX3Y aumentava significativamente il volume nucleolare (Fig. 6D–F), ma aveva effetti divergenti sul numero di nucleoli (Fig. 6G). Infatti, Ddx3x+/y/hDDX3Y mostrava un numero di nucleoli paragonabile a quello dei neuroni Ddx3x+/y, ma Ddx3x+/y/hDDX3X presentava una riduzione significativa rispetto a tutti gli altri genotipi (Fig. 6G). La mancanza di effetto di hDDX3Y sul numero di nucleoli è compatibile con la mancanza di un fenotipo nucleolare nei neuroni Ddx3x-/y (Fig. S6). Le caratteristiche nucleari sono rimaste inalterate in tutti i genotipi (Fig. 6H). La co-espressione di hDDX3X-E348Q non ha avuto alcun effetto su nessuna delle misure (Fig. 6B, C).

Considerando che il nucleolo è un organello con fasi separate, i nostri dati sono in linea con le prove precedenti che dimostrano che i DDX3X e DDX3Y umani hanno distinte propensioni alla LLPS^{15,18,19}.

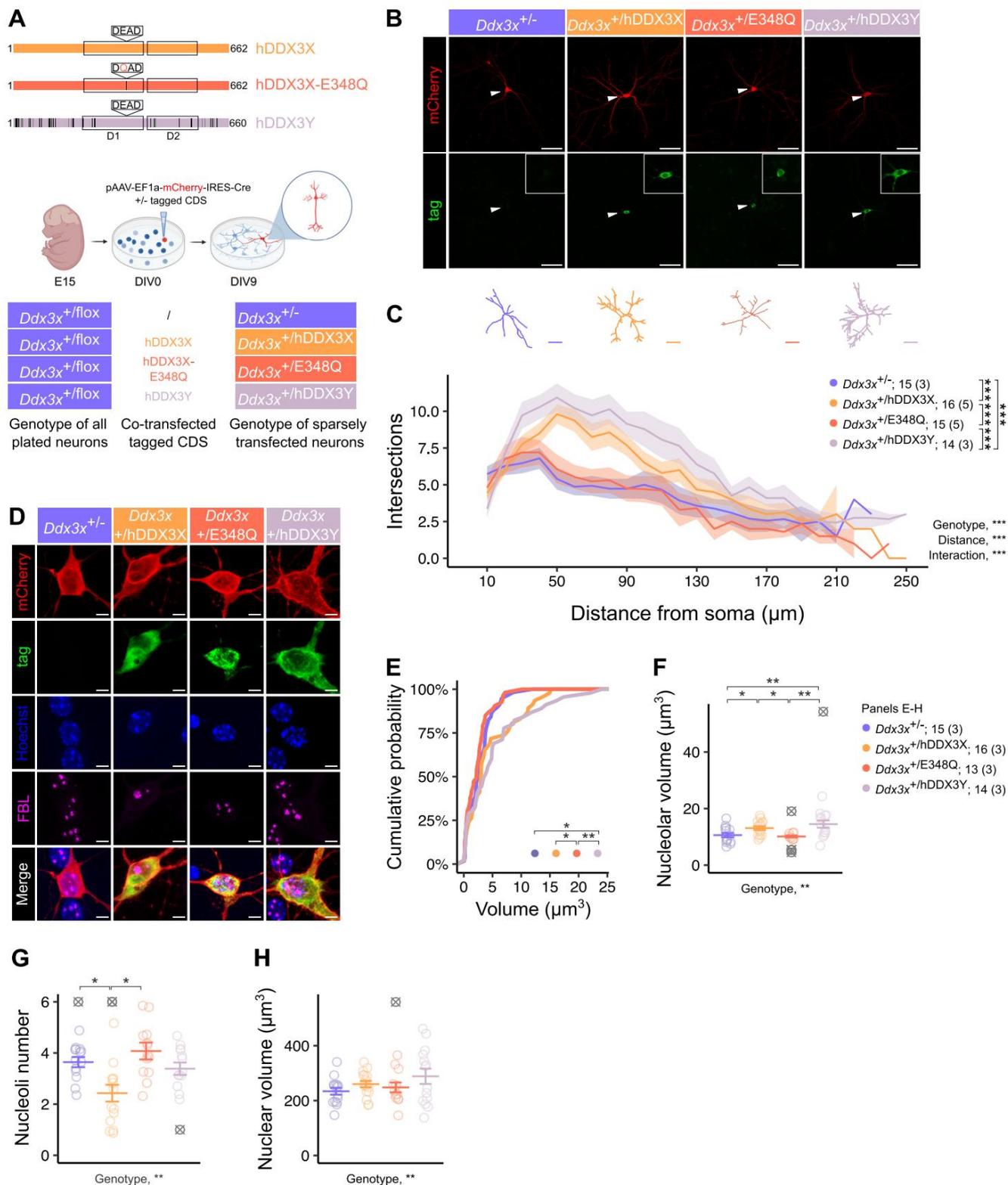
Questa serie di risultati dimostra che è necessaria un'attività catalitica intatta affinché DDX3X regoli la morfogenesi neuronale e la dinamica nucleolare e che l'equilibrio tra DDX3X e DDX3Y risiede sia nella loro espressione che nella loro funzione.

La perdita di Ddx3x nel proencefalo provoca ritardi nello sviluppo e deficit motori nell'adulto. Abbiamo quindi

cercato di valutare se l'interazione tra dosaggio di Ddx3x e sesso osservata a livello molecolare e cellulare si traducesse in risultati comportamentali.

Il knockout completo di Ddx3x è incompatibile con la vita nei topi maschi^{24,26}, mentre le femmine Sox2-Ddx3x+/y presentano ritardi motori postnatali, deficit motori in età adulta, iperattività, comportamenti ansiosi e deficit cognitivi²⁴. Per poter confrontare topi mutanti maschi e femmine, abbiamo selezionato un modello knockout di Ddx3x condizionato al proencefalo, basato su osservazioni cliniche^{2,3,5} e su evidenze in modelli murini^{3,12,24} (inclusi quelli presentati qui) che dimostrano come i neuroni del proencefalo siano particolarmente vulnerabili alle mutazioni di DDX3X. Abbiamo incrociato la linea Ddx3x^{fl} con una linea driver Emx1-IRES-Cre che esprime la ricombinasi CRE sotto il promotore endogeno Emx1 nel telencefalo già a partire da E10.5^{72,73}. Abbiamo ottenuto quattro genotipi: femmine di controllo Emx1-Ddx3x+/y, femmine aploinsufficienti Emx1-Ddx3x+/-, maschi di controllo Emx1-Ddx3x+/y e maschi nulli Emx1-Ddx3x-/y. Come previsto, i maschi nulli Emx1-Ddx3x-/y mostrano perdita di DDX3X nel proencefalo, ma non nel mesencefalo o nel rombencefalo (Fig. 7A). I mutanti Emx1-Ddx3x sono nati con il rapporto mendeliano previsto, non hanno mostrato una ridotta vitalità dalla nascita al 21° giorno postnatale e sono sopravvissuti fino all'età adulta.

I maschi nulli Emx1-Ddx3x-/y hanno mostrato un ritardo di crescita nelle prime quattro settimane di vita (Fig. 7B), che si è poi normalizzato in età adulta (Fig. 7C). I maschi nulli Emx1-Ddx3x-/y non hanno mostrato ritardi significativi nello sviluppo fisico (Fig. S7), sensoriale (Fig. S8) o motorio (Fig. S9), ma hanno mostrato un ritardo statisticamente significativo nell'eruzione del dente superiore (Fig. S7D), e l'acquisizione di capacità motorie come la forza di presa (Fig. S9E) e il raddrizzamento in aria (Fig. S9F) ha mostrato una traiettoria distinta nel tempo. La traiettoria di sviluppo delle femmine eterozigoti Emx1-Ddx3x+/y era per lo più indistinguibile da quella dei loro compagni di cucciolata di controllo (Fig. 7B, Fig. S7–9), ad eccezione dello sviluppo precoce dell'arto anteriore.



riflesso di prensione che ha poi raggiunto un plateau (Fig. S8B). Inoltre, sia i topi giovani *Emx1-Ddx3x^{-/-}* che *Emx1-Ddx3x^{+/-}* hanno mostrato lievi cambiamenti indicativi di un'andatura più ampia, che si sono manifestati a P22 nei topi *Emx1-Ddx3x^{+/-}* e solo a P30 nei maschi *Emx1-Ddx3x^{-/-}* (Fig. S10). Ciò è in contrasto con quanto precedentemente osservato nei topi *Sox2-Ddx3x^{+/-}*, che hanno mostrato una riduzione dei parametri orizzontali e diagonali a P22, risolta a P30-24. Nel complesso, questi dati indicano che i ritardi di sviluppo precedentemente riportati nel modello globale *Sox2-Ddx3x* si

non dipendono esclusivamente dal proencefalo e che tuttavia esiste un'interazione tra sesso e genotipo e/o un effetto complesso del dosaggio, poiché alcuni fenotipi vengono rilevati nelle femmine aploinsufficienti ma non nei maschi nulli (Fig. S8B, S10).

Tra i fenotipi clinicamente più salienti osservati nel modello murino *Sox2-Ddx3x* vi sono ritardi motori e scarsa coordinazione motoria ed equilibrio²⁴, che ricordano le manifestazioni motorie pervasive negli individui con sindrome *DDX3X2,3,5*. Inoltre, la corticopontina

Fig. 6 | Le funzioni di DDX3X nella dendritogenesi e nella biogenesi dei ribosomi dipendono dalla sua attività catalitica e sono parzialmente ridondanti con DDX3Y.

A Disegno sperimentale. I neuroni corticali vengono isolati da embrioni Ddx3x+/flox E15 e trasfettati al DIV0 con il costrutto contenente mCherry e CRE, con o senza il vettore di espressione contenente la sequenza codificante (CDS) di DDX3X umano selvatico (hDDX3X; marcato con HA; arancione), mutante E348Q con deficit di ATPasi (hDDX3X-E348Q; marcato con HA; corallo) o DDX3Y (hDDX3Y; marcato con FLAG; viola chiaro; residui non identici a hDDX3X mostrati in grigio). Le analisi vengono eseguite al DIV9. Creato in BioRender103. B Validazione delle manipolazioni Ddx3x. Immagini confocali dei neuroni DIV9 immunocolorate per mCherry (rosso) e marcato con HA/FLAG (verde). Barra di scala, 50 μ m. I deficit di arborizzazione dendritica causati dall'aploinsufficienza di Ddx3x sono alleviati da DDX3X o DDX3Y, ma non da un DDX3X con deficit di ATPasi. Il grafico mostra il numero di punti di ramificazione in funzione della distanza dal soma nei neuroni DIV9. Tracce rappresentative sono mostrate in alto.

Barra di scala, 50 μ m. D DDX3X o DDX3Y differiscono nel loro impatto sulle proprietà nucleolari,

mentre DDX3X con deficit di ATPasi non ha effetto. Immagini confocali di neuroni DIV9 immunocolorati per mCherry (rosso), CTIP2 (verde), tag HA/FLAG (verde) e Hoechst (blu). Barra di scala, 5 μ m. E, F L'espressione di DDX3X o DDX3Y induce nucleoli più grandi, mentre DDX3X con deficit di ATPasi non ha impatto. Il grafico mostra la funzione di distribuzione cumulativa empirica del volume dei nucleoli (E) o il volume totale di tutti i nucleoli (F). G DDX3X, ma non DDX3Y, influenza il numero di nucleoli. Il grafico mostra il numero totale di nucleoli per cellula. H L'espressione di DDX3X o DDX3Y non altera il volume nucleare. Il grafico mostra il volume nucleare totale per cellula. Statistiche: Pannello C, ANOVA a misure ripetute, seguito da test di Tukey con correzione di Benjamini-Hochberg; Panel F e H: ANOVA a un fattore, seguita da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg; Panel E: test di Kolmogorov-Smirnov; Panel G: test di Kruskal-Wallis, seguito da test di Wilcoxon con correzione di Benjamini-Hochberg. In tutti i panel, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto a genotipo e sesso; media \pm errore standard medio (SEM); valori anomali indicati come \bar{y} ; *valore P < 0,05, **valore P < 0,01, ***valore P < 0,001. I dati sorgente sono forniti come file dati sorgente.

I neuroni, coinvolti in circuiti motori critici, presentano alterazioni dendritiche in caso di mutazione di Ddx3x (Fig. 2). Pertanto, abbiamo valutato la funzione motoria nella linea mutante Emx1-Ddx3x. Durante la manipolazione, una settimana prima del test comportamentale, non abbiamo notato differenze nell'aspetto fisico o nel peso (Fig. 7C). In termini di attività basale, abbiamo osservato una riduzione delle prestazioni allo schermo invertito per i mutanti Emx1-Ddx3x+/- e Emx1-Ddx3x-/y rispetto ai controlli (Fig. 7D), e una riduzione del numero di salti durante il monitoraggio dell'attività spontanea per le femmine Emx1-Ddx3x+/- (Fig. S11B), ma nessun'altra variazione (Fig. S11A, S11C–E).

Per valutare la forza neuromuscolare, abbiamo utilizzato un test di sospensione al filo (Fig. 7E, F). Abbiamo rilevato un effetto significativo del genotipo sulle prestazioni, con i maschi nulli Emx1-Ddx3x-/y che mostravano una ridotta latenza alla caduta dal filo rispetto ai maschi della stessa cucciolata (Fig. 7E), simile alla ridotta resistenza osservata nei topi Sox2-Ddx3x+/-²⁴. Per valutare la coordinazione motoria e l'equilibrio, abbiamo utilizzato un test della trave di equilibrio e un test del palo verticale. Camminando sulla trave di equilibrio, le femmine di controllo coprivano una distanza maggiore sulla trave (Fig. 7G) rispetto ai maschi della stessa cucciolata, plausibilmente a causa del loro peso corporeo inferiore (Fig. 7C). In linea con le osservazioni nei topi Sox2-Ddx3x+/-²⁴, Emx1-Ddx3x+/- coprivano una distanza minore sulla trave rispetto alle femmine di controllo della stessa cucciolata (Fig. 7G). Non sono state notate differenze nel numero di slittamenti o nella latenza (Fig. S12A, B). Non sono state osservate differenze di sesso o genotipo quando i topi scendevano da un'asta verticale (Fig. S12C, D), in contrasto con precedenti riscontri di compromissioni in questo compito motorio nei topi Sox2-Ddx3x+/-²⁴. Per testare ulteriormente la coordinazione e la resistenza motoria e approfondire l'apprendimento motorio, abbiamo utilizzato il test del rotarod in accelerazione, con un disegno di quattro prove al giorno, per tre giorni. In linea con i risultati del test della trave di equilibrio (Fig. 7G), le femmine di controllo hanno ottenuto risultati migliori rispetto ai maschi della stessa cucciolata (Fig. 7H). Sebbene le femmine Emx1-Ddx3x+/- siano state in grado di apprendere il compito, hanno mostrato prestazioni ridotte rispetto alle femmine di controllo (Fig. 7H). I maschi Emx1-Ddx3x-/y hanno mostrato sia un apprendimento che una coordinazione compromessi rispetto ai maschi di controllo (Fig. 7H).

Queste osservazioni sono coerenti con i difetti nei neuroni cortico-pontini (Fig. 2), indicano che la carenza di Ddx3x nel proencefalo è sufficiente a produrre sequele motorie che ricordano quelle riscontrate nella popolazione di pazienti⁷⁴ e riaffermano le complesse interazioni sesso-dosaggio per il locus Ddx3x.

Discussione

In virtù della sua natura di sfuggito all'inattivazione del cromosoma X²⁹, DDX3X è uno dei 15 geni con maggiore espressione femminile nella corteccia umana³⁰ (Fig. S3) e una delle 5 proteine con maggiore espressione nei neuroni corticali murini femminili (Fig. 4B, Dati supplementari 1). Nonostante il drammatico decadimento del cromosoma Y durante l'evoluzione, DDX3X e altri 18 geni sfuggiti hanno mantenuto omologhi Y³², suggerendo che l'equilibrio tra i partner X e Y (o la sua assenza) contribuisce a modellare i dimorfismi sessuali^{33,35}.

Il nostro studio dimostra che Ddx3x agisce come mediatore della differenziazione sessuale durante lo sviluppo cerebrale. In primo luogo, dimostriamo che Ddx3x è necessario per l'espressione di una firma molecolare e cellulare a predominanza femminile associata alla biogenesi dei ribosomi (Figg. 4–6).

In secondo luogo, Ddx3x è indispensabile per la formazione e la maturazione delle spine dendritiche solo nei neuroni femminili, poiché le spine dei neuroni di controllo maschili o nulli sono indistinguibili (Fig. 3). In terzo luogo, le femmine di topo superano i maschi in due compiti motori, ma questo vantaggio sessuale si perde nelle femmine mutanti Ddx3x (Fig. 7). Questi dati, combinati con le evidenze presenti in letteratura, supportano uno scenario secondo cui DDX3X e DDX3Y si sono evoluti fino ad avere **funzioni solo parzialmente ridondanti**^{15,18,19}, oltre a un **pattern di espressione divergente**^{37,39,41}. Infatti, DDX3X e DDX3Y umane differiscono nelle loro proprietà catalitiche e nella propensione alla LLPS^{15,18,19}.

Coerentemente, hanno un impatto distinto sui nucleoli (Fig. 6). Inoltre, a differenza di altre coppie XY, DDX3X e DDX3Y possono regolare reciprocamente il loro dosaggio, probabilmente a causa dell'elevata sensibilità al dosaggio ereditata dal loro antenato autosomico comune⁷⁵. Infatti, in linea con dati precedenti sui modelli murini^{12,25}, rileviamo l'espressione della proteina DDX3X nei neuroni maschili quando Ddx3x è silenziato (Fig. S4A, Dati supplementari 1). Tuttavia, DDX3Y non è in grado di compensare DDX3X durante lo sviluppo neurologico, come dimostrato dai casi maschili con mutazioni patogene DDX3X^{2,3,5,8} e dalle conseguenze molecolari (Fig. 4), cellulari (Fig. 1) e comportamentali (Fig. 7) della perdita di Ddx3x nei maschi.

Le nostre osservazioni aggiungono un ulteriore livello di complessità alle alterazioni molecolari derivanti dall'aploinsufficienza DDX3X nei neuroni. Si è ipotizzato che DDX3X agisca nella fase di inizio della traduzione e faciliti la traduzione di un sottoinsieme di mRNA con 5'UTR che presentano strutture secondarie complesse attraverso la sua attività elicastica^{10,11}. I nostri dati sui neuroni mostrano firme molecolari distinte in base al sesso. La perdita di Ddx3x nei neuroni maschili determina un impatto distinto e limitato sulle proteine direttamente necessarie per la crescita dei neuriti (Fig. 4), senza alterazioni nucleolari evidenti (Fig. S6B–F). L'aploinsufficienza di Ddx3x nei neuroni femminili (Fig. 4) ha downregulation dei componenti costitutivi del macchinario di sintesi proteica (Fig. 4, Fig. S4B, C), corroborata ortogonalmente da una riduzione del volume di rRNA e nucleoli (Fig. 5). Resta da verificare se l'aploinsufficienza di Ddx3x influenzi anche l'elaborazione e la maturazione degli rRNA. I deficit ribosomiali potrebbero a loro volta alterare la sintesi di proteine specifiche necessarie per sostenere la crescita dendritica, determinando la ridotta ramificazione dendritica derivante dalle perturbazioni di Ddx3x (Fig. 1, 2).

Le implicazioni dei nostri risultati che collegano Ddx3x alla biogenesi dei ribosomi sono duplice. In primo luogo, la biogenesi dei ribosomi è regolata dinamicamente durante lo sviluppo corticale^{21,62,76} e la velocità di sintesi proteica è una caratteristica intrinseca del sottotipo neuronale corticale²³. L'evidenza di una predisposizione femminile Ddx3x-dipendente nella biogenesi dei ribosomi nei neuroni corticali che esprimono CTIP2 introduce un nuovo fattore (Ddx3x) e una nuova variabile (il sesso). Più in generale, il nostro studio si aggiunge a un panorama in continua evoluzione dei meccanismi di sintesi proteica in

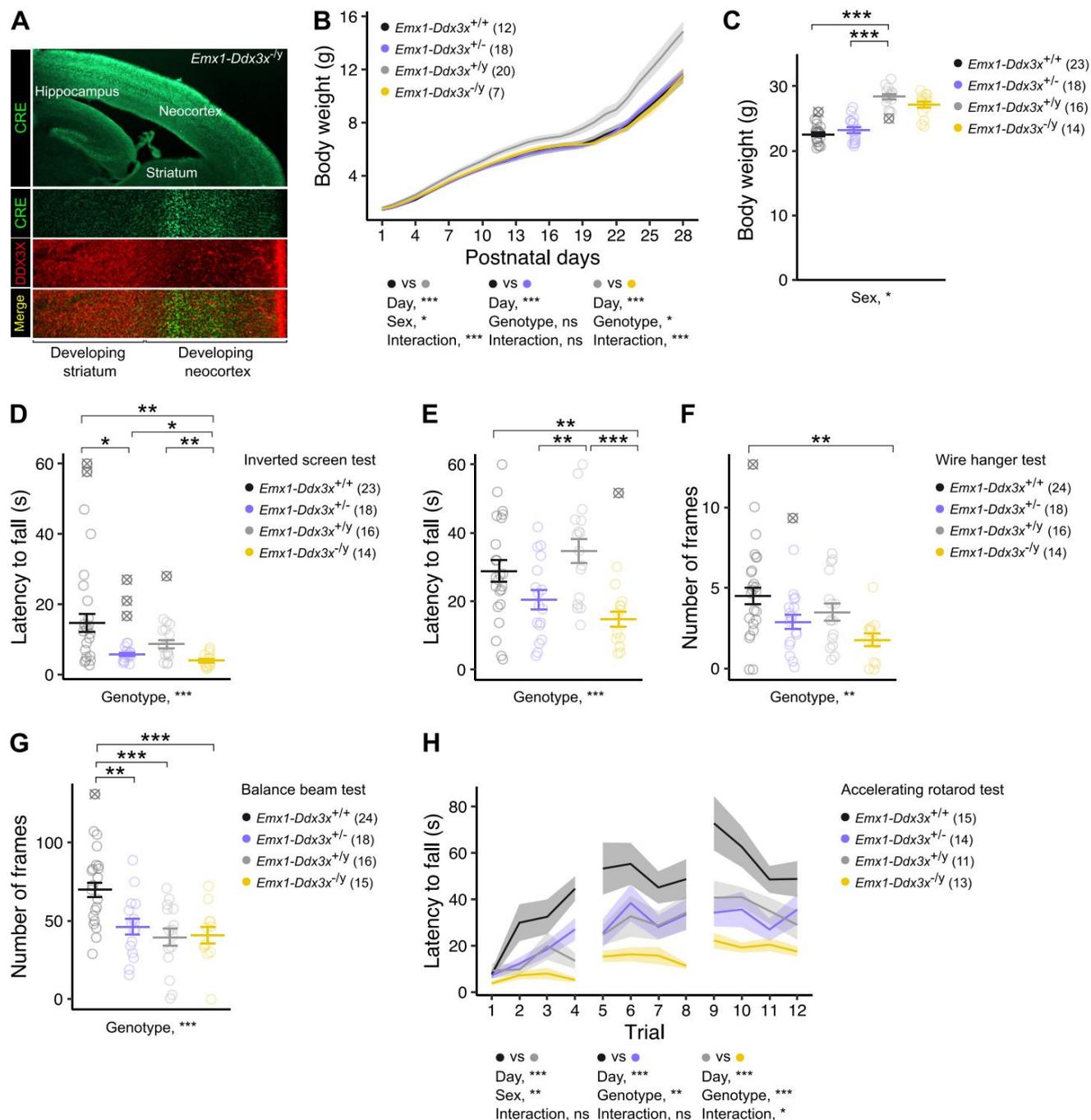


Fig. 7 | La perdita di Ddx3x nel proencefalo causa deficit motori nell'adulto. A Validazione della linea di topi knock-out Emx1-Ddx3x. Immagini confocali di una sezione E18.5 di un topo nullo Emx1-Ddx3x^{-ly}, che mostrano CRE (verde) esclusivamente nel proencefalo, con corrispondente perdita di DDX3X (rosso). I cuccioli nulli Emx1-Ddx3x presentano una crescita postnatale ritardata. Curve di crescita per femmine di controllo Emx1-Ddx3x^{+/+} (nere), femmine aploinsufficienti Emx1-Ddx3x^{+/-} (viola), maschi di controllo Emx1-Ddx3x^{+/y} (grigio) e maschi nulli Emx1-Ddx3x^{-ly} (giallo). I maschi nulli Emx1-Ddx3x non mostrano più un peso corporeo inferiore da adulti. Il grafico mostra il peso corporeo nei topi adulti nei quattro genotipi. La perdita di Ddx3x causa una presa ridotta nel test dello schermo invertito, rispetto ai controlli Emx1-Ddx3x^{+/+} femminili e Emx1-Ddx3x^{+/y} maschili. E, F La perdita di Ddx3x riduce la resistenza nel test dell'appendino, misurata dalla latenza alla caduta (E) e

Numero di frame (F). G Il sesso e il dosaggio di Ddx3x nel proencefalo influenzano la prestazione nel test della trave di equilibrio, misurata come numero di frame percorsi. H Il sesso e il dosaggio di Ddx3x nel proencefalo influenzano la prestazione su un rotarod in accelerazione, misurata come latenza alla caduta. Statistiche: Pannelli B e H, ANOVA a misure ripetute per i confronti mostrati sotto il grafico; Pannelli C, D, test di Kruskal-Wallis, seguito da test dei ranghi con segno di Wilcoxon con correzione di Benjamini-Hochberg; Pannelli E-G, ANOVA a un fattore, seguito da test t di Student con correzione di Benjamini-Hochberg. In tutti i pannelli, i dati sono stati raccolti in cieco rispetto al genotipo e al sesso; n è mostrato nella legenda come numero di topi; media ± errore standard medio (SEM); valori anomali mostrati come *; Valore P < 0,05, **Valore P < 0,01, ***Valore P < 0,001. I dati sorgente sono forniti come file Dati sorgente.

neuroni, dove i ribosomi hanno conformazioni distinte⁷⁷, co-regolatori specifici⁷⁸ e meccanismi non canonici di biogenesi⁵⁸.

In secondo luogo, una classe di condizioni genetiche causate da mutazioni nelle proteine che regolano la LLPS e che determinano alterazioni nucleolari ha

emersi⁶⁸. I nostri risultati suggeriscono che la sindrome DDX3X appartiene a questo gruppo di disturbi.

I nostri risultati hanno una rilevanza diretta per la nostra comprensione di come lo sviluppo neurologico vada storto quando DDX3X è mutato, aggiungendo

I dati clinici^{2,3,5} e funzionali^{3,12,24} indicano che i neuroni del proencefalo, in particolare nella corteccia, sono estremamente vulnerabili alle perturbazioni di DDX3X. Dimostriamo che l'espressione di Ddx3x nel proencefalo è necessaria per lo sviluppo e la funzione intatti dei neuroni coinvolti nei circuiti motori, poiché i neuroni corticopontini con deficit di Ddx3x presentano un'arborizzazione dendritica alterata (Fig. 2) e i topi mutanti Ddx3x con deficit di proencefalo presentano deficit motori, sebbene con significative differenze di sesso (Fig. 7). Dimostriamo inoltre che Ddx3x è necessario per lo sviluppo dei neuroni corticali post-mitotici, in linea con un precedente studio²⁷, ampliando così la finestra di rischio per le mutazioni di DDX3X oltre lo sviluppo prenatale^{3,12}. In particolare, la funzione sinaptica è stata individuata come uno dei principali fattori di rischio per l'ASD⁷⁹, e anche i modelli murini geneticamente modificati per l'ASD hanno mostrato deficit nello sviluppo sinaptico^{80–83}.

È importante sottolineare che la crescita dendritica, la formazione di nuove sinapsi e la maturazione delle sinapsi continuano a essere rimodellate plasticamente durante il periodo postnatale, anche in risposta all'esperienza^{84–86}, offrendo così una finestra più praticabile per l'intervento terapeutico. I nostri dati precedenti²⁴ supportano i potenziali benefici dell'intervento postnatale su topi mutanti Ddx3x. Infatti, abbiamo scoperto che i topi Sox2-Ddx3x^{+/−} di un anno di età presentano deficit motori più gravi rispetto ai topi Sox2-Ddx3x^{+/−} naïve di 4 mesi, ma questo declino non è più osservato nei topi di un anno pre-esposti all'addestramento comportamentale a 4 mesi di età. Questi dati suggeriscono che potrebbero esserci meccanismi che mantengono lo stato patologico (forse attraverso le alterazioni cellulari e molecolari sinaptiche che abbiamo riscontrato) che potrebbero essere manipolati nel periodo postnatale. Ciò potrebbe contribuire al crescente numero di prove che dimostrano come il ripristino dell'espressione/funzione di alcuni geni di rischio per i disturbi dello spettro autistico nei topi adulti possa alleviare i loro deficit molecolari e/o comportamentali^{87–91}. Studi futuri saranno fondamentali per comprendere come le alterazioni molecolari e cellulari identificate in questo studio possano essere utilizzate per lo sviluppo di nuove terapie per la sindrome DDX3X.

Metodi Linee

di topi Tutte le

procedure sugli animali sono state approvate dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali della Icahn School of Medicine al Mount Sinai.

Per generare le colture neuronali, abbiamo incrociato femmine Ddx3xflox/+ 24 con maschi Ddx3x+/y di tipo selvatico o maschi Ddx3xflox/y. Per generare i topi Ddx3x Sox2[−], le femmine Ddx3xflox/flox sono state incrociate con B6.Cg-Edil3Tg (Sox2-Cre).

Maschi 1Amc/J (Sox2-Cre/+)⁹² (The Jackson Laboratory, numero di catalogo #008454).

Per generare i topi Emx1-Ddx3x, le femmine Ddx3xflox/flox sono state incrociate con maschi emizigoti B6.129S2-Emx1tm1(cre)Krlj/J (Emx1IRES-Cre/+) 72,73 (The Jackson Laboratory, numero di catalogo #005628). La colonia è stata mantenuta in una stanza con un ciclo luce/buio di 12 ore e 12 ore, con luci accese alle 7 del mattino, a una temperatura costante di 21-22 °C e un'umidità del 55%.

Cibo standard per roditori e acqua potabile erano disponibili a volontà.

Gli animali sono stati alloggiati in gruppi, con 3-5 topi per gabbia. Lo svezzamento è avvenuto a P21. La colonia è stata mantenuta su uno sfondo di C57BL/6 J.

La genotipizzazione è descritta nella Nota integrativa.

Colture corticali primarie Le colture

sono state preparate da singoli embrioni E15 con un protocollo modificato⁹³. Le cortecce sono state isolate in soluzione salina bilanciata di Hank (HBSS) ghiacciata e quindi digerite con papaina preriscaldata contenente DNasi (Worthington, #LK003150) a 37 °C e 5% di CO₂ per 30 minuti.

I frammenti di tessuto sono stati lavati 3 volte con Neuronal Plating Medium e quindi centrifugati per 3 minuti a 400 g. La dissociazione meccanica è stata quindi eseguita in 1 ml di Neurobasal Medium preriscaldato (Thermo Fisher Scientific, n. 21103049). La densità cellulare è stata determinata con il Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific), con una resa dell'ordine di 3-4 × 10⁶ cellule per embrione.

Indipendentemente dal momento della trasfezione/infezione (vedi sotto), le cellule sono state mantenute nel Neuronal Plating Medium e 90 minuti dopo la semina, il terreno è stato sostituito con Neurobasal Plus preriscaldato (Thermo Fisher Scientific, n. A3582901) addizionato con B27 Plus (Thermo Fisher Scientific,

#A3582801). Al DIV4, le cellule sono state trattate con 1 μM di citosina arabinoside (1-bD-arabinofuranosilcitosina) (Sigma-Aldrich Inc, #C1768). La genotipizzazione è descritta nella Nota Integrativa.

Trasfezioni di DNA. Per

le analisi di arborizzazione dendritica in Fig. 1, 2 × 10⁵ cellule sono state incubate per 1 ora in 50 μl di Neurobasal contenente 0,5 μl di Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, n. 11668019) e 500 ng di pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre (Addgene, n. 55632) in provette coniche da 1,5 ml subito prima della semina (DIV0) e quindi seminate su coprioggetto rivestiti di poli-L-isina in piastre da 24 pozzetti contenenti Neuronal Plating Medium. I coprioggetto sono stati fissati (vedi sotto) a DIV9. Per l'analisi delle spine dendritiche (Fig. 3), 1,5 × 10⁵ neuroni sono stati piastrati a DIV0 su coprioggetto rivestiti di poli-L-isina in piastre da 24 pozzetti contenenti terreno di coltura neuronale e quindi transfettati a DIV9 aggiungendo 100 μl di Neurobasal contenente 0,75 μl di Lipofectamina e 500 ng di pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre direttamente su ciascun pozzetto. I coprioggetto sono stati fissati (vedi sotto) a DIV14. Per le analisi in Fig. 6, le cellule DIV0 2 × 10⁵ sono state incubate per 1 ora in 100 μl di Neurobasal contenente 0,5 μl di Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, n. 11668019) e 500 ng di pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre (Addgene, n. 55632) con o senza pCI-Neo-HA-DDX3X, pCI-Neo-HA-DDX3X-DQAD (E348Q) o pTWIST-CMV-FLAG-DDX3Y, in provette coniche da 1,5 ml e quindi seminate su coprioggetto rivestiti di poli-L-isina in piastre da 24 pozzetti contenenti Neuronal Plating Medium. I coprioggetto sono stati fissati (vedi sotto) a DIV9. Per l'analisi dei nucleoli in Figura S6, 2 × 10⁵ cellule DIV0 sono state incubate per 1 ora in 100 μl di Neurobasal contenente 0,5 μl di Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific, n. 11668019) e 500 ng di pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre o 500 ng di un pAAV-Ef1a-mCherry di controllo (Addgene, n. 114470). I coprioggetto sono stati fissati (vedi sotto) a DIV9.

Trasduzioni di virus adeno-associati. Per le analisi in

Fig. 4, 10⁶ cellule sono state piastrate direttamente su piastre Petri da 35 mm rivestite con poli-L-isina contenenti terreno di coltura Neuronal Plating Medium, e le cellule sono state quindi trasdotte con 1 μl di AAV8-Ef1a-mCherry-IRES-Cre (Addgene, #55632-AAV8, 1 × 10¹³ vg/ml, molteplicità di infezione (MOI) di 10.000). Le cellule sono state raccolte al DIV9 (vedi sotto).

Immunocolorazione su neuroni coltivati Al DIV9 (Fig.

1, 6, Fig. S6A–F) o al DIV14 (Fig. 3), i coprioggetto sono stati lavati con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) 1X preriscaldata e fissati con una soluzione preriscaldata di paraformaldeide (PFA) al 4% / saccarosio al 4% in PBS 1X a temperatura ambiente (TA) per 10 minuti. I coprioggetto sono stati quindi lavati una volta con glicina 50 mM in PBS 1X e due volte con PBS 1X / Triton X-100 allo 0,1% a TA per 5 minuti, e quindi trattati con PBS 1X / Triton X-100 allo 0,3% per 20 minuti per consentire la permeabilizzazione. Dopo il blocco in siero d'asino al 10%/PBS 1X/Triton X-100 allo 0,1% per 1 ora a temperatura ambiente, i coprioggetto sono stati incubati con anticorpo policlonale di capra anti-mCherry (anticorpi SICgen, #AB0040, 1:200), un anticorpo policlonale di coniglio anti-DDX3X (Thermo Fisher Scientific, #A300-474A, 1:400), un anticorpo policlonale di coniglio anti-Fibrillarina (Abcam, #ab5821, 1:2.000), un anticorpo monoclonale di topo anti-HA-Tag (6E2) (Cell Signaling, #2367, 1:100), un anticorpo monoclonale di topo anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, #F3165, 1:100), un anticorpo monoclonale di ratto anti-CTIP2/BCL11B (Millipore, #MABE1045, 1:300) e/o colorante Hoechst (Thermo Fisher Scientific, #H3570, 1:1.000), diluiti in soluzione bloccante per una notte a 4 °C. I coprioggetto sono stati quindi lavati 3 volte con PBS 1X e incubati per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo anti-coniglio di asino coniugato con Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, #A-31573, 1:200), un anticorpo anti-capra di asino coniugato con Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, #A-11057, 1:200), un anticorpo anti-topo di asino coniugato con Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, #A-21202, 1:200) o un anti-ratto di asino coniugato con Alexa Fluor 488 (Abcam, #ab150153, 1:200) e/o colorante Hoechst (Thermo Fisher Scientific, #H3570, 1:1.000), in PBS 1X/ 0,1% Triton X-100. I coprioggetto sono stati montati su vetrini da 25 × 75 × 1,0 mm

vetrini da microscopio, su una goccia di ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, #P36970).

Immunocolorazione su tessuto cerebrale:

cervelli di topo E18 (Fig. 7) o P0 (Fig. 5) sono stati fissati in PFA al 4% in PBS 1X per una notte a 4 °C, crioconservati in saccarosio al 30% (g/vol)/sodio azide allo 0,05%/glicina 100 mM in PBS 1X e inclusi in composto Scigen Tissue-Plus OCT (Fisher Scientific, n. 23-730-571). Sezioni di 30 µm sono state ottenute utilizzando un criostato Leica CM1860 e montate su vetrini. Per la colorazione CRE, i vetrini sono stati lavati in soluzione salina tamponata con Tris (TBS) 1X 3 volte, 5 minuti ciascuna, e bloccati per 1 ora a temperatura ambiente in siero d'asino al 10% (Sigma-Aldrich Inc., n. D9663)/Triton-X 100 allo 0,3% in TBS 1X. I vetrini sono stati incubati durante la notte con un anticorpo policlonale anti-CRE di cavia (Synaptic Systems, #257004, 1:100), un anticorpo policlonale anti-DDX3X di coniglio (Thermo Fisher Scientific, #A300-474A, 1:400), un anticorpo policlonale anti-Fibrillarina di coniglio (Abcam, #ab5821, 1:2000), un anticorpo monoclonale di topo prodotto contro l'rRNA 5.8S (clone Y10b, Abcam, #ab171119, 1:50) o un anticorpo monoclonale anti-CTIP2/BCL11B di ratto (Millipore, #MABE1045, 1:300) in tampone di incubazione (5% siero d'asino/0,1% Triton-X 100 in 1X TBS). Dopo il lavaggio, i vetrini sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con un anticorpo anti-coniglio di asino coniugato con Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, #A-31573, 1:200), un anticorpo anti-topo di asino coniugato con Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, #A-32787, 1:200), un anticorpo anti-cavia di asino coniugato con Alexa Fluor 488 (Abcam, #ab150185, 1:200), un anticorpo anti-ratto di asino coniugato con Alexa Fluor 488 (Abcam, #ab150153, 1:200) e/o colorante Hoechst (Thermo Fisher Scientific, #H3570, 1:1.000) in Triton-X 100 allo 0,1% in TBS 1X. I coprioggetto sono stati montati utilizzando Dapi-Fluoromount G (SouthernBiotech, #0100-20).

Imaging confocale Le

immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio invertito Leica TCS SP8 e il software Leica LAS X. Sono stati accoppiati fasci di eccitazione a 561 e 633 nm o 405, 488, 561 o 633 nm, la dimensione dell'immagine è stata impostata a 1024 x 1024 pixel e la velocità di scansione è stata selezionata a 600 Hz. Sono stati acquisiti 60 z-stack con passo di 300 nm (18 µm in totale) utilizzando un obiettivo ad aria 20X per le analisi dei dendriti e un obiettivo a immersione in olio 100X per le analisi delle spine. Le proiezioni degli z-stack sono state preparate utilizzando il software Fiji versione 2.9.0/1.53t94. Per l'imaging dei nucleoli e dei nuclei, nonché per l'imaging dell'rRNA, sono stati realizzati 30 z-stack con passo di 300 nm (9 µm in totale) utilizzando un obiettivo a immersione in olio 100X con zoom 2.

Analisi di immunofluorescenza Per le

analisi dei nucleoli (Fig. 5, Fig. S6A, B), i volumi dei nucleoli e dei nuclei sono stati ricostruiti dalle immagini Z-stacks utilizzando IMARIS 10.1.0. Sono state misurate le dimensioni di ciascun nucleolo, la somma dei volumi nucleolari per ciascun nucleo, le dimensioni dei nuclei e il numero di nucleoli in ciascun nucleo. Per le analisi dell'rRNA (Fig. 5), la percentuale di rRNA nel citoplasma o nel nucleo è stata calcolata come il valore grezzo della densità integrata nel citoplasma o nel nucleo sulla cellula totale utilizzando Fiji. Il segnale medio di immunofluorescenza dell'rRNA è stato misurato come media dei valori di grigio dei pixel sulle immagini binarie utilizzando Fiji. Per le analisi di espressione di DDX3X (Fig. 1C), la fluorescenza è stata quantificata come media dei valori di grigio dei pixel, dopo la segmentazione dell'immagine, utilizzando Fiji. I livelli di espressione di DDX3X sono stati misurati come rapporto tra la media dei neuroni mCherry+ e la media di 5 neuroni mCherry- adiacenti all'interno dello stesso coprioggetto.

Tracciamento virale retrogrado:

topi di 5 settimane di età sono stati anestetizzati con una miscela di ossigeno e isoflurano (5% di induzione e 1% di mantenimento) in una camera di incubazione e inseriti nell'apparato stereotassico per iniezioni intracerebrali nel nucleo reticolare pontino (AP -4,00, ML 0,75, VD 4,50, secondo l'Allen Brain Atlas) di particelle virali retrograde AAV-CAG-GFP (Addgene, #37825-AAVrg, 0,5 µl; velocità di 0,1 µl/minuto) utilizzando una siringa microlitro Hamilton da 5 µl. L'ago è stato lasciato in sede per 5 minuti dopo l'iniezione per garantire una corretta diffusione del virus nel tessuto. Topi

sono stati perfusi e i cervelli sono stati raccolti per l'analisi posteriore 3 settimane dopo l'iniezione stereotassica.

Clearing e imaging dell'intero cervello Cervelli

di topi adulti fissati con tracciamento virale retrogrado sono stati delipidati con un protocollo Adipo-Clear modificato^{95,96}. In breve, i campioni di cervello fissati per perfusione sono stati lavati con tampone B1n (H₂O/0,1% Triton X-100/0,3 M glicina, pH 7), quindi trasferiti a una serie di gradienti di metanolo (20%, 40%, 60%, 80%) in tampone B1n, 4 mL per ciascun cervello, 1 ora per ogni passaggio; quindi metanolo al 100% per 1 ora; quindi incubazione notturna in una miscela 2:1 di DCM:metanolo e un'incubazione di 1,5 ore in DCM al 100%.

Il giorno successivo; quindi metanolo al 100% per 1 ora per tre volte e serie di gradienti di metanolo inversi (80%, 60%, 40%, 20%) in tampone B1n, 30 minuti per ogni fase. I campioni sono stati quindi lavati in tampone B1n per 1 ora e per tutta la notte. Le procedure sopra descritte sono state eseguite a temperatura ambiente con oscillazione per completare la delipidazione. I campioni delipidati sono stati quindi bloccati in tampone PTxwH (PBS/0,1% Triton X100/0,05% Tween 20) con DMSO al 5% e glicina 0,3 M per 3 ore e per tutta la notte a 37 °C, quindi lavati con PTxwH per 1 ora, 2 ore e per tutta la notte a temperatura ambiente. Per la colorazione, i campioni di cervello sono stati incubati in un anticorpo primario (anticorpo primario anti-GFP di capra, Rockland 600-101-215, 1:300) diluito in PTxwH per 2 settimane a 37 °C. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, i campioni sono stati lavati in PTxwH per 1 ora, 2 ore, 4 ore, per una notte, poi per 1 giorno, e quindi incubati in un anticorpo secondario (Jackson ImmunoResearch 705-607-003, Alexa Fluor 647 anti-capra d'asino, 1:100) diluito in PTxwH a temperatura ambiente per 2 settimane.

I campioni sono stati quindi lavati in PTxwH per 1 h, 2 h, 4 h, per una notte e poi per 1 giorno. I campioni sono stati ulteriormente fissati in PFA all'1% a 4 °C per una notte, lavati in PTxwH a temperatura ambiente (1 h, 2 h, 4 h, per una notte), quindi bloccati in B1n a temperatura ambiente per una notte e lavati in PTxwH a temperatura ambiente (1 h, 2 h, 4 h). I campioni sono stati quindi sbiancati in H₂O₂ allo 0,3% a 4 °C per una notte, lavati 3 volte in PB 20 mM (16 mM Na₂HPO₄, 4 mM Na₂PO₄ in H₂O) a temperatura ambiente per 2 h. Per un'ulteriore delipidazione, i campioni sono stati immersi in tampone SBiP quattro volte (1 h, 2 h, 4 h, per una notte, 1 giorno X6). Successivamente, i cervelli sono stati lavati 2 volte (2 h, 4 h) in tampone PB 20 mM e infine 2 volte in soluzione PTS (25% 2,2'-tiodietanolo/10 mM PB) (2 h, per tutta la notte), quindi equilibrati con tampone histodenz al 75% (Cosmo Bio USA AXS-1002424) con indice di rifrazione regolato a 1,53 utilizzando 2,2'-tiodietanolo. I campioni sono stati conservati a -20 °C fino all'acquisizione. I campioni di cervello chiarificati sono stati visualizzati orizzontalmente con tiling utilizzando il microscopio a foglio luminoso LifeCanvas SmartSPIM. Sono stati utilizzati laser a 647 nm per l'imaging IHC della marcatura virale GFP con la lente di rilevamento 3,6x/0,2. L'illuminazione a foglio luminoso è focalizzata con una lente NA 0,2 e scansionata assialmente con una lente elettricamente regolabile accoppiata alla telecamera (Hamamatsu Orca Back-Thin Fusion) in modalità slit. L'esposizione della fotocamera è stata impostata in modalità rapida (2 ms) con imaging a 16 bit. La frequenza di campionamento X/Y era di 1,866 µm e il passo

Analisi Sholl: i

neuroni mCherry+ in Fig. 1 sono stati ricostruiti utilizzando il plugin Simple Neurite Tracer (SNT) del software Fiji in modo semi-automatico. I dendriti sono stati classificati in primari, secondari, terziari e quaternari in base alla loro crescita dal soma e ai pattern di ramificazione. Sono stati misurati anche la lunghezza e il diametro di ciascun dendrite. Le proiezioni assonali sono state escluse dall'analisi. Anelli concentrici distanti 10 µm attorno ai somi dei neuroni ricostruiti con SNT e che si irradiano verso l'esterno sono stati definiti sui neuroni ricostruiti con SNT, e il numero di intersezioni tra gli arbori dendritici e il

sono stati contati gli anelli concentrici. I neuroni mCherry+ (Fig. 6) e i neuroni corticali GFP+ marcati in vivo (Fig. 2), sono stati analizzati come immagini segmentate, prive di proiezioni assonali, per eseguire un'analisi Sholl automatizzata.

I neuroni GFP+ sono stati inoltre analizzati con SNT per misurare la lunghezza dei tronchi apicali e dei ciuffi.

Analisi delle spine dendritiche Le

spine dendritiche sono state annotate sui neuroni mCherry+ a partire da 30 µm dal soma e su segmenti lunghi 10 µm sul dendrite.

Le spine sono state contate manualmente su una media di 16 segmenti lunghi 10 µm per neurone e il conteggio delle spine è stato quindi calcolato in media per neurone. La densità delle spine dendritiche è stata misurata come numero totale di spine dendritiche in 10 µm di lunghezza dendritica. Per ciascuna spina, sono state misurate la larghezza della testa (W) e la lunghezza del collo (L). Le spine sono state classificate in 6 sottotipi morfologici: ramificate (spine a due teste), a fungo (W > 0,7 µm; 1 < L > 3 µm), tozze (W > 0,6 µm; nessun collo rilevato), sottili (W > 0,7 µm; L > 1 µm), lunghe e sottili (W > 0,7 µm; 1 < L > 3 µm) e filopodi (nessuna testa rilevata; L > 3 µm), sulla base della letteratura precedente^{97,98}.

Sinaptosomi I

sinaptosomi sono stati isolati come descritto in precedenza⁹⁸. Topi femmina P21 Sox2-Ddx3x+/+ e Sox2-Ddx3x+/- sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale. Le cortecce sono state rapidamente dissezionate su ghiaccio e omogeneizzate in tampone di omogeneizzazione ghiacciato (0,32 M di saccarosio, 1 mM di EDTA, 1 mg/ml di BSA, 5 mM di HEPES pH=7,4) in un douncer di vetro in Teflon e centrifugate a 3000 × g per 10 minuti a 4 °C. I surmatanti sono stati recuperati e centrifugati a 14.000 g per 12 minuti a 4 °C. I pellet contenenti sinaptosomi sono stati risospesi delicatamente in tampone Krebs-Ringer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucosio, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES pH 7,4), sottoposti a un gradiente di densità previa aggiunta di Percoll Plus (Sigma-Aldrich) (45% v/v finale) e centrifugati a 18.800 × g per 2 minuti a 4 °C per arricchire i sinaptosomi sulla superficie del gradiente. I sinaptosomi sono stati recuperati, lavati in tampone Krebs-Ringer e quindi centrifugati a 18.800 × g per 30 secondi a 4 °C. I pellet contenenti sinaptosomi purificati sono stati lisati come descritto nella sezione sulla proteomica.

Preparazione del campione per cromatografia liquida con spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)

I pellet cellulari o sinaptosomi sono stati sospesi in 200 µl di tampone RIPA contenente un cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi. Tre cicli di sonicazione (5% amp, impulsi di 1 secondo) per 15 secondi ciascuno sono stati utilizzati per lisare le cellule/sinaptosomi. La sospensione è stata centrifugata a 20.500 g per 10 minuti a 4 °C e 175 µl del surmatante sono stati aliquotati per la precipitazione proteica cloroformio:metanolo:acqua utilizzando protocolli standard. Il pellet proteico essiccato è stato risospeso in 10 µl di urea 8 M contenente 400 mM di bicarbonato di ammonio (ABC), ridotto con ditiotreitolo (DTT), alchilato con iodoacetamide e sottoposto a doppia digestione enzimatica con LysC e tripsina (eseguita a 37 °C per una notte o per 7 ore, rispettivamente). La digestione è stata interrotta aggiungendo acido trifluoroacetico (allo 0,5%) prima della desalinizzazione dei peptidi con colonne C18 MiniSpin (The Nest Group). Gli effluenti derivanti dalla fase di desalinizzazione sono stati essiccati e ridisciolti in tampone di caricamento MS (acetonitrile al 2%, acido trifluoroacetico allo 0,2%). Le concentrazioni proteiche (A260/A280) sono state misurate con uno spettrofotometro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Ogni campione è stato quindi ulteriormente diluito con tampone di caricamento MS a 0,06 µg/µl, iniettandone 300 ng (5 µl) per l'analisi LC-MS/MS. A ciascun campione è stata aggiunta una diluizione 1:10 della miscela di calibrazione del tempo di ritenzione Pierce 10X (Thermo Fisher Scientific, n. 88321) per verificare la variabilità del tempo di ritenzione durante l'analisi dei dati LFQ.

Analisi LC-MS/MS L'analisi

LC-MS/MS è stata eseguita su un sistema Thermo Scientific Q Exactive HF-X dotato di un sistema UPLC Waters classe M che utilizza un sistema di solventi binario (A: 100% acqua, 0,1% acido formico; B: 100% acetonitrile, 0,1% acido formico). La cattura è stata eseguita a 10 µl/min, tampone A al 99% per 3 minuti utilizzando una colonna Waters nanoEase M/Z Symmetry C18 (100 Å, 5 µm, 180 µm x 20 mm). I peptidi sono stati separati utilizzando una colonna nanoEase M/Z Peptide BEH C18 (130 Å, 1,7 µm, 75 µm X 250 mm) (37 °C) mediante eluizione con gradienti lineari che raggiungevano il 6% di B a 2 minuti, il 25% di B a 175 minuti, il 40% di B a 195 minuti e il 90% di B a 200 minuti. La rigenerazione della colonna e fino a tre iniezioni di bianco sono state eseguite tra tutte le iniezioni di campione. La spettroscopia a spettroscopia (MS) è stata acquisita in modalità profilo nell'intervallo 350-1.500 m/z utilizzando 1 microscansione, risoluzione 60.000, target AGC.

di 3E6 e un tempo di iniezione massimo di 100 ms. I dati dipendenti MS/MS sono stati acquisiti in modalità centroide sui primi 20 precursori per scansione MS utilizzando 1 microscansione, risoluzione 30.000, target AGC di 1E5, tempo di iniezione massimo di 100 ms e una finestra di isolamento di 1,6 m/z. I precursori sono stati frammentati mediante attivazione HCD con un'energia di collisione del 28%. MS/MS sono stati raccolti su specie con una soglia di intensità di 2,5E4, stati di carica 2-6 e corrispondenza peptidica preferita. L'esclusione dinamica è stata impostata a 20 secondi. I dati LC-MS/MS sono stati elaborati con il software Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics, versione 4.2) con identificazione proteica effettuata utilizzando il motore di ricerca interno Mascot (2.4). Il software Pro-genesis Q1 esegue l'allineamento cromatografico/spettroscopico (una corsa viene scelta come riferimento per l'allineamento di tutti gli altri file di dati), la selezione e il filtraggio dei picchi spettrali di massa (il segnale ionico deve soddisfare la deviazione standard 3 volte superiore al rumore) e la quantificazione di proteine e peptidi. È stato calcolato un fattore di normalizzazione per ogni corsa per tenere conto delle differenze nel carico di campione tra le iniezioni, nonché delle differenze di ionizzazione. Il fattore di normalizzazione è stato determinato calcolando un rapporto di abbondanza quantitativa tra la corsa di riferimento e la corsa normalizzata, presupponendo che la maggior parte delle proteine/peptidi non cambi durante l'esperimento, quindi il valore quantitativo dovrebbe essere pari a 1. Il disegno sperimentale è stato impostato per raggruppare più iniezioni (repliche tecniche e biologiche) da ogni corsa in ciascun set di confronto. L'algoritmo calcola quindi le abbondanze grezze e normalizzate tabulate, i valori di p dell'ANOVA per ciascuna caratteristica nel set di dati. Gli spettri MS/MS sono stati esportati come mgf (file generici Mascot) per la ricerca nel database. Mascot Distiller è stato utilizzato per generare le liste dei picchi, e l'algoritmo di ricerca Mascot è stato utilizzato per la ricerca nel database Swiss Protein con tassonomia limitata a Mus musculus (17.174 sequenze); e carbamidometile (Cys), ossidazione di Met, fosfo (Ser, Thr, Tyr), acetilazione (Lys e proteina N-term) e deamidazione (Asn e Asp) sono stati inseriti come modifiche variabili. Erano consentiti due tagli triptici mancati, la tolleranza alla massa del precursore è stata impostata a 10 ppm e la tolleranza alla massa del frammento è stata impostata a 0,02 Da. La soglia di significatività è stata impostata sulla base di un tasso di falsi positivi (FDR) del 2%.

I risultati della ricerca Mascot sono stati esportati come file .xml e quindi importati nel dataset elaborato nel software Progenesis Q1, dove i peptidi identificati sono stati sincronizzati con le corrispondenti caratteristiche quantificate e le relative abbondanze. Le abbondanze proteiche (che richiedono almeno 1 peptide univoco con un punteggio MOWSE >95%) sono state quindi calcolate dalla somma di tutte le assegnazioni di ID ionici peptidici non conflittuali per una proteina specifica in ogni analisi. È stato utilizzato un approccio di quantificazione senza etichetta utilizzando Progenesis Q1 (Nonlinear Dynamics)⁹⁹ per ottenere informazioni quantitative su peptidi e proteine. Le analisi a valle sono state limitate alle proteine identificate con almeno due peptidi univoci. I dati di proteomica della spettrometria di massa sono stati depositati presso il consorzio ProteomeXchange tramite il repository partner PRIDE100 con l'identificativo del dataset PXD060033.

I dettagli del test basato sulla puromicina sono descritti nella Nota integrativa.

Tappe evolutive. I test sono stati eseguiti come riportato in precedenza²⁴, utilizzando una batteria di test adattati dalla scala Fox101,102. I dettagli sono descritti nella Nota integrativa.

Analisi dell'andatura. I dettagli sono descritti nella Nota integrativa.

Test motorio su adulti. Il test è iniziato a 10 settimane ± una settimana. Il test comportamentale è stato condotto durante la fase di luce in stanze insonorizzate. I topi sono stati maneggiati quotidianamente per una settimana prima del test comportamentale per valutare la salute generale, l'aspetto fisico e l'attività spontanea (Nota integrativa). I topi sono stati abituati alla stanza del test per 30 minuti prima.

Articolo

Per i test. Tutte le superfici e le attrezzature sono state pulite con disinfettante Rescue Veterinary tra una prova e l'altra e sono stati utilizzati guanti in nitrile. I quattro genotipi sono stati testati lo stesso giorno in ordine randomizzato da uno sperimentatore ignaro del genotipo. Tutti i dati sono stati valutati e analizzati inconsapevoli del genotipo. Per l'accelerazione del rotarod, i topi sono stati testati su un'asta motorizzata di 3 cm di diametro (Omnitech Electronics Inc) con un graduale aumento della velocità da 4 a 40 giri al minuto in 5 minuti. Ai topi sono state presentate quattro prove di 5 minuti al giorno, a distanza di 1 ora, per tre giorni consecutivi. Sono state registrate la latenza alla caduta e la velocità. Il test della trave di equilibrio è stato condotto come descritto in precedenza²⁴. In breve, la trave consisteva in un prisma quadrato lungo 70 cm con una faccia di 1,3 cm posizionato orizzontalmente a 40 cm sopra il banco. Ogni telaio era lungo 5 cm. Ai topi è stato permesso di camminare liberamente sulla trave per due sessioni (una di addestramento e una di test) di 2 minuti ciascuna, separate da 4 ore. Sono stati analizzati il numero di scivolamenti e la distanza percorsa durante la sessione di test. Il test del palo verticale è stato condotto come descritto in precedenza²⁴. È stato utilizzato un palo di legno avvolto con del nastro adesivo per facilitare la camminata. Il test consisteva in due giorni di addestramento consecutivi e un giorno di test (3 prove al giorno). I topi sono stati posizionati con la faccia rivolta verso l'alto appena sotto la sommità del palo e sono stati misurati il tempo necessario per completare la rotazione e il tempo necessario per scendere dal palo. Il test di sospensione al filo è stato condotto come descritto in precedenza²⁴. I topi sono stati condotti dalla base della coda e lasciati afferrare un'asta posta a 40 cm sopra il banco da lavoro con entrambe le zampe anteriori. Il compito consisteva in una sessione di addestramento di 5 secondi seguita da tre sessioni di test di 60 secondi. Sono stati registrati il tempo di caduta e la distanza percorsa lungo il palo, e la media delle sessioni di test è stata utilizzata per l'analisi.

Analisi statistiche Tutte

le statistiche e i grafici sono stati generati utilizzando i pacchetti R stats e ggplot2. I test statistici, il numero di animali in ciascun esperimento e la significatività sono indicati in ciascuna figura e/o nella legenda corrispondente. I dati sono mostrati come media \pm SEM, ad eccezione dei grafici che mostrano la funzione di distribuzione cumulativa empirica (ECDF). I grafici ECDF mostrano i punti dati dal più basso al più alto (asse X) rispetto ai loro percentili (asse Y). I valori anomali sono stati definiti come punti dati inferiori a Q1-1,5xIQR o superiori a Q3 + 1,5xIQR, dove Q1 è il primo quartile, Q3 è il terzo quartile e IQR è l'intervallo interquartile. I valori anomali, mostrati nei grafici con il simbolo \ddot{y} , sono stati rimossi dai calcoli della media e dell'SEM e per i test statistici. Il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato per valutare la normalità e il test di Bartlett per valutare l'omoschedasticità.

Per osservazioni ripetute è stata utilizzata un'ANOVA a misura ripetuta a un fattore o a due fattori. In caso di confronti multipli, è stato impiegato il test ANOVA a un fattore, a due fattori o a tre fattori per dati distribuiti normalmente con uguale varianza, l'ANOVA di Welch per dati distribuiti normalmente con varianza disuguale o il test di Kruskal-Wallis per dati non parametrici. I confronti tra gruppi sono stati quindi condotti con il test t di Student per dati distribuiti normalmente con uguale varianza, il test t di Welch a due campioni per dati distribuiti normalmente con varianza disuguale o il test di Wilcoxon dei ranghi con segno per dati non distribuiti normalmente, con correzione di Benjamini-Hochberg per confronti multipli. Per confrontare la funzione di distribuzione cumulativa empirica tra i gruppi, è stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov.

Riepilogo del reporting

Ulteriori informazioni sulla progettazione della ricerca sono disponibili nel Nature Portfolio Reporting Summary collegato a questo articolo.

Disponibilità dei dati I dati

sorgente sono forniti con questo articolo. I dati proteomici elaborati generati in questo studio sono disponibili nei Dati Supplementari 1 e 2. I corrispondenti dati proteomici grezzi sono stati depositati su ProteomeXchange con l'identificativo PXD060033.

Ulteriori informazioni e richieste di risorse e reagenti devono essere indirizzate e saranno soddisfatte dalla referente principale, Silvia De Rubeis (silvia.derubeis@mssm.edu). I dati sorgente sono forniti con questo articolo.

Riferimenti

- Decifrare i disturbi dello sviluppo, S. Scoperta su larga scala di nuove cause genetiche dei disturbi dello sviluppo. *Nature* 519, pp. 223–228 (2015).
- Tang, L. et al. Fenotipizzazione comportamentale prospettica e dettagliata nella sindrome DDX3X. *Mol. Autism* 12, 36 (2021).
- Lennox, AL et al. Le mutazioni patologiche DDX3X compromettono il metabolismo dell'RNA e la neurogenesi durante lo sviluppo corticale fetale. *Neurone* 106, 404–420.e408 (2020).
- Ruzzo, EK et al. Il rischio genetico ereditario e de novo per l'autismo influisce sulle reti condivise. *Cell* 178, 850–866.e826 (2019).
- Snijders Blok, L. et al. Le mutazioni in DDX3X sono una causa comune di disabilità intellettiva inspiegata con effetti specifici di genere sulla segnalazione WNT. *Am. J. Hum. Genet.* 97, 343–352 (2015).
- Wang, X. et al. Espansione fenotipica in DDX3X: una causa comune di disabilità intellettiva nelle donne. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 5, 1277–1285 (2018).
- Ng-Cordell, E. et al. Caratteristiche sociali ed emotive di ragazze e giovani donne con disabilità intellettiva associata a DDX3X: uno studio descrittivo e comparativo. *J. Autism Dev. Disord.* 53, 3208–3219 (2023).
- Kellaris, G. et al. Una variante patogena ereditaria ipomorfica del gene DDX3X causa disabilità intellettiva maschile con ulteriori caratteristiche neurodegenerative e di sviluppo neurologico. *Hum. Genomics* 12, 11 (2018).
- Nordahl, CW Perché abbiamo bisogno di studi sull'autismo equilibrati per genere? *Autism Res* 16, 1662–1669 (2023).
- Soto-Rifo, R. et al. La proteina DEAD-box DDX3 si associa con eIF4F per promuovere la traduzione di mRNA selezionati. *EMBO J.* 31, 3745–3756 (2012).
- Calviello, L. et al. La deplezione di DDX3 reprime la traduzione di mRNA con UTR complessi 5'. *Nucleic Acids Res.* 49, 5336–5350 (2021).
- Hoye, ML et al. Lo sviluppo corticale aberrante è guidato da Ciclo cellulare e controllo traduzionale alterati in un modello di sindrome DDX3X. *Elife* 11, e78203 (2022).
- Shih, JW et al. Ruoli critici dell'RNA elicasi DDX3 e delle sue interazioni con eIF4E/PABP1 nell'assemblaggio dei granuli da stress e nella risposta allo stress. *Biochem J.* 441, 119–129 (2012).
- Fiorenzani, C., Mossa, A. & De Rubeis, S. DEAD/DEAH-box RNA Le elicasi influenzano il rischio di disturbi dello sviluppo neurologico. *Trends Genet* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2024.12.006> (2025).
- Shen, H. et al. Le RNA elicasi sessualmente dimorfiche DDX3X e DDX3Y regolano in modo differenziale il metabolismo dell'RNA attraverso la separazione di fase. *Mol. Cell* 82, 2588–2603.e2589 (2022).
- Hondele, M. et al. Le ATPasi DEAD-box sono regolatori globali di organelli a fase separata. *Nature* 573, 144–148 (2019).
- Saito, M. et al. L'acetilazione di regioni intrinsecamente disordinate regola la separazione di fase. *Nat. Chem. Biol.* 15, 51–61 (2019).
- Yanas, A., Shweta, H., Owens, MC, Liu, KF e Goldman, YE Le RNA elicasi DDX3X e DDX3Y formano cluster RNA-proteine su scala nanometrica che supportano l'attività catalitica. *Curr. Biol.* 34, 5714–5727.e5716 (2024).
- Owens, MC et al. Mutanti DDX3X specifici, con alterazione catalitica, formano condensati cavi sessualmente dimorfici. *Nat. Commun.* 15, 9553 (2024).
- Salamon, I. et al. Celf4 controlla la traduzione dell'mRNA sottostante Sviluppo sinaptico nella neocorteccia prenatale dei mammiferi. *Nat. Comm.* 14, 6025 (2023).
- Harnett, D. et al. Un periodo critico del controllo traduzionale durante Sviluppo cerebrale alla risoluzione dei codoni. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 29, 1277–1290 (2022).

22. Duffy, EE et al. Dinamiche evolutive della traduzione dell'RNA nel cervello umano. *Nat. Neurosci.* 25, 1353–1365 (2022).
23. Borisova, E. et al. La velocità di traduzione delle proteine determina il destino dei neuroni neocorticali. *Nat. Commun.* 15, 4879 (2024).
24. Boitnott, A. et al. Fenotipi evolutivi e comportamentali in un modello murino di sindrome DDX3X. *Biol. Psychiatry* 90, 742–755 (2021).
25. Patmore, DM et al. DDX3X sopprime la suscettibilità di linee cellulari del rombencefalo che portano al medulloblastoma. *Dev. Cell* 54, 455–470 e455 (2020).
26. Chen, CY et al. Inattivazione mirata di Ddx3x murino: ruoli essenziali di Ddx3x nella placentazione e nell'embriogenesi. *Ronzio. Mol. Genet* 25, 2905–2922 (2016).
27. Chen, HH, Yu, HI e Tarn, WY DDX3 modula lo sviluppo dei neuriti attivando a livello traduzionale un regolone a RNA coinvolto nell'attivazione di Rac1. *J. Neurosci.* 36, 9792–9804 (2016).
28. Garieri, M. et al. Ampia eterogeneità cellulare dell'inattivazione del gene X rivelata dall'espressione allele-specifica di singole cellule in fibroblasti umani. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 115, 13015–13020 (2018).
29. Tukiainen, T. et al. Panorama dell'inattivazione del cromosoma X nei tessuti umani. *Nature* 550, 244–248 (2017).
30. Oliva, M. et al. L'impatto del sesso sull'espressione genica in tessuti umani. *Science* 369, eaba3066 (2020).
31. Borensztein, M. et al. Contributo dei paesaggi epigenetici e dei fattori di trascrizione alla riattivazione del cromosoma X nella massa cellulare interna. *Nat. Commun.* 8, 1297 (2017).
32. Bellott, DW et al. I cromosomi Y dei mammiferi mantengono regolatori ampiamente espressi e sensibili al dosaggio. *Nature* 508, 494–499 (2014).
33. Arnold, AP Agenti del cromosoma X nella differenziazione sessuale. *Nat. Rev. Endocrinol.* 18, 574–583 (2022).
34. Cortez, D. et al. Origini ed evoluzione funzionale dei cromosomi Y nei mammiferi. *Nature* 508, 488–493 (2014).
35. Lukin, J., Smith, CM e De Rubeis, S. Geni emergenti legati al cromosoma X associati a disturbi dello sviluppo neurologico nelle femmine. *Curr. Opinione. Neurobiol.* 88, 102902 (2024).
36. Foresta, C., Ferlin, A. & Moro, E. L'analisi della delezione e dell'espressione dei geni AZFa sul cromosoma Y umano ha rivelato un ruolo importante per DBY nell'infertilità maschile. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1161–1169 (2000).
37. Dicke, AK et al. DDX3Y è probabilmente il fattore spermatogenico chiave nella regione AZFa che contribuisce all'azoospermia non ostruttiva umana. *Commun. Biol.* 6, 350 (2023).
38. Ramathal, C. et al. Il recupero del gene DDX3Y da una delezione AZFa del cromosoma Y ripristina la formazione delle cellule germinali e i programmi trascrizionali. *Sci. Rep.* 5, 15041 (2015).
39. Vogt, PH, Rauschendorf, MA, Zimmer, J., Drummer, C. e Behr, R. Il gene AZFa Y, DDX3Y, ha sviluppato nuove varianti del trascritto testicolare nei primati con poliadenilazione prossimale del terzo tratto dell'UTR per la traduzione specifica delle cellule germinali. *Sci. Rep.* 12, 8954 (2022).
40. Scala, M. et al. Tre varianti de novo del gene DDX3X associate a specifiche anomalie dello sviluppo cerebrale e tumori cerebrali in donne con disabilità intellettiva. *Eur. J. Hum. Genet* 27, 1254–1259 (2019).
41. Ditton, H.J., Zimmer, J., Kamp, C., Rajpert-De Meyts, E. & Vogt, P. H. Il gene AZFa DBY (DDX3Y) è ampiamente trascritto, ma la proteina è limitata alle cellule germinali maschili dal controllo della traduzione. *Hum. Mol. Genet* 13, 2333–2341 (2004).
42. Chauvin, C. et al. Coinvolgimento dei fattori di rilascio umani eRF3a ed eRF3b nella terminazione della traduzione e nella regolazione della formazione del complesso di terminazione. *Mol. Cell Biol.* 25, 5801–5811 (2005).
43. Gong, C. et al. La disregolazione inversa sequenziale degli RNA elica DDX3X e DDX3Y facilita la linfogenesi indotta da MYC. *Mol. Cell* 81, 4059–4075.e4011 (2021).
44. Deuel, TA et al. Interazioni genetiche tra doublecortin e chinasi doublecortin-like nella migrazione neuronale e nella crescita assonale. *Neuron* 49, 41–53 (2006).
45. Sawada, M. et al. La segnalazione PlexinD1 controlla la morfologia cambiamenti e terminazione della migrazione nei neuroni neonati. *EMBO J.* 37, e97404 (2018).
46. Hor, CHH e Goh, ELK Rab23 regola la migrazione radiale dei neuroni di proiezione tramite N-caderina. *Cereb. Cortex* 28, 1516–1531 (2018).
47. Na, Y. et al. Fbxo45 lega i motivi SPRY nel dominio extracellulare della N-caderina e regola la migrazione dei neuroni durante lo sviluppo cerebrale. *Mol. Cell Biol.* 40, e00539–19 (2020).
48. Karczewski, KJ et al. Lo spettro dei vincoli mutazionali quantificato dalla variazione in 141.456 esseri umani. *Nature* 581, 434–443 (2020).
49. Thormann, A. et al. Filtraggio diagnostico flessibile e scalabile di varianti genomiche utilizzando G2P con Ensembl VEP. *Nat. Commun.* 10, 2373 (2019).
50. Fu, JM et al. La rara variazione di codifica fornisce informazioni sull'Architettura genetica e contesto fenotipico dell'autismo. *Nat. Genet* 54, 1320–1331 (2022).
51. Heyne, HO et al. Varianti de novo nei disturbi dello sviluppo neurologico con epilessia. *Nat. Genet* 50, 1048–1053 (2018).
52. Epi, KC, Epilepsy Phenome/Genome, P. Variazione genetica ultra rara nelle epilessie comuni: uno studio di sequenziamento caso-controllo. *Lancet Neurol.* 16, 135–143 (2017).
53. Epi25 Collaborative. Indirizzo elettronico, sbuea & Epi, C. Variazione genetica ultra-rara nelle epilessie: uno studio di sequenziamento dell'intero esoma su 17.606 individui. *Am. J. Hum. Genet.* 105, 267–282 (2019).
54. Mercaldo, V. et al. Alterata dinamica dell'actina striatale determina rigidità comportamentale in un modello murino di sindrome dell'X fragile. *Neuron* 111, 1760–1775 e1768 (2023).
55. Koopmans, F. et al. SynGO: una base di conoscenza basata sull'evidenza e curata da esperti per la sinapsi. *Neuron* 103, 217–234 e214 (2019).
56. Schmidt, EK, Clavarino, G., Ceppi, M. e Pierre, P. SUNSET, a Metodo non radioattivo per monitorare la sintesi proteica. *Metodi Nazionali* 6, 275–277 (2009).
57. Hoeffler, CA et al. L'inibizione delle interazioni tra i fattori di inizio eucariotici 4E e 4G compromette il consolidamento della memoria associativa a lungo termine, ma non il consolidamento. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 3383–3388 (2011).
58. Fusco, CM et al. I ribosomi neuronali mostrano dinamiche e Scambio di proteine ribosomiali dipendente dal contesto. *Nat. Com-mun.* 12, 6127 (2021).
59. Seo, SS et al. L'eccessiva produzione di proteine ribosomiali sbilancia la traduzione in un modello di sindrome dell'X fragile. *Nat. Commun.* 13, 3236 (2022).
60. Scarnati, MS, Kataria, R., Biswas, M. & Paradiso, KG Ribosomi presinaptici attivi nel cervello dei mammiferi e rilascio alterato del trasmettitore dopo inibizione della sintesi proteica. *Elife* 7, e36697 (2018).
61. Akbalik, G. et al. Visualizzazione di RNA neuronale di nuova sintesi in vitro e in vivo mediante click-chemistry. *RNA Biol.* 14, 20–28 (2017).
62. Chau, KF et al. Downregulation della biogenesi dei ribosomi durante sviluppo precoce del proencefalo. *Elife* 7, e36998 (2018).
63. Salehi, S. et al. Il Ptbp2 citosolico modula la crescita assonale nei motoneuroni attraverso la localizzazione assonale e la traduzione di Hnmp. *Nat. Com-mun.* 14, 4158 (2023).
64. Kondrashov, N. et al. Specificità mediata dai ribosomi nella traduzione dell'mRNA di Hox e nel pattern tissutale dei vertebrati. *Cell* 145, 383–397 (2011).

65. Metz, JB et al. Profilazione traslazionale ad alto rendimento con riboPLATE-seq. *Sci. Rep.* 12, 5718 (2022).
66. Calvino, FR et al. La simportina 1 accompagna l'assemblaggio del 5S RNP durante la biogenesi del ribosoma occupando un sito essenziale di legame per l'rRNA. *Nat. Commun.* 6, 6510 (2015).
67. Leidig, C. et al. La biogenesi del ribosoma 60S richiede la rotazione della particella ribonucleoproteica 5S. *Nat. Commun.* 5, 3491 (2014).
68. Mensah, MA et al. Separazione di fase aberrante e nucleolare disfunzione nelle malattie genetiche rare. *Nature* 614, 564–571 (2023).
69. Valentin-Vega, YA et al. Le mutazioni DDX3X associate al cancro guidano l'assemblaggio dei granuli di stress e compromettono la traduzione globale. *Sci. Rappresentante* 6, 25996 (2016).
70. Toyama, Y. e Shimada, I. Caratterizzazione NMR della proprietà di legame all'RNA dell'RNA elicasi DEAD-box DDX3X e sue implicazioni per l'attività elicastica. *Nat. Commun.* 15, 3303 (2024).
71. Xiol, J. et al. Il clamping dell'RNA da parte di Vasa assembla un complesso amplificatore di piRNA sui trascritti dei trasposoni. *Cell* 157, 1698–1711 (2014).
72. Kast, RJ, Lanjewar, AL, Smith, CD e Levitt, P. FOXP2 mostra un'espressione specifica per la classe di neuroni di proiezione, ma non è necessaria per molteplici aspetti dell'istogenesi corticale. *Elife* 8, e42012 (2019).
73. Gorski, JA et al. Neuroni eccitatori corticali e glia, ma non neuroni GABAergici, sono prodotti nella linea evolutiva che esprime Emx1. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314 (2002).
74. Levy, T. et al. Sindrome DDX3X: Riepilogo dei risultati e Raccomandazioni per la valutazione e la cura. *Pediatr. Neurol.* 138, 87–94 (2023).
75. Rengarajan, S., Derks, J., Bellott, D. W., Slavov, N. & Page, D. C. Espressione del tampone di autoregolazione e cross-regolazione post- **trascrizionale** delle RNA elicasi umane DDX3X e DDX3Y. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39794123/> (2024).
76. Sidhaye, J. et al. L'analisi integrata del trascrittoma e del proteoma rivela la regolazione post-trascrizionale dei geni ribosomiali negli organoidi cerebrali umani. *Elife* 12, e85135 (2023).
77. Anadolu, MN et al. La puromicina rivela una conformazione distinta dei ribosomi neuronali. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 121, e2306993121 (2024).
78. Kraushar, ML et al. Sintesi proteica nello sviluppo La neocorteccia a risoluzione quasi atomica rivela la proteostasi neuronale mediata da Ebp1 all'uscita del tunnel 60S. *Mol. Cell* 81, 304–322. e316 (2021).
79. De Rubeis, S. et al. Geni sinaptici, trascrizionali e della cromatina alterati nell'autismo. *Nature* 515, pp. 209–215 (2014).
80. Clement, JP et al. Mutazioni patologiche di SYNGAP1 compromettono lo sviluppo cognitivo interrompendo la maturazione delle sinapsi delle spine dendritiche. *Cell* 151, 709–723 (2012).
81. Cruz-Martin, A., Crespo, M. e Portera-Cailliau, C. Stabilizzazione ritardata delle spine dendritiche nei topi con sindrome dell'X fragile. *J. Neurosci.* 30, 7793–7803 (2010).
82. Fazel Darbandi, S. et al. Il potenziamento della segnalazione WNT ripristina la maturazione delle spine neuronali corticali e la sinaptogenesi nei mutanti Tbr1. *Cell Rep.* 31, 107495 (2020).
83. Spratt, PWE et al. Il gene Scn2a associato all'autismo con Contributi all'eccitabilità dendritica e alla funzione sinaptica nella corteccia prefrontale. *Neuron* 103, 673–685. e675 (2019).
84. Holtmaat, A. & Svoboda, K. Strutture dipendenti dall'esperienza Plasticità sinaptica nel cervello dei mammiferi. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647–658 (2009).
85. Richards, SEV et al. Sviluppo degli arbori dendritici nella corteccia visiva del topo dipendente dall'esperienza. *J. Neurosci.* 40, 6536–6556 (2020).
86. Jan, YN e Jan, LY Ramificazione: meccanismi di ramificazione dendritica arborizzazione. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 316–328 (2010).
87. Creson, TK et al. La riespressione della proteina SynGAP in età adulta migliora le misure traducibili della funzione cerebrale e del comportamento. *Elife* 8, e46752 (2019).
88. Robinson, L. et al. Inversione morfologica e funzionale dei fenotipi in un modello murino di sindrome di Rett. *Brain* 135, 2699–2710 (2012).
89. Sztainberg, Y. et al. Inversione dei fenotipi nei topi con duplicazione di MECP2 mediante recupero genetico o oligonucleotidi antisense. *Nature* 528, pp. 123–126 (2015).
90. Garg, SK et al. La somministrazione sistemica di MeCP2 corregge i deficit comportamentali e cellulari nei modelli murini femmina affetti dalla sindrome di Rett. *J. Neuroscienze.* 33, 13612–13620 (2013).
91. Mei, Y. et al. Il ripristino dell'espressione di Shank3 negli adulti salva fenotipi selettivi di tipo autistico. *Nature* 530, 481–484 (2016).
92. Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L. & McMahon, AP Gene efficiente Modulazione nell'epiblasto del topo utilizzando un ceppo di topo transgenico Sox2Cre. *Mech. Dev.* 119, S97–S101 (2002).
93. Kaech, S. & Banker, G. Coltura di neuroni ippocampali. *Nat. Protoc.* 1, 2406–2415 (2006).
94. Schindelin, J. et al. Fiji: una piattaforma open source per l'analisi di immagini biologiche. *Nat. Methods* 9, 676–682 (2012).
95. Chi, J., Crane, A., Wu, Z. e Cohen, P. Adipo-Clear: un metodo di chiarificazione dei tessuti per l'imaging tridimensionale del tessuto adiposo. *J. Vis. Speranza*, <https://doi.org/10.3791/58271> (2018).
96. Hou, Y. et al. Organizzazione topografica del neurone mammillare Genesi e proiezioni efferenti nel cervello del topo. *Cell Rep.* 34, 108712 (2021).
97. Risher, WC, Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J. & Eroglu, C. Metodo di analisi rapida del Golgi per una classificazione efficiente e imparziale delle spine dendritiche. *PLoS One* 9, e107591 (2014).
98. De Rubeis, S. et al. CYFIP1 coordina la traduzione dell'mRNA e il rimodellamento del citoscheletro per garantire la corretta formazione delle spine dendritiche. *Neuron* 79, 1169–1182 (2013).
99. Vidyadhara, DJ et al. Difetti del trasportatore della dopamina e dello smistamento delle vescicole sinaptiche sono alla base del morbo di Parkinson associato all'auxilina. *Cell Rep.* 42, 112231 (2023).
100. Perez-Riverol, Y. et al. Il database PRIDE a 20 anni: 2025 aggiornamento. *Nucleic Acids Res.* 53, D543–D553 (2025).
101. Fox, WM Riflesso-ontogenesi e sviluppo comportamentale del topo. *Anim. Behav.* 13, 234–241 (1965).
102. Heyser, CJ Valutazione delle tappe dello sviluppo nei roditori. *Curr. Protocol. Neuroscienze. Capitolo 8, Unità 8 18*, <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25> (2004).
103. Hempstead, E. <https://BioRender.com/ndyh7n2> (2025).
104. Hempstead, E. <https://BioRender.com/97593al> (2025).

Ringraziamenti

La ricerca riportata in questa pubblicazione è stata supportata da Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development del National Institutes of Health con il numero di assegnazione R21HD097561 (a SDR) e R01HD104609 (a SDR), e dal National Istituto di Salute Mentale del National Institutes of Health sotto Numero di premio R01MH131537 (a SDR e ZW). Il contenuto è di esclusiva responsabilità degli autori e non rappresenta necessariamente il punto di vista ufficiale dei National Institutes of Health. Il lavoro è stato inoltre

Il progetto è stato finanziato dalla Beatrice and Samuel A. Seaver Foundation e ha ricevuto un Distinguished Scholar Award dalla Icahn School of Medicine del Mount Sinai. AM, LD e JL hanno ricevuto borse di studio dalla Beatrice and Samuel A. Seaver Foundation. AM ha ricevuto anche il supporto del Friedman Brain Institute (Doft Family and Friedman Brain Institute Postdoctoral Innovator Award) e del Brain and Behavior Research Foundation Young Investigator Grant 2023. LD ha ricevuto anche un tirocinio dal NIDCR-Interdisciplinary Training in Systems and Developmental Biology and Birth Defects (NICHD, T32HD075735).

ZA è stato sostenuto da una borsa di studio del Dean's Undergraduate Research Fund della New York University e da una borsa di studio Seaver Undergraduate Research. JT è supportato dalla Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Fondazione tedesca per la ricerca) nell'ambito della strategia di eccellenza tedesca - EXC

2033 – 390677874 – RESOLV e TA 167/6-3. Ringraziamo inoltre il Keck MS & Proteomics Resource della Yale School of Medicine per aver fornito gli spettrometri di massa necessari e gli strumenti biotecnologici di accompagnamento, finanziati in parte dalla Yale School of Medicine e dall'Office of The Director dei National Institutes of Health (S10OD02365101A1, S10OD019967 e S10OD018034). I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta e analisi dei dati, nella decisione di pubblicare o nella preparazione del manoscritto. La microscopia è stata eseguita presso il Microscopy and Advanced Bioimaging CoRE della Icahn School of Medicine at Mount Sinai. Ringraziamo Dévina Ung per la configurazione iniziale dell'esperimento, Kristi Niblo per il supporto tecnico e Olivia Pistone, Sylvia Maxwell e Mahmuda Hannan per il supporto nell'inserimento dei dati. I plasmidi pCIneo-HA-DDX3X sono stati gentilmente forniti dal Dr. Ricardo Soto-Rifo (Universidad de Chile).

Il gene pTWIST-CMV-FLAG-DDX3Y è stato gentilmente fornito dal Dr. Stephen Floor (Università della California, San Francisco). Questo lavoro è dedicato alla memoria del Dr. Daniele Di Marino.

Contributi degli autori: SDR, AM, LD

e JL hanno concettualizzato lo studio e progettato gli esperimenti. AM, LD, JL, YP, CF, ZA e MGF hanno condotto gli esperimenti e raccolto i dati. ZW e WW hanno progettato gli esperimenti sull'intero campione e raccolto i dati. FM, JK e JT hanno fornito il loro contributo per gli esperimenti biochimici. SDR, AM, LD e JL hanno analizzato i dati. SDR, AM, LD e JL hanno redatto la bozza originale e tutti gli altri autori hanno revisionato e approvato il manoscritto.

Conflitti di interesse Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Informazioni aggiuntive Informazioni

supplementari La versione online contiene materiale supplementare disponibile all'indirizzo <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59680-8>.

La corrispondenza e le richieste di materiale devono essere indirizzate a Silvia De Rubeis.

Informazioni sulla revisione paritaria Nature Communications ringrazia l'anon- Ringraziamo i revisori per il loro contributo alla revisione paritaria di questo lavoro. È disponibile un file di revisione paritaria.

Le informazioni sulle ristampe e sulle autorizzazioni sono disponibili su <http://www.nature.com/reprints>

Nota dell'editore: Springer Nature rimane neutrale per quanto riguarda le rivendicazioni di giurisdizione nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Accesso aperto Questo articolo è rilasciato con licenza Creative Commons Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 4.0 Internazionale, che consente qualsiasi utilizzo non commerciale, condivisione, distribuzione e riproduzione in qualsiasi mezzo o formato, a condizione che venga dato credito appropriato agli autori originali e alla fonte, venga fornito un link alla licenza Creative Commons e venga indicato se è stato modificato il materiale concesso in licenza. Questa licenza non autorizza la condivisione di materiale adattato derivato da questo articolo o da parti di esso. Le immagini o altro materiale di terze parti presenti in questo articolo sono inclusi nella licenza Creative Commons dell'articolo, salvo diversa indicazione nella riga di credito del materiale. Se il materiale non è incluso nella licenza Creative Commons dell'articolo e l'uso previsto non è consentito dalla legge o eccede l'uso consentito, sarà necessario ottenere l'autorizzazione direttamente dal detentore del copyright. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitare <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© L'autore(i) 2025