Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Estela Mitie Cruvinel

**Estudo da expressão diferencial de genes localizados no
segmento cromossômico 15q11-q13 em pacientes com as
síndromes de Angelman e Prader-Willi**

Orientadora: Prof^a Celia P. Koiffmann

São Paulo

2015

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Estela Mitie Cruvinel

**Estudo da expressão diferencial de genes localizados no
segmento cromossômico 15q11-q13 em pacientes com as
síndromes de Angelman e Prader-Willi**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Prizskulnik Koiffmann

São Paulo

2015

Cruvinel, Estela Mitie

Estudo da expressão diferencial de genes localizados no segmento cromossômico 15q11-q13 em pacientes com as síndromes de Angelman e Prader-Willi

Tese de doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

- 1- Síndrome de Prader-Willi
- 2- Células-tronco pluripotente induzidas
- 3- *SNORD116*
- 4- ZNF274
- 5- SETDB1

Comissão Julgadora:

.....

.....

.....

.....

.....

Agradecimentos

Uma tarefa tão árdua quanto a de escrever a tese é a de escrever os agradecimentos. Durante os meus 10 anos de USP tive o prazer e a sorte de conhecer pessoas que mudaram e continuam mudando minha vida. São pessoas maravilhosas que vieram para minha vida para acrescentar. Em especial durante o doutorado, muitos laços se estreitaram e novos foram feitos. Sou grata a todos que de alguma forma me ajudaram nesta jornada.

Em especial gostaria de agradecer a Prof^a Dr^a Celia P. Koiffmann pela confiança, paciência, dedicação e ajuda. Ela é uma professora excepcional que sempre se preocupa muito com seus alunos. Essa preocupação vai além do meio acadêmico. Sou grata a todos seus ensinamentos.

No meu dia-a-dia sempre estive bem acompanhada, o laboratório embora seja repleto de mulheres que repelem homens, pois essa deve ser a única explicação pela falta da presença masculina, é um ambiente ótimo que me proporcionou muitas risadas, histórias e amadurecimento! Agradeço a Monica Varela e a Claudia Castro que além da companhia muitíssimo agradável, me ajudaram com alguns experimentos do doutorado. E tive a felicidade de trabalhar com a Carla D'Angelo, Cristiani Giffali, Amanda Coimbra, Mauren dos Santos, Lucilene da Silva e Roseli Zanelato. Muito obrigada meninas!

Além do laboratório da Prof^a Celia Koiffmann, tive sempre o apoio e companhia de pessoas maravilhosas de diversos laboratórios do CEPID-CEGH. Agradeço ao pessoal da Prof^a Maria Rita dos Passos-Bueno, em especial a meus companheiros de sala de cultura: Gerson Kobayashi, Danielle

Moreira, May Suzuki, Andressa Morales e Karina Griesi Oliveira. A Karina foi fundamental para o estabelecimento das linhagens iPSCs e, durante a reprogramação, a May e a Andressa trabalharam arduamente para que tudo funcionasse. E, também agradeço a minha companheira de sala, a Eloisa pela prazerosa companhia.

Outro laboratório que sempre me ajudou e continua ajudando é o da Prof^a Mayana Zatz. Obrigada a Juliana, Amanda, Marcos, Mayra, Tatiana e Guiliana por compartilhar o pequeno espaço de vocês comigo e sempre serem muito solícitos e carinhosos!

Quero agradecer a outros laboratórios do CEPID-CEGH que também me ajudaram: do Prof^o Oswaldo K. Okamoto e da Prof^a Mariz Vainzof. E também aos funcionários do CEPID-CEGH.

I have to thank all my labmates at UCHC in Prof. Dr. Marc Lalande's lab where I spent one of the most amazing year of my life. Prof. Marc, Prof. Kristen Martins-Taylor and Tara Budinetz worked hard with me; they were always very attentive and ease to work with. Moreover, Prof Stormy Chamberlain, Ivy Chen, Jack Hsiao, Noelle Germain, Heather Glatt-Deeley, Vibha Sail and Leann Crandall were fantastic people that turned my one-year stay in US unforgettable. They were amazing colleagues and friends that thought me a lot about new techniques and, most important, about cultural diversity and, at the same time, how similar we are no matter where you were born.

I cannot forget to thank my housemate, Chongchong Xu, and my Brazilian friends in Connecticut, Daniela Ambrisio, Eliane Dutra and Rogerio

Feris. They were essential to make my stay in US very much special and easier.

Quero agradecer a minha família que mesmo sem entender direito o que faço sempre me apoiou. Agradeço meus amigos por me fazerem rir quando estava precisando relaxar. Tanto a família quanto os amigos me ajudaram muito durante todos esses anos de doutorado.

E por último deixei as três pessoas mais importantes da minha vida: meu irmão, Arthur K. Cruvinel, com quem me preocupo e tenho um carinho muito especial desde quando ele morava na barriga da minha mãe. Quero agradecer por toda ajuda e companhia da minha mãe, Lucia T. Cruvinel, que foi fundamental em todos os momentos deste doutorado e da minha vida. E ao Rafael F. Pinto, meu companheiro, que faz com que meus dias sejam repletos de alegria e aprendizado.

Esse trabalho foi possível por causa do apoio financeiro da FAPESP-CEPID (#1998/14254-2 e #2013/08028-1) e do CNPq (#201272/2012-1 e #161855/2011-3).

Abreviações

5mC - presença do grupo metil no carbono da posição 5 no anel de pirimidina da citosina

5hmC - presença do grupo hidroximetil no carbono da posição 5 no anel de pirimidina da citosina

5fC - presença de formilcitosina da posição 5 no anel de pirimidina da citosina

5caC - presença do grupo carboxil no carbono da posição 5 no anel de pirimidina da citosina

AS – síndrome de Angelman

AS-IC - menor região do controle do *imprinting* que quando deletada causa defeito de *imprinting* desencadeando na síndrome de Angelman

BS – local de ligação, foram investigados 6 dentro do SNOG1 que foram chamados de SNOG1-BS1, SNOG1-BS2, SNOG1-BS3, SNOG1-BS4, SNOG1-BS5 e SNOG1-BS6

E6-AP – proteína associada ao E6, proteína traduzida a partir do *UBE3A*

GH – hormônio de crescimento

H3K9me3 – trimetilação da lisina 9 na histona 3

H3k4me2 – dimetilação da lisina 4 na histona 3

ICR – região de controle do *imprinting*

iPSCs – células-tronco pluripotente induzidas

LCR – repetições de baixo número de cópias

lncRNA – RNA não codificante longo

ncRNA – RNA não codificante de proteína

PWS – síndrome de Prader-Willi

PWS-IC – menor região do controle do *imprinting* que causa síndrome de Prader-Willi quando deletada devido a defeito do *imprinting*

SHEDs – células-tronco da polpa de dente decíduo

SNOG1/SNOG2/SNOG3 - o *SNORD116* é um conjunto de sequências repetidas e é dividido em 3 grupos conforme a similaridade das repetições grupo 1 (*SNORD116*-1 até -9), grupo 2 (*SNORD116*-10 até -24) e grupo 3 (*SNORD116*-25 até -29). Neste trabalho esses grupos foram referidos como SNOG1, SNOG2 e SNOG3, respectivamente.

snoRNA – RNA pequeno e nucleolar

UBE3A-AS – transcrito de sentido contrário do *UBE3A*

Sumário

1. Resumo e <i>Abstract</i>	11
1.1. Resumo.....	11
1.2. <i>Abstract</i>	12
2. Introdução	14
2.1 Síndromes de Angelman e de Prader-Willi	14
2.2. <i>Imprinting</i> genômico.....	18
2.3. Região 15q11-q13.....	19
2.4. Alguns genes da região 15q11-q13 importantes para AS e PWS.....	22
2.4.1. <i>UBE3A</i>	22
2.4.2. <i>SNORD116</i>	27
2.5. Controle do <i>imprinting</i>	29
2.6. Estabelecimento e manutenção do <i>imprinting</i>	33
2.7. Zfp57 e ZNF274	40
2.8. Células pluripotentes induzidas (iPSCs)	43
3. Objetivos	46
4. Materiais e Métodos	48
4.1. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)	48
4.2. Congelamento das iPSCs	49
4.3. Obtenção de neurônios	50
4.4. Extração de RNA e preparação de cDNA	51
4.5. Imunocitoquímica	51
4.6. Extração de DNA	52
4.7. MLPA	52
4.8. PCR em tempo real (qPCR).....	53
4.9. <i>Knockdown</i> ZNF274.....	56
4.10. <i>Knockdown</i> SETDB1.....	56
4.11. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP).....	56
4.12. ChIP sequencial.....	58
4.13. Imunoprecipitação de DNA metilado (MeDIP) e hidroximetilado	58
4.14. Análise de 5hmC e 5mC	58
5. Resultados	60
5.1. Reprogramação das iPSCs.....	60

5.2. ZNF274 se liga preferencialmente ao alelo materno.....	65
5.3. <i>Knockdown</i> do ZNF274.....	68
5.4. SETDB1 forma um complexo repressivo com ZNF274.....	71
5.5. <i>Knockdown</i> do SETDB1 e ZNF274 nas iPSCs	73
5.6. Neurônios derivados de iPSCs	80
5.7. Ligação do ZNF274 em neurônios derivados de iPSCs.....	85
5.8. Ligação do ZNF274 em SHEDs	86
5.9. Estado das citosinas na região PWS-IC	88
5.10. Expressão de alguns genes importantes para o estabelecimento e manutenção de marcas epigenéticas.....	89
6. Discussão	93
7. Conclusões.....	108
8. Referências bibliográficas	109
9. Anexos	126
9.1. Anexo 1	126
9.2. Anexo 2.....	127

1. Resumo e Abstract

1.1. Resumo

A síndrome de Prader Willi (PWS) é uma doença de neurodesenvolvimento; a principal hipótese de causa de PWS é a ausência da expressão de *SNORD116*. O *SNORD116* fica na região 15q11-q13 que apresenta vários genes com *imprinting* genômico e é conhecida por ser controlada pela região de controle de *imprinting* PWS (PWS-IC) que se localiza sobreposta à região promotora e ao exon 1 do gene *SNRPN*. Em camundongos, uma proteína zinc finger (Zfp57) foi descrita como importante para o estabelecimento e manutenção do *imprinting* no *Snrpn*. Através de análise do ENCODE do Genome Browser, verificamos que outra proteína zinc finger (ZNF274) se liga ao *SNORD116*. ZNF274 é conhecida por formar um complexo com TRIM28 e SETDB1 que inibe a expressão através da trimetilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9me3). No atual estudo mostramos que ZNF274 se liga ao *SNORD116* preferencialmente ao alelo materno nas células-tronco pluripotente induzidas (iPSCs). Adicionalmente, as proteínas TRIM28 e SETDB1, que formam um complexo com a ZNF274, estão presentes na região do *SNORD116*, e a modificação H3K9me3 ocorre preferencialmente no alelo materno nas iPSCs. Na análise funcional, mostramos que o *knockdown* de SETDB1 isoladamente ou combinado com o *knockdown* de ZNF274 causa aumento na expressão de *SNRPN* e *SNORD116* nas iPSCs. Além disso, ocorre redução do H3K9me3 e aumento da modificação relacionada à ativação da transcrição, H3K4me2 (dimetilação da lisina 4 na histona 3), na PWS-IC. Os *knockdowns* também afetam a metilação de DNA, ocasionando o aumento de 5-hidroximetilação de citosinas na PWS-IC. Em

outros tipos celulares estudados, neurônios derivados de iPSCs e SHEDs, ZNF274 e a modificação H3K9me3 ocorrem em ambos os alelos dentro do *SNORD116*. É possível que, nas iPSCs, este complexo proteja a região imprintada da desmetilação do DNA de proteína(s) que atue(m) nessa região somente em células pluripotentes. Nossos achados possibilitam melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no *imprinting* da região 15q11-q13, principalmente do *SNORD116*, e, conseqüentemente, disponibiliza novas ferramentas para o desenvolvimento de futuras terapias para PWS.

1.2. Abstract

Prader-Willi syndrome (PWS) is a neurodevelopmental disorder. Loss of paternal copies of the cluster of *SNORD116* C/D box snoRNAs and their host transcript, *116HG*, on human chromosome 15q11-q13 imprinted region is considered to be the major responsible for PWS. PWS-imprinting center (PWS-IC) regulates 15q11-q13 imprinting. PWS-IC is located upstream and in the exon 1 of *SNURF-SNRPN* gene. In mice, *Zfp57* plays an important role in establishment and maintenance of *Snrpn* imprinting. In human, ENCODE database indicates that ZNF274 binds to *SNORD116*. Moreover, ZNF274 are C2H2/KRAB zinc finger proteins as *Zfp57*. We have investigated the mechanism of repression of the maternal *SNORD116*. Here, we report that the ZNF274, in association with the histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase SETDB1, is part of a complex that binds to the silent maternal but not to the active paternal alleles in induced pluripotent stem cells (iPSCs). Knockdown of SETDB1 in PWS-specific iPSCs causes a decrease in the accumulation of H3K9 trimethylation (H3K9me3) at *SNORD116*. We also show that upon

knockdown of SETDB1 in PWS-specific iPSCs, expression of maternally silenced *116HG* RNA is partially restored. SETDB1 knockdown in PWS iPSCs also disrupts DNA methylation at the PWS-IC where a decrease in 5-methylcytosine is observed in association with a concomitant increase in 5-hydroxymethylcytosine. In iPSCs-derived neurons and stem cells from human exfoliated teeth (SHEDs) ZNF274/SETDB1 complex binding and H3K9me3 modification occur in both alleles. These observations suggest that the ZNF274/SETDB1 complex bound to the *SNORD116* cluster may protect the PWS-IC from DNA demethylation during early development, as indicated by iPSCs. Our findings reveal novel epigenetic mechanisms that function to repress the maternal 15q11-q13 region. The better understanding of epigenetic mechanisms provides new tools for future therapy research.

2. Introdução

2.1 Síndromes de Angelman e de Prader-Willi

A síndrome de Angelman (AS) é uma doença rara (~1:15.000 nascimentos) descrita em 1965 por Harry Angelman. AS é caracterizada por atraso grave do desenvolvimento, falha no desenvolvimento da fala, distúrbio de movimento (andar atáxico e movimento trêmulo dos membros) e comportamento característico (crise de risos facilmente motivada). Além disso, algumas outras características são recorrentes como: microcefalia, epilepsia, padrão anormal no eletroencefalograma, língua protrusa, hipotonia, atração por água, e obesidade a partir da adolescência (Varela *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006; Williams, 2010).

Diferentes mecanismos genéticos causam AS: deleção *de novo* do segmento 15q11-q13 do cromossomo materno em 70-75% (Knoll *et al.*, 1989), dissomia uniparental paterna do cromossomo 15 em 2-3% (Magenis *et al.*, 1990), defeito na região de controle de *imprinting* (ICR) do cromossomo 15 materno em ~5% dos casos (Buiting *et al.*, 1995), e, mutação no gene *UBE3A* em 8% dos casos (Kishino *et al.*, 1997).

A síndrome de Prader-Willi (PWS) tem uma incidência similar à encontrada na AS e foi descrita por Prader, Willi e Labhart em 1956. PWS é um distúrbio neuropsicomotor com quadro clínico que varia conforme a idade do portador da síndrome. Tradicionalmente ela é dividida em duas fases. Na primeira fase os pacientes apresentam hipotonia e dificuldade de alimentação associada, principalmente, com a dificuldade de sucção; assim eles apresentam dificuldade de ganho de peso e baixa estatura. Na segunda fase,

apresentam hiperfagia que leva a obesidade. Além disso, outras características são recorrentes entre portadores da PWS: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, déficit intelectual leve a moderado, dificuldade de aprendizado, face característica (olhos amendoados, fronte estreita, ponte nasal estreita, lábio superior fino com cantos voltados para baixo), mãos e pés pequenos, hipogonadismo, criptorquidismo, comportamento obsessivo-compulsivo, distúrbio no sono e aumento do risco de doenças com espectro autista (Holm *et al.*, 1993; Varela *et al.*, 2005; Hogart *et al.*, 2008; Cassidy *et al.*, 2012).

Recentemente, foi observado que a mudança da primeira fase para a segunda fase é muito mais complexa e gradual. Miller e colaboradores (2011) fizeram uma caracterização da PWS mais detalhada analisando principalmente aspectos nutricionais da síndrome. A fase inicial, chamada de 0, ocorre durante o desenvolvimento uterino e é caracterizada pela redução dos movimentos fetais e baixo peso e tamanho. Durante a fase seguinte, 1a, que vai do nascimento até o 9º mês é marcada pela hipotonia e dificuldade de alimentação. Na fase 1b, termina a dificuldade de alimentação e o crescimento começa atingir números normais da curva de crescimento. Na fase 2a, que ocorre aproximadamente dos 2 até 4,5 anos, inicia o aumento de peso, sem aumento do apetite. A fase seguinte que vai até os 8 anos é caracterizada pelo aumento de peso e de apetite, mas ainda ocorre saciedade e uma dieta apropriada pode ser introduzida. A fase 3 que compreende dos 8 anos até a fase adulta é marcada pela hiperfagia, comportamento obsessivo-compulsivo (roubam comida, comem alimentos do lixo e congelados, alimentos precisam ser trancados) e nunca se sentem satisfeitos em relação a alimentos. Na última

fase, 4, ocorre uma melhora no controle de apetite em relação à fase anterior. Pode ser que portadores da PWS pulem algumas dessas fases e a idade para alcançarem essas fases pode variar entre pacientes. Além disso, pode ser que não alcancem a última fase. A progressão por essas fases pode ser alterada pela administração de hormônio de crescimento (GH) nos pacientes com PWS.

A maioria dos pacientes com PWS apresentam insuficiência do GH e a terapia com este hormônio tem sido realizada. Melhoras importantes do quadro clínico têm sido observadas e os melhores resultados são observados em caso tratados com GH desde bebês (dos 6 meses aos 2 anos). Eles apresentam melhora no índice de massa corpórea, aumento da massa muscular, aumento da circunferência da cabeça, melhora na fala, na coordenação motora e cognitiva (Goldstone *et al.*, 2008; Cassidy *et al.*, 2012). Em muitos casos o tratamento tem se mostrado muito efetivo, porém alguns exames, além do diagnóstico genético, são necessários antes e/ou durante o tratamento como avaliação de distúrbios do sono (ex. apneia), raio-X para observar escoliose, avaliar níveis de IGF-I para evitar elevação excessiva com o tratamento com GH. Essas avaliações são necessárias, pois um considerável número de crianças faleceram nos primeiros 9 meses de tratamento do GH. As doenças respiratórias são a principal causa das mortes, que também é uma causa comum de morte em pacientes com PWS não tratados com GH (Goldstone *et al.*, 2008; Tauber *et al.*, 2008)

Em relação ao diagnóstico genético, a maioria dos casos (~70%) é decorrente de deleção do segmento 15q11-q13 do cromossomo paterno (Knoll *et al.*, 1989); dissomia uniparental materna corresponde a ~25% dos casos

(Mascari *et al.*, 1992); e ~2% dos casos são de defeito na ICR no cromossomo paterno (Buiting *et al.*, 1995).

Na PWS, ao contrário da AS, não existe relato de pacientes com mutação em um único gene desencadeando o quadro clínico. Entretanto, uma região crítica de ~91kb foi estabelecida pelo estudo de casos isolados. Sahoo e colaboradores (2008) descreveram um caso de PWS devido a uma microdeleção envolvendo *SNORD109A*, todo grupo de repetições do *SNORD116*, *IPW* e de parte do *SNORD115*. Posteriormente, foi identificado um caso de microdeleção de ~187kb incluindo o exon 2 do gene *SNURF-SNRPN* (aqui mencionado como *SNRPN*) até *IPW* (Smith *et al.*, 2009). Um terceiro caso, semelhante ao primeiro, com uma deleção um pouco maior, corroborou a importância da região que inclui *SNORD109A*, *SNORD116* e *IPW* para PWS (Duker *et al.*, 2010). Um último e recente caso, de uma mulher com PWS portadora de uma deleção de 118kb que inclui *SNORD109A*, *SNORD116* e *IPW* herdada do pai, diminuiu a região crítica, mas a quantidade de genes nela continuou a mesma (Bieth *et al.*, 2014) (fig. 1).

Figura 1: Esquema da região crítica da PWS. Estão representados os quatro casos de deleções pequenas que levaram a quadros de PWS; eles delimitaram a região crítica em ~91kb e com 3 genes: *SNORD109A*, *SNORD116* e *IPW*. A região crítica está representada pela barra vermelha. Ilustração modificada de Bieth *et al.*, 2004.

Recentemente, foram descritos pacientes com doença do espectro autista, déficit intelectual e algumas características semelhantes às dos pacientes com PWS que apresentaram mutação do gene *MAGEL2* que se localiza na região 15q11-q13. Entretanto, 3 dos 4 pacientes descritos não apresentaram todas as principais características de PWS (Schaaf *et al.*, 2013). E mutações do *MAGEL2* foram encontradas em indivíduos que não apresentavam PWS segundo os critérios estabelecidos por Holm (1993), deixando a função do *MAGEL2* incerta (Buiting *et al.*, 2014).

As AS e PWS foram importantes para demonstrar o mecanismo de *imprinting* genômico nos humanos (Nicholls *et al.*, 1989).

2.2. *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico é um mecanismo epigenético muito estudado e é a expressão diferencial dos alelos dependendo de sua origem parental, podendo ser um fenômeno tecido específico ou estágio específico (revisado em Plasschaert & Bartolomei, 2014). Faz 30 anos que o *imprinting* genômico foi descoberto nos animais. Através da observação do desenvolvimento embrionário de zigotos com dois pronúcleos femininos ou masculinos, observou-se que alguns alcançavam até a fase de blástula, porém paravam de desenvolver logo após a implantação (McGrath & Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984).

Além da importância durante o desenvolvimento embrionário, o *imprinting* genômico influencia no crescimento, diferenciação e regulação de vários processos biológicos; seus efeitos se estendem até a vida adulta e os

defeitos de *imprinting* genômico podem desencadear uma série de patologias, como AS e PWS (Peters, 2014).

Resumidamente, a PWS foi descrita em 1956, como mencionado anteriormente, mas os mecanismos genéticos que desencadeiam na síndrome começaram a ser desvendados após o advento das técnicas de análise de cromossomos com bandas. Os primeiros casos de deleção da região 15q11-q13 em pacientes com PWS foram observados por Ledbetter e colaboradores (1981). Entretanto, a mesma região foi posteriormente identificada como deletada também na AS (Magenis *et al.*, 1987).

Posteriormente, a diferença entre as deleções responsáveis pela AS e PWS foram elucidadas pelas diferenças nas bandas Q e G e polimorfismos de comprimento de fragmentos após tratamento com enzimas de restrição. Essas diferenças indicaram que as deleções, no caso da PWS, ocorrem no cromossomo de origem paterna e, no caso da AS, no cromossomo de origem materna (Butler *et al.*, 1986; Nicholls *et al.*, 1989; Knoll *et al.*, 1989). Assim, foi sugerido que a região deletada, 15q11-q13, apresenta genes imprintados.

2.3. Região 15q11-q13

A maioria dos casos de AS e PWS é decorrente de deleção, pois o segmento 15q11-q13 apresenta grande instabilidade meiótica. Nesta região ocorre a presença de “duplicons” (LCR - *low copy repeat sequences*) que podem causar rearranjos cromossômicos. A grande homologia entre essas sequências facilita o desalinhamento que pode resultar em recombinação

homóloga não alélica durante a meiose, assim, podendo causar duplicações e deleções (Ji *et al.*, 2000).

Alguns pontos de quebra, que são sítios de quebra cromossômica (BP), são conhecidos próximos da região 15q11-q13; perto deles ou neles foram identificadas sequências repetitivas derivadas do gene *HERC2* (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). A origem dessas repetições, que correspondem aos primeiros 79 exons do gene *HERC2*, é de rearranjos internos ocorridos durante a evolução dos primatas (Ji *et al.*, 1999).

A maioria das deleções em AS e PWS envolvem os sítios de quebra 1 (BP1) até o sítio de quebra 3 (BP3), sendo de aproximadamente 6Mb e são chamadas de deleções do tipo 1. Ou as deleções podem ser do tipo 2 envolvendo os sítios de quebra 2 (BP2) e BP3, que geram um segmento deletado um pouco menor, excluindo pelo menos 4 genes com expressão bialélica (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYF1P1* e *GCP5*) que estão deletados nos pacientes com deleção do tipo 1. Os pacientes com deleção mais extensa apresentam maior gravidade na vocalização ou mais problemas cognitivos e de comportamento no caso da AS ou PWS, respectivamente (Varela *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2004).

A região entre os BP2 e BP3 tem pelo menos 17 genes imprintados: 15 deles expressos, preferencialmente, a partir do cromossomo paterno: *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *PWRN1*, *NPAP1* (*C15orf2*), *SNRPN*, *IPW*, *PAR-1*, e vários são snoRNAs (*small nucleolar RNA*) como *SNORD107* (*HBII-436*), *SNORD64* (*HBII-13*), *SNORD108* (*HBII-437*), *SNORD109A* (*HBII-438A*), *SNORD116* (*HBII-85*), *SNORD115* (*HBII-52*) e *SNORD109B* (*HBII-438B*); somente 2 genes

são de expressão preferencialmente materna: *UBE3A* e *ATP10A* (fig. 2) (Nicholls *et al.*, 1998; Runte *et al.*, 2001).

Figura 2: Esquema da expressão de genes da região 15q11-q13 (modificado de Horsthemke & Wagstaff, 2008). Essa região apresenta vários genes com expressão preferencial ou exclusiva paterna, enquanto que a expressão materna é preferencial em somente 2 genes. Na figura também estão representadas modificações epigenéticas diferentes entre os alelos dependendo de sua origem parental. Essa figura mostra parte do cromossomo de origem paterna (PAT) e do cromossomo de origem materna (MAT) e os vários genes contidos na região representados por caixas ou traços. As setas mais grossas indicam alta expressão do alelo, enquanto que as setas mais finas indicam uma menor expressão do alelo. Na figura, cen indica o centrômero e tel indica o telômero.

2.4. Alguns genes da região 15q11-q13 importantes para AS e PWS

2.4.1. *UBE3A*

A ausência de expressão do *UBE3A* materno é a principal responsável pelo quadro clínico da AS. A região promotora do *UBE3A* não é diferencialmente metilada, e, o *imprinting* do *UBE3A* possui algumas peculiaridades em relação aos mecanismos envolvendo o centro de regulação do *imprinting*. A expressão paterna de um RNA de sentido contrário (*UBE3A-AS*, *RNA antisense*) causa a repressão da expressão do *UBE3A* paterno (Rougeulle *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 2003; Roloff & Nuber, 2005; Johnstone *et al.*, 2006).

O *imprinting* do *UBE3A* é observado em vários tipos neuronais, como células de Purkinje, neurônios hipocampus, células mitraes do bulbo olfatório, neurônios da região cortical. Além disso, em tecidos fetais do sistema nervoso também foi observada uma expressão predominantemente materna. Entretanto, em outros tipos celulares, como fibroblastos, linfócitos, precursores neurais e células da glia, a expressão do *UBE3A* é bialélica (Albrecht *et al.*, 1997; Vu & Hoffman, 1997; Yamasaki *et al.*, 2003; Gustin *et al.*, 2010; DuBose *et al.*, 2010).

O transcrito que inclui a região *UBE3A-AS* se inicia na região promotora do *SNRPN* e faz parte do extenso transcrito *SNRPN* senso-*UBE3A-AS* que tem mais de 460kb, com mais que 146 exons e inclui vários snoRNAs (*SNORD107*, *SNORD64*, *SNORD108*, *SNORD109A*, *SNORD116*, *SNORD115* e *SNORD109B*) (Runte *et al.*, 2001; Runte *et al.*, 2004). Além disso, foi determinada que o *Ube3a-as* é transcrito pela RNA polimerase II, pequena

porcentagem (~2%) apresenta cauda poli-A, tem meia vida de 4 horas, se localiza principalmente no núcleo e a região promotora é a mesma do *Snrpn* e também apresenta promotores *upstream* ao *Snrpn*; estes últimos podem ser controlados, especificamente, em neurônios (Meng *et al.*, 2012).

O transcrito que se inicia no *SNRPN* é expresso somente do alelo paterno e sofre *splicing* alternativo que varia conforme o tecido. Em neurônios, o transcrito é maior do que em outros tipos celulares; esse transcrito inclui os exons 58 até 149, que é uma região com o *UBE3A-AS* e o *SNORD115*. Nos demais tecidos, o transcrito não inclui a região *UBE3A-AS*; assim, o *UBE3A* apresenta expressão bialélica (Runte *et al.*, 2004). Entretanto, Galivete e colaboradores (2014) mostraram que embora os ncRNAs (RNAs não codificantes) até *IPW* apresentem o mesmo padrão de expressão em 20 diferentes tecidos, o *SNORD115* e *UBE3A-AS* expressam de forma diferente dos outros ncRNAs e entre si. Assim, eles propuseram que ocorre uma regulação da transcrição diferente entre os 2 últimos transcritos.

O paciente com PWS descrito por Smith e colaboradores (2009) que apresenta uma microdeleção paterna que se inicia após exon 1 do *SNRPN* e se expande até após o *IPW* apresenta a expressão do *UBE3A-AS* paterna em células não neuronais e a expressão do *UBE3A* paterno é reduzida. Este achado indica que a região que controla a transcrição, impedindo a expressão do *UBE3A-AS* nestes tipos celulares, está dentro da região deletada; a ausência desta região em combinação com a região promotora do *SNRPN* intacta, possibilita a expressão do *UBE3A-AS* (Martins-Taylor *et al.*, 2014).

A proteína codificada pelo *UBE3A*, a E6-AP (proteína associada ao E6), é uma enzima ubiquitina-ligase envolvida na degradação protéica. Essa ubiquitina-ligase é capaz de receber a ubiquitina da proteína E2 (enzima ubiquitina-conjugase) através de ligação tioéster que ocorre porque essa enzima possui resíduos de cisteína na região C-terminal, no domínio HECT. A E6-AP transfere a ubiquitina para a proteína-alvo, que é reconhecida pelas sequências na região NH2-terminal da proteína E6-AP. Assim, E6-AP identifica a proteína-alvo e tem atividade enzimática (Huibregtse *et al.*, 1995; Glickman & Ciechanover, 2002).

Na ausência da E6-AP, que é o caso de pacientes com AS, o acúmulo de proteína(s) gera(m) o quadro clínico da síndrome (Matentzoglou & Scheffner, 2008; Lalande & Calciano, 2007). Em todos os pacientes com mutação no gene *UBE3A*, a mutação ocorre no domínio HECT, afetando a atividade de ubiquitina-ligase (Mishra & Jana, 2008).

Modelos animais são importantes ferramentas para o estudo de vias afetadas com a ausência de expressão do *Ube3a* materno; camundongos com mutação no *Ube3a* materno apresentam anormalidades motoras e comportamentais como andar atáxico, epilepsia, eletroencefalograma anormal e déficit de aprendizado. Esses animais apresentam alta concentração da cálcio/calmodulina quinase do tipo 2 (CaMKII) fosforilada que pode causar a diminuição da atividade basal devido à fosforilação prolongada (Weeber *et al.*, 2003; van Woerden *et al.*, 2007); e o hipocampo destes animais apresenta maior expressão da subunidade $\alpha 1$ da Na/K-ATPase que está relacionada a um potencial de repouso mais hiperpolarizado, e da subunidade NaV1.6 de canais de sódio dependentes de voltagem e anquirina G que são proteínas de

ancoramento presentes em segmentos iniciais do axônio (Kaphzan *et al.*, 2011). Entretanto, nestes casos, nenhuma proteína alvo da E6-AP foi identificada.

Outros estudos com modelos animais para AS identificaram algumas proteínas alvos da E6-AP, como a RhoA GEF (fator de troca de guanina) efexina 5 (E5) e a Arc. No caso da E5, é conhecido que as efrinas e os receptores de efrinas (Eph) desempenham importante papel no desenvolvimento das sinapses e a E5 é importante para desenvolvimento de sinapses dependentes de EphB. A ligação de EphB com a efrinaB desencadeia a fosforilação e degradação de E5 permitindo o desenvolvimento da sinapse. A degradação de E5 depende da atividade da proteína E6-AP. Em camundongos *Ube3a*^{-/+}, ocorre o aumento de E5 e, mesmo com tratamento com efrinaB, não ocorre a degradação de E5, o que explica os defeitos no desenvolvimento e, consequentemente, na função das sinapses (Marolis *et al.*, 2010; Scheiffele & Beg, 2010).

Além disso, a sinalização de neurotransmissores regula a transcrição do *Ube3a*. Após um estímulo de neurotransmissor ocorre o aumento de expressão do *Ube3a*, principalmente após a sinalização por neurotransmissores glutamatérgicos. Outra proteína de sinapse que se liga ao domínio de ligação da E6-AP, além da E5, é a proteína Arc e já foi mostrado que os níveis de Arc são maiores em camundongos com mutação no *Ube3a* materno (Mardirossian *et al.*, 2009; Greer *et al.*, 2010). Arc regula o tráfego do receptor do neurotransmissor glutamatérgico alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone-propionato (AMPA) nas sinapses, Arc internaliza o receptor AMPA. E6-AP degrada a proteína Arc pela via de ubiquitinação, prevenindo a internalização

do receptor AMPA. Logo, na ausência de E6-AP, a proteína Arc não é degradada, e o número de receptores AMPA diminui nas sinapses, e isso pode contribuir no desenvolvimento alterado dos neurônios (Greer *et al.*, 2010; Tai & Schuman, 2010; Scheiffele & Beg, 2010).

A busca por tratamento da AS tem alcançado resultados promissores com o uso de inibidores de topoisomerase, especialmente topotecan, em camundongos *Ube3a*^{-/+}. Essa droga ativa a expressão do *Ube3a* paterno em neurônios devido à redução da expressão do *Ube3a* antisenso (Huang *et al.*, 2011). Uma das hipóteses de atuação do topotecan é a de que induz o aumento de *R-loops* na região do *Snord116*, o que impede a transcrição a partir do *Snord116*, não formando o transcrito *Ube3a-as* (Powell *et al.*, 2013a).

Por outro lado, neurônios do paciente com PWS devido à deleção do exon 2 do *SNRPN* até o *IPW* (inclui *SNORD116*), quando tratados com topotecan, apresentam redução da expressão do *UBE3A-AS* menor do que neurônios sem esta deleção; isso indica que o *SNORD116* não é essencial para o processo de atuação do topotecan nos humanos, mas pode ser que tenha alguma influência para reduzir a transcrição, ou, a ação do topotecan foi menor nos pacientes com deleção que inclui o *SNORD116* devido ao menor tamanho do transcrito formado pelo *SNRPN* e *UBE3A-AS*, pois o topotecan atua em transcritos longos (Martins-Taylor *et al.*, 2014).

Os modelos animais mostraram que a proteína E6-AP atua em várias vias no sistema nervoso e são importantes para o teste de drogas que podem melhorar o quadro clínico de pacientes com AS. Porém, diferenças em relação a essas vias, à resposta a drogas e ao *imprinting* genômico podem ocorrer

entre humanos e murinos. Chamberlain e colaboradores (2010) obtiveram células pluripotente induzidas (iPSCs) de pacientes com AS; além disso, as iPSCs foram diferenciadas em neurônios e a expressão do *UBE3A* era mais baixa nos neurônios derivados de iPSCs de pacientes com AS, mostrando que algumas dessas células expressavam o *UBE3A-AS*. Posteriormente, foi feito o tratamento dessas células com topotecan e verificaram um aumento da expressão do *UBE3A* em células de pacientes com AS, indicando a ativação do alelo paterno através da repressão do *UBE3A-AS* (King *et al.*, 2013).

2.4.2. *SNORD116*

Diferente da AS, como dito anteriormente, ainda não se conhece caso de deleção de um único gene que desencadeia na PWS, mas o *SNORD116* é um forte candidato responsável por importantes características da PWS. *SNORD116* é um cluster de RNA não codificantes e transcreve RNAs pequenos e nucleolares (snoRNAs – *SNORD116*) do tipo *C/D box* e um *spliced* RNA não codificante longo (lncRNA) formado por exons do gene hospedeiro (*116HG*) que é retido no núcleo (Vitali *et al.*, 2010). Além disso, ele também transcreve um sno-lncRNA que se liga ao Fox2 (Yin *et al.*, 2012).

SNORD116 é dividido em 3 grupos pelo grau de semelhança das repetições: grupo 1 (*SNORD116*-1 até -9), grupo 2 (*SNORD116*-10 até -24) e grupo 3 (*SNORD116*-25 até -29). O *SNORD116* grupo 1 é altamente expresso no hipocampo, enquanto grupos 2 e 3 apresentam baixa expressão. O *SNORD116* é altamente expresso no hipocampo, mas também é expresso, em menor intensidade, em uma variedade de tecidos, como rins, ovários e músculo

esquelético (Castle *et al.*, 2010). Em camundongos a expressão de *Snord116* e *116HG* é exclusiva em neurônios, diferentemente dos humanos. O grupo 1 do *Snord116* apresenta alta expressão no cérebro de camundongo (Shen *et al.*, 2011).

A função do *SNORD116* não está totalmente esclarecida. Recentemente, foi demonstrado que nuvens de RNAs são formadas por *116HG* nos núcleos de neurônios com poucas semanas de vida e aumentam conforme a maturação neuronal; além disso, a nuvem é maior no período diurno do que noturno, indicando relação com o ciclo circadiano. *116HG* se associa a vários genes relacionados ao metabolismo e ao ciclo circadiano e, também, se liga a proteína RBBP5, que é uma ativadora de transcrição, mas os locais no DNA em que a *116HG* se liga são distantes das regiões promotoras dos genes, sugerindo que *116HG* sequestra RBBP5 para diminuir a expressão. Corroborando com essa hipótese, animais *Snord116*^{+/-} apresentam um aumento da expressão de vários genes relacionados com o ciclo circadiano e metabolismo (Powell *et al.*, 2013b).

Camundongos *Snord116*^{+/-} recapitulam algumas características da síndrome como: atraso do crescimento em recém-nascidos, atraso na maturação sexual, deficiência de *Igf-I* no fígado, atraso de aprendizado e hiperfagia quando adulto. Embora eles tenham hiperfagia, não são obesos, indicando algum controle diferente do humano (Ding *et al.*, 2008). Sendo a obesidade um importante fenótipo da PWS, os modelos animais presentes até agora apresentam diferenças importantes dos humanos.

Na busca de outros modelos, iPSCs a partir de células de pacientes com PWS foram obtidas por diversos grupos (Chamberlain *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014; Stelzer *et al.*, 2014); essas células são importantes ferramentas para o estudo desta patologia e, posteriormente, será feito melhor detalhamento sobre elas.

Além do *SNORD116*, o *IPW*, recentemente, foi apontado como tendo papel importante na regulação da expressão de genes imprintados no grupo *DLK1-DIO3*. iPSCs de pacientes com PWS apresentam expressão aumentada dos genes com expressão materna na região *DLK1-DIO3*, e quando *IPW* é expresso nestas células iPSCs, a expressão do *DLK1-DIO3* se assemelha a iPSCs de indivíduos normais. RNA do *IPW* interage com a H3K9metiltransferase G9A e induz na metilação de H3K9 na região diferencialmente metilada do cluster *DLK1-DIO3*, reduzindo a expressão de genes que são maternalmente expressos na região *DLK1-DIO3*. Assim, a regulação da expressão de genes na região *DLK1-DIO3* pelo *IPW* também pode ter um papel importante no fenótipo da PWS (Stelzer *et al.*, 2014).

2.5. Controle do *imprinting*

Os genes *UBE3A* e *SNORD116* são importantes nas AS e PWS, respectivamente. Entretanto, os outros genes da região 15q11-q13 contribuem para os fenótipos (Bird, 2014). A região 15q11-q13 apresenta características comuns com a maioria dos agrupamentos de genes imprintados descritos em Peters (2014): ocorre a presença de genes que expressam, preferencialmente, o alelo paterno quanto outros com expressão preferencial do alelo materno;

existem genes codificadores de proteínas como genes que transcrevem snoRNAs; e apresenta uma região responsável pelo controle do *imprinting*.

O *imprinting* do segmento 15q11-q13 é conhecido por ser controlado pela região de controle do *imprinting* (ICR) que se localiza na região promotora e no exon 1 do gene *SNRPN*. A localização foi determinada através de estudos de pacientes com microdeleções que apresentavam defeito de *imprinting* genômico e de deleções induzidas na região ortóloga em camundongos no cromossomo 7, que apresenta um *cluster* de genes em sequencia semelhante aos humanos, porém com orientação oposta, sendo, por exemplo, o *Ube3a* mais centromérico e *Ndn* mais telomérico (Buiting *et al.*, 1995; Beilinska *et al.*, 2000).

Em humanos, a ICR pode ser dividida em duas regiões importantes: PWS-IC e AS-IC. A região do PWS-IC foi determinada através de pacientes com PWS com os cromossomos 15 de origem biparental, mas com padrão de metilação uniparental; em alguns desses casos são encontradas microdeleções na ICR no cromossomo paterno causando um defeito do *imprinting*. O PWS-IC foi determinado pela área de sobreposição de todos os casos identificados de PWS com microdeleções na ICR, e é de, aproximadamente, 4.3kb e se localiza na região promotora do *SNRPN* e se sobrepõe ao exon 1 deste gene (Ohta *et al.*, 1999a). Da mesma forma, mas com pacientes com AS, foi possível determinar o AS-IC, que se localiza 35kb upstream do PWS-IC e tem pelo menos 880kb (Buiting *et al.*, 1999).

As microdeleções nos AS-IC e PWS-IC afetam a mudança do estado do *imprinting* paterno para materno e materno para paterno, respectivamente,

durante o estabelecimento do *imprinting* (Ohta *et al.*, 1999b). Existem pacientes com PWS devido ao defeito do *imprinting* que contêm deleções que incluem AS-IC e PWS-IC; mas os pacientes com AS que apresentam microdeleções na ICR, causando defeito no *imprinting*, apresentam a região do PWS-IC intacta e do AS-IC deletada. Assim, o PWS-IC é essencial para ocorrer o padrão de expressão paterno; quando PWS-IC está desmetilado, ele ativa a transcrição bidirecionalmente (Brannan & Bartolomei, 1999; Perk *et al.*, 2002).

O DNA no PWS-IC é metilado no alelo materno e é desmetilado no alelo paterno (Glenn *et al.*, 1996). A região do AS-IC tem DNA metilado bialelicamente; porém, ela é mais sensível a DNase I e apresenta acetilação de histonas e metilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4me) no alelo materno (Perk *et al.*, 2002). É proposto que o AS-IC ativo (no alelo materno) é responsável pela inativação do PWS-IC desencadeando o silenciamento de genes de expressão paterna (Brannan & Bartolomei, 1999; Perk *et al.*, 2002).

Em camundongos a ICR apresenta algumas diferenças em relação aos humanos. Existe uma região homóloga ao PWS-IC e alguns trabalhos mostraram que deleções de um segmento na região promotora e primeiros exons do *Snrpn* no alelo paterno podem inativar a expressão de genes expressos paternalmente: uma deleção envolvendo os 6 primeiros exons e região upstream do *Snrpn* reduz a expressão do *Snrpn*, *Ndn* e *Magel2* (Yang *et al.*, 1998), uma deleção de 4.8kb no exon 1 do *Snrpn* causa inativação parcial do alelo paterno, levando a letalidade parcial e os sobreviventes apresentam atraso de crescimento (Bressler *et al.*, 2001) ou uma deleção de 6kb a 1kb upstream da deleção de 4.8kb causa falha do controle do *imprinting* levando a um fenótipo semelhante à PWS (DuBose *et al.*, 2011).

Em relação ao AS-IC, ainda não foi encontrada uma região homóloga em camundongos (Horsthemke & Wagstaff, 2008). Por outro lado, a ausência de exons *upstream* ao *Snrpn* e ao equivalente do PWS-IC causa perda do *imprinting* quando transmitida maternalmente (Smith *et al.*, 2011). Além disso, quando a deleção de 4.8kb no exon1 do *Snrpn* ocorre no alelo materno, é observado um aumento parcial da expressão do *Snrpn*, *Snord116*, *Snord115* e *Ndn*; e quando essa deleção materna é acompanhada pela deleção do exon 2 do *Snrpn* até a região do *Ube3a* no alelo paterno ocorre a baixa expressão de genes provindos do alelo materno e é capaz de melhorar o fenótipo, diminuindo a mortalidade após nascimento e aumentando o crescimento (Wu *et al.*, 2012).

A inserção do AS-IC e PWS-IC humano na região *upstream* ao *Snrpn* mostrou que a ICR humana pode controlar a expressão do *Snrpn*, mas não controla a expressão de outros genes (*Ndn*, *Magel2* e *Mkrn3*). Adicionalmente, oócitos murinos com esta inserção apresentaram o PWS-IC metilado; mas camundongos PWS-IC^{humano/del} (com a ICR humana no alelo materno e o alelo paterno deletado) apresentavam neurônios com expressão do *Snrpn*, indicando que a ICR humana pode estabelecer o *imprinting*, mas não é suficiente para a manutenção (Johnstone *et al.*, 2005).

Diversos outros mecanismos relacionados ao estabelecimento e/ou manutenção do *imprinting* da região 15q11-q13 foram descritos em células somáticas humanas. A região promotora do *SNRPN* apresenta acetilação de histonas H3 e H4 em células de paciente com AS (ou seja, com apenas o alelo do *SNRPN* ativo) e em células de pacientes com PWS, as histonas estão hipoacetiladas (Saitoh & Wada, 2000). Outras modificações de histonas encontradas foram as metilações: o cromossomo paterno apresenta metilação

da lisina 4 na histona 3 (H3K4me) na região do PWS-IC e na região promotora do *NDN*; o cromossomo materno, que tem o PWS-IC inativo, apresenta nesta região metilação da lisina 9 na histona 3 (H3K9me) (fig. 2)(Xin *et al.*, 2001).

2.6. Estabelecimento e manutenção do *imprinting*

Para a propagação do *imprinting* de um indivíduo para sua prole é importante que, durante a gametogênese ou até o início do desenvolvimento embrionário (antes da união dos pronúcleos), o padrão de metilação diferenciado entre os alelos seja apagado e que novo padrão de metilação seja determinado.

Em relação à desmetilação do DNA, enzimas da família *ten-eleven translocation* (TET) foram recentemente descobertas e podem ter um papel importante. A família TET apresenta três proteínas: TET1, TET2 e TET3. A TET1 foi a primeira entre as três a ser relacionada com a desmetilação de DNA. A TET1 foi superexpressa em células HEK293 e causou redução da metilação do DNA (presença do grupo metil no carbono na posição 5 no anel de pirimidina da citosina; 5mC) e aumento de DNA hidroximetilado (presença do grupo hidroximetil no carbono na posição 5 no anel de pirimidina da citosina; 5hmC) (Tahiliani *et al.*, 2009). Demais membros da família Tet também apresentam a habilidade de converter 5mC em 5hmC (Ito *et al.*, 2010). Posteriormente, foi demonstrado que além da conversão de 5mC em 5hmC, as proteínas Tet podem gerar 5fC (formilcitosina no carbono 5) e 5caC (carboxilcitosina no carbono 5) (Ito *et al.*, 2011). Adicionalmente, o 5caC pode ser reconhecido pela proteína TDG (timina-DNA glicosilase) que remove o

5caC e uma citosina não metilada é inserida através do reparo de excisão de base (BER) (He *et al.*, 2011).

Proteínas da família TET apresentam domínio catalítico de dioxigenases que utilizam de Fe (II) e alfa cetoglutarato que é fundamental para oxidação do 5mC gerando 5hmC. Outros domínios foram identificados nessas proteínas, como um rico em cisteína, e TET1 e TET3 apresentam domínio CXXC que é conhecido por se ligar em sequencias CpG (Tahiliani *et al.*, 2009; Wu & Zhang, 2011; Kohli & Zhang, 2013).

O cruzamento de camundongos selvagens com animais Tet1^{-/-} ou de selvagem com duplo *knockout* (Tet1^{-/-} Tet2^{-/-}) causa letalidade, defeito no crescimento embrionário e placentário ou, quando viáveis, atraso no crescimento pós-natal; além disso, ocorre uma expressão anormal de alguns genes imprintados, indicando que as proteínas Tet1 e, possivelmente com papel secundário, as Tet2, são importantes para a desmetilação que ocorre durante o início da gametogênese (Dawlaty *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2013).

Em relação ao PWS-IC, nenhum dos estudos que indicaram o papel da Tet1 (e Tet2) na desmetilação durante a gametogênese mencionou se o *knockout* dessas proteínas influenciou no *imprinting* da região homóloga ao PWS-IC nos camundongos.

A desmetilação causada pela combinação de proteína TET e TDG é um processo ativo. Outros processos ativos são propostos para desmetilação nas células progenitoras germinativas, como as citosinas desaminases AID (*activation-induced deaminase*) e APOBEC1 (*apolipoprotein B mRNA editing*

enzime, catalitic polypeptide 1) podem converter 5mC em timinas, que podem se ligar com TDG ou MBD4 (*methyl CpG binding domain protein 4*) e, consequentemente, serem reparadas pelo BER (Popp *et al.*, 2010; Saitou *et al.*, 2012).

Além do processo ativo de desmetilação, pode ocorrer o processo de desmetilação passivo. A expressão de *Dnmt3a* (metiltransferase de DNA 3A), *Dnmt3b* (metiltransferase de DNA 3B) e *Uhrf1* (proteína que auxilia a ligação do Dnmt1 ao DNA hemimetilado) é reduzida nas células primordiais germinativas (revisado por Saitou *et al.*, 2012). Adicionalmente, pode ocorrer uma mistura dos processos ativos e passivos: é possível que a desmetilação se inicie com as proteínas da família TET e continue por diluição passiva, pois várias proteínas que reconhecem DNA metilado (5mC), não reconhecem 5hmC e os outros derivados; e essas proteínas podem ter papéis importantes na manutenção da metilação, que com a baixa afinidade delas com 5hmC e seus derivados, o DNA é desmetilado conforme vão ocorrendo as divisões celulares. Já foi mostrado que 5hmC não pode ser reconhecido por algumas proteínas que se ligam ao 5mC, como muitas proteínas MBDs (domínio de ligação a CpG metiladas), com exceção, por exemplo, da MBD3 que se liga fortemente ao 5hmC (Valinluck *et al.*, 2004; Yildirim *et al.*, 2011); e é possível que diminua o acesso de metiltransferases de DNA (DNMTs), como ocorre com a Dnmt1 durante a replicação do DNA, resultando na desmetilação (Valinluck & Sowers, 2007; Wu & Zhang, 2011).

Durante a gametogênese de camundongos, ocorre uma queda na metilação (5mC) antes do E9.5; porém, alguns genes são protegidos e sofrem desmetilação posteriormente junto com alta expressão das proteínas Tet1 e

Tet2, e, entre os genes desmetilados nesta segunda queda da metilação estão os genes imprintados (fig. 3) (Seisenberger *et al.*, 2012; Hackett *et al.*, 2013). Além disso, Seisenberger e colaboradores (2012) verificaram que a *Zfp57* é expressa durante o início da gametogênese; eles sugeriram que esta proteína pode proteger regiões imprintadas da desmetilação inicial que ocorre antes do E9.5 em camundongos.

Figura 3: Esquema dos níveis de metilação do DNA (5mC) no genoma durante o desenvolvimento das células germinativas murinas. Figura adaptada da revisão feita por Kohli & Zhang (2013). O esquema representa uma desmetilação inicial que ocorre nas células germinativas primordiais; nesta fase, regiões imprintadas são protegidas e se mantêm metiladas; depois ocorre outra queda na metilação, desta vez afetando genes imprintados, que ocorre junto com aumento de 5hmC e alta expressão de Tet1.

Após a desmetilação ocorre o estabelecimento de um novo padrão de metilação na gametogênese. Em camundongos, o *imprinting* materno ocorre nos oócitos em crescimento, mas na gametogênese masculina isso não ocorre em todas as regiões diferencialmente metiladas. O estabelecimento da metilação nessas regiões durante a espermatogênese foi encontrado em regiões intergênicas de genes imprintados, como *H19*, *Rasgrf1* e *Dlk1/Gtl2* (Li

et al., 2004). As proteínas Dmmt3a e Dmmt3L são importantes para esse processo; a Dmmt3L é essencial para auxiliar na identificação de regiões que serão metiladas e interage com Dnmt3a que possui atividade catalítica (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Kaneda *et al.*, 2004).

Em camundongos, a metilação do DNA na região homóloga ao PWS-IC, região upstream do *Snrpn*, ocorre nos oócitos, indicando que o padrão de metilação é estabelecido na oogênese (Shemer *et al.*, 1997). A expressão de exons *upstream* ao *Snrpn* é importante para o estabelecimento do *imprinting* (Smith *et al.*, 2011). A hipótese de como a transcrição pode auxiliar no estabelecimento da metilação de DNA foi dada por Chotalia e colaboradores (2009); eles sugerem que a transcrição pode abrir a cromatina permitindo que proteínas envolvidas na metilação possam se ligar ao local a ser metilado.

No caso da região do PWS-IC, nos humanos, ainda não está claro quando ocorre a metilação do DNA. Existem trabalhos indicando que o estabelecimento da metilação do PWS-IC ocorre depois ou durante a fertilização (El-Maarri *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2009) e também há um trabalho indicando que oócitos no estágio de vesícula germinal já apresentam esta região metilada (Geuns *et al.*, 2003). A contradição pode ser resultado de diferenças e dificuldades metodológicas como, por exemplo, na obtenção deste tipo celular e na análise da metilação de uma única célula.

Em humanos, como em camundongos, a transcrição parece ser importante para o estabelecimento do *imprinting*. Um trabalho recente mostrou que a expressão de exons *upstream* ao *SNRPN* (u5 e u6) que se localizam com AS-IC e um novo terceiro exon próximo ao u6, chamado de u6.5, fazem

parte de transcritos presentes em oócitos humanos, mas não em neurônios. Esses transcritos incluem pelo menos os exons 2 e 3 do *SNRPN*, mas exclui o exon 1. Lewis e colaboradores (2014) propuseram que a transcrição desses exons *usptream* e os exons 2 e 3 em humanos é importante para o estabelecimento da metilação do DNA na PWS-IC.

Além disso, recentemente, ficou demonstrado que a proteína *zinc finger* *Zfp57* é importante no estabelecimento da metilação na região homóloga ao PWS-IC em camundongos. Estudo com fêmeas com ausência de expressão do *Zfp57* indicaram que a expressão materna de *Zfp57* é importante para estabelecer o *imprinting* do *Snrpn* (Li *et al.*, 2008). Mais informações sobre *Zfp57* serão apresentadas num item exclusivo.

Logo após a fecundação ocorre outra onda de desmetilação, porém algumas regiões do genoma são protegidas, como genes imprintados (Saitou *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). A proteína Tet3 é expressa, tardiamente, nos oócitos em crescimento e nos zigotos, e após fertilização, a sua expressão reduz. A expressão do *Tet3* ocorre no mesmo momento que 5hmC é gerado, principalmente em retrotransposons LTR, durante o crescimento do oócitos (Sakashita *et al.*, 2014). Adicionalmente, a expressão materna de Tet3, após a fecundação, é mais concentrada no pronúcleo masculino do que no pronúcleo feminino, ocorrendo junto com a conversão do 5mC em 5hmC no DNA masculino (Gu *et al.*, 2011). Aparentemente, o pronúcleo feminino não sofre a desmetilação ativa como o pronúcleo masculino, e a proteína Stella (PGC7/Dppa3) tem um papel importante para essa proteção, pois seu *knockout* causa aumento de 5hmC no DNA materno. Entretanto, Wang e colaboradores (2014) demonstraram que a desmetilação ativa também ocorre em pelo menos

uma porção importante do DNA de origem materna, pois verificaram a presença de 5hmC e 5fC no genoma materno em embriões de 4 células.

A proteína Stella também é importante para proteção de regiões imprintadas contra a onda de desmetilação. A ausência de *Stella* causa a conversão do 5mC para 5hmC de regiões imprintadas materna e paternalmente (Nakamura *et al.*, 2012).

A onda de desmetilação após fertilização ocorre da fase do zigoto até a implantação embrionária, e, também, acontece de forma passiva devido à redução na expressão de *Dnmt1*. Entretanto, em camundongos com expressão reduzida de *Dnmt1*, com o *knockout* condicional, foi possível verificar que as expressões materna e zigótica de *Dnmt1* são, também, importantes para a manutenção do *imprinting* genômico na fase pré-implantacional. Inclusive a região diferencialmente metilada do *Snrpn* sofre desmetilação no caso da ausência de *Dnmt1*, resultando em expressão bialélica do *Snrpn*. Outras regiões que são diferencialmente metiladas dentro da região 15q11-q13, como *Mkrn3* e *Ndn*, também, apresentam aumento da expressão em embriões *knockout* para *Dnmt1* e a expressão ocorre de forma bialélica (Hirasawa *et al.*, 2008; Nakagaki *et al.*, 2014).

É interessante que embora não ocorra desmetilação nas regiões imprintadas, estas sofrem diferenças nas regiões diferencialmente metiladas quando comparamos gametas e blastocistos; no caso específico do *Snrpn*, ocorre uma mudança na localização da região diferencialmente metilada (Tomizawa *et al.*, 2010).

Novamente a proteína Zfp57 apresentou importante papel na manutenção do *imprinting* na região homóloga ao PWS-IC durante o desenvolvimento embrionário murino, sendo que a ausência da expressão zigótica do *Zfp57* causa mortalidade de parte dos embriões e ocorre redução da metilação do alelo materno no PWS-IC (Li *et al.*, 2008).

2.7. Zfp57 e ZNF274

Em camundongos, uma KRAB (Krüppel-associated Box) proteína zinc finger, *Zfp57* tem papel importante no estabelecimento e manutenção do *imprinting* do PWS-IC. Embriões *knockout* de *Zfp57* apresentam uma parcial metilação da região promotora do *Snrpn* e isso leva a letalidade de muitos embriões. Entretanto, quando, além do embrião *knockout*, a mãe também não expressa *Zfp57*, os embriões não são viáveis até o final do desenvolvimento, e, é possível verificar que a região promotora do *Snrpn* está desmetilada nos embriões que pararam de se desenvolver (Li *et al.*, 2008).

O *Zfp57* é importante para manutenção do *imprinting* de outros genes, como *Peg3*, *Dlk1-Dio3*, *Peg1* (Li *et al.*, 2008; Hanna & Kelsey, 2014). *Zfp57* se liga ao DNA e *Krüppel-associated Box - associated protein 1* (Trim28/Kap1) se liga ao *Zfp57*. Trim28 serve de suporte para enzimas que inibem a expressão como Setdb1 (H3K9 metiltransferase ESET), HP1 (proteína de heterocromatina 1), NuRD (complexo remodelador de nucleossomo e de acetilação de histonas) Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt1e UHRF1 (Quenneville *et al.*, 2011; Messerschmidt, 2012; Zuo *et al.*, 2012).

Em camundongos, o *Zfp57* é altamente expresso em mES (células-tronco embrionárias murinas) e sua expressão é reduzida quando diferenciadas (Li & Leder, 2007). Além disso, Trim28 se liga ao *Zfp57* através do domínio KRAB e quando este domínio está mutado ou quando ocorre redução da expressão do *Trim28*, é observada uma perda da metilação da região homóloga ao PWS-IC e de outros genes metilados nas mES (Quenneville *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2012). Adicionalmente, *Zfp57*, Trim28, Setdb1 e HP1 se colocam com a modificação H3K9me3 em regiões que controlam o *imprinting* no alelo que apresenta DNA metilado (5mC) (Quenneville *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a ZFP57 humana apresenta somente 50% de semelhança com a *Zfp57* murina, e, além disso, a proteína humana apresenta 7 domínios C2H2 e a forma murina tem 5 desses domínios (Takikawa *et al.*, 2013). Adicionalmente, metade dos pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 neonatal transiente apresenta mutação do *ZFP57* (Mackay *et al.*, 2008). Pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para mutação do *ZFP57* apresentam hipometilação de várias regiões diferencialmente metiladas, perda total da metilação no *TNDM1*, perda parcial da metilação no *PEG3* e *GRB10*, e alguns casos apresentaram 1 dos 3 loci *PEG1*, *KCNQ1OT1* e *NESPAS/GNAS-AS1* hipometilados parcialmente (Boonen *et al.*, 2013). Entretanto, em nenhum caso de mutação do *ZFP57* foi observada alteração na metilação do *SNRPN* que é maternalmente metilado e *H19* e *DLK1* que são paternalmente metilados, indicando que o *ZFP57* apresenta um papel diferente entre humanos e camundongos na metilação do PWS-IC.

Experimentos de ChIP-seq (sequenciamento de última geração de cromatina imunoprecipitada) indicam que ZNF274 se liga ao grupo 1 do *SNORD116* em 6 pontos de ligação e não se liga aos grupos 2 e 3 em diversos tipos de células, incluindo células hES (células-tronco embrionárias) (visualizado no *ENCODE Genome Browser*, fig 4).

Figura 4: ChIP-seq do ZNF274 em células H1 (hESs) encontrado no ENCODE. ZNF274 apresenta 6 locais de ligação ao *SNORD116* e todos se encontram dentro do grupo 1 do *SNORD116*. A barra e gráfico em preto são dados do ChIP-seq para ZNF274 em células H1, e em azul são sequencias do *SNORD116*.

ZNF274 se liga na região 3' de genes que transcrevem proteínas zinc fingers. ZNF274 também é uma proteína zinc finger com domínios C2H2 e domínio KRAB que permitem a ligação da TRIM28 e servem de ancoramento para a histona metiltransferase SETDB1, que é uma enzima que causa trimetilação da histona 3 na lisina 9 (H3K9me3) (fig. 5) (Fietze *et al.*, 2010).

Figura 5: Esquema do complexo repressor formado pela proteína zinc-finger ZNF274. A proteína KRAB-ZNF em azul indica a ZNF274 que tem habilidade de se ligar a regiões específicas do DNA e permite a ligação com a KAP1 (TRIM28). TRIM28 serve de suporte para a SETDB1. A SETDB1 apresenta atividade enzimática que causa trimetilação de histona 3 na lisina 9 (H3K9me3). Essa figura foi adaptada de Fietze e colaboradores (2010).

Além da diversidade das proteínas zinc finger entre humanos e camundongos, indicando a necessidade do uso de células humanas para estudar esta região, adicionalmente, é possível que existam diferenças importantes entre humanos e camundongos em relação ao *imprinting*; é possível que ainda falte muita informação sobre mecanismos de estabelecimento e manutenção do *imprinting*, principalmente em humanos. Além disso, como vimos anteriormente, muitos modelos animais já foram produzidos para o estudo da PWS, como por exemplo, camundongos com deleção paterna do *Snord116*, e eles foram importantes na busca da função de alguns genes imprintados na região 15q11-q13; entretanto, nenhum modelo apresenta totalmente o fenótipo da PWS, nem todas as principais características. Adicionalmente, o *SNORD116* em humanos é expresso constitutivamente, e, em camundongos tem expressão somente nos neurônios. Assim, o uso de células iPSCs de pacientes com PWS se tornam uma importante ferramenta para o estudo desta patologia.

2.8. Células pluripotentes induzidas (iPSCs)

As células-tronco são células precursoras que possuem a capacidade de auto-renovação e de diferenciação podendo dar origem a uma variedade de tipos teciduais (Watt & Hogan, 2000). As células-tronco podem ser

classificadas em relação ao potencial de diferenciação e em relação a sua origem, sendo utilizadas em pesquisa, principalmente, as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

As células-tronco embrionárias constituem a massa celular interna do blastocisto e podem gerar todos os tipos celulares provenientes dos 3 folhetos embrionários e, além disso, apresentam a capacidade de se diferenciarem em células germinativas.

Além das células supracitadas, foram descritas recentemente as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). As iPSCs foram obtidas, primeiramente, através de transdução retroviral em células somáticas dos seguintes fatores de transcrição: Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4; essas células expressam proteínas de células pluripotentes como Fbx5 e Nanog, formam corpos embrióides e são capazes de formarem teratomas em camundongos imunossuprimidos (Takahashi & Yamanaka, 2006; Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). Sendo assim, por meio de reprogramação epigenética foi possível obter células com características semelhantes às células-tronco embrionárias (ES).

Outro grupo que conseguiu obter iPSCs humanas utilizou uma combinação diferente de fatores, como Oct4, Sox2, Nanog e Lin28 (Yu *et al.*, 2007). Nos anos seguintes a essas descobertas muitos outros estudos foram feitos com as iPSCs, visto que a transdução retroviral apresenta alguns riscos como a inserção dos genes em locais importantes que podem causar mutações ou a reativação dos genes transduzidos, especialmente os oncogenes como c-Myc; outros métodos estão sendo desenvolvidos para induzir a pluripotência,

como a indução por proteínas. Entretanto, o método tradicional ainda é muito utilizado em pesquisas.

As iPSCs são consideradas promissoras para o estudo de doenças que afetam o sistema nervoso (Abeliovich & Doege, 2009; Chamberlain, 2008). Neurônios derivados de iPSCs específicos de pacientes foram obtidos em algumas doenças, como a síndrome de Rett, na qual se verificou diferenças morfológicas (neurônios menores e diminuição no número de sinapses) e de função (alteração na sinalização de cálcio e defeitos na resposta eletrofisiológica) em relação aos controles (Marchetto *et al.*, 2010).

Recentemente, foram obtidas iPSCs de pacientes com AS e PWS (Chamberlain *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014; Stelzer *et al.*, 2014). Com as iPSCs dos pacientes com AS e PWS foi possível verificar que o *imprinting* da região 15q11-q13 se mantém estável após reprogramação, e neurônios derivados das iPSCs de pacientes com AS apresentam uma redução na expressão do *UBE3A*, assim indicando que o *UBE3A* está imprintado em algumas dessas células (Chamberlain *et al.*, 2010). Logo, as iPSCs têm se mostrado importantes para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestas patologias.

3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é analisar mecanismos epigenéticos adicionais aos já conhecidos que sejam importantes na regulação da expressão do *SNORD116*, que é um gene considerado importante para PWS, e de outros genes imprintados na região 15q11-q13.

Para isso, foram utilizadas iPSCs de pacientes com AS e PWS e foram avaliadas proteínas que formam um complexo proteico que inclui ZNF274, KAP1 e SETDB1 na região 15q11-q13 e auxiliam na regulação de expressão do *SNORD116*. Além disso, o mesmo complexo será avaliado em neurônios derivados das iPSCs e as células que foram utilizadas para reprogramar as iPSCs, que são as células-tronco da polpa de dentes decíduos (SHEDs).

As etapas realizadas foram:

- Caracterização das iPSCs reprogramadas a partir de SHEDs de pacientes com AS e PWS, e de controle saudável.

- Verificação da metilação da região promotora do *SNRPN* para descartar alterações do *imprinting* da região 15q11-q13 durante a reprogramação das iPSCs.

- Identificação da ligação das proteínas ZNF274, KAP1 e SETDB1 na região 15q11-q13 e avaliação da ocorrência de modificações de histonas H3K9me3 na mesma região em iPSCs.

- Análise de função do complexo formado por ZNF274 e SETDB1 nas iPSCs.

-Diferenciação neuronal a partir das iPSCs, verificação da expressão de genes da região 15q11-q13 nos neurônios e da presença do complexo proteico formado pela ZNF274 nos neurônios.

-Avaliação da presença do mesmo complexo proteico na região 15q11-q13 nas SHEDs que não foram reprogramadas em iPSCs.

4. Materiais e Métodos

4.1. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)

As iPSCs utilizadas neste estudo têm duas origens: de fibroblastos ou de células-tronco da polpa de dente decíduo (SHEDs). As linhagens obtidas a partir de fibroblastos já foram descritas e caracterizadas anteriormente (Chamberlain *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014) e são a AS del 1-0, PWS del 1-7 (pacientes com AS e PWS, respectivamente, que apresentam deleção do segmento 15q11-q13), PWS SD 2-8 (paciente com PWS com deleção pequena incluindo o exon 2 do *SNRPN* e *IPW*, descrito por Smith *et al.*, 2009) e NML 1-0 (controle). As células foram cultivadas em meio hES: meio Dulbecco's modified Eagle's/F-12 (DMEM/F-12) suplementado com 20% substitutivo de soro knockout, 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 1mM l-glutamina (todos da Life Technologies), 0,1 mM β -mercaptoetano (Sigma-Aldrich), 4ng/ml bFGF (Millipore) em placas com fibroblastos embrionários murinos (MEFs) inativados com mitomicina C. Mais tarde as células foram transferidas para placas tratadas com Matrigel (BD Biosystems) e cultivadas em meio mTeSR (Stem Cell) ou E8 (Life Technologies).

Além disso, foram reprogramadas SHEDs obtidas de pacientes AS e PWS e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (número do processo: 055-06). As células do indivíduo normal foram obtidas do banco de células do Centro de Estudos do Genoma Humano. As SHEDs foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1) (Life Technologies) suplementado com 15% de soro fetal bovino definido (Hyclone), 1x aminoácidos não essenciais e antibiótico penicilina/estreptomicina (Life Technologies).

Plasmídeos contendo sequências para SOX2, KFL4, c-MYC e OCT4 do grupo Yamanaka (Takahashi *et al.*, 2007) foram obtidos da Addgene. Retrovírus foram produzidos em células HEK-293 que foram transfectadas com um dos plasmídeos do Yamanaka em combinação com os plasmídeos pCMV-GP e pVSVG. As células HEK-293 foram cultivadas em meio DMEM High Glicose (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). O sobrenadante contendo vírus foi coletado após 48h da transfecção e foi adicionado nas SHEDs. Após 3 dias da transdução, as células foram transferidas para placas com células MEFs irradiadas. O meio hES foi trocado todos os dias. Após 7 dias o meio foi adicionado em uma placa com MEFs e no dia seguinte foi adicionado nas placas com células (meio condicionado); 20-30 dias após a transdução, as colônias foram capturadas e cultivadas em placas tratadas com Matrigel (BD biosystems) e cultivadas em meio mTeSR ou E8. As linhagens utilizadas foram: PWS del 1-1, PWS del 1-2, AS del 3-1, AS del 3-3 (de pacientes com PWS ou AS com deleção no segmento 15q11-q13) e F7908-1 (controle).

Durante a caracterização das iPSCs reprogramadas neste estudo, foi formado o corpo embrióide (EB). Para obter os EBs as células foram cultivadas em placas de baixa adesão com meio hES sem bFGF. Elas foram mantidas em suspensão por 10 dias antes de serem capturadas para análise.

4.2. Congelamento das iPSCs

Para congelamento, foram feitos quadriculados na placa com agulha. A placa foi lavada rapidamente com PBS 1x. Foi adicionado 1ug/ml de dispase

(Stem Cells) para auxiliar o descolamento das colônias, a enzima atuou por 5 min a 37°C. A dispase foi removida e foi adicionado o meio mTeSR, as células foram finalmente descoladas com auxílio de um “rodinho”. O meio com células foi colocado em um falcon de 15mL e após 5 min as células se depositaram no fundo. O meio foi retirado e foi colocado o meio de congelamento. As células foram colocadas a -70°C gradativamente e no dia seguinte foram transferidas para o nitrogênio líquido. O meio de congelamento utilizado foi o Cryostor (Stem Cells).

4.3. Obtenção de neurônios

Neurônios derivados de iPSCs foram obtidos com protocolo baseado em trabalhos publicados (Griesi-Oliveira *et al.*, 2014; Chamberlain *et al.*, 2010 e Martins-Taylor *et al.*, 2014; Germain *et al.*, 2014). Os progenitores neurais foram obtidos através dos corpos embrionários (EBs). Para isso, iPSCs foram descoladas da placa manualmente e cultivadas em suspensão por 7 dias, depois foram plaqueadas e as células foram cultivadas em meio NB: DMEM/F12 e Neurobasal A (1:1) (Life Technologies) com N2 (Life Technologies) e B27 (Life Technologies), suplementado com 1µM dorsomorfina nos primeiros dias e depois com 20ng/mL EGF (Peprotech) e 20ng/mL FGF (R&D Systems). Em poucos dias foi possível visualizar rosetas neurais que foram coletadas e plaqueadas em placas tratadas com poli-ornitina (Sigma-Aldrich) e laminina (Life Technologies). Após 3 semanas do início da diferenciação, os neuroprogenitores foram submetidos à diferenciação neural com meio Neurobasal A suplementados com 10ng/mL de GDNF (Peprotech),

10ng/mL de BDNF (Prepotech), 200mM ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e dibutilil-cAMP (Sigma-Aldrich) até completar 9 semanas.

4.4. Extração de RNA e preparação de cDNA

A extração de RNA foi feita em iPSCs, SHEDs e neurônios derivados de iPSCs. O RNA foi extraído com o uso de TRIZOL™ (Life Technologies) e tratado com DNase TURBO (Life Technologies) conforme o indicado pelo fabricante. Para verificar a integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2% a 100V por 60 minutos e a concentração de RNA foi medida no Nanodrop. O cDNA foi obtido com SuperScript III (Life Technologies) conforme o indicado pelo fabricante.

4.5 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica foi realizada nas colônias de iPSCs estabelecidas e em neurônios cultivados em lâminas com espaço para cultivo (Thermo-Fisher). As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos em temperatura ambiente, depois foram lavadas com PBS 1x e 100mM glicina (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. A cultura foi bloqueada por 1 hora com IBB (tampão bloqueador de imunofluorescência que contém PBS com 5% de soro albumina bovino, 10% soro fetal de burro, 0,1% Triton X-100). Depois, incubada com IBB e anticorpo primário anti-NANOG (1:200; Cell Signaling), o anti-OCT4 conjugado (1:50; Cell Signaling), anti-TRA-1-60 (1:100; R&D) ou anti-TRA-1-81 (1:100; R&D) no caso das iPSCs, e anti-TUJ1 (1:500; Covance) e anti-MAP2 (1:500; Sigma) nos neuronônios derivados das iPSCs. Foram

usados anticorpos secundários anti-IgG de camundongo, de coelho ou de cabra (Life Technologies) por 1 hora e os núcleos foram corados com DAPI por 1 minuto.

4.6. Extração de DNA

As células foram lisadas com solução de 100mM Tris HCL, pH 8,5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl. Após vortexagem, foi adicionado 20ng/μl de Proteinase K. O lisado foi mantido a 55°C *overnight*. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido e adicionado a 500μl de isopropanol e foi misturado por inversão. Após centrifugação a 12000rpm por 15 min, foi adicionado tampão TE (10mM Tris pH 8,0 com HCl e 1mM EDTA). Foi realizada mais uma centrifugação e o sobrenadante foi guardado e dosado para determinar a concentração no Nanodrop.

4.7. MLPA

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) é uma reação que envolve a desnaturação da molécula de DNA, seguida de seu *annealing* a sondas para a região cromossômica em estudo. Para o presente trabalho, foram utilizados os kits SALSA® P036 MLPA® KIT subtelomérico, kit SALSA® P070 MLPA® KIT subtelomérico e kit SALSA® P064-B1 MLPA® KIT déficit intelectual (MRC-Holland - Amsterdam, Holanda).

O protocolo de MLPA utilizado foi modificado de Schouten *et al.* (2002) e está dividido em duas etapas, sendo que todas as reações foram realizadas em um termociclador. Na primeira etapa, as amostras de DNA foram quantificadas e diluídas em TE para uma concentração final de 50 ng/μl. Durante 5 minutos a 98°C, o DNA foi desnaturado, e, em seguida, adicionou-se uma solução de *annealing*, que continha sondas específicas para a região cromossômica em estudo. A hibridação do material foi feita por 3 horas (1 minuto a 95°C e 60°C “*hold*”). Na segunda etapa, a solução *Master Mix I* contendo a enzima ligase foi adicionada, que é a responsável por unir as duas extremidades dos oligonucleotídeos das sondas adjacentes hibridadas, reação esta que dura 20 minutos (15 minutos a 54°C e 5 minutos a 98°C). Em seguida, foi adicionada a solução *Master Mix II* contendo os *primers* e a enzima *Taq* DNA polimerase, utilizados na reação de PCR, cujo programa envolve 33 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C, seguidos ao final de um período de 20 minutos a 4°C. Por fim, os produtos da PCR foram diluídos com Tween 20 0,1% e Size Standard (ET-550) e submetidos à eletroforese no seqüenciador Megabace. O seqüenciador utilizado é o ABI, os produtos da PCR foram diluídos com água Milli-Q, formamida (Life Technologies) e *Size Standard* (Gene Scan 500).

4.8. PCR em tempo real (qPCR)

PCR em tempo real foi realizado com SYBR® Green, primers (Tabela 1) e com DNA do experimento ChIP e MeDIP descrito mais tarde. Durante a análise, foi calculado o input ajustado ($Ct \text{ do INPUT} - 6,644$) e a porcentagem

do input de cada amostra é 100*2 (INPUT ajustado – Ct da amostra) para os experimentos de ChIP e MeDIP. O valor de Ct é o número de ciclos da reação da PCR necessário para a fluorescência ultrapassar o *threshold*.

Tabela1: Par de oligos utilizados na reação de PCR em tempo real para ChIP e meDIP.

Gene alvo	Primer F	Primer R
ZNF180	TGATGCACAATAAGTCGAGCA	TGCAGTCAATGTGGCAAGTC
SNRPN (exon 1)	ATCTGTCTGAGGAGCGGTCACT	TCCCCAGGCTGTCTCTTGAG
SNORD116-BS1	GAGTGAGCGACAACCTCCACTGA	TCCCACCCATGTACCTCACA
SNORD116-BS2	AACTGAGGTCCAGCACATTGG	GTGCCTGTGATGTGAGACTTTCA
SNORD116-BS3	CCACCCATGTACCTCACACAGA	GGCCAAAGTCTTCCATGAAA
SNORD116-BS4	TGCCTCTTCGAACGTGCTT	CGTGCTGGACCTGAGTTCTG
SNORD116-BS5	GGCATCCACAGGCCAAGT	CCAGGCTGCCACACCATA
SNORD116-BS6	TGAGGGTGTCTTTGGGATTCC	AGCTGTGCCACTGAGCAAAA
SNORD116-G2	GCCTGGATCGATGATGACTTC	TAGCCCCTGTAAGAGCAATGTG
SNORD116-G3	CAGACTGAGGGTTCCTTTAATG	GCTGGACCTCAGCTCACAGAATG

Em relação ao estudo de expressão gênica (qRT-PCR), foram utilizados cDNA das amostras. Para verificar a eficiência dos *knockdowns* foram realizadas qPCRs com sondas e primers da TaqMan® (Life Technologies) para *ZNF274*, *SETDB1*, *SNORD116*, *SNRPN*, *MAGEL2*, *NDN*, *IPW*, *UBE3A*, *ATP10A* e o controle endógeno *GAPDH*. Para avaliar a expressão gênica em neurônios foram utilizadas sondas e oligos de TaqMan® para *UBE3A* e *SNRPN* de exons *upstream*, e alguns genes foram avaliados pelo SYBR® Green com primers indicado na tabela 2. Nesta tabela também são expostos pares de oligos utilizados para avaliar os corpos embrióides e pluripotência das iPSCs. Para a análise, foram calculados o $\Delta\Delta Ct$ (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno) e a expressão relativa é igual a $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os experimentos foram realizados em duplicatas e com, pelo menos, duas culturas celulares diferentes. Os três grupos celulares estudados (SHEDs, iPSCs e neurônios derivados a partir de

iPSCs) foram avaliados quanto a expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *UHRF1*, *TET1*, *TET2*, *TET3*, *ZNF274* e *SETDB1* através da qRT-PCR com SYBR® Green e *primers* da tabela 3 e o *GAPDH* da tabela 2.

Tabela 2: Par de primers utilizados na reação de PCR em tempo real para qRT-PCR.

Gene alvo	Primer F	Primer R
<i>NANOG</i>	TGAAGACGTGTGAAGATGAGTG	CTATGAGGGATGGGAGGAGG
<i>SOX2</i>	AACGAGGGAAATGGGAGGG	TTGCTGTGGGTGATGGGA
<i>PAX6</i>	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
<i>TUBB3</i>	GGCCTGACAATTTTCATCTTTG	ACCACATCCAGGACCGAAT
<i>MAP2</i>	GGAGGTGTCTGCAAGGATAGT	CTGTTCTGAGGCAGGTGATG
<i>GATA4</i>	ATCTCACTACGGGCACAGCA	GAGGACAGGGTGGATGGAGG
<i>GATA6</i>	GTGCCCAGACCACTTGCTAT	GTTGGAGTCATGGGAATGGA
<i>MYH6</i>	GAAGGGATAACCAGGGGAAG	GGCCTCTAGACGCTCCTTCT
<i>FN1</i>	ATGATGAGGTGCACGTGTGT	CTCTTCATGACGCTTGTGGA
<i>UBE3A-AS</i>	GGAAGCCTTCTCAAGTGTGC	CACATCTCTTGGCAGCATGT
<i>GAPDH</i>	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC
<i>ACTb</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	TTTGATGTCACGCACGATT

Tabela 3: Par de primers utilizados na reação de PCR em tempo real para qRT-PCR para comparar os 3 tipos celulares: SHEDs, iPSCs e neurônios.

Gene alvo	Primer F	Primer R
<i>DNMT3A</i>	AGCTCCCTTCCCTTCCTCCC	TTTCTCTCTCCCACCTTTCTCT
<i>DNMT3B</i>	GAGAGGAGTGTGAAGCAAGGA	AAGATGAGAAATGAGGGTAGCAGA
<i>DNMT1</i>	CTCCGACTACATCAAAGGCA	GTGGACTTGTGGGTGTTCT
<i>UHRF1</i>	CACGGGTAGTGGTGGTCG	GCCCTGTTGGTGTGGTG
<i>TET1</i>	TCTAAAGTCATACAATGGGCACC	CTGGGGCTTGGGCTTCTAC
<i>TET2</i>	AGAGAAGCAGAAGGAAGCAAGA	TCAACAGGAGCAAAGGCAAG
<i>TET3</i>	GAGTTCCCCACCTGCGATT	TCTCTCCATACCGCTCCTCC
<i>ZNF274</i>	GGATTGTGCCTTGTCTCTAC	GACTCCATCTGCTTCAACACT
<i>SETDB1</i>	GCCAGAAAGAGAACGGAC	TACAGGGATTGAGGGAGGAA

4.9. Knockdown ZNF274

Para fazer o *knockdown* da expressão de ZNF274, PWS del1-7, iPSCs em forma de célula única (colônias dissociadas) foram transfectadas com 40 nM de ZNF274 siRNA (Stealth Select RNAi, Life Technologies: HSS116638, HSS116639, HSS116640) ou si-GLO RISC-Free (Dharmacon; catalog # D-001600-01); como controle negativo, com o uso de Lipofectamina RNAiMAX (Life Technologies) diluídos em meio reduzido de soro Opti MEM (Life Technologies) (Ma *et al.*, 2012). As células foram transfectadas duas vezes, sendo a segunda após 48 horas da primeira transfecção. As células foram coletadas após 72 horas da primeira transfecção para extração de RNA e DNA e para realizar a ChIP.

4.10. Knockdown SETDB1

shRNA foi utilizado para fazer o *knockdown* de SETDB1 (Clone number TRCN0000148112, Sigma-Aldrich) e o controle negativo (MIS, clone# SHC002). iPSCs de PWS del 1-7 foram transfectadas com o vírus SETDB1Kd ou MIS, e foram selecionadas com puromicina como descrito em Martins-Taylor e colaboradores (2012).

Para gerar as iPSCs PWS del 1-7 com duplo *knockdown*, ZNF274 siRNA foram utilizados em células com SETDB1Kd.

4.11. Imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

Células foram fixadas com 4% de formaldeído e 0.125M de glicina. Foram feitas duas lavagens com PBS1x gelado e as células foram retiradas da

placa com uso de um “rodinho” em PBS1X e 1x de coquetel de inibidor de protease II. Células foram lisadas com tampão de lise SDS e 1x de coquetel de inibidor de protease II. As células lisadas foram sonicadas em 20 ciclos na potencia 4 por 15 segundos, entre cada ciclo o lisado ficou 1 minuto no gelo. A cromatina ligada com as proteínas foi imunoprecipitada com o uso dos anticorpos de interesse: anti-ZNF274 (Novus Biologicals; catalog # H00010782-M01), anti-KAP1 (Abcam; catalog # ab10483), anti-SETDB1 (Proteintech; catalog # 11231-1-AP), anti-trimethyl histone H3 (Lys9) (H3K9me3; Millipore, catalog # 07-442), anti-dimethyl histone H3 (Lys4) (H3K4me2; Millipore, catalog # 07-030) e imãs magnéticos proteína A (Life Technologies) overnight. Os imãs foram lavados com tampão de lavagem com baixa concentração de sal, depois com alta concentração de sal, depois com tampão com LiCl e por último com TE. Os imãs foram incubados em tampão de eluição (água ultra pura com 1% SDS e 0.1 M NaHCO₃) com proteinase K a 62°C overnight. Depois foram incubados por 10 min a 95°C, e o supernadante foi misturado com água e fenol-cloroformio (Life Technologies). Os tubos foram centrifugados a máxima velocidade por 5 min e a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo e foi adicionado clorofórmio, o mesmo processo foi repetido, mas a fase aquosa foi misturada com álcool absoluto, glicogênio e 0,5 M NaCl para o DNA ser precipitado. O DNA foi ressuspendido em água ultra pura e utilizado para PCR em tempo real. O dado foi indicado pela porcentagem do Input subtraído o valor do IgG.

4.12. ChIP sequencial

Para realizar o ChIP sequencial, foi utilizado o kit RE-CHIP-IT® (Active Motif; catalog # 53016) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a sonicação e a imunoprecipitação foram realizadas como a ChIP comum, e primeiro o DNA ligado com as proteínas foi incubado com anticorpo para ZNF274, depois os imãs magnéticos foram incubados com anticorpo para SETDB1. Assim, foi possível identificar locais que ocorrem as duas proteínas. Depois o material foi purificado e foi avaliado através da PCR em tempo real. Os dados foram apresentados em porcentagem do Input subtraído o valor do IgG.

4.13. Imunoprecipitação de DNA metilado (MeDIP) e hidroximetilado

MeDIP foi feito baseado no protocolo descrito por Mohn e colaboradores (2009) com as seguintes modificações: anticorpos para 5mC (Diagenode; catalogo # Mab-006-100) ou 5hmC (Active Motif; catalogo # 39791) foram incubados overnight a 4°C. Após lavagens, amostras foram eluídas e tratadas com Proteinase K *overnight*. Enriquecimento das frações do MeDIP foram quantificadas por PCR em tempo real.

4.14. Análise de 5hmC e 5mC

Além do meDIP, avaliamos a metilação e a hidroximetilação com o kit EpiMark® (New England BioLabs). Foram seguidas as instruções do fabricante: primeiramente, 5000ng de DNA foi tratado com T4 β -glucosiltransferase que adiciona glucose ao 5hmC, transformando em 5ghmC. Depois as amostras

tratadas e controles foram digeridas com enzimas de restrição *MspI* ou *HpaII* ou sem enzima (controle), a primeira enzima reconhece e cliva 5mC, 5hmC, mas não 5ghmC; e a segunda não reconhece 5mC, 5hmC e 5ghmC, assim, só cliva citosinas sem modificações. A T4 β -glucosiltransferase converte uma citosina que é reconhecida pela *MspI* para uma forma que não é reconhecida. O mesmo tratamento com enzimas de restrição foi realizado com DNA não tratado com T4 β -glucosiltransferase. O cálculo aproximado das porcentagens foi realizado conforme indicado pelo fabricante nos experimentos em duplicatas de duas amostras diferentes. Os dados foram normalizados pelo controle.

5. Resultados

5.1. Reprogramação das iPSCs

Neste estudo foram utilizadas linhagens de iPSCs que já foram descritas anteriormente (Chamberlain *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014), e algumas novas (tabela 4). Assim, a caracterização é um passo importante para as linhagens não descritas que são originárias de pacientes com PWS (PWS1-1 e PWS1-2) ou AS (AS3-1 e AS3-3) e de indivíduo saudável (F7908-1). As iPSCs caracterizadas neste estudo foram obtidas a partir de células de dente decíduo (SHEDs). A reprogramação foi realizada com a colaboração da Dr^a Karina Griese Oliveira (pesquisadora do Hospital Israelita Albert Einstein), da Dr^a Andressa Moraes e da May Suzuki (laboratório da Prof^a Maria Rita do Passos Bueno).

Tabela 4: Identificação das iPSCs utilizadas no estudo. Na tabela é indicado o tipo celular que foi reprogramado para originar as iPSCs, a doença, os mecanismos genéticos e a referência bibliográfica da descrição das linhagens.

identificação das iPSCs	origem da célula	doença	Mecanismo genético	descrição
PWS del 1-7	fibroblastos	PWS	deleção 15q11-q13	Chamberlain <i>et al.</i> , 2010
PWS 1-1	SHEDs	PWS	deleção 15q11-q13	Não descrita
PWS 1-2	SHEDs	PWS	deleção 15q11-q13	Não descrita
PWS SD 2-8	fibroblastos	PWS	deleção exon 2 do <i>SNRPN</i> até IPW	Martins-Taylor <i>et al.</i> , 2014
AS del 1-0	fibroblastos	AS	deleção 15q11-q13	Chamberlain <i>et al.</i> , 2010
AS 3-1	SHEDs	AS	deleção 15q11-q13	Não descrita
AS 3-3	SHEDs	AS	deleção 15q11-q13	Não descrita
MCH 2-10	fibroblastos	normal	-	Chamberlain <i>et al.</i> , 2010
F7908-1	SHEDs	normal	-	Não descrita

As células reprogramadas apresentam morfologia semelhante às hESs e expressam marcadores de pluripotência: TRA-1-60, TRA-1-81, OCT4 e NANOG (fig. 6A). Além disso, a expressão gênica de SOX2 e NANOG foram

confirmadas pela qRT-PCR comparando a expressão nas iPSCs em relação às SHEDs e uma linhagem já descrita, PWS SD 2-8, foi utilizada com referência (fig. 6B).

Outra característica importante das iPSCs é a capacidade de se diferenciarem em diversos tecidos de origem dos 3 folhetos embrionários. As iPSCs foram cultivadas em suspensão em placa de baixa aderência. Assim, os corpos embrióides (EBs) se formaram. qRT-PCR foi realizada para avaliar a expressão de genes dos diferentes folhetos embrionários: *TUBB3* e *PAX6* (ectoderme); *FN1* e *MYH6* (mesoderme); *GATA6* e *GATA4* (endoderme). Foi observada a expressão dos 6 genes nos EBs das iPSCs caracterizadas e, quando comparadas com as expressões desses genes em EBs da linhagem já descrita de PWS SD 2-8 iPSCs, foi verificado que os valores de expressão nos EBs são superiores ou semelhantes aos dos EBs da PWS SD 2-8 iPSCs, que já foi caracterizado em trabalho anterior (Martins-Taylor *et al.*, 2014) (fig. 6C).

Figura 6: Caracterização das iPSCs. A: No canto esquerdo superior temos a imagem de colônias de iPSCs no microscópio com aumento de 4x. Ao lado, um painel com imagens das imunocitoquímicas realizadas nas iPSCs, indicando a expressão de TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG e OCT4. Barra amarela é de 50μm. B: Gráfico com dados da qRT-PCR para *NANOG* e *SOX2*. As iPSCs expressam *NANOG* e *SOX2* como a linhagem PWS SD 2-8 iPSCs que já foi

caracterizada anteriormente. Os resultados foram normalizados com a expressão de *GAPDH* e são relativos à expressão da linhagem controle F7908-1 iPSCs. As SHEDs (PWS1, AS3 e F7908) não expressam *NANOG* e *SOX2* quando comparadas com as iPSCs. As barras de erro indicam o erro padrão da média e as SHEDs apresentam padrão de expressão estatisticamente diferente das iPSCs (teste T de Student). A linhagem de iPSCs de PWS SD 2-8 é utilizada como referência. C: qRT-PCR dos corpos embrióides (EBs) obtidos a partir das iPSCs. Foram analisados genes dos 3 folhetos embrionários: *TUBB3* e *PAX6* (ectoderme), *FN1* e *MYH6* (mesoderme) e *GATA4* e *GATA6* (endoderme). Os resultados foram normalizados pela expressão do *GAPDH*. EBs de células do controle F7908-1 (F7908-1 EB) foram determinados com expressão igual a 1. Os resultados foram comparados com a expressão dos EBs obtidos a partir de iPSCs de PWS SD 2-8 (PWS SD EB) que é uma linhagem previamente descrita.

Para avaliar a estabilidade cromossômica das células após reprogramação, foi realizada com ajuda da Claudia Castro (técnica da Prof^a Celia Koiffmann) a análise de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) com os kits de análise subtelomérica, P070 e P036. Nas linhagens estudadas não foram encontradas anomalias nos cromossomos. As iPSCs de pacientes com AS e PWS apresentaram, como esperado, deleções da região 15q11.2 (fig. 7B, 7C e anexo 1).

Além disso, para confirmar os casos de PWS e AS, foi realizada a análise de MLPA com o kit P064, que é para diagnóstico de déficit intelectual e tem 5 sondas dentro da região 15q11-q13, sendo 2 semelhantes aos kits usados anteriormente (P070 e P036). Foi mostrado que as linhagens de pacientes apresentavam deleção deste segmento cromossômico e a linhagem normal não (fig. 7A, anexos 1 e 2). E nenhuma outra deleção ou duplicação foi encontrada para as regiões estudadas.

Figura 7: Análise de MLPA da linhagem PWS1-1 iPSCs (gráfico em azul) em relação aos controles da corrida (gráfico em vermelho). A: MLPA com o Kit P064 que contém 5 sondas na região 15q11-q13 e confirma que a linhagem apresenta deleção do segmento 15q11-q13; as 5 setas vermelhas indicam as sondas com deleção. B e C: MLPAs com os Kits P036 e P070, respectivamente, mostram somente deleções de sonda na região 15q11.2 indicadas pelas setas nas PWS1-1 iPSCs. O restante das sondas obtiveram valores semelhantes aos controles, indicando estabilidade cromossômica.

Por último, foi analisado o *imprinting* da região 15q11-q13 para avaliar se a reprogramação não alterou o padrão da região. Através de um kit que avalia metilação (5mC) e hidroximetilação (5hmC), foi possível verificar que o

segmento 15q11-q13 na região promotora do *SNRPN* se manteve como esperado: com aproximadamente 100% das citosinas metiladas nas iPSCs de pacientes com PWS (PWS1-1 e PWS1-2), aproximadamente 0% das citosinas não metiladas nas iPSCs de pacientes com AS (AS3-1 e AS3-3) e a linhagem controle (F7908-1) apresentou aproximadamente metade das citosinas metiladas e a outra metade, desmetilada (tabela 5).

Tabela 5: Quantificação de citosinas metiladas e não metiladas feitas a partir do kit EpiMark® (New England BioLabs). Foram desconsiderados valores de citosinas hidroximetiladas 5hmC.

	<i>SNRPN</i>	
iPSCs	5mC	C não modificadas
PWS1-1	100	0
PWS1-2	96	2.1
AS3-1	0.2	99.6
AS3-3	0	99.2
F7908-1	53	45

5.2. ZNF274 se liga preferencialmente ao alelo materno

O experimento ChIP-qPCR de iPSCs de pacientes com PWS e AS mostrou que a proteína ZNF274 se liga a região do *SNORD116* grupo 1 (chamamos de *SNOG1*) nos 6 locais de ligação estudados, que foram previamente determinados após estudo dos resultados do ENCODE em outros tipos celulares, incluindo hES. Como é possível avaliar a ligação nos diferentes alelos com o uso de células de pacientes com deleção, verificamos que a ligação do ZNF274 ocorre, preferencialmente, nas linhagens de pacientes com PWS em comparação com as linhagens de pacientes com AS, indicando que ZNF274 se liga preferencialmente ao alelo materno que está silenciado. Tanto

iPSCs com origem de fibroblastos quanto iPSCs de origem das SHEDs mostraram os mesmos resultados (fig. 8). Além disso, verificamos que ZNF274 se ligava ao exon 1 do *SNRPN*, na região em comum ao PWS-IC, e nos grupos 2 e 3 (*SNOG2* e *SNOG3*) do *SNORD116* de forma não tão intensa quando comparado ao *SNOG1*. E para facilitar a visualização dos dados, os sítios de ligação 3,5 e 6 (*SNOG1-BS3*, *SNOG1-BS5* e *SNOG1-BS6*) foram selecionados para demonstração dos resultados na maioria dos experimentos, diminuindo a quantidade de informação em cada gráfico.

Figura 8: Ligação da ZNF274 ao *SNORD116* é alelo-específica nas iPSCs. ChIP-qPCR utilizando anticorpo para ZNF274 indica que esta proteína se liga a região do grupo 1 do *SNORD116* (*SNOG1*) em diversos locais indicados com BS (*binding sites*) que foram determinados a partir de resultados do ENCODE. A: Estudos com iPSCs derivados de fibroblastos indicaram que ZNF274 se liga ao grupo 1 do *SNORD116* nos locais de ligação 3,5

e 6 (SNOG1-BS3, SNOG1- BS5 e SNOG1-BS6), além disso é possível determinar que ZNF274 não se liga ao PWS-IC (determinado pelo SNRPN). ZNF180 é controle positivo. B: Ligação do ZNF274 nos demais locais de ligação dentro do grupo 1 do SNORD116 (SNOG1-BS1, SNOG1-BS2 e SNOG1-BS4) também foi observada, mas para facilitar a visualização dos gráficos, elas foram retiradas dos demais gráficos. C: Estudos com iPSCs derivadas de SHEDs corroboram com os resultados acima, indicando que ZNF274 se liga preferencialmente ao alelo materno silenciado. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.05$ e * $p \leq 0.1$.

A proteína ZNF274 apresenta domínios de ligação a regiões específicas do DNA e domínio de ligação ao KRAB que permite a ligação da proteína TRIM28. A TRIM28 serve de suporte para diversas proteínas que atuam na repressão de expressão gênica, como a SETDB1, que é uma histona metiltransferase que causa metilação na H3K9 (Fietze *et al.*, 2010). Através de análise do ENCODE, observamos que nos locais onde ZNF274 se liga, também ocorre a modificação H3K9me3.

Para avaliar se ZNF274 pode estar formando o complexo proteico que auxilia na repressão da expressão do *SNORD116*, ChIP-qPCR foi também realizada com anticorpo para H3K9me3. E foi observado um enriquecimento da modificação de histona H3K9me3 em iPSCs de pacientes com PWS em comparação às iPSCs de pacientes com AS. Logo, podemos concluir que o alelo silenciado materno apresenta modificação de histonas repressivas do tipo H3K9me3 no *SNORD116*. Adicionalmente, verificamos que na região do exon 1 do *SNRPN*, a modificação H3K9me3 também ocorre preferencialmente no alelo materno (fig. 9).

Figura 9: A modificação de histona H3K9me3 ocorre preferencialmente no alelo materno silenciado em iPSCs. A: ChIP-qPCR com iPSCs reprogramadas a partir de fibroblasto de indivíduo normal, com PWS devido à deleção do segmento 15q11-q13, PWS com a deleção rara descrito por Smith e colaboradores (2009) e com AS devido a deleção 15q11-q13 no cromossomo materno (NML 1-0, PWS del 1-7, PWS SD 2-8, AS del 1-0, respectivamente). Observamos uma ligação preferencial do anticorpo no *SNORD116* de origem materna. B: ChIP-qPCR para H3K9me3 usando iPSCs reprogramadas a partir de SHEDs de indivíduo normal, com PWS e AS com deleção do segmento 15q11-q13 (F7908-1 iPS, PWS 1-1 iPS e AS 3-3 iPS, respectivamente). As iPSCs de origem das SHEDs obtiveram resultados semelhantes às iPSCs reprogramadas de fibroblastos. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.05$ e $p \leq 0.1$.

5.3. Knockdown do ZNF274

Para avaliar o papel do ZNF274, o *knockdown* foi realizado em iPSCs da linhagem PWS del 1-7 com o uso simultâneo de 3 construções de siRNAs que atuam em mRNAs do ZNF274 (PWS ZNF274Kd) e, como controle, foi utilizado

uma construção *mismatch* (PWS MIS). A redução da expressão do *ZNF274* nas iPSCs de PWS *ZNF274Kd* foi de 70% em relação às iPSCs PWS MIS (fig. 10).

Para verificar se a redução de expressão do *ZNF274* causou menor ligação da proteína *ZNF274* ao *SNOG1*, foi realizado novamente ChIP-qPCR. Menor enriquecimento de *ZNF274* foi observado no *SNOG1* nas iPSCs de PWS *ZNF274Kd* em comparação com iPSCs PWS MIS. Adicionalmente, verificamos uma tendência de redução de deposição de H3K9me3 em iPSCs de PWS *ZNF274Kd* em relação às iPSCs de PWS MIS no *SNOG1-BS3* (fig. 11). Embora haja uma tendência de redução da modificação H3K9me3 em células com *knockdown*, a redução não alcançou valores estatisticamente significativos nos sítios de ligação estudados dentro do *SNOG1*, exceto no *SNOG1-BS3*.

Além disso, foi observado que o *knockdown* do *ZNF274* causa um aumento da expressão de *SNRPN* e *116HG* localizados no grupo 1 (o transcrito *116HGG1* não diferencia *116HG* antes do processamento e *SNORD116*) em relação ao controle PWS MIS (fig 10). Entretanto, a expressão de *116HGG1* é aproximadamente 1000X menor do que a expressão do alelo ativo.

Figura 10: Expressão das iPSCs de PWS del 1-7 ZNF274Kd (com knockdown do ZNF274) em comparação com o controle iPSCs de PWS del 1-7 MIS (controle). A: O uso de siRNA para ZNF274 reduziu a expressão de ZNF274 em 70% em relação às iPSCs de PWS del 1-7 MIS. B: Com o *knockdown* de ZNF274, ocorreu pequeno aumento na expressão de *SNRPN* e *116HGG1*. O *GAPDH* foi usado com controle endógeno para normalizar a quantificação. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, ** $p \leq 0.05$

Figura 11: ChIP-qPCR de iPSCs de PWS del 1-7 ZNF274Kd em comparação com o controle iPSCs de PWS del 1-7 MIS. A: ChIP com anticorpo para ZNF274 indica redução da ligação do ZNF274 na região controle, *ZNF180*, e no *SNOG1*. B: qPCR de amostras que foram

submetidas a ChIP para H3K9me3 indicam uma redução no enriquecimento da modificação H3K9me3 no *ZNF180* e em um dos sítios de ligação do *SNOG1* (*SNOG1-BS3*). Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.05$ e * $p \leq 0.1$.

5.4. SETDB1 forma um complexo repressivo com ZNF274

A proteína ZNF274 tem o domínio KRAB que tem afinidade com a TRIM28, uma proteína de suporte para outras proteínas que atuam em modificações que alteram a cromatina (DMNT3, DNMT1, SETDB1). Assim, avaliamos se TRIM28 e SETDB1 se ligavam à região 15q11-q13 através de ChIP-qPCR. Foi verificado que diferentemente da ZNF274 e H3K9me3, as proteínas TRIM28 e SETDB1 se ligam de forma bialélica ao *SNOG1*. Além disso, essas proteínas se ligam bialelicamente ao *SNOG2* e *SNRPN* (fig. 12).

Figura 12: ChIP-qPCR para TRIM28 e SETDB1 em iPSCs. A: ChIP-qPCR com anticorpo para TRIM28 indica que esta proteína está presente em ambos os alelos do *SNORD116* e, também, está presente no *SNRPN*. B: ChIP-qPCR para SETDB1 tem resultados semelhantes ao

TRIM28, SETDB1 se liga em ambos os alelos do *SNORD116* e *SNRPN*. Os resultados não apresentam diferenças estatisticamente significantes quando avaliados pelo teste T de Student. ZNF180 é controle positivo.

Com a finalidade de investigar se SETDB1 forma um complexo com ZNF274 no *SNOG1*, fizemos ChIP sequencial com anticorpo para ZNF274 e SETDB1 como os realizados por Fietze e colaboradores (2010) nas regiões 3' UTR de alguns genes que codificam para proteínas *zinc finger*. O material resultante da ChIP sequencial é reduzido e só permite a investigação de poucos locais de ligação; foram escolhidos o controle positivo *ZNF180* e o *SNOG1-BS5*. Foi verificado que ZNF274 e SETDB1 se localizam no mesmo local no *SNOG1-BS5* e somente ocorre no alelo silenciado, pois o enriquecimento da ChIP sequencial foi observado somente nas iPSCs de PWS del 1-7 e ausente nas iPSCs de AS del 1-0 (fig. 13).

Figura 13: ChIP sequencial para ZNF274 e SETDB1 em iPSCs. ZNF274 e SETDB1 se ligam num mesmo local indicando um provável complexo no controle positivo, *ZNF180*, corroborando com o descrito anteriormente (Fietze *et al.*, 2010). Essa colocalização também foi observada

em iPSCs de PWS del 1-7 (PWS ZNF274-SETDB1), mas é ausente em iPSCs de AS del 1-0 (AS ZNF274-SETDB1). Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, * $p \leq 0.1$.

5.5. Knockdown do SETDB1 e ZNF274 nas iPSCs

Para analisar a função do SETDB1, o *knockdown* utilizando lentivirus que expressam *short hairpin* RNA (shRNA) direcionado para mRNA do *SETDB1* e para controle *mismatch* (MIS) foi realizado em iPSCs de PWS del 1-7. O *knockdown* reduziu em 70% a expressão do *SETDB1* em PWS del 1-7 SETDB1Kd com relação às iPSCs PWS del 1-7 MIS (fig. 14A). Ao mesmo tempo, as expressões de *SOX2* e *ACTB* se mantiveram semelhantes nos dois grupos (fig. 14B).

Figura 14: *Knockdown* do *SETDB1* em iPSCs de PWS del 1-7 (PWS SETDB1Kd). A: O uso de shRNA reduziu a expressão de SETDB1 em 70% em comparação com iPSCs de PWS del 1-7 MIS (PWS MIS). B: A expressão de *SOX2*, que é um fator de transcrição de células pluripotentes, e a expressão de *ACTB*, que é um gene endógeno, são semelhantes nas iPSCs de PWS SETDB1Kd e PWS MIS. O gene endógeno utilizado para normalizar a expressão foi o *GAPDH*. O teste estatístico T de Student foi utilizado, *** $p \leq 0.01$.

Foi verificado através de experimento de ChIP-qPCR que o *knockdown* do *SETDB1* causou menor ligação dessa proteína no *SNRPN*, no *SNORD116* e na região controle, *ZNF180*, em relação ao controle MIS (fig. 15A). Adicionalmente, foi observado um menor enriquecimento de H3K9me3 nas iPSCs de PWS del 1-7 SETDB1Kd do que nas iPSCs de PWS del 1-7 MIS (fig. 15B) . E na direção contrária, em relação às modificações de histonas relacionadas com ativação de transcrição, a H3K4me2, cresceu o enriquecimento nas células com *knockdown* quando comparadas com o iPSCs de PWS del 1-7 MIS. (fig. 15C).

Adicionalmente ao *knockdown* do *SETDB1*, foi feito o *knockdown* do ZNF274 em células que tinham expressão reduzida de *SETDB1*. Essas linhagens que expressavam 70% a menos do SETDB1 e 60% a menos de ZNF274 em relação ao controle *mismatch* foram nomeadas de PWS del 1-7 SETDB1Kd + ZNF274Kd (fig. 16). Essas células com duplo *knockdown* apresentam características semelhantes às iPSCs de PWS del 1-7 SETDB1Kd. iPSCs de PWS del 1-7 SETDB1Kd + ZNF274Kd apresentam menor enriquecimento da H3K9me3 na região do *SNORD116* (fig. 15B). Além disso, foi observado o aumento no enriquecimento de H3K4me2 em comparação ao PWS del 1-7 MIS na região do *SNORD116* (fig. 15C).

Figura 15: ChIP-qPCR de iPSCs de PWS del 1-7 com *knockdown* de *SETDB1* e *ZNF274*. A: Imunoprecipitação com anticorpo para *SETDB1* indica que em células *knockdown* para *SETDB1* em comparação com controle *mismatch* (PWS del 1-7 MIS) há menor ligação desta proteína em todos os sítios de ligação analisados no *SNORD116*, *SNRPN* e na região controle *ZNF180*. B: ChIP realizado com anticorpo para H3K9me3. iPSCs com *knockdown* do *SETDB1* (PWS del 1-7 *SETDB1*kd) ou *knockdown* duplo (PWS del 1-7 *SETDB1*kd + *ZNF274*kd) apresentaram menor enriquecimento da modificação H3K9me3 nos *SNRPN*, *SNORD116* e *ZNF180*. C: Imunoprecipitação com anticorpo para H3K4me2, que é uma modificação de histona relacionada à ativação de transcrição, indica aumento do enriquecimento desta modificação nas iPSCs com *knockdown* de *SETDB1* e duplo. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.05$ e * $p \leq 0.1$.

Figura 16: Duplo *knockdown* das iPSCs de PWS del 1-7 reduziu a expressão de *ZNF274* e *SETDB1*. iPSCs de PWS del 1-7 *SETDB1kd* e *ZNF274kd* apresentam 40% e 30% da expressão de *ZNF274* e *SETDB1* encontrada no controle *mismatch* (PWS del 1-7 MIS). Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$.

O interessante foi que as linhagens de iPSCs de PWS del 1-7 com *knockdown* de *SETDB1* ou duplo -*SETDB1* e *ZNF274*- apresentaram aumento da expressão de *SNRPN* e *116HGG1* estatisticamente significante quando comparadas com o controle (iPSCs de PWS del 1-7 MIS) (fig. 17A). Além disso, em relação à expressão dos outros grupos do *SNORD116* (*116HGG2* e *116HGG3*) e o transcrito downstream, *IPW*, também foi observado aumento de expressão nas iPSCs de PWS del 1-7 com *knockdown* em relação ao controle iPSCs de PWS del 1-7 MIS (fig. 17B). Entretanto, o transcrito downstream ao *IPW* que é expresso exclusivamente no cérebro, *115HG*, não é expresso em iPSCs; quando investigada a expressão, os valores do Ct são superiores a 37 e não foi observado aumento da sua expressão. Assim, os *knockdowns* de *SETDB1* só ou acompanhado pelo *knockdown* de *ZNF274* não afetaram a expressão de transcritos, que são específicos de neurônios, nas iPSCs.

Figura 17: Expressão de alguns genes da região 15q11-q13 em iPSCs de PWS del 1-7 com *knockdown* do *SETDB1* em conjunto ou não com *knockdown* do *ZNF274*. A: A expressão do *116HGG1* e *SNRPN* aumentou significativamente nas iPSCs com *knockdown* em relação ao controle (iPSCs de PWS del 1-7 MIS). B: A expressão de outros transcritos da região 15q11q-13 como *116HGG2*, *116HGG3* e *IPW* também sofreram aumento com o *knockdown* da expressão do *SETDB1*, mas o *115HG* que é expresso exclusivamente no cérebro, não sofreu aumento de expressão em iPSCs. A expressão foi normalizada pela expressão do *GAPDH* e iPSCs de PWS del 1-7 MIS foram utilizadas como padrão (valor expressão relativa igual a 1). Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, ** $p \leq 0.05$ e *** $p \leq 0.01$.

O aumento da expressão de alguns genes na região 15q11-q13 também pode ser decorrente de modificações na metilação de DNA, além da diminuição das modificações de histonas H3K9me3 e aumento de H3K4me2. Para acessar metilação (5mC) e hidroximetilação (5hmC) de DNA foi realizada análise através do kit EpiMark®. Primeiro o DNA foi tratado com T4-β-glucosiltransferase que adiciona um motivo de glicose no DNA com 5hmC. Essa modificação previne a

digestão do DNA pela enzima de restrição *MspI*, assim permitindo a distinção de 5mC e 5hmC.

Inicialmente, o ensaio do kit EpiMark® foi utilizado para averiguar metilação da região do PWS-IC (exon 1 do *SNRPN*) em iPSCs de AS del 1-0 e PWS del 1-7. Foi observado que a região PWS-IC está majoritariamente metilada em iPSCs de PWS del 1-7 e não metilada em células de AS (fig. 18A). O mesmo ensaio foi feito em iPSCs de PWS del 1-7 SETDB1kd e no controle iPSCs de PWS del 1-7 MIS. Foi observado que as células de PWS com *knockdown* em relação às células controle apresentaram queda na porcentagem de citosina metiladas (fig. 18B), mas não houve aumento da porcentagem de citocinas não modificadas (fig. 18D). Porém, houve aumento na porcentagem de citocina hidroximetilada (fig. 18C).

Os dados em relação à hidroximetilação de citosinas foram confirmados com experimentos de imunoprecipitação de DNA metilado (meDIP). Resultados do meDIP indicaram aumento da porcentagem de *input* em iPSCs de PWS del 1-7 SETDB1kd em comparação às iPSCs de PWS del 1-7 MIS (fig. 19B). Entretanto, a porcentagem de *input* de DNA metilado não foi diferente nos dois grupos (fig. 19B).

Figura 18: Ensaio para análise de DNA metilado e hidroximetilado. A: iPSCs de AS e PWS mostraram que na região PWS-IC o DNA é preferencialmente metilado no alelo materno e não metilado no alelo paterno. B: Porcentagem de citosinas metiladas na região do PWS-IC em iPSCs de PWS del 1-7 MIS e com *knockdown* de SETDB1 (PWS SETDB1kd) indica redução de 5mC em células com iPSC de PWS SETDB1kd. C: Porcentagem de citosinas hidroximetiladas em PWS MIS e PWS SETDB1kd mostra aumento de hidroximetilação no PWS-IC com redução de expressão de *SETDB1*. D: Porcentagem de citocinas não modificadas em PWS-IC indica semelhança em PWS MIS e PWS SETDB1kd. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, *** $p \leq 0.01$.

Figura 19: Imunoprecipitação de DNA metilado e hidroximetilado ((h)meDIP). A: Metilação e hidroximetilação de iPSCs de AS e PWS com deleção de segmento 15q11-q13. iPSCs de AS e PWS apresentam porcentagem de *input* de 5hmC semelhante, mas a porcentagem de *input* de 5mC é alta no caso de iPSCs de PWS del 1-7 e baixa em iPSCs de AS del 1-0. B: 5mC e 5hmC em iPSCs de PWS del 1-7 controle (MIS) e com *knockdown* de *SETDB1* (SETDB1kd). Ocorre aumento da porcentagem de *input* de 5hmC em iPSCs de PWS del 1-7 com *knockdown* de *SETDB1* em relação ao controle. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, ** $p \leq 0.05$ e *** $p \leq 0.01$.

5.6. Neurônios derivados de iPSCs

Depois de verificado o complexo proteico repressivo formado por ZNF274/SETDB1 nas células iPSCs, foi feita a diferenciação das iPSCs em neurônios para analisar se este complexo está presente em células diferenciadas.

Para a diferenciação neuronal foram obtidas rosetas após o tratamento de corpos embrióides (fig. 20). Após 6 semanas de diferenciação a partir dos neuroprogenitores, foram feitas análises de expressão gênica por qRT-PCR e proteica através de imunocitoquímica. Neurônios derivados de iPSCs expressam *MAP2* e *TUBB3*. Análise estatística feita pelo teste T de Student ($p \leq 0.05$) (fig. 21). Além disso, a expressão proteica de MAP2 e TUJ1 foi confirmada através de ensaios de imunocitoquímica (fig. 20).

Figura 20: Caracterização dos neurônios derivados das iPSCs por imunocitoquímica. Superior esquerda: imagem das rosetas obtidas no início da diferenciação. Superior direita: imagem dos neurônios em microscopia de transluminescência. Imagens abaixo: Imunocitoquímica dos neurônios obtidos de iPSCs do controle (F7908-1), de paciente com PWS (PWS1-1) e paciente com AS (AS3-3). Foram avaliados para expressão de MAP2 e TUJ1.

Figura 21: Expressão de *MAP2*, *TUBB3* e *NANOG* nos neurônios derivados de iPSCs. A: Gráficos de expressão relativa de *MAP2* indicam aumento de expressão nos neurônios. B: A expressão de *TUBB3* também aumenta nos neurônios. C: Expressão de *NANOG*, um dos fatores de transcrição marcador de pluripotência, indica queda de expressão nos neurônios em relação às iPSCs. Os dados foram comparados pela diferenciação da linhagem PWS SD 2-8, já descrita anteriormente, na qual foi demonstrada sua capacidade de diferenciação neuronal

(Martins-Taylor *et al.*, 2014). O gene endógeno utilizado para padronização foi *GAPDH*. Os valores foram avaliados pelo teste T de Student, ** $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$.

Adicionalmente, os neurônios derivados de iPSCs apresentaram aumento da expressão de *UBE3A-AS* e de exons *upstream* ao *SNRPN* que são expressos exclusivamente em neurônios. Este aumento pode ser observado em neurônios derivados de células controle e de pacientes com AS. Em células de pacientes com PWS com somente o alelo materno do *UBE3A-AS* e *SNRPN*, ele não é expresso. A expressão do *UBE3A* é menor em neurônios derivados de iPSCs do paciente com AS em comparação com neurônios derivados de células do paciente com PWS e controle. Entretanto, ainda é observada a expressão de *UBE3A* em neurônios derivados de AS. *UBE3A* é expresso bialelicamente em outros tecidos, como observado nas iPSCs. O grupo 1 do *SNORD116* é expresso em neurônios derivados de iPSCs e em iPSCs, porém a expressão é baixa nas SHEDs; entretanto, como esperado, as células de pacientes com PWS não expressam *SNORD116* no três tipos celulares estudados (fig. 22).

Figura 22: Expressão de exons *upstream* do *SNRPN*, *UBE3A* e *UBE3A-AS* em SHEDs, iPSCs e neurônios derivados de iPSCs. A: Em relação à expressão de exons *upstream* ao *SNRPN*, que são transcritos exclusivamente em neurônios, foi observado aumento de expressão nos neurônios derivados de iPSCs do controle e do paciente com AS (F7908-1 e AS3-3) do que nos demais tipos celulares (SHEDs e iPSCs) e neurônios derivados de iPSCs de PWS. B: Em

relação à expressão do *UBE3A* é possível ver a expressão bialélica nas iPSCs, pois é expresso nas células de pacientes e controle, sendo maior no controle. Além disso, com a diferenciação em neurônios, foi observado que a expressão do *UBE3A* em células de AS é bem menor que a expressão em células controle e de PWS. C: A expressão do *UBE3A-AS*, como os exons upstream ao *SNRPN*, é exclusiva em neurônios: o gráfico indica a sua alta expressão em neurônios derivados de iPSCs de pacientes com AS e de controle (AS3-3 e F7908-1). Entretanto, *UBE3A-AS* não é expresso ou apresenta expressão bem baixa nos demais tipos celulares (SHEDs e iPSCs) e em neurônios derivados de iPSCs de pacientes com PWS (PWS1-1). D: Expressão do grupo 1 do *SNORD116* (SNOG1) nos três tipos celulares. O *SNORD116* é expresso nos neurônios e iPSCs de pacientes com AS e de doadores controles, mas não é expresso em células de paciente com PWS. Além disso, *SNORD116* não é expresso ou tem expressão baixa nas SHEDs. A expressão foi normalizada com a expressão de *GAPDH* e a amostra padrão (quantificação igual a 1) é a iPSCs do controle (F7908-1 iPS).

5.7. Ligação do ZNF274 em neurônios derivados de iPSCs

Como ZNF274/SETDB1 parecem desempenhar um papel importante na manutenção do *imprinting* em células iPSCs, analisamos, também, o estado deste complexo em neurônios. Curiosamente, nos neurônios derivados de iPSCs, ZNF274 se liga ao *SNORD116* de forma diferente do que nas iPSCs. ZNF274 se liga aos dois alelos dentro do *SNORD116* em neurônios, sem preferência alélica (fig. 23A).

Além disso, a modificação de histonas H3K9me3 também ocorre de forma diferente nos neurônios derivados de iPSCs. H3K9me3 está enriquecida em ambos os alelos. Por outro lado, H3K9me3 continua mais enriquecida no alelo silenciado materno do que no alelo paterno no *SNRPN* (que sobrepõe ao PWS-IC) (fig. 23B).

Figura 23: ChIP-qPCR de neurônios derivados de iPSCs. A: Imunoprecipitação feita com anticorpo para ZNF274 indica que essa proteína se liga em ambos os alelos. B: Imunoprecipitação para H3K9me3 demonstra que esta modificação ocorre em ambos os alelos dentro do *SNORD116*. Na região do PWS-IC (exon 1 do *SNRPN*), a modificação de histona repressora ocorre preferencialmente em neurônios derivados iPSCs de PWS 1-1 e de PWS SD 2-8 em comparação com os derivados de AS 3-3. SNOG1-BS3, SNOG1-BS5 e SNOG1-BS6 são sítios de ligação dentro do grupo 1 do *SNORD116* que foram selecionados e SNOG2 é o grupo 2 do *SNORD116*. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student e *** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.1$.

5.8. Ligação do ZNF274 em SHEDs

As SHEDs são células-tronco mesenquimais que apresentam diferença na expressão de vários genes quando comparadas às iPSCs, incluindo genes dentro da região 15q11-q13. A expressão do *UBE3A* é menor nas SHEDs em comparação com as iPSCs. Entretanto, a expressão de exons *upstream* ao *SNRPN* e do *UBE3A-AS* é praticamente nula nas SHEDs, como nas iPSCs (fig. 22). Além disso, a expressão de genes importantes para pluripotência são muito maiores nas iPSCs do que nas SHEDs (fig. 6).

Além dos neurônios, as SHEDs também foram analisadas por ChIP-qPCR para verificar ligação da proteína ZNF274 neste tipo celular. Como nos neurônios, a ligação ZNF274 ocorreu em ambos os alelos dentro do *SNORD116*. E a ligação não apresenta preferência pelo alelo materno como ocorre nas iPSCs (fig. 24A).

A modificação de histona H3K9me3 nas SHEDs também ocorre em ambos os alelos e não ocorre de forma preferencial em nenhum alelo dentro do grupo 1 do *SNORD116*. Contudo, a modificação H3K9me3 ocorre preferencialmente no alelo materno no *SNRPN* e no grupo 2 do *SNORD116* (fig. 24B).

Figura 24: ChIP-qPCR de SHEDs. A: Imunoprecipitação para ZNF274 mostra que essa proteína se liga em ambos os alelos na região do grupo 1 do *SNORD116*. B: Imunoprecipitação para H3K9me3 demonstra que esta modificação está enriquecida no alelo materno no grupo 2 do *SNORD116*, mas no grupo 1 ela ocorre em ambos alelos. Na região do *SNRPN*, a modificação de histona repressora ocorre preferencialmente no alelo materno, nas SHEDs de controle saudável e nas de paciente com PWS em comparação às células de AS 3-3. Os dados foram avaliados pelo teste estatístico T de Student, * $p \leq 0.1$.

5.9. Estado das citosinas na região PWS-IC

Os experimentos de ChIP com anticorpo para H3K9me3 mostraram que a região do exon 1 do *SNRPN* (PWS-IC) apresenta enriquecimento dessa modificação no alelo no qual o *SNRPN* é silenciado independente do tipo celular analisado: SHEDs, iPSCs ou neurônios derivados de iPSCs. Foi realizada a análise de metilação e hidroximetilação desta região cromossômica nos 3 tipos celulares. Foi observado que o padrão de metilação é semelhante em todos os tipos celulares. Nas células do controle aproximadamente 50% das citosinas estão metiladas e a outra metade desmetilada. Nas células do paciente com PWS a maioria das citosinas é metilada. Por último, nas células do paciente com AS, a maioria das citosinas está desmetilada. Os níveis de 5hmC são baixos em todos tipos celulares e não apresentaram diferença entre os grupos celulares (fig.25).

Figura 25: Análise de metilação e hidroximetilação de citosinas na região do exon 1 do *SNRPN* que faz parte do PWS-IC. O padrão de (hidroxi)metilação é semelhante nas SHEDs, iPSCs e neurônios. Os dados foram comparados estatisticamente pelo teste T de Student entre cada tipo celular do mesmo doador. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

5.10. Expressão de alguns genes importantes para o estabelecimento e manutenção de marcas epigenéticas

Para tentar elucidar a expressão de genes que atuam no estabelecimento e manutenção de marcas epigenéticas, um estudo de expressão foi feita nos três tipos celulares (SHEDs, iPSCs e neurônios derivados das iPSCs) com alguns genes conhecidamente envolvidos nestes mecanismos. Foram selecionados alguns genes que são importantes para o estabelecimento e manutenção de marcas epigenéticas, como *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT1* e *UHRF1*. E também avaliamos a expressão de genes relacionados a hidroximetilação: *TET1*, *TET2* e *TET3*.

Entre os genes avaliados, alguns deles apresentaram diferenças estatisticamente significativas em um dos grupos (SHEDs, iPSCs ou neurônios derivados de iPSCs) quando comparados através do teste ANOVA com comparações múltiplas de Tukey. O *DNMT3B* apresenta expressão maior nas iPSCs quando comparado com as SHEDs e os neurônios (fig. 26B). Em relação aos genes que transcrevem para as proteínas TETs, eles apresentaram um grupo com expressão diferencial dos demais. O *TET1* é significativamente menos expresso nas SHEDs, enquanto que *TET2* e *TET3* apresentam valores de expressão significativamente maiores nos neurônios (fig. 27).

Adicionalmente, utilizando a mesma metodologia, foi analisada a expressão do *ZNF274* e *SETDB1*. E o *ZNF274* apresentou expressão mais elevada nos neurônios derivados de iPSCs do que nas SHEDs e iPSCs (fig. 28). E a expressão de *SETDB1* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tipos celulares estudados.

Figura 26: Expressão de alguns genes selecionados que atuam na manutenção ou/estabelecimento de marcas epigenéticas nas SHEDs, iPSCs e neurônios derivados de iPSCs. A: expressão de *DNMT3A* não é estatisticamente diferente nos 3 tipos celulares estudados. B: A expressão de *DNMT3B* é maior nas iPSCs em relação às SHEDs e aos neurônios. C: *DNMT1* não apresenta diferença de expressão estatisticamente significativa entre os diferentes

tipos celulares. D: O gene *UHRF1* também não apresenta diferença de expressão entre os 3 grupos de forma estatisticamente significativa. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de 2 fatores e, posteriormente, os grupos foram comparados pelo teste de Tukey, $**p \leq 0.05$.

Figura 27: Expressão dos genes que transcrevem as proteínas TET (*ten-eleven translocation*) nas SHEDs, iPSCs e neurônios derivados das iPSCs. A: Expressão da *TET1* é menor nas SHEDs de forma estatisticamente significativa. B e C: A expressão de *TET2* e *TET3*, respectivamente, é maior nos neurônios derivados de iPSCs do que nas SHEDs e iPSCs. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de 2 fatores e, posteriormente, os

grupos foram comparados pelo teste de Tukey, $**p \leq 0.05$ e $*** \leq 0.01$.

Figura 28: Estudo da expressão de *ZNF274* e *SETDB1* nas SHEDs, iPSCs e neurônios derivados de iPSCs. A: Neurônios apresentam expressão maior de *ZNF274* estatisticamente significativa. B: A expressão de *SETDB1* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA de 2 fatores e, posteriormente, os grupos foram comparados pelo teste de Tukey, $**p \leq 0.05$.

6. Discussão

Neste estudo foram utilizadas iPSCs de pacientes com AS, PWS e de controles normais. Algumas linhagens foram previamente descritas (Chamberlain *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014). As linhagens obtidas a partir de SHEDs (iPSCs PWS1-1, iPSCs PWS1-2, iPSCs AS3-1, iPSCs AS3-3 e iPSCs F7908-8) ainda não haviam sido descritas, e, portanto, fizemos a caracterização.

As iPSCs derivadas de SHEDs expressam *SOX2*, que está na lista de fatores utilizados para reprogramação, e *NANOG*, que é um fator de transcrição importante para pluripotência, mas não está entre os fatores de reprogramação utilizados. Além disso, verificamos que as iPSCs expressam proteínas relacionadas à pluripotência: TRA-1-61, TRA-1-81, OCT4 e *NANOG*.

Adicionalmente para verificar a pluripotência, as células foram cultivadas em suspensão em placas de baixa adesão para induzir a formação dos corpos embrioides (EBs). Os EBs foram avaliados em relação à expressão gênica e observamos que genes dos três folhetos embrionários são expressos: *TUBB3*, *PAX6*, *MYH6*, *FN1*, *GATA6* e *GATA4*. *TUBB3* é beta tubulina da classe três que é específica de neurônios e *PAX6* transcreve uma proteína que regula a transcrição e é expresso durante o desenvolvimento de neurônios e olhos, assim, *TUBB3* e *PAX6* marcam células de ectoderme. *FN1* (fibronectina 1) é uma glicoproteína importante para adesão e migração celular, por exemplo, no desenvolvimento embrionário e é relacionada com a mesoderme. *GATA4* transcreve outra proteína zinc-finger com motivo GATA e é importante para diferenciação e função do miocárdio, e ela é usada para marcar células da endoderme.

Outro ponto importante investigado nas iPSCs é a integridade cromossômica. Para isso, foram empregados 2 kits de MLPA com sondas subteloméricas que indicaram resultados normais, com exceção das linhagens iPSCs PWS1-1, iPSCs PWS1-2, iPSCs AS3-1 e iPSCs AS3-3 que apresentaram, como esperado, deleção no cromossomo 15 na região 15q11-13. Além disso, foi empregado um kit com 5 sondas localizadas dentro da região 15q11-q13 para confirmar a deleção nos casos de células de PWS e AS.

Adicionalmente, é essencial avaliar o padrão de metilação na região do PWS-IC nas iPSCs para utilizá-las como modelo de estudo em PWS e AS. Através do kit Epimark[®] foi possível quantificar a porcentagem de citosinas metiladas (5mC), hidroximetiladas (5hmC) e não modificadas. As iPSCs apresentaram quantidade de citosinas metiladas e não metiladas na região PWS-IC como esperado: a maioria das citosinas metiladas nas células de pacientes com PWS e não metiladas em AS, e células controle apresentaram aproximadamente 50% das citosinas metiladas e o restante, não metiladas. Um dos métodos mais tradicionais para avaliar metilação é o tratamento do DNA com bissulfito e o uso de oligos que reconhecem citosinas metiladas e não metiladas, mas esse método não diferencia citosinas metiladas e hidroximetiladas e é somente qualitativo, assim a metodologia aqui utilizada é mais sensível e foi útil para análises posteriores. Portanto, nossos resultados indicam que o *imprinting* genômico da região 15q11-q13 não foi alterado com a reprogramação e está de acordo com o encontrado nos trabalhos anteriores que estudaram iPSCs de pacientes com AS e PWS (Chamberlain *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Martins-Taylor *et al.*, 2014; Stelzer *et al.*, 2014).

Após caracterização, podemos afirmar que as iPSCs obtidas apresentam as características básicas necessárias para serem modelo *in vitro* no estudo das doenças AS e PWS. O enfoque deste trabalho é analisar possíveis proteínas que podem influenciar o estabelecimento ou a manutenção do *imprinting* genômico da região 15q11-q13. Entre as modificações epigenéticas conhecidas da região 15q11-q13 estão as metilações de citosinas no PWS-IC do alelo materno enquanto o alelo paterno não é metilado (Glenn *et al.*, 1996). Além disso, o alelo materno da região PWS-IC e a região promotora do *NDN* apresentam outras marcas de repressão de expressão, como H3K9me3. O alelo paterno apresenta a modificação de histona relacionada com a ativação de expressão, a H3K4me2 (Xi *et al.*, 2001). O alelo ativo também apresenta acetilação de histonas H3 e H4 (Saitoh & Wada, 2000). A região AS-IC não está diferencialmente metilada, mas o alelo materno apresenta histonas modificadas com marca de ativação H3K4me2 e histonas acetiladas, além de serem mais sensíveis a DNase I (Perk *et al.*, 2002). E no atual estudo buscamos outras proteínas com papel importante no *imprinting* genômico com específico enfoque no *SNORD116*.

O *SNORD116* é importante para o neurodesenvolvimento normal e a ausência de sua expressão tem sido sugerida como fundamental para desencadear a PWS. Em camundongos, a expressão de *Snord116* é restrita em neurônios; porém, em humanos, o *SNORD116* é expresso em vários tecidos. Em camundongos, a proteína Zfp57 foi apontada como essencial para o estabelecimento e manutenção do *imprinting* do *Snrpn* (Li *et al.*, 2008). No atual estudo foi avaliada a importância de uma proteína *zinc finger*, a ZNF274,

para o *imprinting* do *SNRPN* e *SNORD116* em iPSCs humanas e a presença deste complexo proteico em outros tipos celulares.

A determinação da ZNF274 como proteína interessante a ser estudada ocorreu através de análises utilizando o *ENCODE Genome Browser*. Foi observado que a ZNF274 se liga ao *SNORD116* em vários tipos celulares. E ZNF274 foi estabelecida como parte de um complexo proteico envolvendo proteínas, como SETDB1 e TRIM28, conhecidas por reprimir a expressão de vários genes através da trimetilação da histona H3K9 (Fietze *et al.*, 2010).

Utilizando a técnica de ChIP-qPCR verificamos que ZNF274 se liga preferencialmente ao alelo silenciado (materno) do *SNORD116* nas iPSCs. Além disso, a modificação de histonas H3K9me3 também é alelo-específica, ocorrendo preferencialmente no alelo materno nas iPSCs. Logo, sugerimos que ZNF274 possa desempenhar um papel no estabelecimento ou manutenção do *imprinting* na região. No estudo de Fietze e colaboradores (2010) ZNF274 se ligava a região repetitiva do 3'UTR de genes ZNF, e o *SNORD116* também é composto por um conjunto de sequencias repetitivas. Embora os motivos de ligação da ZNF274 aos genes ZNF não sejam encontrados na região do *SNORD116*, outros motivos conservados foram apontados por Fietze e colaboradores (2010) e Khurana e colaboradores (2013) e são encontrados dentro do *SNORD116*.

O local no qual ocorre a modificação de histona H3K9me3 é maior que os locais onde ZNF274 se liga. A modificação H3K9me3 se espalha pelo grupo 2 e 3 do *SNORD116* e pode ser que se espalhe ao PWS-IC. A modificação H3K9me3 pode espalhar no genoma com auxílio de outras proteínas, como por

exemplo, a proteína heterocromatina tipo 1 (HP1). HP1 tem um domínio que se liga às histonas metiladas H3K9 que foram modificadas pela SETDB1 (Lachner *et al.*, 2001). Algumas funções já foram atribuídas ao HP1 tais como espalhar a modificação H3K9me3, aumentar metilação ou espalhar H4K20me2 (Maksakova *et al.*, 2011). Assim é possível que a HP1 ou outra proteína semelhante à HP1 espalhe a modificação de histona H3K9me3 pelo alelo materno.

Ao avaliar a presença de outras proteínas que previamente foram descritas como parte do complexo que reprime expressão, TRIM28 e SETDB1, verificamos que ambas estão presentes nos mesmos segmentos que as modificações H3K9me3, porém, não são alelo-específicas. Ao fazer o experimento de ChIP sequencial, que é ChIP com anticorpo para SETDB1 após outro ChIP com anticorpo para ZNF274, verificamos que locais com a coocupação de ZNF274 e SETDB1 ocorrem preferencialmente no alelo materno silenciado. Propomos que é formado o complexo pela ZNF274 e SETDB1, mas é possível que outra(s) proteína(s) atraia(am) TRIM28 e SETDB1.

O *knockdown* do ZNF274 foi feito para avaliar a função desta proteína. O *knockdown* causou um sutil aumento da expressão de *116HG* (um dos transcritos do *SNORD116*) e *SNRPN*, porém não foi observada muita alteração na modificação da histona H3K9me3, sendo que somente um dos sítios de ligação (1 dos 6 sítios no grupo 1 do *SNORD116*) apresentou redução significativa da porcentagem do *input*. É possível que, uma vez formado o complexo proteico que regula a expressão, as proteínas possuam a habilidade de continuar a repressão mesmo na ausência de proteína *zinc finger*. Além

disso, não é possível excluir a possibilidade do tempo ou nível de *knockdown* ser insuficiente para observar maiores alterações, pois foi utilizado siRNA e a redução da expressão foi de 60-70% em relação ao controle.

O *knockdown* do *SETDB1* sozinho ou em combinação com *ZNF274* reforçou a importância dessas proteínas na repressão da expressão do *116HG*, pois, a expressão aumentou significativamente, aproximadamente 100 vezes da expressão do controle. Essa expressão ainda não alcançou o valor expressado pelo alelo ativo paterno que é 10x maior do que a expressão em iPSCs de PWS com *knockdown* do *SETDB1*, mas este achado pode ser importante para futuros estudos focando a ativação do alelo silenciado e, consequentemente, o desenvolvimento de uma terapia para PWS.

Com o *knockdown* do *SETDB1* houve redução da trimetilação de H3K9, que é uma modificação de histona relacionada com a repressão da expressão, dentro do *SNORD116* e do próprio PWS-IC. Além disso, houve aumento da dimetilação de H3K4 que é uma modificação de histona associada à ativação de transcrição.

Modificações de histonas e metilação de DNA são importantes mecanismos epigenéticos que regulam a transcrição. Entender como uma modificação pode alterar outra é uma tarefa complexa, porém a metilação de DNA já foi associada com a ausência de metilação na histona H3K4 e presença de metilação de H3K9; entretanto, nenhuma associação foi encontrada em relação à metilação da histona H3K27 (Laurent *et al.*, 2010). Adicionalmente, proteína MBD1 (proteína com domínio de ligação metil CpG tipo 1) forma um complexo estável com SETDB1. *Setdb1* é altamente expresso durante a

oogênese e na pré-implantação, que são estágios importantes para o estabelecimento da metilação do DNA e a não expressão de *Setdb1* pode interferir na metilação do DNA (Matsui *et al.*, 2010). Além disso, em células de câncer, SETDB1 pode recrutar DNMT3A em genes supressores de tumor (Li *et al.*, 2006). Adicionalmente, a proteína TRIM28 pode se associar a proteínas que regulam expressão incluindo DNA metiltransferases; logo, TRIM28 pode estar envolvida tanto na modificação de histonas através da SETDB1, como também na metilação de DNA num processo mais lento (Quenneville *et al.*, 2012). Assim, foi investigado a metilação do DNA nas iPSCs com *knockdown* específico para *SETDB1* ou em conjunto com *knockdown* para *ZNF274*.

Foram usadas duas abordagens para analisar metilação de DNA. Primeiro, foi realizada análise com o kit mencionado anteriormente, Epimark[®], que contém uma enzima que adiciona glicose ao grupo hidroxil do 5hmC (5ghmC) e enzimas de restrição que reconhecem 5ghmC, 5mC e C. Com esta abordagem observamos uma redução de DNA 5mC na região de PWS-IC nas iPSCs com *knockdown* do *SETDB1*. Ao mesmo tempo, foi observado aumento de DNA com 5hmC nestas células em comparação com iPSCs controle (MIS).

A segunda metodologia utilizada foi meDIP. As iPSCs com *knockdown* não apresentaram diminuição de DNA com 5mC. Entretanto, é possível que o anticorpo não seja específico para distinguir 5mC de 5hmC. Foi observado um aumento de 5hmC nas iPSCs com *knockdown* de *SETDB1*. Logo, mesmo que a quantidade de citocinas não modificadas não tenha aumentado com o *knockdown* do *SETDB1*, 5mC foi convertido em 5hmC.

A conversão de 5mC para 5hmC pode ser realizada através das proteínas da família TET (*ten-eleven translocation*), principalmente a Tet1, que tem se mostrado importante para autorreplicação e manutenção do estado indiferenciado das mESs (células-tronco embrionárias murinas) (Ito *et al.*, 2010). Além disso, em células com expressão constitutiva do *Tet1*, como mESs, o *knockdown* dessa expressão causa redução de 5hmC (Tahiliani *et al.*, 2009).

Outros membros da família Tet foram mostrados por Ito e colaboradores (2010), como importantes para conversão de 5mC em 5hmC. Além disso, verificaram que células mES apresentam expressão alta de *Tet1* e *Tet2*, mas não tão elevada de *Tet3*; *Tet1*, que é expresso desde o zigoto até o blastocisto, se liga ao *Nanog* e desempenha papel importante na manutenção da capacidade de auto-renovação e do estado indiferenciado.

Nas iPSCs humanas observamos que *TET1* é altamente expresso, mas as expressões de *TET2* e *TET3* são baixas quando comparadas aos neurônios. Esses resultados estão de acordo com o achado de Yan e colaboradores (2013) que avaliaram o padrão de expressão pelo RNA-seq de embriões preimplantação e células hES (células-tronco embrionárias humana) e verificaram que *TET1* é altamente expresso em hES e o mesmo não ocorre com *TET2* e *TET3*. Assim, é possível que *TET2* seja diferencialmente expresso em células pluripotentes humanas e murinas.

Além disso, em algumas regiões ricas em CpG metiladas (como regiões pericentroméricas), proteínas com domínio MBD (como MeCP2 e MBD1) se ligam a essas regiões e essas também são ricas em SETDB1 e HP1, tudo isso

impedindo o acesso de Tet1 a esses locais (Xu *et al.*, 2011). Propomos que com o *knockdown* de *SETDB1*, é possível que TET1 possa se ligar a regiões próximas ao PWS-IC e ao *SNORD116* e converter 5mC em 5hmC. Já foi mostrado que 5hmC não pode ser reconhecido por proteínas com domínio MBD (Valinluck *et al.*, 2004) e, é possível que diminua o acesso de DNMTs iniciando, posteriormente, a desmetilação passiva do DNA.

Quando avaliamos células diferenciadas, neste caso utilizando neurônios derivados das iPSCs, verificamos que a proteína ZNF274 não se liga de forma alelo-específica. ZNF274 se liga ao *SNORD116* em ambos os alelos. Além disso, a modificação de histona H3K9me3 também ocorre em ambos os alelos no *SNORD116*. Entretanto, na região de PWS-IC, a modificação H3K9me3 continua mais enriquecida em neurônios derivados de células de pacientes com PWS, indicando maior enriquecimento no alelo materno. Esse dado condiz com dados anteriores que afirmam que a região PWS-IC é mais enriquecida de H3K9me3 no alelo materno (Xi *et al.*, 2001).

A ausência da preferência alélica do ZNF274 e da modificação H3K9me3 no *SNORD116* pode indicar que o complexo formado por eles desempenha papel importante no *imprinting* da região 15q11-q13 durante o início do desenvolvimento, em células pluripotentes semelhantes às hESs (células da massa interna dos blastocistos). Além disso, os valores de porcentagem do input para ChIP com anticorpo para ZNF274 dentro do *SNORD116* é menor nos neurônios do que nas iPSCs. Análise do ENCODE *database* mostra que o ZNF274 se liga ao *SNORD116* em vários tipos celulares, mas o enriquecimento é maior nas hES do que em outros tipos celulares diferenciados.

Os neurônios murinos, como as mES, são ricos em DNA com 5hmC, sendo que os neurônios são muito mais ricos que mES. Além disso, nas mES a *Tet1* é mais transcrita, enquanto que em neurônio murinos a *Tet3* é mais expressa (Szwagierczak *et al.*, 2010). Embora a expressão de *Tet1* seja menor que *Tet3* em neurônios, Tet1 desempenha papel importante na proliferação de células progenitoras neurais (Santiago *et al.*, 2014). Neste trabalho, quando comparamos a expressão entre SHEDs, iPSCs e neurônios derivados de iPSCs, observamos que *TET1* é altamente expresso nos neurônios e iPSCs, e *TET2* e *TET3* são mais expressos nos neurônios.

Em trabalhos anteriores outras diferenças foram observadas entre células pluripotentes e neurônios em relação à hidroximetilação. A modificação 5hmC é encontrada no corpo gênico de genes ativos em neurônios e mES, mas ocorre em menor escala em mES. Entretanto, no sítio de início de transcrição de genes com baixa expressão, 5hmC pode ocorrer junto com complexos de repressores em mES, mas não em neurônios murinos. Assim, é possível que 5hmC tenha diferentes papéis nos neurônios (Szulwach *et al.*, 2011; Santiago *et al.*, 2014). De qualquer forma, no atual estudo, os valores de porcentagem de 5hmC na região PWS-IC nas iPSCs e nos neurônios não apresentaram diferença estatisticamente significativa e os valores são baixos. Assim, embora ZNF274 e a modificação de histonas H3K9me3 ocorram em ambos os alelos do *SNORD116* nos neurônios, o padrão de metilação e a modificação de histonas H3K9me3 na região do PWS-IC continuam iguais ao encontrado nas iPSCs.

Seria interessante avaliar a função de SETDB1 nos neurônios, mas o *knockdown* nos neurônios pode não ser viável, pois o SETDB1 é essencial

para diferencial neuronal, pois desempenha papel importante na repressão de genes não específicos de neurônios; isso ocorre através da adição de H3K9me3 na região promotora desses genes. Além disso, a ausência de SETDB1 induz a apoptose celular e interfere na diferenciação de células promotoras neurais (Tan *et al.*, 2012).

Outro tipo celular investigado foram as SHEDs. Embora as SHEDs sejam células-tronco, o potencial de diferenciação é reduzido quando comparado às iPSCs. Semelhante ao observado nos neurônios, ZNF274 se liga em ambos os alelos do *SNORD116*. Adicionalmente, a modificação de histonas H3K9me3 está presente nos dois alelos da *SNORD116*.

Estudos com células-tronco da polpa do terceiro molar (DPSCs) indicam que *TET1* são expressas em níveis crescentes até a sexta passagem, depois os níveis de *TET1* decaem e é quando se inicia a senescência celular. Além disso, quando as células se diferenciam em odontoblastos, *TET1* é também expresso. Assim, *TET1* parece desempenhar papel na proliferação e diferenciação celular (Li *et al.*, 2014). Foram avaliadas a expressão de *TET1*, *TET2* e *TET3* nas SHEDs de passagens 4 a 6. Para todos os transcritos a expressão foi baixa quando comparados aos valores encontrados nos neurônios.

Além da expressão de transcritos das proteínas TET, outros genes que atuam na manutenção e estabelecimento de marcas epigenéticas foram avaliados, com *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *UHRF1*. Entre eles, somente o *DNMT3B* apresentou padrão de expressão diferente nas iPSCs em relação às SHEDs e aos neurônios. *DNMT3B* é mais expresso na iPSCs. Nas hES a

expressão de *DNMT3B* também é alta (Yan *et al.*, 2013). Entretanto, a expressão é semelhante nos três tipos celulares para os demais transcritos. Foi descrito anteriormente que *Dnmt3a* e *Dnmt1* apresentam alta expressão nos neurônios e são importantes para a função sináptica (Feng *et al.*, 2010). E já foi demonstrado que *DNMT3A* apresenta alta expressão em hES (Yan *et al.*, 2013). Então, é possível que todos esses transcritos apresentem alta expressão nas iPSCs e nos outros tipos celulares estudados.

Adicionalmente, verificamos que ZNF274 é mais expresso em neurônios do que em iPSCs, mas isso não se correlaciona ao enriquecimento da porcentagem do *input* entre esses dois tipos celulares. Assim, a expressão não está necessariamente ligada com a quantidade de proteína em um loci específico. A busca por possíveis proteínas que interajam com o complexo repressor ZNF274/SETDB1, ou, que sejam impedidas de se ligar ao alelo materno nas iPSCs por causa do complexo repressor não é possível por deduções a partir da expressão desses alvos, sendo que o ideal seria realizar ChIP-Seq ou ChIP-qPCR com todos os candidatos. Mas para muitos deles ainda não existem anticorpos que funcionem bem para ChIP-Seq e, por exemplo, façam parte do *ENCODE database*.

Resumindo, nosso modelo propõe que no início do desenvolvimento, que é estudado pelas iPSCs, a proteína ZNF274 se liga ao DNA em regiões específicas do *SNORD116* no alelo silenciado materno e o TRIM28 se liga ao ZNF274 pelo domínio KRAB. SETDB1 se liga à TRIM28 e possui a atividade enzimática que causa trimetilação da histona H3K9. E essa modificação auxilia na repressão da expressão do *SNORD116* e *SNRPN*. Além disso, a SETDB1 é importante para a manutenção da metilação do DNA no PWS-IC; pois, na

ausência dela, 5mC é convertido em 5hmC. Em células não pluripotentes, SHEDs e neurônios, o complexo já não apresenta a distribuição alelo-específica. É possível que esse complexo seja importante para manutenção do *imprinting* somente no início do desenvolvimento (fig. 29).

Sugerimos que SETDB1 ou histonas modificadas, H3K9me3, inibam a ligação de TET1 ou de outra proteína que possa se ligar ao DNA causando a desmetilação (fig. 30). E é possível que esta proteína que altera o DNA esteja presente ou se ligue a esta região somente em células pluripotentes e não em neurônios e SHEDs. Seria interessante verificar a ligação de TET1 nos sítios de ligação investigados dentro do 15q11-q13; porém, para a realização do ChIP é importante o uso de anticorpo de alta qualidade que funcione bem para essa técnica (normalmente são selecionados anticorpos já listados no ENCODE que foram utilizados para ChIP-seq), mas até o presente momento, este anticorpo não está disponível. Nas SHEDs e neurônios provavelmente outros mecanismos adicionais aos conhecidos atuam no *imprinting* da região 15q11-q13, assim como nas próprias iPSCs. É provável que o mecanismo descrito de repressão de expressão atue em conjunto a outros.

Figura 29: Esquema com os três tipos celulares analisados em relação ao ZNF274 e a modificação de histona H3K9me3. Observamos que nas SHEDs a proteína ZNF274 se liga no grupo 1 dos SNORD116 de forma bialélica e a modificação de histona H3K9me3 também ocorre nos dois alelos, exceto no PWS-IC que ocorre, preferencialmente, no alelo materno. Com a reprogramação celular, as células passaram a expressar marcadores de pluripotência e o alelo paterno do *SNORD116* não está enriquecido de ZNF274 como o alelo materno. Além disso, a modificação de histona H3K9me3 está também enriquecida no alelo materno. Após a indução da diferenciação, o ZNF274 se liga ao *SNORD116* de forma bialélica nos neurônios derivados de iPSCs. A modificação de histona H3K9me3 também ocorre bialelicamente no *SNORD116*, mas não no PWS-IC.

Figura 30: Esquema simplificado da linhagem iPSCs de PWS del 1-7 que apresenta deleção do segmento 15q11-q13 no alelo paterno. No alelo materno da iPSCs PWS del 1-7 o ZNF274 se liga ao grupo 1 do *SNORD116*, e é formado o complexo repressor com TRIM28 e SETDB1. A ZNF274 tem a capacidade de se ligar a regiões específicas do DNA e também atrai a proteína TRIM28 que serve de suporte para proteína SETDB1. A SETDB1 é uma proteína metiltransferase de histonas que pode metilar a H3K9. Mas quando o *knockdown* da *SETDB1* é realizado, ocorre redução do enriquecimento de H3K9me3 e, além disso, na região do PWS-IC algumas citosinas metiladas (5mC) ficam hidroximetiladas (5hmC). Uma das possíveis proteínas que podem atuar da desmetilação é a TET1. Essas modificações epigenéticas causam o aumento da expressão do *SNORD116*, *SNRPN* e *IPW*.

7. Conclusões

- ZNF274 e a modificação de histonas H3K9me3 são alelo-específicas em células pluripotentes, ocorrendo, preferencialmente, no alelo silenciado.

- SETDB1, que é uma proteína metiltransferase de histona e faz parte do complexo repressivo formado a partir de ZNF274, é importante para a manutenção da repressão do *SNRPN*, *SNORD116* e *iPW*.

- Alterações desencadeadas pela ausência de SETDB1 também afetam a metilação de DNA, aumentando a conversão de 5mC para 5hmC.

- O complexo ZNF274/SETDB1 é importante para o *imprinting* da região 15q11-q13 no início desenvolvimento, mas não atua de forma alelo-específica em células não pluripotentes.

Compreender esses processos é importante para ampliar os conhecimentos de mecanismos que influenciam no *imprinting* da região 15q11-q13 e aumentar a possibilidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas para PWS.

8. Referências bibliográficas

Abeliovich A, Doege CA. 2009. Reprogramming therapeutics: iPS cell prospects for neurodegenerative disease. *Neuron*. 61: 337-339

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaud *et al.* 1997. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *UBE3A*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* 17: 75-78

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. 1999. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65: 370-386.

Angelman H. "Puppet" children: a report on three cases. 1965. *Develop Med Child Neurol* 7: 681-688.

Bieth E, Eddiry S, Gaston V, Lorenzini F, Buffet A, Conte Auriol F, Molinas C, Cailley D, Rooryck C, Arveiler B, Cavaillé J, Salles JP, Tauber M. 2014. Highly restricted deletion of the SNORD116 region is implicated in Prader-Willi Syndrome. *Eur J Hum Genet*, doi: 10.1038/ejhg.2014.103

Bird LM. 2014. Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *Appl Clin Genet* 7: 93-104.

Boonen SE, Mackay DJ, Hahnemann JM, Docherty L, Grønskov K, Lehmann A, Larsen LG, Haemers AP, Kockaerts Y, Doms L, Vu DC, Ngoc CT, Nguyen PB, Kordonouri O, Sundberg F, Dayanikli P, Puthi V, Acerini C, Massoud AF, Tümer Z, Temple IK. 2013. Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care* 36(3): 505-12.

Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294 (5551): 2536-9.

Brannan CI, Bartolomei MS. 1999. Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 9(2):164-70.

- Bressler J, Tsai TF, Wu MY, Tsai SF, Ramirez MA, Armstrong D, Beaudet AL. 2001. The *SNRPN* promoter is not required for genomic imprinting of the Prader-Willi/Angelman domain in mice. *Nat Genet.* 28(3): 232-40.
- Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. 1995. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting center on human chromosome 15. *Nat Genet.* 9, 395-400.
- Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B. 1999. A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* 105(6): 665-6.
- Buiting K, Di Donato N, Beygo J, Bens S, Von Der Hagen M, Hackmann K, Horsthemke B. 2014. Clinical phenotypes of *MAGEL2* mutations and deletions. *Orphanet J Rare Dis.* 9:40,
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG. 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet.* 23 (3): 793-809.
- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T. 2004. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics.* 113(3 Pt 1):565-73
- Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. 2012. Prader-Willi syndrome. *Genet Med* 14(1):10-26.
- Castle JC, Armour CD, Löwer M, Haynor D, Biery M, Bouzek H, Chen R, Jackson S, Johnson JM, Rohl CA, Raymond CK. 2010. Digital genome-wide ncRNA expression, including SnoRNAs, across 11 human tissues using polyA-neutral amplification. *PLoS One* 26: 5(7)
- Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M. 2010. Induced pluripotent stem cell models of genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *PNAS* 107(41): 17668-73

Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N, Dawson C, Lucifero D, Frontera M, James K, Dean W, Kelsey G. 2009. Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev* 23(1):105-17

Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Barrasa MI, Cheng AW, Gao Q, Powell BE, Li Z, Xu M, Faull KF, Lyko F, Jaenisch R. 2013. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Cerv Cell* 24(3):310-23

de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Van Haelst MM, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GS, O'Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AI. 2009. A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet.* 18(17):3257-65

Ding F, Li HH, Zhang S, Solomon NM, Camper SA, Cohen P, Francke U. 2008. SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* 3(3):e1709. doi: 10.1371/journal.pone.0001709

DuBose AJ, Johnstone KA, Smith EY, Hallett RA, Resnick JL. 2010. *ATP10A*, a gene adjacent to the PWS/AS gene cluster, is not imprinted in mouse and is insensitive to the PWS-IC. *Neurogenetics.* 11(2):145-51

DuBose AJ, Smith EY, Yang TP, Johnstone KA, Resnick JL. 2011. A new deletion defines the boundaries of the murine Prader-Willi syndrome imprinting center. *Hum Molec Genet.* 20(17): 3461–3466

Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T. 2010. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 18(11):1196-201

El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B. 2001. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* 27(3):341-4

Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G. 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neurosci* 13(4): 423-432

Frietze S, O'Geen H, Blahnik KR, Jin VX, Farnham PJ. 2010. ZNF274 recruits the histone methyltransferase SETDB1 to the 3' ends of ZNF genes. *PLoS One* 5(12):e15082

Galiveti CR, Raabe CA, Konthur Z, Rozhdestvensky TS. 2014. Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader-Willi Syndrome locus. *Sci Rep* 4:6445 doi: 10.1038/srep06445

Germain ND, Pin-Fang C, Plocik AM, Glatt-Deeley H, Brown J, Fink JJ, Bolduc KA, Robinson TW, Levine ES, Reiter LT, Graveley BR, Lalande M, Chamberlain SJ. 2014. Gene expression analysis of human induced pluripotent stem cell-derived neurons carrying copy number variants of chromosome 15q11-q13.1. *Molec Autism* 5(44): doi:10.1186/2040-2392-5-44

Glenn CC, Saitoh S, Jong MT, Filbrandt MM, Surti U, Driscoll DJ, Nicholls DR. 1996. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet* 58(2): 335-46.

Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428

Goldstone AP, Holland AJ, Hauffa BP, Hokken-Koelega AC, Tauber M, speakers contributors at the Second Expert Meeting of the Comprehensive Care of Patients with PWS. 2008. Recommendations for the diagnosis and management of Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11): 4183-4197.

Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, Kim TK, Griffith EC, Waldon Z, Maehr R, Ploegh HL, Chowdhury S, Worley PF, Steen J, Greenberg ME. 2010. The Angelman syndrome protein *UBE3A* regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell* 140: 704-716

Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. 2003. Methylation imprintis of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. Hum Mol Genet 12(22):2873-9

Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, Nunez Y, Walker MF, Murdoch JD, Sanders SJ, Fernandez TV, Ji W, Lifton RP, Vadasz E, Dietrich A, Pradhan D, Song H, Ming GL, Gu X, Haddad G, Marchetto MC, Spitzer N, Passos-Bueno MR, State MW, Muotri AR. 2014. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. Mol Psychiatry doi: 10.1038/mp.2014.141

Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, Xie ZG, Shi L, He X, Jin SG, Iqbal K, Shi YG, Deng Z, Szabó PE, Pfeifer GP, Li J, Xu GL. 2011. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. Nature 477(7366):606-10

Gustin RM, Bichell TJ, Bubser M, Daily J, Filonova I, Mrelashvili D, Deutch AY, Colbran RJ, Weeber EJ, Haas KF. 2010. Tissue-specific variation of *UBE3A* protein expression in rodents and in a mouse model of Angelman syndrome. Neurobiol Dis 39(3): 283-291

Hackett JA, Sengupta R, Zylitz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, Surani MA. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. Science 339(6118):448-52

Hanna CW, Kelsy G. 2014. The specification of imprints in mammals. Heredity (Edinb) 113(2): 176-83.

Hata K, Okano M, Lei H, Li E. 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. Development 129(8): 1983-93.

He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. Science 333(6047):1303-7

Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, Sasaki H. 2008. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 22(12):1607-16

Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. 2008. *Neurobiol. of Disease*. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.11

Holm VA, Cassisy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. 1993. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91, 398-402.

Horsthemke B, Wagstaff J. 2008. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A* 146A(16):2041-52Huang HS, Allen JA, Mabb AM, King IF, Miriyala J, Taylor-Blake B, Sciaky N, Dutton JW Jr, Lee HM, Chen X, Jin J, Bridges AS, Zylka MJ, Roth BL, Philpot BD. 2011. Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of *UBE3A* in neurons. *Nature* 481(7380):185-9

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol*. 13(2):775-84

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466(7310):1129-33

Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333(6047):1300-3

Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD. 1999. The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in Prader-Willi/Angelman regions encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* 3: 533-542

Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. 2000. Structure of the highly conserved *HERC2* gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res.* 10(3): 319-329

Johnstone KA, DuBose AJ, Futtner CR, Elmore MD, Brannan CI, Resnick JL. 2006. A human *imprinting* centre demonstrates conserved acquisition but diverged maintenance of *imprinting* in a mouse model for Angelman syndrome *imprinting* defects. *Hum Mol Genet* 15:3, 393-404

Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429(6994):900-3.

Kaphzan H, Buffington SA, Jung JI, Rasband MN, Klann E. 2011. Alterations in intrinsic membrane properties and the axon initial segment in a mouse model of Angelman syndrome. *J Neurosci* 31(48):17637-48

Khurana E., et al. 2013. Integrative annotation of variants from 1092 humans: application to cancer genomics. *Science* 342 (6154): : 10.1126/science.1235587

King IF, Yandava CN, Mabb AM, Hsiao JS, Huang HS, Pearson BL, Calabrese JM, Starmer J, Parker JS, Magnuson T, Chamberlain SJ, Philpot BD, Zylka MJ. 2013. Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 501(7465): 58-62.

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. 1997. UBE3A/E6AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 15, 70-73

Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Grajam Jr JM, Lalande M, Latt SA. 1989. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32, 285-290.

Kohli RM, Zhang Y. 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502(7472):472-9

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 410(6824):116-20 (2001)

Lalande M, Calcianno MA. 2007. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cell Mol Life Sci* 64:7-9, 947-960

Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 20(3):320-31 (2010)

Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan SB, Crawford JD. 1981. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi Syndrome. *N Engl J Med* 304: 325–32

Lewis MW, Brant JO, Kramer JM, Moss JI, Yang TP, Hansen PJ, Williams RS, Resnick JL. 2014. Angelman syndrome imprinting center encodes a transcriptional promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* Nov 5. pii: 201411261

Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. 2006. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem.* 281(28): 19489-500

Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP. 2004. Timing of establishment of methylation imprints in the mouse. *Genomics* 84 (6): 952-60

Li Q, Rao L, Zhang D, Xu Q. 2014. Expression Features of DNA Methylcytosine Dioxygenase Ten-eleven Translocation 1 in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 40(11): 1791-5
Li X, Leder P. 2007. Identifying genes preferentially expressed in undifferentiated embryonic stem cells. *BMC Cell Biol* 28(8):37.

Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. 2008. A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell.* 15(4):547-57

Ma Y, Jin J, Dong C, Cheng EC, Lin H, Huang Y, Qiu C. 2012. High-efficiency siRNA-based gene knockdown in human embryonic stem cells. *RNA.* 16(12):2564-9

Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud

AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. 2008. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 40(8):949-51

Maksakova IA, Goyal P, Bullwinkel J, Brown JP, Bilenky M, Mager DL, Singh PB, Lorincz MC. H3K9me3-binding proteins are dispensable for SETDB1/H3K9me3-dependent retroviral silencing. *Epigenetics Chromatin*. 4(1):12 (2011)

Magenis RE, Toth-Fejel S, Allen LJ, Black M, Brown MG, Budden S, Cohen R, Friedman JM, Kalousek D, Zonana J, Lacy D, LaFranchi S, Lahr M, Macfarlane J, Williams CPS. 1990. Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am J Med Genet* 35, 333-349.

Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. 2010. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4):527-39

Mardirossian S, Rampon C, Salvart D, Fort P, Sarda N. 2009. Impaired hippocampal plasticity and altered neurogenesis in adult *UBE3A* maternal deficient mouse model for Angelman syndrome. *Exper Neurol*. 220, 341-348

Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM, Mandel-Brem C, Wills ZP, Mardinly AR, Hu L, Greer PL, Bikoff JB, Ho HYH, Soskis MJ, Sahin M. 2010. EphB-mediated degradation of the RhoA GEF ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell*. 143, 442-455

Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu RH. 2012. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics*. 7(1):71-82

Martins-Taylor K1, Hsiao JS, Chen PF, Glatt-Deeley H, De Smith AJ, Blakemore AI, Lalande M, Chamberlain SJ. 2014. Imprinted expression of UBE3A in non-neuronal cells from a Prader-Willi syndrome patient with an atypical deletion. *Hum Mol Genet* 23(9): 2364-73.

Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JAL, Jaffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD. 1992. The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* 326, 599-607.

Matentzoglou K, Scheffner M. 2008. Ubiquitin ligase E6-AP and its role in human disease. *Biochem Soc Trans* 36: 797-801

Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y. 2010. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 464(7290):927-31 (2010)

McGrath J, Solter D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37(1):179-83

Meng L, Person RE, Beaudet AL. 2012. Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet* 21(13): 3001-12.

Mishra A, Jana NR. 2008. Regulation of turnover of tumor suppressor p53 and cell growth by E6-AP, an ubiquitin protein ligase mutated in Angelman mental retardation syndrome. *Cell Mol Life Sci* 65, 656-666

Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC, Goldstone AP, Gold J-A, Kimonis V, Dykens E, Butler MG, Shuster JJ, Driscoll DJ. 2011. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet Part A* 155:1040-1049.

Mohn F, Weber M, Schübeler D, Roloff TC. 2009. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods Mol Biol* 507:55-64.

Nakagaki A, Osanai H, Kishino T. 2014. Imprinting analysis of the mouse chromosome 7C region in DNMT1-null embryos. *Gene* 553(1):63-8

Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. 2012. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486(7403): 415-9

Nicholls RD, Knoll JH, Glatt K, Hersh JH, Brewster TD, Graham JM Jr, Wurster-Hill D, Wharton R, Latt SA. 1989. Restriction fragment length polymorphism within proximal 15q and their use in molecular cytogenetics and the Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 33 (1): 66-77.

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. 1998. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *TIG* 14: 194-200

Ohta T, Gray TA, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD. 1999a. Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 64(2): 397-413.

Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD. 1999b. Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* 64(2): 385-96.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-318

Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R. 2002. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman region control center. *EMBO journal* 21: 5807-5814

Peters J. 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet* 15(8):517-30

Plasschaert RN, Bartolomei MS. 2014. Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. *Development* 41: 1805-1813 doi:10.1242/dev.101428.

Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W. 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463(7284):1101-5.

Powell WT, Coulson RL, Gonzales ML, Crary FK, Wong SS, Adams S, Ach RA, Tsang P, Yamada NA, Yasui DH, Chédin F, LaSalle JM. 2013. R-loop formation at Snord116 mediated topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(34):13938-43.

Powell WT1, Coulson RL, Crary FK, Wong SS, Ach RA, Tsang P, Alice Yamada N, Yasui DH, Lasalle JM. 2013. A Prader-Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. *Hum Mol Genet*. 22(21): 4318-28.

Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, Baglivo I, Pedone PV, Grimaldi G, Riccio A, Trono D. 2011. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 44(3): 361-72

Roloff TC, Nuber UA. 2005. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J Cell Biol* 84: 123-135

Rougeulle C, Cardoso C, Fontés M, Colleaux L, Lalande M. 1998. *Nat Genet* 19(1): 15-16

Runte M., Hüttenhofer A, Groß S, Kiefmann M, Horsthemke, Buiting K. 2001. The IC-*SNURF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum Molec Genet* 10 (23): 2687-2700

Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. 2004. *SNURF-SNRPN* and *UBE3A* transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 114, 553-561

Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL. 2008. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 40(6): 719-721

Saitoh S, Wada T. 2000. Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 66(6):1958-62

Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. 2012. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139(1): 15-31.

Sakashita A, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T. 2014. Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes Cells* 19(8):629-36

Santiago M, Antunes C, Guedes M, Sousa N, Marques CJ. 2014. TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function – How critical are they? *Genomics* 104(5): 334-40

Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B, Peters BA, McElwain MA, Drmanac R, Beaudet AL, Caskey CT, Yang Y. 2013. Truncating mutations of *MAGEL2* cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet.* 45(11): 1405-8

Scheiffele P, Beg AA. 2010. Neuroscience: Angelman syndrome connections. *Nature* 468(7326): 907-908

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-probe amplification. *Nucleic Acid Research* 30 (12): 12-57

Shemer R, Birger Y, Riggs AD, Razin A. 1997. Structure of the imprinted mouse *Snrpn* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19):10267-72

Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J., Walter J, Santos F, Popp C, Thienpont B, Dean W, Reik W. 2012. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* **48** (6): 849-62 doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.001. Epub 2012 Dec 6

Shen M, Eyraas E, Wu J, Khanna A, Josiah S, Rederstorff M, Zhang MQ, Stamm S. 2011. Direct cloning of double-stranded RNAs from RNase protection analysis reveals processing patterns of C/D box snoRNAs and provides evidence for widespread antisense transcript expression. *Nucleic Acids Res.* 39(22):9720-30

Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrews SR, Kelsey G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* 43(8): 811-4.

Smith EY, Futtner CR, Chamberlain SJ, Johnstone KA, Resnick JL. 2011. Transcription is required to establish maternal imprinting at the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome locus. *PLoS Genet* 7(12):e1002422. doi: 10.1371/journal.pgen.1002422

Stelzer Y, Sagi I, Yanuka O, Eiges R, Benvenisty N. 2014. The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in na induced pluripotent stem cell modelo f Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*. 26(6): 551-7.

Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308(5959):548-50

Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng X, He C, Jin P. 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* 14(12):1607-16.

Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H. 2010. Sensitivity enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acid Res* 38(19):e181

Tahiliani M1, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324(5929): 930-5.

Tai HC, Schuman EM. 2010. Preview. Angelman syndrome: finding the lost arc. *Cell* 140(5):608-10

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872

Tan SL, Nishi M, Ohtsuka T, Matsui T, Takemoto K, Kamio-Miura A, Aburatani H, Shinkai Y, Kageyama R. 2012. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the

epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development* 139 (20): 3806-16

Tauber M, Diene G, Molinas C, Hébert M. 2008. Review of 64 cases of death in children with Prader-Willi syndrome (PWS). *Am J Med Genet A* 146 (7): 881-887

Tomizawa S, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. 2011. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development* 138(5):811-20

Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 32(14):4100-8

Valinluck V, Sowers LC. 2007. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67(3):946-50

Van Woerden GMV, Harris KD, Hojjati MR, Gustin RM, Qiu S, de Avila Freire R, Jiang YH, Elgersma Y, Weeber EJ. 2007. Rescue of neurological deficits in a mouse model for angelman syndrome by reduction of α CaMKII inhibitory phosphorylation. *Nature Neurosci.* 10(3): 280-282

Varela MC, Kok F, Otto PA, Koiffmann CP. 2004. Phenotypic variability in Angelman syndrome: comparison among different deletion classes and between deletion and UPD subjects. *Eur J Hum Genet* 12: 987-992.

Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. 2005. Impact of molecular mechanism, including deletion size, in Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet*, 67:47-52

Vitali P, Royo H, Marty V, Bortolin-Cavaillé ML, Cavaillé J. 2010. Long nuclear-retained non-coding RNAs and allele-specific higher-order chromatin organization at imprinted snoRNA gene arrays. *J Cell Sci* 123(1):70-83

Vu TH, Hoffmann AR. 1997. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet.* 17(1): 12-13

Xin Z, Allis CD, Wagstaff J. 2001. Parent-Specific Complementary Patterns of Histone H3 Lysine 9 and H3 Lysine 4 Methylation at the Prader-Willi Syndrome Imprinting Center. *Am J Hum Genet* 69(6): 1389–1394

Xu Y, Wu F, Tan L, Kong L, Xiong L, Deng J, Barbera AJ, Zheng L, Zhang H, Huang S, Min J, Nicholson T, Chen T, Xu G, Shi Y, Zhang K, Shi YG. 2011. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell.* 42(4):451-64

Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, Yang L, Zhang J, Li G, Ci W, Li W, Zhou Q, Aluru N, Tang F, He C, Huang X, Liu J. 2014. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* 157 (4): 979-91.

Watt FM, Hogan BL. 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287(5457):1427-30

Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, Christian JM, Mirnikjoo B, Silva A, Beaudet AL, Sweatt JD. 2003. Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *J Neurosci* 23(7): 2634-2644

Williams CA, Beaudet AL, Smith JC, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, Magenis RE, Moncla A, Schinzel AA, Summers JA, Wagstaff J. 2006. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* 140A, 413-418.

Williams CA. The behavioral phenotype of the Angelman syndrome. 2010. *Am J Med Gen.* 154C, 432-427

Wu H, Zhang Y. 2011. Tet1 and 5-hydroxymethylation: wide view in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle* 10(15):2428-36

Wu M-Y, Jiang M, Zhai X, Beaudet AL, Wu R-C. 2012. An unexpected function of the Prader-Willi syndrome imprinting center in maternal imprinting in mice. *PLOS One* 7(4): e34348

Yamaguchi S, Shen L, Liu Y, Sendler D, Zhang Y. 2013. Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. *Nature* 504(7480):460-4

Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T. 2003. *Hum Molec Genet* 12(8): 837-847

Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wun J, Li R, Liu P, Lian Y, Zheng X, Yan J, Huang J, Li M, Wu X, Wen L, Lao K, Li R, Qiao J, Tang F. 2013. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural Mol Bio* 20: 1131–1139

Yang T, Adamson TE, Resnick JL, Leff S, Wevrick R, Francke U, Jenkins NA, Copeland NG, Brannan CI. 1998. A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-center mutations. *Nat Genet* 19 (1), 25-31

Yang J1, Cai J, Zhang Y, Wang X, Li W, Xu J, Li F, Guo X, Deng K, Zhong M, Chen Y, Lai L, Pei D, Esteban MA. 2010. Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader-Willi syndrome. *J Biol Chem* 285(51): 40303-11.

Yildirim O, Li R, Hung JH, Chen PB, Dong X, Ee LS, Weng Z, Rando OJ, Fazzio TG. 2011. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell* 147(7):1498-510

Yin QF, Yang L, Zhang Y, Xiang JF, Wu YW, Carmichael GG, Chen LL. 2012. Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Mol Cel* 48(2):219-30

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920

Zuo X, Sheng J, Lau HT, McDonald CM, Andrade M, Cullen DE, Bell FT, Iacovino M, Kyba M, Xu G, Li X. 2012. Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain. *J Biol Chem* 287(3): 2107-18

9. Anexos

9.1. Anexo 1

Anexo1: Análise de MLPA da linhagem AS3-3 iPSCs (em azul) em relação aos controles (em vermelho). A: MLPA com o Kit P064 que contem 5 sondas na região 15q11-q13 e confirma que a linhagem apresenta deleção do segmento 15q11-q13, 6 setas vermelhas indicam a deleção. B e C: MLPAs com os Kits P036 e P070, respectivamente, mostram somente deleções na região 15q11.2 indicadas pelas setas nas AS3-3 iPSCs. O restante das sondas obtiveram valores semelhantes aos controles, indicando estabilidade cromossômica.

9.2. Anexo 2

Anexo2: Análise de MLPA da linhagem F7908-1 iPSCs (em azul) em relação aos controles da corrida (em vermelho). A e B: MLPAs com os Kits P036 e P070, respectivamente, indicam que nenhuma sonda está deletada ou duplicada.