RAQUEL STABELLINI

ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES *XIST* E *DNMT1*
NA MANUTENÇÃO DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO
DO CROMOSSOMO X HUMANO ATRAVÉS DO
SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNAi.

SÃO PAULO

2008

RAQUEL STABELLINI

ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES *XIST* E *DNMT1*
NA MANUTENÇÃO DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO
DO CROMOSSOMO X HUMANO ATRAVÉS DO
SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNAi.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia - Genética.

Orientadora: Dra Lygia da Veiga
Pereira Carramaschi

SÃO PAULO

2008

Stabellini, Raquel

Análise funcional dos genes *XIST* e *DNMT1* na manutenção do processo de inativação do cromossomo X humano através do silenciamento gênico por RNAi.

143 páginas

Tese de Doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Inativação do cromossomo X 2. *XIST* 3. *DNMT1* I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Lygia pela oportunidade de ter aprendido tanto dentro de seu laboratório. Sua orientação cheia de energia e entusiasmo sempre foi contagiante na comemoração de bons resultados e revigorante nas dificuldades. Seu comprometimento também com a divulgação da ciência é impressionante. Sem dúvida será sempre um querido exemplo a ser seguido. Obrigada!

Agradeço a todos que tanto contribuíram para a minha aprendizagem, sem os quais teria sido, se não impossível, ao menos muito mais difícil. Agradeço especialmente à Dra. Marina Soukoian, pela paciência e dedicação inesgotáveis ao compartilhar seus imensos conhecimentos, mesmo com os alunos mais inexperientes como eu era. Agradeço também à Dra. Luciana Vasques, por ter me ensinado toda a base do que sei da prática da biologia molecular, por ter me introduzido no mundo da inativação do X, e pelas discussões acadêmicas que temos até hoje.

Agradeço aos amigos queridos do laboratório, passados e presentes, por tornaram o dia-a-dia sempre mais divertido, além, é claro, de sempre contribuírem com idéias e a “mão na massa” sem hesitação. Obrigada a todos! Agradeço particularmente à Ana Maria, Joana e Luciana, por tanto compartilharmos e por terem se tornado grandes amigas nesse nosso caminho. Obrigada meus amores!

Agradeço às Dras Ângela Morgante e Regina Mingroni, pelas quais sinto profunda admiração, e aos seus estimados alunos por compartilharem seus laboratórios, suas sempre boas idéias e suas horas descontraídas de almoço. Agradeço especialmente às queridas Rafa, Lilian, Fátima e Mara por oferecerem ajuda e carinho sempre que esses eram necessários.

Agradeço ao Dr. Bryan Strauss e sua aluna Paula por serem tão solícitos na colaboração para produção viral.

Agradeço a Dra. Miriam Jasiulionis e sua equipe pelas discussões sobre epigenética e pela colaboração na citometria de fluxo.

Agradeço à Dra. Anamaria Camargo e seu aluno Fabrício pelas dicas que me ajudaram tanto a entrar no mundo do bissulfito.

Agradeço à Dra. Luciana Haddad por compartilhar sua admirável experiência e seu protocolo de FISH de RNA.

Agradeço à Dra. Marie-Anne Van Sluys pela prontidão em disponibilizar seu equipamento de PCR em tempo real.

Agradeço a todos os outros professores e suas equipes, que nunca se negaram a auxiliar, especialmente aos Drs. Luis Netto e Eduardo Gorab, e ao Marcio Yamamoto pela ajuda técnica nos seqüenciamentos.

Agradeço às minhas queridas amigas Roberta, Ana Lucia e Marisa, por estarem sempre presentes, participando de cada passo da minha vida. Amo cada momento com vocês.

Agradeço à minha família querida por ser a minha família, especialmente Vó, Vô, Vêio, Véia, Rê, Pedrinho e Estela, que torcem tanto por mim.

Agradeço ao Nil, meu amorzinho, por seu carinho, sua ajuda e por sempre me dar força nesses anos todos.

Aos meus pais e à Feca, agradeço por seu carinho e apoio incondicionais e por sempre acreditarem em mim. Vocês são meus motivos de orgulho pelas pessoas que são e à vocês dedico essa tese. Fico feliz por deixar vocês felizes.

ÍNDICE

Capítulo I – Introdução ao estudo da Inativação do Cromossomo X	1
A. Introdução Geral	2
B. Objetivos	21
C. Materiais e Métodos	22
1. Cultura de células	22
2. Outros procedimentos	26
Capítulo II – Caracterização do sistema celular de fibroblastos humanos quanto aos SNPs de regiões expressas de genes ligados ao cromossomo X	40
Capítulo III – Análise dos efeitos do silenciamento do gene <i>XIST</i> em fibroblastos humanos e na linhagem tumoral 293	59
Capítulo IV – Análise dos efeitos do silenciamento do gene <i>DNMT1</i> em fibroblastos humanos	85
Capítulo V – Discussão Geral e Conclusões	116
Resumo e Abstract	119
Referências Bibliográficas	124
Anexos	143

Figura 1 – Representação esquemática dos três mecanismos de compensação de dosagem encontrados em mamíferos, drosófilas e <i>C. elegans</i> .	3
Figura 2 – Dinâmica dos eventos da ICX no desenvolvimento de camundongos.	7
Figura 3 – Mapa dos principais <i>loci</i> do centro de inativação do X de camundongos.	11
Figura 4 – Ação dos genes <i>Tsix</i> e <i>Xist</i> na iniciação da ICX durante a diferenciação de células ES de camundongos.	12
Figura 5 – Esquema representativo da estrutura de <i>Xist</i> e <i>Tsix</i> murinos e das versões humanas <i>XIST</i> e <i>TSIX</i> .	14
Figura 6 – Esquema e sequência dos oligonucleotídeos utilizados.	28
Figura 7 - Ideograma representativo do cromossomo X humano mostrando a localização dos genes analisados neste trabalho.	50
Figura 8 – Expressão mono-alélica dos genes <i>MAOA</i> e <i>GYG2</i> na linhagem de fibroblastos GM135-Tel G9.	52
Figura 9 – Análise de sequenciamento após tratamento de bissulfito da região 5' dos genes <i>MAOA</i> e <i>GYG2</i> .	54
Figura 10 – Desenho esquemático do vetor retroviral de interferência por RNA pRETRO-SUPER.	67
Figura 11 – Amplificação do vetor sem inserto pRETRO-SUPER e de alguns clones celulares positivos.	69
Figura 12 – Compilação dos resultados de PCR em tempo real para	70

quantificação relativa de *XIST* em diferentes colônias de células 293
transfectadas com vetores para inativação desse gene.

Figura 13 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para 72
quantificação relativa de *XIST* em diferentes pools de fibroblastos humanos
transduzidos com pRS-*XIST*502.

Figura 14 – FISH de RNA utilizando sondas contra *XIST*. 77

Figura 15 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para 80
quantificação relativa de *XIST* nos clones celulares da sub-linhagem clonal
293 F6.

Figura 16 - Avaliação do número de sinais de *XIST* por FISH de RNA em 82
células 293 F6 e no clone X- 23.

Figura 17 – FISH de RNA das células 293 F6 utilizando como sonda um 82
fragmento do cDNA de *XIST*

Figura 18 – Representação da sequência da região 5' e início do primeiro 95
exon do gene *XIST*.

Figura 19 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para 97
quantificação relativa de *DNMT1* em diferentes colônias de células 293
transfectadas com vetores para inativação desse gene.

Figura 20 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para 98
quantificação relativa de *DNMT1* nos diferentes pools de fibroblastos
humanos transduzidos com pRS-*DNMT1*-515.

Figura 21 – Análise por Western blot de extratos celulares dos pools de 99
fibroblastos com *DNMT1* reprimida.

Figura 22 – Quantificação relativa de outras DNA metil-transferases nos 100
fibroblastos humanos da linhagem D3B.

Figura 23 – Estado de metilação dos fibroblastos humanos com diferentes 102
níveis de silenciamento de *DNMT1*.

Figura 24 – Padrão de digestão dos pools celulares com a enzima de 104
restrição sensível à metilação *Hpa* II.

Figura 25 – Análise de seqüenciamento após tratamento de bissulfito da 107
região 5' do gene *MAOA* em fibroblastos humanos controle e deficientes em
DNMT1.

Figura 26 – Padrão de metilação do fragmento compreendendo a região 5' 109
do gene *XIST*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genótipo e expressão alelo-específica das linhagens de fibroblastos humanos. 53

Tabela 2 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel e em sua sub-linhagem X3A. 75

Tabela 3 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem 293 F6 e em sua sub-linhagem X- 23. 81

Tabela 4 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel e em sua sub-linhagem D3B. 105

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO AO ESTUDO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

MECANISMOS DE COMPENSAÇÃO DE DOSAGEM

A reprodução sexuada é a principal forma de reprodução dos eucariontes. Seja pela recombinação genética durante a meiose ou pela união de dois gametas haplóides para restaurar a diploidia e gerar um organismo novo e diferente em cada fertilização, esse mecanismo é o grande responsável pela diversidade encontrada nos diferentes grupos de plantas e animais. A evolução de um par de cromossomos sexuais derivados de autossomos é freqüentemente associada a esse tipo de reprodução. Os sexos, então, podem ser distinguidos pela presença de um ou dois cromossomos X, como no caso de *Caenorhabditis elegans*, ou pela presença ou ausência de um cromossomo Y, como em drosófilas e mamíferos. Diferentes mecanismos de compensação de dosagem evoluíram para regular a expressão dos cromossomos sexuais e estabelecer o equilíbrio quanto aos produtos gênicos entre os sexos. As diferentes estratégias conhecidas envolvem modulação da estrutura da cromatina para controlar os níveis transcricionais de um ou do par de cromossomos X (Fig. 1).

	Mamíferos	Drosófilas	<i>C. elegans</i>
	Inativam um X ♀	Dobram a expressão do X ♂	Diminuem a expressão dos X _s ♀
X			
X			
X			
Y			

Figura 1 – Representação esquemática dos três mecanismos de compensação de dosagem encontrados em mamíferos, drosófilas e *C. elegans* (adaptado de Lewin, 1997).

Em *C. elegans*, os indivíduos hermafroditas reprimem parcialmente a expressão de seus dois cromossomos X para igualar à quantidade de produtos gênicos gerados a partir do único X presente nos machos XO (revisto por Straub e Becker, 2007). Em *Drosophila melanogaster*, por outro lado, para compensar a ausência de um dos alelos, o cromossomo X dos machos XY apresenta um aumento de expressão significativa em relação à expressão de cada um dos X das fêmeas XX (revisto por Straub e Becker, 2007; Deng e Meller, 2006). Nesses dois casos, embora de maneiras opostas, os dois cromossomos X do sexo homogamético são tratados da mesma maneira pela maquinaria do complexo regulatório de compensação de dosagem. Em mamíferos, por outro lado, cada cromossomo X é tratado diferencialmente nas células somáticas femininas. O desequilíbrio da dosagem gênica entre machos XY e fêmeas XX é compensado pela inativação transcricional de um dos cromossomos X femininos.

Em humanos, assim como na maioria dos mamíferos, os cromossomos sexuais são bastante heteromórficos. A maioria dos traços que demonstram a origem comum desses cromossomos a partir de um par de autossomos foi degenerada por diferentes rearranjos, inversões e deleções ao longo da evolução. Como consequência à barreira para a recombinação que se estabeleceu, ocorreu uma erosão do cromossomo Y, que atualmente é pequeno (aproximadamente 60 Mb), possui um grande bloco heterocromático de tamanho variável e poucos genes (~100), principalmente envolvidos com a determinação e desenvolvimento sexual masculino (Skaletsky *et al.*, 2003). Já o cromossomo X é quase três vezes maior que o Y, com aproximadamente 155 Mb, e sua porção eucromática é seis vezes maior que a do Y. O X possui 1098 genes que codificam proteínas de funções variadas, dentre os quais somente 54 possuem homólogos funcionais no Y; destes últimos, 29 se encontram nas regiões de recombinação desses cromossomos (Ross *et al.*, 2005). Nessas pequenas zonas de homologia, as chamadas regiões pseudo-autossômicas (ou PARs, do inglês *pseudoautosomal regions*) ocorrem eventos de recombinação durante a meiose masculina, mediando a segregação dessa dupla de cromossomos. A PAR1 se encontra na extremidade do braço curto do X e do Y, com aproximadamente 2,7 Mb, e na outra extremidade está a PAR2, com apenas 330 Kb.

BREVE HISTÓRICO DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X (ICX)

Em 1949, Barr e Bertram descreveram que a presença ou ausência de um “satélite” nuclear densamente corado em neurônios permitia determinar o sexo de gatos. A partir de então, a análise dessa estrutura, que passou a ser referida

como cromatina sexual ou corpúsculo de Barr, se tornou amplamente utilizada na sexagem de mamíferos em geral.

Uma década depois, Ohno e colaboradores demonstraram que a cromatina sexual era formada pela porção heterocromática de um só cromossomo X e, portanto, que os dois cromossomos X de células diplóides de fêmeas de rato e camundongo eram morfologicamente diferentes: um deles aparentava e se comportava como um autossomo, enquanto o outro se encontrava muito compactado e corava fortemente (Ohno *et al.*, 1959; Ohno e Hauschka, 1960).

Duas outras evidências encontradas em camundongos foram de extrema importância para a descoberta da ICX: o fenótipo normal encontrado em fêmeas X0, mostrando que um único X é suficiente para o desenvolvimento normal feminino; e o fenótipo mosaico de fêmeas heterozigotas para genes ligados ao X que afetam cor de pelagem. Baseada em todos esses resultados prévios, Mary F. Lyon (1961) propôs a hipótese de que em uma célula diplóide feminina todos os cromossomos X exceto um são inativados logo no início do desenvolvimento embrionário, de forma aleatória em relação à sua origem parental.

Hoje se sabe que a ICX pode ocorrer de duas formas: aleatória ou desviada. Na inativação aleatória o cromossomo X que será inativado é escolhido ao acaso em cada célula, como se observa nas células somáticas das fêmeas dos mamíferos eutérios, de forma que o organismo como um todo é um mosaico dos produtos gênicos ligados ao X.

Já na ICX desviada ou *imprintada* (do inglês *imprinted*), a escolha do X a ser inativado depende de sua origem parental. Este tipo de ICX foi primeiramente identificado em mamíferos metatérios (marsupiais), onde o X paterno (Xp) é

invariavelmente reprimido (Sharman, 1971). Mais tarde observou-se que existe ICX de forma *imprintada* também em alguns eutérios, especificamente nos tecidos extra-embrionários de ratos, camundongos e bovinos, onde Xp é sempre inativado (Wake *et al.*, 1976; Takagi e Sasaki, 1975; Xue *et al.*, 2002). Os resultados acerca do padrão de inativação dos tecidos extra-embrionários humanos ainda são conflitantes (revisto em Zeng e Yankowitz, 2003).

ETAPAS DA INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

O processo de ICX inclui modificações epigenéticas que caracterizam fases de iniciação da inativação, incluindo o pareamento, contagem e escolha dos cromossomos X das células, propagação do sinal de inativação e manutenção do silenciamento (revisto por Heard e Distèche, 2006). Pelo mecanismo de contagem é determinada a razão X/autossomo para garantir que apenas um X permaneça ativo por núcleo diplóide, o que é seguido por um passo de escolha, onde os cromossomos X são selecionados para permanecer ativo ou ser inativado. Essas duas etapas parecem ocorrer concomitantemente e depender do pareamento entre os dois cromossomos X nas células femininas. Após o início e propagação do sinal de inativação, o Xi se torna transcricionalmente silenciado, e este estado inativado é mantido de forma clonal nas mitoses devido a modificações epigenéticas que alteram a estrutura da cromatina do Xi e caracterizam a fase de manutenção da ICX.

Embora se acreditasse que a ICX ocorresse concomitante à diferenciação celular na massa celular interna dos blastocistos, há alguns anos diferentes grupos a

detectaram em estágios embrionários muito precoces em camundongo (Okamoto *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2004; revisto por Okamoto e Heard, 2006). Já no embrião de quatro células foram encontradas modificações epigenéticas demonstrando inativação do Xp. Essa inativação *imprimada* é mantida até o estágio de blastocisto, onde as células do trofotoderma e da endoderme primitiva mantêm o estado inativo do Xp, mas as células da massa celular interna reativam esse cromossomo, apagando as marcas epigenéticas impostas na XCI *imprimada*. Em seguida, ocorre uma segunda onda de inativação, desta vez aleatória, nas células do epiblasto, que darão origem ao embrião propriamente dito (Fig. 2). Devido às implicações éticas relacionadas à geração de embriões humanos somente com a finalidade de utilizá-los para pesquisa, estudos similares não foram ainda relatados em humanos.

Figura 2 – Dinâmica dos eventos da ICX no desenvolvimento de camundongos. PE, endoderme primitiva; TE, trofotoderme; ICM, massa celular interna (modificado de Pereira e Stabellini, 2005).

O CENTRO DE INATIVAÇÃO DO X (XIC)

Estudos citogenéticos clássicos em células apresentando anomalias cromossômicas envolvendo o X já indicavam a presença de um *locus* necessário para a correta inativação desse cromossomo (Russell e Montgomery, 1965; Therman *et al.*, 1974; Daly *et al.* 1977; Zabel *et al.*, 1978). Este *locus*, denominado centro de inativação do X (XIC/Xic, do inglês *X Inactivation Center*), foi localizado em Xq13 em humanos (Brown *et al.*, 1991) e na banda XD em camundongo (Rastan e Robertson, 1985). Esse centro de inativação é indispensável para a correta ICX, já que segmentos do X sem essa região devido a deleções ou translocações permanecem ativos.

Na caracterização das seqüências que compõem Xic e suas funções, foi determinante o uso de células tronco embrionárias (ES) de camundongos, células pluripotentes derivadas da massa celular interna de blastocistos (revisto por Heard e Disteche, 2006). A grande vantagem de se utilizar essas células é que quando indiferenciadas elas apresentam características pré-ICX, e ao se diferenciarem *in vitro* elas compõem um modelo para o estudo da iniciação da ICX. Além disso, o uso de transgenia também foi importante na tentativa de delimitar a região suficiente para desempenhar a função de Xic (revisto em Chureau *et al.*, 2002).

O gene *XIST/Xist* (do inglês *X Inactive Specific Transcript*) foi identificado como principal constituinte do XIC baseado na sua posição determinada por mapeamento genético e no seu padrão peculiar de expressão que, como o próprio nome diz, ocorre exclusivamente a partir do cromossomo X inativo (Xi)

(Brown *et al.*, 1991B; Brockdorff *et al.*, 1991). Condizente com esse padrão de expressão, a extremidade 5' desse gene encontra-se metilada no cromossomo X ativo (Xa) e desmetilada no Xi (Hendrich *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1994).

A versão humana do gene transcreve um RNA de aproximadamente 19 Kb (Brown *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 2000), e a murina de 17 Kb (Brockdorff *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 1999). Ambos não possuem quadro de leitura aberto significativo e não são traduzidos, e apresentam localização nuclear, em posição indistinguível do Xi.

O início da ICX coincide com o aumento da expressão de *XIST/Xist* a altos níveis no X escolhido para ser o inativado, e com a sua repressão no futuro X ativo (Xa). Isso implica numa estreita relação entre a iniciação do silenciamento e o acúmulo desse RNA no Xi. De fato, múltiplas cópias do RNA de *XIST* se ligam ao longo desse cromossomo X (Brown *et al.*, 1992; Clemson *et al.*, 1996) e desencadeiam uma série de modificações epigenéticas que agem em conjunto para deixar sua cromatina muito compactada e num estado de inatividade transcricional. A ligação do RNA de *XIST/Xist* e a propagação desse sinal de inativação ocorrem bidirecionalmente a partir do *XIC/Xic*. Além disso, o papel imprescindível de *XIST/Xist* na ICX foi demonstrado já que deleções nesse gene levaram a falhas nesse processo, e camundongos nocautes morrem próximo ao estágio de gastrulação (Marahrens *et al.*, 1997; Penny *et al.*, 1996).

Quando fragmentos de autossomos são inseridos no cromossomo X por translocação, o sinal de inativação pode se disseminar por longas distâncias na porção autossômica, mas nunca tão longe nem de maneira tão eficiente como

ocorre no próprio X (revisto em Bailey *et al.*, 2000). Por outro lado, quando o *Xist* é introduzido como um transgene em um autossomo, seu RNA também cobre esse cromossomo, embora de maneira pouco efetiva (Lee e Jaenisch, 1997). Ambos os resultados estão de acordo com a hipótese de que o sinal para propagação da inativação não é exclusivo do X, e pode ser apenas organizado diferentemente ou ser mais freqüente nesse cromossomo.

Ainda que se conheçam quais regiões do RNA de *Xist* são importantes para sua associação com o X e para desencadear o silenciamento da ICX recrutando os modificadores de cromatina (Wutz *et al.*, 2002; revisto em Wutz, 2007), não se sabe quais seqüências cromossômicas garantem essa associação. Nesse sentido, em 1998 Lyon sugeriu que os elementos repetitivos LINE-1 (do inglês *Long Interspersed Elements*) agiriam como pontos de ancoragem e propagação deste RNA ao longo do X. De fato, quase um terço do cromossomo X é coberto por esses elementos (28,87%), enquanto a média do genoma humano é significativamente menor (16,89%) (Ross *et al.*, 2005; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Nos mamíferos placentários, além do *Xist* o *Xic* também contém outros *loci* importantes para as etapas iniciais da ICX (Fig. 3).

Figura 3 – Mapa dos principais *loci* do centro de inativação do X de camundongos. O gene *Xist*, o RNA antisentido *Tsix*, *Xite*, o sítio de ligação de CTCF em DXPas34, e as regiões implicadas no pareamento do Xic, escolha e contagem estão indicados (modificado de Ng *et al.*, 2007; Heard e Disteche, 2006; Xu *et al.*, 2007).

O segundo mais bem estudado *locus* de Xic é o gene *Tsix*, que foi identificado em camundongos como um regulador da ação de *Xist* (Lee *et al.*, 1999). Seu nome foi escolhido baseado na sua posição característica na fita complementar, antisentido (*antisense*) em relação ao *Xist* (Fig. 3). *Tsix* inibe a expressão de *Xist* do alelo materno nas células do tecido extra-embrionário (Lee, 2000), assim como a expressão desse gene no futuro Xa das células ES em diferenciação (Lee *et al.*, 1999; Lee e Lu, 1999). Ao inibir o acúmulo do RNA de *Xist*, *Tsix* bloqueia a cascata de eventos que levam à inativação transcricional.

Embora diferentes modelos já tenham sido propostos para a ação desse gene, o mais aceito atualmente é que a transcrição de *Tsix* na orientação contrária sobre a região correspondente ao promotor de *Xist* leva a modificações na estrutura da cromatina dessa área, resultando no silenciamento de *Xist* (Ohhata *et al.*, 2008). Em última instância, os diferentes balanços de expressão de *Xist* e *Tsix* nos dois

X das células femininas é que resultam nos estados ativo/silenciado desses cromossomos (Fig. 4).

Figura 4 – Ação dos genes *Tsix* e *Xist* na iniciação da ICX durante a diferenciação de células ES de camundongos. No estágio pré-diferenciação (A), *Xist* é transcrito num nível baixo a partir dos dois cromossomos X ativos devido ao controle exercido pela transcrição de *Tsix*. Com a indução da diferenciação, as células entram na via da ICX (B): a expressão de *Tsix* é diminuída e ele é desligado no futuro X_i , o que se acredita ser um pré-requisito para o acúmulo de *Xist* em *cis*; no futuro X_a , a expressão de *Tsix* persiste até que *Xist* seja desligado por outras modificações epigenéticas que alteram a estrutura da cromatina de seu promotor. O acúmulo de *Xist* ao longo do X_i desencadeia as outras modificações epigenéticas que resultam no estado silenciado desse cromossomo (C). Quando *Xist* é desligado no X_a , a expressão de *Tsix* também cessa. Já no X_i , também não há mais expressão de *Tsix*, mas *Xist* continua sendo expresso ubiqüamente nas células somáticas femininas. (Modificado de Morey e Bickmore, 2006.)

Tsix possui importante papel na contagem e escolha do X a ser inativado, o que foi demonstrado pela observação que mutações nesse gene levaram à inativação do único X de embriões masculinos e dos dois X de embriões femininos de

camundongos (Lee, 2000). Além disso, diferentes alterações na sequência ou padrão de expressão desse gene resultaram em desvios extremos quanto à escolha na inativação (revisto em Clerc e Avner, 2006).

A versão humana do gene, *TSIX*, não compartilha a mesma função que seu homólogo murino (Migeon *et al*, 2001; Migeon *et al*, 2002). *TSIX* é apenas parcialmente complementar a *XIST*, não cobre o promotor deste último, e possui uma deleção da ilha CpG e da região correspondente aos primeiros exons murinos, essenciais para sua função (Fig. 5) (Lee e Lu, 1999; Migeon *et al*, 2001; Lee, 2002). *TSIX* não é capaz de reprimir *XIST*, e surpreendentemente é expresso somente a partir do Xi durante o desenvolvimento embrionário humano (Migeon *et al.*, 2002). Apesar desses relatos da transcrição desse gene, mesmo com o seqüenciamento do cromossomo X humano, *TSIX* ainda não foi anotado já que não há seqüências expressas correspondentes a ele disponíveis nos bancos de dados públicos (Ross *et al.*, 2005). De fato, não há evidências em nenhum trabalho até hoje que indique alguma regulação de *XIST* por *TSIX*, o que corrobora a idéia que *TSIX* seja um remanescente de *Tsix* cujas funções se perderam (Migeon *et al.*, 2002). Em humanos, então, ainda não se sabe quem regula a expressão de *XIST*.

Figura 5 – Esquema representativo da estrutura de *Xist* e *Tsix* murinos (painel superior), e das versões humanas *XIST* e *TSIX* (painel inferior), onde se pode notar a diferente sobreposição desses genes nas duas espécies. Os retângulos em cinza claro representam os exons de *XIST/Xist*, em pretos, os de *TSIX/Tsix*. As setas indicam a direção e o tamanho dos transcritos. A ilha CpG dos genes, quando presente, também são indicadas (adaptado de Vasques *et al.*, 2002).

INATIVAÇÃO E ESCAPE

Durante a iniciação da ICX, uma vez que o futuro Xi é escolhido, a inativação é iniciada com a propagação do sinal de inativação em *cis* ao longo de todo o cromossomo X nas duas direções a partir do XIC (Brown *et al.*, 1991A). A disseminação do sinal de ICX promove o silenciamento dos genes localizados neste cromossomo, excetuando algumas regiões que escapam da inativação (revisto por Vasques *et al.*, 2002; Carrel e Willard, 2005; Ross *et al.*, 2005).

No cromossomo X humano, aproximadamente 15% dos genes sempre escapam à inativação, e pelo menos outros 10% exibem inativação variável, sendo

expressos em alguns, mas não em todos os X inativos (Carrel e Willard, 2005). Esses últimos genes, então, indicam heterogeneidade entre as mulheres e devem possuir alguma relevância médica.

Em camundongos, por outro lado, a porcentagem de genes que escapam à ICX é bem menor (Disteche, 1999; Tsuchiya e Willard, 2000), o que explica a normalidade do fenótipo de animais X0 comparado às inúmeras características apresentadas pelas mulheres X0, portadoras da síndrome de Turner. Os produtos dos genes que escapam à ICX, assim, devem possuir funções sensíveis à dose, já que sua ausência em dose dupla é o que compõem, a princípio, as diferenças das mulheres normais e X0. O mesmo raciocínio vale para os homens com cromossomos X supranumerários da Síndrome de Klinefelter, onde o excesso de produtos dos genes que escapam à ICX deve ter papel nos fenótipos encontrados.

MANUTENÇÃO DO SILENCIAMENTO DO Xi

Uma vez que um cromossomo X é inativado em uma célula, todas as suas descendentes terão o mesmo Xi. Faz-se necessária, então, a existência de mecanismos de manutenção desse estado silenciado, o que se dá por meio de modificações epigenéticas.

Alguns fatores epigenéticos caracterizam o cromossomo Xi (revisto em Heard e Disteche, 2006; e Ng *et al.*, 2007), além da expressão de *XIST/Xist*. As primeiras mudanças observadas após a ligação desse RNA em *cis* referem-se à exclusão de marcas de eucromatina das histonas: H3 e H4 são desacetiladas, e a dimetilação da lisina 4 das H3 (H3K4m2) é perdida. O recrutamento transiente de

membros de complexos repressivos polycomb (PcG) é observado, e outras marcas epigenéticas de inatividade transcricional se tornam cada vez mais freqüentes, tais como H3K27m3, H3K9m2, H2A ubiquitinada, H4K20m1. A replicação do cromossomo Xi passa a ocorrer tardiamente na fase S. A associação da variante de histona macroH2A e a metilação da região 5' dos genes do X são considerados os eventos mais tardios do processo de inativação. Em conjunto, todas essas modificações alteram a estrutura da cromatina do X, que se torna bastante compactada, e como resultado final, o Xi se encontra heterocromático e inativado transcionalmente.

Como já citado, é particular do cromossomo Xi a expressão do gene *XIST/Xist*. Seu papel é indispensável na iniciação da ICX, e levando-se em conta sua expressão constitutiva durante toda a vida celular e a sua contínua associação com o cromossomo Xi, seria esperado que esse gene tivesse um papel também no processo de manutenção da inativação. Os resultados até hoje obtidos propiciam incerteza acerca dessa função.

Em humanos, o estado silenciado do Xi não foi perturbado apesar da deficiência de XIC em híbridos somáticos camundongo/humano (Brown e Willard, 1994) e células de leucemia (Rack *et al.*, 1994). Ambos os resultados indicaram que essa região, e conseqüentemente *XIST*, não é necessária para a manutenção da ICX.

Já em camundongos, deleções em *Xist* levaram à perda da associação preferencial de histonas macroH2A1.2 no Xi (Csankovszki *et al.*, 1999). Seu RNA parece agir em conjunto à metilação do DNA e à desacetilação das histonas no

silenciamento e manutenção da ICX, assegurando a estabilidade da repressão dos genes no Xi (Csankovszki *et al.*, 2001).

Trabalhos envolvendo construções onde a expressão de cDNAs de *XIST* e *Xist* podiam ser moduladas apresentaram resultados distintos destes anteriormente citados, onde foi demonstrado que *Xist* não estava envolvido na manutenção do Xi (Wutz e Jaenisch, 2000), e a versão humana desse RNA parecia ter relação direta com as outras modificações epigenéticas de manutenção do Xi (Chow *et al.*, 2007).

Assim, pode-se perceber que o papel do *XIST/Xist* no processo de manutenção da inativação do cromossomo X ainda não foi completamente elucidado. Mais especificamente em humanos, estudos nesse sentido nunca foram feitos em células normais, o que pode ainda ser investigado.

A metilação das citosinas presentes em dinucleotídeos CpG desempenha uma função importante na manutenção do silenciamento gênico no Xi, onde as seqüências promotoras dos genes encontram-se fortemente metiladas, em contraste ao Xa, que é hipometilado (Yen *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1984).

A enzima DNA (citosina-5) metiltransferase 1 (DNMT1/Dnmt1) é tida como a principal metilase de manutenção já que ela apresenta uma forte preferência por DNA hemi-metilado (revisto em Bestor, 2000). Em camundongos, a ausência dessa enzima leva à desmetilação global do DNA e não é compatível com a vida embrionária (Li *et al.*, 1992). Além disso, a diminuição da metilação de *Xist* em células ES nocautes para esse gene resultou na inativação do único X presente

em células masculinas e dos dois X das células femininas (revisto em Pereira e Vasques, 2000).

Em humanos, a inativação de DNMT1 por recombinação homóloga na linhagem de carcinoma HCT116 levou à perda de somente 20% da metilação do DNA (Rhee *et al.*, 2000), diferentemente do encontrado em camundongos. Somente com o nocaute duplo, desse gene e da metilase *de novo* DNMT3B, é que se provocou a desmetilação de 95% do genoma (Rhee *et al.*, 2002). Pelo menos nessas células humanas, as duas enzimas possuem funções sobrepostas e cooperam para manter a metilação do DNA. Posteriormente, vários estudos inativaram DNMT1 por siRNAs em diferentes linhagens de carcinoma humano, e relataram resultados divergentes entre si e em relação aos dados obtidos com as células nocautes para esse gene (Robert *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Ting *et al.*, 2004).

Fica claro que DNMT1 não atua igualmente em camundongos e humanos, e todos esses resultados conflitantes mantêm inconclusivo o papel dessa enzima na manutenção da metilação global de DNA em humanos, principalmente em células normais, onde nenhum estudo foi realizado.

Mais especificamente no controle da expressão de *XIST*, a ausência de DNMT1 e DNMT3B não foi suficiente para modificar a metilação de seu promotor a ponto de alterar seu padrão de expressão (Vasques *et al.*, 2005). Nenhum trabalho, entretanto, analisou o papel da DNMT1 na metilação de *XIST* em células humanas não tumorais.

Pode-se resumir que as conclusões a respeito do papel da metiltransferase DNMT1 na manutenção global da metilação do DNA ainda são controversas,

incompletas a respeito do controle da expressão do gene *XIST*, e inexploradas no processo de manutenção da ICX. Além disso, todos os trabalhos feitos com células humanas envolviam células de carcinoma, tornando necessária a investigação dessas funções em células normais, o que pode vir a auxiliar no esclarecimento das diferenças encontradas com o uso de diferentes metodologias e linhagens celulares.

Muito do que se sabe a respeito do processo de ICX foi estudado em camundongos. No entanto, existem várias diferenças entre humanos e camundongos (revisto em Vasques *et al.*, 2002) que destacam a necessidade de investigações deste processo em células humanas, mais especificamente não tumorais.

Nesse sentido, foram objetivos desse trabalho investigar as funções dos genes *XIST* e *DNMT1* na manutenção do estado silenciado do Xi em fibroblastos humanos não transformados.

Para isso, foi aperfeiçoado um sistema celular desenvolvido previamente por integrantes do laboratório para o estudo de perturbações na ICX (Vasques, 2003), no qual é possível monitorar a atividade do cromossomo Xi pela análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) localizados em regiões codificadoras de genes ligados ao X.

Usando o princípio da genética reversa, esses genes foram inativados pós-transcricionalmente por moléculas de shRNAs com alvos eficientes em diminuir

sua expressão. Uma vez inativados, buscou-se analisar os efeitos biológicos advindos da diminuição desses produtos gênicos quanto à manutenção da ICX.

B. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o papel dos genes *XIST* e *DNMT1* na manutenção do estado inativo do Xi em fibroblastos humanos. Mais especificamente:

- . construir vetores retrovirais que expressam shRNAs para inativação dos genes *XIST* e *DNMT1* e testar os melhores alvos para esta finalidade;
- . observar o efeito da inativação desses genes na manutenção do estado inativo do Xi através da análise de expressão gênica alelo-específica e de metilação de DNA.

C. MATERIAIS E MÉTODOS

1. CULTURA DE CÉLULAS

1.1. LINHAGEM DE CÉLULAS HEK-293

A linhagem de células transformadas HEK-293 (ou simplesmente 293) é derivada de rim embrionário humano. Elas foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen) com alta concentração de glicose acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 2mM L-Glutamina (Sigma), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma), 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (Invitrogen).

1.2. LINHAGEM DE CÉLULAS GM135^{TEL}-G9

A linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel G9 é uma linhagem estabelecida por integrantes do próprio laboratório (Vasques, 2003) a partir de células GM135, obtida através do Coriell Institute of Medical Research (New Jersey, USA). Essas células são provenientes de uma mulher portadora da Síndrome de Lesch-Nyhan, e, portanto, são heterozigotas para uma mutação no gene do cromossomo X que codifica a enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT), envolvida no metabolismo de purinas (Nyhan, 2005). Através de seleção em meio contendo 8-azaguanina, obteve-se uma subpopulação de células com a ICX desviada, ou seja, todas as células possuem o cromossomo X com o alelo normal do gene HPRT gene inativado (e dessa forma elas são HPRT-negativas, com o genótipo $X_i^{HPRT} X_a^{hpert}$) (Migeon, 1970). A linhagem estabelecida no laboratório (Vasques,

2003) possui atividade da telomerase restituída pela transdução de retrovírus expressando a porção catalítica da hTERT, expandindo a vida celular, e possibilitando extenso manuseio em cultura. A vantagem dessa metodologia é que as células, apesar de serem imortalizadas, não adquirem um fenótipo transformado como aquelas transformadas com o antígeno T do SV40.

Estes fibroblastos foram cultivados em meio DMEM com alta concentração de glicose (Invitrogen), acrescido de 20% de soro fetal bovino (Cultilab), 2mM L-Glutamina (Sigma), 1% aminoácidos não essenciais (Sigma), 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (Invitrogen).

1.3. DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS

A ampola com as células foi retirada do nitrogênio líquido e rapidamente levada ao banho a 37°C, por 2 minutos. O conteúdo da ampola foi vagarosamente misturado a 3 ml do meio de cultura, que foi centrifugado em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm. O pellet foi ressuspendido com meio de cultura e plaqueado na garrafa ou placa mais adequada ao número de células ou à finalidade de seu uso.

1.4. CONGELAMENTO DE CÉLULAS

As células foram lavadas 2 vezes PBS (Invitrogen) e desagregadas da placa de cultivo pela ação de 0,25% Tripsina-EDTA ou 1X Tryple Express (ambos Invitrogen) a 37°C por 2-5 minutos. Para inibir a ação da enzima foi acrescido na placa um volume de meio com soro fetal bovino ($\geq 10\%$) igual ou maior que o volume de tripsina utilizado e a camada de células foi desagregada por

pipetagem. As células foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm, e o pellet foi ressuspensionado em meio de cultura acrescido de 10% DMSO (Sigma) e pelo menos 20% de soro fetal bovino. Os criotubos foram rapidamente levados para um freezer a -70°C , e após pelo menos 24 horas foram transferidos para um estoque no nitrogênio líquido por tempo indefinido.

1.5. SUB-CULTIVO DE CÉLULAS

As células foram lavadas 2 vezes PBS (Invitrogen) e desagregadas da placa de cultivo pela ação de 0,25% Trypsina-EDTA ou 1X Tryple Express (ambos Invitrogen) a 37°C por 2-5 minutos. Para inibir a ação da enzima foi acrescido na placa um volume de meio com soro fetal bovino ($\geq 10\%$) igual ou maior que o volume de tripsina utilizado e a camada de células foi desagregada por pipetagem. As células foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm, e o pellet foi ressuspensionado no meio apropriado, que foi dividido em duas ou mais áreas de cultura, conforme a necessidade.

1.6. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA EM MEIO SELETIVO

As células 293 foram examinadas quanto a sua resistência à droga puromicina (Invitrogen), utilizada na seleção de células transfectadas. Para tanto, 4×10^4 células foram plaqueadas por poço de placa de 6. A partir do dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi substituído diariamente por meio acrescido de diferentes concentrações de puromicina (125, 250, 375, 500 e 750ng/ml). Em um poço da placa, meio sem a droga também foi trocado diariamente, para atuar como um controle do experimento. Estas culturas foram mantidas por dez dias e

verificadas ao microscópio óptico quanto à formação de colônias. A concentração ideal da droga para a seleção celular foi determinada em 250 ng/ml como dose letal mínima.

De forma similar, os fibroblastos também foram examinados quanto a sua resistência à puromicina. Para tanto, 1.2×10^5 células foram plaqueadas por poço de placa de 6, correspondendo a aproximadamente 70-75% de confluência. As concentrações de droga testadas foram 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600ng/ml, e a concentração ideal da droga para a seleção celular foi determinada em 400 ng/ml como dose letal mínima.

1.7. TRANSFEÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE PRETRO-SUPER

Aproximadamente 3×10^5 células 293 foram plaqueadas em placas de 6 poços. No dia seguinte, acrescentou-se 85 µl de meio sem soro a 15 µl de DNA já esterilizado, contendo 3µg do vetor. A esta mistura, foram acrescentados 5 µl de lipofectamina (Invitrogen) previamente diluídos em 95 µl de meio também sem soro. O conteúdo das duas misturas permaneceu em contato por 45 minutos a temperatura ambiente. Aos 200 µl da solução de DNA e lipossomos foram acrescentados de 0,8ml de meio sem soro e esse volume foi colocado em contato com as células. Este meio foi substituído após 4-5h por meio com 20% de soro. Após 24 horas, o meio de cultivo foi novamente substituído por meio normal de cultivo (10% soro). 48 horas após a transfecção, as células foram expandidas de modo que 1/5 e 4/5 foram separados em duas placas de 10 cm de diâmetro, já em meio seletivo contendo puromicina a uma concentração final de 250ng/ml. A seleção se estendeu por 10 dias, com troca de meio em dias alternados. Dessa

maneira, ao final desse período, formaram-se colônias resistentes, que foram isoladas e transferidas para placas de 24 poços. Uma parte das células foi congelada, e parte foi destinada para a extração de ácidos nucléicos.

1.8. TRANSDUÇÃO DAS PARTÍCULAS RETROVIRAIS

2×10^5 fibroblastos foram plaqueados em poços de placa de 6, 24 horas antes da transdução. As células foram então tripsinizadas e re-aderiram na placa em meio acrescido de polibreno em concentração final de $8\mu\text{g/ml}$ por 2 horas. Após esse período, esse meio era sugado com cuidado e substituído por aproximadamente 1 ml do sobrenadante contendo partículas virais, de 8×10^5 a 1×10^6 ufc/ml, também acrescido de polibreno. Após um período de 3 horas de contato com as células, o meio foi substituído por meio normal, e este foi trocado após 24 horas por meio seletivo, acrescido de puromicina numa concentração final de 400ng/ml . A seleção foi mantida por dez dias, e o meio foi trocado em dias alternados. Ao final desse período, a área de cultivo foi dissociada para obtenção de um pool celular resistente.

2. OUTROS PROCEDIMENTOS

2.1. DIGESTÃO DO PLASMÍDEO PRETRO-SUPER

Uma alíquota do plasmídeo pRETRO-SUPER ($2\mu\text{g}$) foi digerida com 30 U das enzimas de restrição *Bgl* II e *Hind* III, em volume final de $150\mu\text{l}$, utilizando-se o tampão indicado pelo fornecedor (New England Biolabs). Entre as duas, e após

a segunda digestão, a amostra foi separada em gel de agarose 0,7%, para verificação da clivagem e extração da banda correspondente do gel utilizando o kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf), seguindo protocolo do fabricante.

2.2. ANELAMENTO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os oligonucleotídeos contendo o código para os *hairpins* deduzidos para a construção dos vetores foram sintetizados pela IDT. Os oligonucleotídeos foram previstos para que, quando anelados, possuísem as extremidades coesivas em relação ao vetor digerido onde seriam ligados. Cada oligo *forward* possui internamente a sequência alvo (na direção 5'-3'), baseada na sequência do cDNA, a sequência que formará o loop do *hairpin* (Barton e Medzhitov, 2002), e a sequência alvo reversa e complementar (Fig. 6).

Cada anelamento foi realizado utilizando-se 50 ng de cada par de oligonucleotídeos em tampão de anelamento (100 mM tris pH 8,0; 50 mM MgCl₂), com volume final de 50 µl. A mistura foi incubada a 88°C/2 min, 65°C/10 min; 37°C/10 min; temperatura ambiente/1 h. As duplas aneladas foram chamadas de XIST 502, XIST 850, DNMT1 377 e DNMT1 515 conforme o nucleotídeo de início nos genes alvos.

Figura 6 – Esquema e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados. Em preto, as extremidades coesivas com o vetor. Em azul, as seqüências alvo baseadas nas seqüências dos cDNAs (na direção 5'-3') nos oligonucleotídeos F, e sua fita complementar em R. Em vermelho, a seqüência que formará o loop do *hairpin*. Em verde, o reverso e complementar da seqüência alvo nos oligonucleotídeos F, e sua fita complementar em R.

2.3. LIGAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ANELADOS AO VETOR DIGERIDO

Para a clonagem, foram ligados 1 ng dos oligonucleotídeos previamente anelados a 100 ng do plasmídeo linearizado, utilizando-se 1U da enzima T4 ligase (New England Biolabs) e tampão indicado pelo fornecedor, com volume final de 10 µl. A reação foi mantida a temperatura ambiente por 3 horas. A julgar pela diferença de tamanho dos dois componentes, os volumes utilizados resultam aproximadamente na mesma quantidade de moléculas dos oligonucleotídeos e do plasmídeo (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4. OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Bactérias DH10b ou DH5α foram estriadas em placas contendo LB-ágar e crescidas durante a noite a 37°C. Uma única colônia foi transferida para 10 ml de LB, e incubada a 37°C por 16-18 horas sob agitação. Um mililitro desta cultura foi inoculado em 100 ml de LB e estes foram incubados sob agitação a 37°C por 2 horas. A cultura foi monitorada determinando-se sua DO600 (Densidade Óptica - $\lambda = 600$ nm) a cada 30 minutos. Uma vez atingida a DO600 de 0,2-0,5, as células foram colocadas em tubos estéreis de 50 ml, mantidas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Cada pellet foi ressuscitado em 10 ml de 100 mM CaCl₂ a 4°C. As células foram resgatadas por nova centrifugação e ressuscitadas em 2 ml de 100 mM CaCl₂, 15% glicerol a 4°C. Esta mistura foi mantida por 14-16 h a 4°C, e alíquotas de 100 µl foram congeladas a -70°C.

2.5. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS

Alíquotas de bactérias competentes foram descongeladas no gelo, e a cada uma delas foi adicionada o volume total da reação de ligação ou 5 ng de DNA plasmideal circular. As misturas foram mantidas em gelo por 30 minutos, e após este período as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 37°C por 1 min ou 42°C por 45 segundos e retornadas ao gelo por 2 minutos. Após adicionar 0,5 ml de LB, as bactérias foram incubadas a 37°C por 45 minutos e, plaqueadas em LB-ágar acrescido de 100 µg/ml ampicilina e 100µg/ml de X-gal (quando necessário). As placas foram incubadas por 14-16 horas a 37°C.

2.6. MINI-PREP - PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA (BOILING METHOD)

Colônias isoladas de bactérias contendo os plasmídeos foram inoculadas em 1,5 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina, e incubadas a 37°C durante 14-16h sob agitação. As culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 minuto, e ressuspensas em 210 µl de STET (8 % glicose; 0,5 % triton X-100; 50 mM EDTA; 10 mM tris pH8,0) estéril, acrescido de 15 µl de lisozima 10 mg/ml. Após agitação intensa por alguns segundos, a amostra foi fervida por 50 segundos e centrifugada imediatamente após, a 12000 rpm por 8 minutos. Os pellets foram removidos, e aos sobrenadantes foram adicionados 100 µl de 7,5 M NH₄OAc e 300 µl de isopropanol para a precipitação dos plasmídeos. Após 10 minutos em temperatura ambiente, nova centrifugação foi realizada a 12000 rpm por 10 minutos. Os pellets contendo os plasmídeos foram lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 50 µl de TE contendo 10 ng/µl de RNase.

2.7. DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO

Dois microlitros do DNA plasmideal das colônias obtidos pelo método boiling foram digeridos com 3-15U das enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III, usando tampão fornecido pelo fabricante (New England Biolabs), por no mínimo 3 horas. Amostras de DNA plasmideal intactas e digeridas foram separadas em gel de agarose 0,7%, 1X TAE, em solução 1X TAE a 50 V/1 h, coradas com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen).

2.8. MINI-PREP - PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA

Uma colônia isolada de bactérias contendo as construções foi inoculada em 3 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubada durante 14-16 h sob agitação a 37°C. Estes plasmídeos foram utilizados para o seqüenciamento. A partir dessa cultura, a obtenção de DNA plasmideal em pequena escala foi realizada conforme as especificações descritas no kit Perfectprep Plasmid Mini (Eppendorf).

2.9. SEQÜENCIAMENTO DE DNA PLASMIDEAL

200ng de cada construção foram submetidos à reação de seqüenciamento usando 0,5 µM de *primer* e o DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences), utilizando os *primers* pRS Seq F (5' –GGAAGCCTTGGCTTTTG – 3') ou pRS Seq R (5' – AGTGTCAGTAGGCGGGAAC – 3') (ambos sintetizados pela IDT Technologies). Para a reação de seqüenciamento foi utilizado um programa com 35 ciclos (95°C/0:20 min; 55°C/0:20 min; 60°C/2:30 min) e 60°C/7:00 min. Esses mesmos *primers* foram utilizados posteriormente na

amplificação do DNA das células transfectadas e transduzidas para confirmar a presença do vetor.

Para precipitação do produto do seqüenciamento foi acrescentado à reação 30 µl de etanol 100%, o tubo foi então invertido algumas vezes para homogeneização e em seguida deixado no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi então centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi sugado, e foi adicionado ao pellet 150 µl de etanol 70%. O tubo foi invertido algumas vezes para homogeneização e foi submetido a uma nova centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi sugado, e o tubo foi deixado aberto no escuro para evaporação total do etanol por aproximadamente 30 minutos. Ao pellet seco foram adicionado 16 µl da loading solution e o tubo foi submetido à agitação intensa por 40 segundos para total ressuspensão da amostra, que foi analisada com MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences).

2.10. MIDI-PREP - PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO EM MÉDIA ESCALA

Uma colônia isolada de bactérias contendo o plasmídeo foi inoculada em 5 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubada durante 8 h sob agitação a 37°C. 100 µl desse pré-inóculo foi inoculado em 25 ml de LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubado durante 14-16 h sob agitação a 37°C. A partir dessa cultura, a obtenção de DNA plasmideal em média escala foi realizada conforme as especificações descritas no kit QIAfilter Midi Cartridges (Qiagen).

2.11. ESTOQUE DE BACTÉRIAS

Uma colônia isolada foi crescida em 2ml de LB com antibiótico durante 14 a 16 horas. Acrescentou-se 425µl dessa cultura a 75µl de glicerol, e a amostra foi estocada em freezer -70°C.

2.12. PRECIPITAÇÃO DE DNA PARA TRANSFEÇÃO

O DNA plasmideal foi precipitado acrescentando 1/10 do volume de 3 M NaAc e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto, seguido de um descanso mínimo de 30 minutos a -20°C. A amostra foi então centrifugada a 12.000 rpm durante 15 minutos. Todos os procedimentos seguintes passaram a ser realizados em fluxo laminar, utilizando soluções estéreis. O sobrenadante foi descartado e o DNA novamente lavado com etanol 70% seguido de centrifugação a 12.000 por 20 minutos. O DNA foi deixado secar a temperatura ambiente em ambiente estéril e foi ressuspenso em água.

2.13. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

O DNA das células foi extraído utilizando-se o kit GFX Genomic Blood DNA Purification, com protocolo adaptado à extração de cultura celular fornecido pelo fabricante (Amersham), ou com protocolo de extração por fenol-clorofórmio. O RNA total foi isolado das células utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen).

2.14. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE E SÍNTESE DE cDNA

10 a 15 µg de RNA foram tratados com a enzima Turbo DNA-free, utilizando o protocolo Rigoroso do fabricante (Ambion). A partir de 1 a 2 µg desse RNA tratado foi sintetizado cDNA utilizando-se *random primers*, oligos dT e a transcriptase reversa SuperScript III, de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen). Como controle do tratamento para verificar eventual resistência de contaminação com DNA genômico, o protocolo também foi seguido com uma amostra onde não era adicionada a transcriptase reversa (RT-).

2.15. PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO O SISTEMA TAQMAN

25 ou 50 ng de cDNA dos clones celulares foram amplificados usando 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1X Ensaio para *XIST* ou *DNMT1* ou 0,4X Ensaio de *18S*, num volume final de 25 µl. Em todas as amplificações do trabalho, os parâmetros de ciclagem universais foram utilizados (50°C/2 min; 95°C/10 min; 40 ciclos (95°C/15 seg; 60°C/1 min). Utilizou-se a plataforma ABIPRISM7500 Sequence Detection System. Todas as amplificações foram feitas em triplicatas.

Os códigos para identificação dos ensaios prontos obtidos da Applied Biosystems, assim como os fluoróforos acoplados nas sondas foram: *XIST* - ID Hs01079824_m1, sonda FAM/MGB; *DNMT1* - ID Hs00154749_m1, sonda FAM/MGB; e *18S* - P/N 4319413E, sonda VIC/MGB.

– LIMITAÇÃO DO ENSAIO DE 18S

Utilizando uma quantidade fixa de cDNA (25ng), diferentes quantidades do ensaio de 18S foram utilizadas (1,25; 1; 0,75 e 0,5 μ l). A partir dos resultados desse experimento, passou-se a usar 0,5 μ l do ensaio de 18S por reação, o equivalente a 0,4X de concentração final.

– EXPERIMENTOS DE VALIDAÇÃO

Para a produção das curvas standard, utilizou-se quantidades variáveis de cDNA – 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,26 ng.

2.16. PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO SYBR GREEN I

50 ng de cDNA dos clones celulares foram amplificados usando 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50nM de cada oligonucleotídeo iniciador, num volume final de 25 μ l. Em todas as amplificações do trabalho, os parâmetros de ciclagem universais foram utilizados (50°C/2 min; 95°C/10 min; 40 ciclos (95°C/15 seg; 60°C/1 min). Ao final de cada reação, sempre foi realizada uma curva de dissociação, controlando a presença de contaminações e *primer*-dimers. Utilizou-se a plataforma ABIPRISM7500 Sequence Detection System. Todas as amplificações foram feitas em triplicatas.

Baseando-se em artigos que tratavam da escolha dos controles endógenos (Vandesompele et al., 2002; de Kok et al., 2005), foram desenhados *primers* para os genes *HPRT1* e *HMBS*. Para driblar as dificuldades geradas pelos diversos pseudogenes de *GAPD*, utilizou-se um par de *primers* previamente descrito

(Carraro et al., 2005). A sequência dos *primers* utilizados está listada a seguir. Todos foram sintetizados pela empresa Invitrogen.

DNMT1 RT F	5' – TGAAGGTGGTGTTAATGGCAAA – 3'
DNMT1 RT R	5' – CGGCAAATGAGGTGCTGAA – 3'
HPRT1 RT F	5' – TTCCTTGGTCAGGCAGTATAATCC – 3'
HPRT1 RT R	5' – GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT – 3'
HMBS RT F	5' – CTGGAAGGAGGCTGCAGTGT – 3'
HMBS RT R	5' – TACAGTTGCCCATCCTTCATAGC – 3'
GAPD RT F	5' – CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC – 3'
GAPD RT R	5' – TGAGCGATGTGGCTCGGCT – 3'

2.17. REAÇÃO DE PCR PARA GENOTIPAGEM DOS SNPs E ANÁLISE DA EXPRESSÃO ALELO ESPECÍFICA

DNA das células foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos para cada cSNP identificado no cromossomo X, a fim de genotipar a linhagem celular. No caso do SNP ser informativo, i.e. heterozigoto, cDNA era amplificado para determinar qual alelo do gene estava sendo expresso.

A origem das sequências dos *primers* utilizados para amplificar os cSNPs no DNA genômico é variável: a maioria foi previamente descrita por Carrel e Willard (2005), sendo que alguns foram modificados antes da síntese; outros foram previamente desenhados pela aluna Mariana Klöckner durante seu Mestrado em nosso laboratório; outros ainda foram desenhados ao longo desse trabalho. Todos os *primers* específicos para amplificação dos cSNPs exclusivamente em cDNA

foram desenhados no laboratório. Todos os oligonucleotídeos (Anexo 1) foram sintetizados pela empresa IDT. O desenho dos *primers* e as otimizações de suas condições ideais de uso foram determinadas em conjunto com a aluna de Mestrado Joana Carvalho Moreira de Mello.

25 a 50 ng de DNA ou cDNA das células foram amplificados usando 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Amersham), 1X de tampão, 250 µM de dNTPs, 200 nM de cada *primer*, num volume final de 10 µl. Para alguns pares de iniciadores a reação foi realizada na presença de 1M betaína ou 10% DMSO.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 2%, 1X TAE, em solução 1X TAE a 100 V por 25min, corados com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen) e observados sob luz UV.

2.18. SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Para genotipar os cSNPs, utilizou-se os *primers* correspondentes F e R, ou somente um deles nos casos em que a variação se encontrava muito próxima a um dos oligonucleotídeos. Os produtos de PCR foram diluídos em H₂O bi-destillada em proporção de 1:3 a 1:6, e dessa diluição era usado 0,5 µl em uma reação com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 1X tampão, 150 nM de iniciador, num volume final de 10 µl. Foi utilizado um programa de 40 ciclos (96oC/0:10 min; 52oC/0:20 min; 60oC/4:00 min).

O produto da reação para o seqüenciamento foi precipitado acrescentando-se 20 µl de água e 60 µl de isopropanol 100%, submetido à agitação intensa por 10 segundos para homogeneização, e em seguida deixado no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi então centrifugada por 30 minutos a

14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado ao pellet 150 µl de isopropanol 70%. O tubo foi invertido algumas vezes para homogeneização e foi submetido a uma nova centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto no escuro para evaporação total do álcool por 2-24 horas.

As amostras foram analisadas com seqüenciador ABI PRISM 3700 ou com seqüenciador ABI3100 Prism Genetic Analyzer.

2.19. SEQÜENCIAMENTO APÓS TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

– TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

1 µg de DNA genômico foi submetido ao tratamento de bissulfito de sódio utilizando o kit EpiTect Bisulfite, de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen).

– AMPLIFICAÇÕES

1 ou 2 µl de DNA tratado com foram amplificados usando 1 U de Taq Platinum (Invitrogen), 1X de tampão, 200 µM de dNTPs, 125 nM de cada *primer*, 1,2 mM de MgCl₂, num volume final de 20 µl. Os *primers* foram desenhados para serem usados em reações do tipo *nested*, e as amplificações foram feitas utilizando programas do tipo *step-up*. As seqüências do oligonucleotídeos e a temperatura otimizadas de anelamento de cada dupla serão descritos nos capítulos onde foram utilizados.

Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0,7%, 1X TAE, em solução 1X TAE a 100 V por 20min, coradas com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen) e observados sob luz UV, ou em gel de poliacrilamida 6% corado com prata (Merck).

– CLONAGEM DO PRODUTO DE PCR

Os produtos das PCRs internas foram purificados pela excisão da banda específica do gel de agarose utilizando o kit Perfectprep Gel Cleanup, segundo instruções do fabricante (Eppendorf). 75 a 150 ng desse produto purificado foi ligado ao vetor pGEM T Easy, seguindo protocolo do fabricante (Promega).

– PCR DE COLÔNIAS E SEQÜENCIAMENTO

Utilizando os *primers* M13 F e R, colônias brancas, ou seja, com inserto, foram picadas diretamente no tubo de PCR contendo o mix de reação conforme descrito nesse mesmo item, com programa de amplificação consistindo de 10 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, além de um passo adicional de 10 minutos para extensão final a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 0,7%, 1X TAE, em solução 1X TAE a 100 V por 20min, coradas com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen) e observados sob luz UV. Aqueles que apresentavam o tamanho de fragmento correto foram diluídos em H₂O bi-destilada na proporção de 1:6, e foram seqüenciados conforme protocolo descrito no item 2.18 deste capítulo.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS QUANTO AOS SNPs EM REGIÕES EXPRESSAS DE GENES LIGADOS AO CROMOSSOMO X

Parte deste capítulo foi escrito com base no trabalho “*MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts*” (Anexo 2), submetido para publicação no periódico *Genetics*.

RESUMO

Estudos das modificações epigenéticas que caracterizam o cromossomo X inativo em humanos foram, na grande maioria das vezes, desenvolvidos em células híbridas somáticas humano/roedor ou em linhagens de carcinomas. Embora muito úteis e indicadas para responder algumas perguntas biológicas, essas células não são os modelos ideais para análise de processos como a Inativação do cromossomo X, já que tanto a fusão celular quanto o processo carcinogênico são freqüentemente associados com alterações epigenéticas dos cromossomos humanos das células.

Foi objetivo deste trabalho otimizar um modelo celular de fibroblastos humanos para o estudo da ICX pela caracterização quanto à presença de SNPs contidos nas regiões expressas de genes ao longo de todo o cromossomo X. Dos 38 polimorfismos examinados, a linhagem celular se mostrou heterozigota para 15, e um perfil de expressão foi traçado para essas células, que apresentam a ICX completamente desviada.

Dentre os genes analisados, *MAOA* e *GYG2* apresentaram expressão monoalélica, diferindo do que fora anteriormente descrito em híbridos somáticos. A investigação do padrão de metilação da região 5' desses genes mostrou a presença de dois alelos diferencialmente metilados, concordando com os

resultados do padrão de expressão alelo-específico, e levando à conclusão que esses genes estão submetidos ao processo de ICX em células normais humanas.

Esses resultados dão ênfase à necessidade do uso de sistemas *in vitro* apropriados nos estudos envolvendo padrões de modificações epigenéticas. Destaca-se, ainda, que novas análises em grande escala usando linhagens celulares capazes de mimetizar mais precisamente a condição *in vivo* devem ser realizadas. Dessa forma, será possível determinar quais genes ligados ao X podem, de fato, contribuir para as diferenças entre os sexos, por escapar à ICX.

INTRODUÇÃO

A inativação do cromossomo X ocorre no início de desenvolvimento das fêmeas de mamíferos para equilibrar a dosagem de produtos gênicos do cromossomo X, de acordo com a hipótese de Mary Lyon (1961).

Esse processo é iniciado pela transcrição e localização em *cis* do RNA não codificante XIST/Xist. A ligação desse RNA e a propagação do sinal de inativação ao longo de todo o cromossomo X ocorre nas duas direções a partir do XIC (Brown *et al.*, 1991). A disseminação deste sinal resulta no silenciamento transcricional dos genes localizados neste cromossomo, excetuando algumas regiões escapam da inativação (revisto por Vasques *et al.*, 2002; Carrel e Willard, 2005; Ross *et al.*, 2005).

No cromossomo X humano, aproximadamente 15% dos genes sempre escapam à inativação, e pelo menos outros 10% exibem inativação variável, sendo expressos em alguns, mas não em todos os X inativos em diferentes mulheres

(Carrel e Willard, 2005). Esses últimos genes, então, indicam heterogeneidade entre as mulheres e devem possuir alguma relevância médica.

Contribuindo para o consenso de que a ICX age para manter uma correta dosagem dos produtos gênicos do X devido à contínua degradação do Y, observou-se uma tendência que correlaciona o escape da inativação à idade do estrato do X. De fato, pouquíssimos genes escapam à inativação no estrato remanescente do proto-X, que cobre praticamente todo o braço longo do cromossomo; por outro lado, vários genes situados nas regiões adicionadas mais recentemente nos cromossomos sexuais ao longo da evolução apresentam expressão bialélica nos X, incluindo os genes localizados na PAR1 (Ross *et al.*, 2005; Carrel e Willard, 2005).

A maioria dos genes com homólogos no Y escapam à ICX, sendo a proporção ainda mais significativa considerando aqueles com homólogos funcionais no Y (Carrel e Willard, 2005). Esses últimos genes, então, seriam expressos de forma bialélica em células masculinas e femininas. Essa possível explicação para o escape, entretanto, não é universal, uma vez que outros tantos genes são expressos a partir do Xi mesmo sem apresentar um homólogo no Y. Esses “escapees” burlam o sistema de compensação de dose e geram desequilíbrios de expressão quanto ao X entre os sexos, e possivelmente são importantes para contribuir nas diferenças fisiológicas encontradas entre eles.

Em camundongos, por outro lado, a porcentagem de genes que escapam à ICX é bem menor (Disteche, 1999; Tsuchiya e Willard, 2000), o que explica a normalidade do fenótipo de animais X0 comparado às inúmeras características apresentadas pelas mulheres X0, portadoras da síndrome de Turner. Os produtos dos genes que escapam à ICX, assim, devem possuir funções sensíveis à dose,

já que na ausência de dose dupla é o que compõem, a princípio, as diferenças das mulheres normais e X0. O mesmo raciocínio vale para indivíduos com cromossomos X supranumerários da Síndrome de Klinefelter, onde o excesso de produtos desses genes deve ter papel nos fenótipos encontrados.

Uma vez estabelecida a ICX, ela é mantida precisamente durante as mitoses no organismo, de forma que todas as células numa população clonal possuem o mesmo Xi. A manutenção estável em longo prazo da ICX é mediada pelo sinergismo de múltiplas modificações epigenéticas que caracterizam o Xi (revisto por Heard e Disteche, 2006). A redundância desses mecanismos de manutenção do estado silenciado do Xi reflete a importância dessa fase do processo de inativação (Salstrom, 2007).

Estudos em camundongos desempenham um importante papel em decifrar novos *loci* e mecanismos envolvidos na ICX. Entretanto, várias diferenças entre esse modelo animal e o homem (revistas em Vasques *et al.*, 2002) reforçam a necessidade de se estudar também a dinâmica da inativação do cromossomo X humano.

Com esse intuito, diferentes trabalhos utilizaram células híbridas somáticas humano/roedor que mantiveram o Xa ou Xi humano. Embora esse modelo experimental seja apropriado e eficiente, por exemplo, no mapeamento genético, ele está longe de ser suficiente em estudos de padrão de expressão e de características epigenéticas dos cromossomos humanos.

É muito bem estabelecido que a fusão celular gera alterações globais que podem culminar em mudanças drásticas no epigenótipo de um núcleo somático. A fusão de células somáticas a células pluripotentes (Tada *et al.*, 1997; Tada *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2002) e até mesmo de dois tipos diferentes de células somáticas (Blau *et al.*, 1983) leva à desdiferenciação ou alteração de um estado diferenciado. Mudanças nos padrões de metilação e de expressão gênica foram relatadas, assim como re-ativações de genes previamente silenciados (Tada *et al.*, 1997; Tada *et al.*, 2001; Blau *et al.*, 1983). Além disso, essas modificações no programa epigenético são induzidas na fusão de células de um mesmo organismo (Do e Schöler, 2006) ou de espécies diferentes (Blau *et al.*, 1983).

Mais especificamente em relação à ICX, diferentes comportamentos anômalos foram relatados devido à fusão celular, como a reativação de genes do Xi em taxas maiores que as esperadas (Ellis *et al.*, 1987; Gartler e Goldman, 1994), falhas no estabelecimento e inadequação em manter o estado silenciado do Xi (Yoshida *et al.*, 1997; Takagi, 1993).

Paralelamente, a grande disponibilidade, diversidade e relativa facilidade no cultivo de linhagens tumorais humanas propiciam seu uso no estudo de processos celulares não necessariamente relacionados à carcinogênese. Entretanto, sabe-se que várias alterações globais e gene-específicas são causadas pelas mudanças no padrão das modificações epigenéticas das células que dão origem a um carcinoma (revisto por Grønbaek *et al.*, 2007; e Vucic *et al.*, 2008), e não se pode excluir que essas transformações envolvam o processo de ICX.

Em suma, é indispensável a busca por alternativas para estudar características epigenéticas, incluindo as da ICX, em células humanas tão similares quanto possível ao estado natural, *in vivo*.

Uma inconveniência para os estudos de distúrbios na manutenção da ICX é a necessidade de se trabalhar com populações clonais. É indispensável que o mesmo X esteja inativado em todas as células para que se possa controlar adequadamente eventuais reativações de genes submetidos à ICX. A obtenção de populações clonais requer plaqueamentos limitantes após diluições seriadas das células. Entretanto, a capacidade proliferativa de células não transformadas é reduzida, o que torna difícil a obtenção de sub-linhagens clonais de células normais (por exemplo em Benjamin *et al.*, 2000).

Vasques e Pereira (2001) circundaram este problema pelo uso de células obtidas de mulheres heterozigotas para a Síndrome de Lesch-Nyhan, ou seja, com mutação em um dos alelos do gene ligado ao X *HPRT*, que codifica a enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase 1. *HPRT* está submetido à ICX, e como seu produto gênico está envolvido no metabolismo de purinas, pode-se obter sub-populações celulares com desvio de inativação pela seleção com o composto HAT (fenótipo resultante *HPRT*⁺) ou 8-azaguanina (fenótipo *HPRT*⁻) (Migeon, 1970).

Vasques (2003) também aumentou a sobrevida de uma dessas sub-populações pela restituição da atividade da telomerase com a introdução nas células da sua porção catalítica. Diferente do observado na transformação pelo antígeno T do SV40, essa estratégia expande a vida da linhagem sem alterar seu cariótipo ou o ciclo celular.

Com a publicação do seqüenciamento do X (Ross *et al.*, 2005), um número muito grande de polimorfismos de base única (SNPs) foi identificado, possibilitando a

determinação do perfil de inativação dos genes desse cromossomo (Carrel e Willard, 2005). Usando essas informações, então, nos fibroblastos com ICX desviada e prolongada vida celular (Vasques, 2003), aperfeiçoou-se uma poderosa ferramenta para o estudo de distúrbios na manutenção da inativação, uma vez que mudanças no padrão de expressão alelo-específica dos genes ligados ao X denunciam alterações nesse processo.

Foi objetivo desse trabalho gerar um painel da atividade dos cromossomos X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel G9, baseado na presença de SNPs presentes em regiões expressas de genes ao longo desse cromossomo.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos fibroblastos humanos, a extração de DNA e RNA, o tratamento com DNase e a síntese de cDNA, as amplificações dos genes ligados ao X com os SNPs analisados bem como seu seqüenciamento, e as informações gerais do seqüenciamento após tratamento de bissulfito de sódio já foram descritos no Material e Métodos do Capítulo I.

1. LINHAGENS CELULARES

Além das células descritas no Capítulo I (GM135-Tel), outras três sub-linhagens de fibroblastos não transformados com desvio de inativação pela seleção com 8-azaguanina ou HAT foram aqui utilizadas: GM2226, GM13 e GM1661, todas derivadas de portadoras de mutações no gene *HPRT*. Essas células também foram obtidas do NIGMS Human Genetic Cell Repository, e foram cultivadas da mesma forma que as GM135, conforme descrito no Material e Métodos Geral.

2. SEQÜENCIAMENTO APÓS TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

– AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5' DOS GENES *MAOA* E *GYG2*

DNA da linhagem GM135-Tel tratado com bissulfito foi amplificado em PCRs *nested* para analisar um fragmento de 417 pb na região 5' do gene *MAOA*, incluindo toda a extensão de sua ilha CpG, e um fragmento de 443 pb englobando a região 5' e o primeiro exon de *GYG2*, incluindo parte de sua ilha CpG. As sequências dos *primers* utilizados nas PCRs externas (Ext) e internas (Int) são:

MAOA_Ext_F – 5' TtTGtAtttAGTAATtTTTtAG 3';

MAOA_Ext_R – 5' aCCAAaCCATaaCTACACTACAC 3';

MAOA_Int_F – 5' AtAtAAGGAtATTtTAAAttTAATAA 3';

MAOA_Int_R – 5' ACCCCTCACTaaCCAaaaTC 3';

GYG2_Ext_F – 5' TGtAtTtATTtATTtATTtAGTTTATG 3';

GYG2_Ext_R – 5' AaaCCTCCTCCACTaCCCA 3';

GYG2_Int_F – 5' TAAGtttTGttTTtTttTtTGG 3';

GYG2_Int_R – 5' TCCCCTaCAaCCCCCTAC 3'.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de SNPs conhecidos no X foi muito ampliado com a publicação do seqüenciamento desse cromossomo humano (Ross *et al.*, 2005). Com base nesses dados, Carrel e Willard (2005) produziram um extensivo perfil da ICX utilizando esses polimorfismos.

No presente trabalho foram selecionados SNPs em regiões expressas do X com altos valores de heterozigosidade (maior que 0,25), cruzando informações de Carrel e Willard (2005) com aqueles disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp>). Além disso, com base nos perfis de expressão contidos na ferramenta UniGene disponível também no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>), foram selecionados genes que se expressam em tecido conectivo e/ou na pele, por se assemelharem mais ao ambiente das células que seriam analisadas. Também foi levado em conta o padrão de atividade dos genes escolhidos no cromossomo Xi de acordo com Carrel e Willard (2005), de forma que a maioria deles era submetida (24 genes) e outros escapavam à ICX (8), estes últimos incluídos como controles da metodologia (Fig. 7).

38 polimorfismos foram examinados em genes ao longo do cromossomo X (Anexo 3). A linhagem de fibroblastos GM135-Tel se mostrou heterozigota para 15 SNPs, para os quais foi determinado qual alelo estava sendo expresso através da análise de cDNA sintetizado a partir de RNA com altos níveis de pureza e/ou pelo uso de *primers* específicos para essas moléculas (Anexo 1). Esses *primers* específicos foram preferencialmente desenhados em outro exon em relação ao SNP, de modo que a presença de um intron no amplicon pudesse ser facilmente reconhecida por gerar bandas de tamanhos muito distintos após eletroforese.

Figura 7 - Ideograma representativo do cromossomo X humano mostrando a localização dos genes analisados neste trabalho. Os genes marcados em verde escapam à ICX, em vermelho estão submetidos a esse processo, e em azul apresentaram expressão variável nos diferentes híbridos somáticos analisados por Carrel e Willard (2005).

Dentre os genes analisados, dois se destacaram por apresentar um padrão de expressão diferente daquele descrito por Carrel e Willard (2005): segundo os autores, *MAOA* e *GYG2* escapam à inativação em todos os híbridos somáticos analisados (9 de 9). Entretanto, encontramos clara expressão de um só alelo dos dois genes (Fig. 8).

Monoamina oxidase A (MAOA) é uma importante enzima na regulação do nível dos neurotransmissores serotonina, epinefrina e norepinefrina, e está implicada em múltiplas desordens psiquiátricas e traços comportamentais (revisto por Shih e Thompson, 1999). *MAOA* se localiza em Xp11.3 e sua expressão mono-alélica foi descrita em bois (Xue *et al.*, 2002) e humanos (Benjamin *et al.*, 2000; Nordquist e Orelund, 2006), embora em células híbridas somáticas humano/camundongo tenha sido encontrada expressão bialélica desse gene (Carrel e Willard, 2005).

A glicogenina 2 humana (GYG2) foi identificada devido à sua similaridade com a glicogenina 1 muscular, e pode ser encontrada no fígado, coração e pâncreas (Um *et al.*, 1997). GYG2 se auto-glicosila para formar um oligossacarídeo que atua como *primer* na iniciação da biosíntese de glicogênio. A única descrição de seu padrão de expressão foi feita em células híbridas somáticas humano/camundongo, onde foi determinado que esse gene escapa à ICX (Carrel e Willard, 2005).

Para confirmar nossos resultados do padrão de expressão desses genes, genotipamos outras três linhagens de fibroblastos não transformados com desvio total de inativação (Tab. 1). A linhagem GM2226 também era informativa para dois dos SNPs de *MAOA*, que também demonstraram expressão mono-alélica desse gene.

Figura 8 – Expressão mono-alélica dos genes *MAOA* e *GYG2* na linhagem de fibroblastos GM135-Tel G9. Em A e B estão os resultados referentes aos SNPs rs3027407 e rs1137070, respectivamente, no gene *MAOA*; em C, rs211659, no gene *GYG2*. Fragmentos das sequências com os SNPs no DNA estão mostrados nos painéis superiores, e no cDNA nos painéis inferiores. As setas indicam a posição do polimorfismo.

Tabela 1 – Genótipo e expressão alelo-específica das linhagens de fibroblastos humanos. As letras entre parênteses indicam o alelo expresso de cada SNP informativo.

Gene	Variante [*]	GM135	GM1661	GM13	GM2226
MAOA	rs3027407	A/G (A)	A	G	A/G (G)
	rs11544798	G	G	G	G
	rs1137070	T/C (T)	T	C	T/C (C)
	rs1800466	A	A	A	A
GYG2	rs211659	A/T (T)	A	A	A
* Identificação do banco de dados SNP do NCBI.					

O estado de atividade da cromatina e os padrões de metilação do DNA estão intimamente correlacionados, de forma que regiões ativas e acessíveis de cromatina estão associadas com a hipometilação de DNA, e regiões inativas, inacessíveis, com DNA hipermetilado (Razin e Cedar, 1977). Sabe-se também, que devido à ICX, os cromossomo Xi e Xa são diferencialmente metilados (Wolf *et al.*, 1984), e os genes que escapam à inativação não compartilham a mesma estrutura metilada característica do resto do Xi (Goodfellow *et al.*, 1988; Gilbert e Sharp, 1999; Boggs *et al.*, 2002; Filippova *et al.*, 2005).

Para complementar, então, nossos resultados da expressão alelo-específica, analisamos o padrão de metilação da região 5' dos genes *MAOA* e *GYG2* por seqüenciamento após tratamento com bissulfito de sódio. Para os dois genes, dois padrões de metilação puderam ser identificados: em *MAOA*, um alelo

intensamente metilado se opõem a um pouco metilado (Fig. 9A), concordando com o que foi previamente descrito pelo uso de ensaios com enzimas de restrição sensíveis à metilação (Hendriks *et al.*, 1992). Em GYG2 dois padrões de metilação diferenciados também são observados, com sítios exclusivamente metilados em cada um deles (Fig. 9B).

Figura 9 – Análise de sequenciamento após tratamento de bissulfito da região 5' dos genes *MAOA* (A) e *GYG2* (B). Cada linha representa uma molécula de DNA, e cada coluna um dinucleotídeo CpG da sequência analisada. Círculos pretos e vazios representam CpGs metilados e desmetilados, respectivamente.

Sobre cada diagrama se encontra um mapa esquemático da região analisada, onde a barra preta grossa corresponde à ilha CpG, e as pequenas barras vermelhas mostram a posição dos *primers* internos utilizados para amplificação do fragmento.

Diferente do encontrado em células híbridas humano/roedor (Carrel e Willard, 2005), o conjunto dos nossos resultados de expressão alelo-específica e padrão de metilação demonstram que *GYG2* e *MAOA* estão submetidos à ICX em fibroblastos humanos normais. Nossos achados reforçam os de Benjamin e colaboradores (2000), que identificaram a inativação de *MAOA* pelo uso de polimorfismos intrônicos, e os de Nordquist e Orelund (2006), que observaram expressão monoalélica também desse gene em culturas clonais derivadas de uma linhagem de fibroblastos humanos.

GYG2 se localiza em Xp22.3, muito próximo mas fora da região pseudo-autossômica 1 (Zhai *et al.*, 2000). Essa região contém vários genes que são compartilhados entre o X e o Y, ou genes no X com pseudogenes relacionados presentes no Y. Embora uma sequência do cromossomo Y (AC002992) inclua regiões com mais de 90% de identidade em relação aos exons 1 e 3 de *GYG2* (Zhai *et al.*, 2000), esse pseudogene não possui a sequência que codifica o domínio glicosil-transferase, nem a região conservada próxima da extremidade COOH terminal comum às glicogeninas, que é importante para sua interação com a glicogênio sintase. Dessa forma, embora esteja localizado muito próximo de *PAR1*, *GYG2* não compartilha da característica dos genes dessa região que escapam à ICX e possuem homólogos funcionais no Y, resultando em expressão similar entre machos e fêmeas quanto a esses produtos gênicos.

Similar ao que ocorre na maior parte do cromossomo X, o balanço gênico de GYG2 entre os sexos é obtido pela sua inativação em Xi (Fig. 8).

O uso de células híbridas somáticas teve grande importância no mapeamento cromossômico de diversos organismos, incluindo o homem, e essa ferramenta ainda é extensivamente utilizada no estudo das espécies que não compõem os principais modelos animais, cujos genomas ainda não estão caracterizados. Com uma coleção de linhagens celulares híbridas com diferentes conteúdos da espécie de interesse, é possível gerar painéis que podem ser usados para mapear qualquer sequência de DNA em um cromossomo específico.

Entretanto, para estudos envolvendo padrões de expressão e características epigenéticas das células, como é o caso da ICX, essa ferramenta está longe de ser um sistema modelo ideal. A fusão celular, com a conseqüente alteração do ambiente protéico celular, são capazes de gerar inúmeras alterações resultando, em última instância, em mudanças no epigenoma das células. Até hoje, pouco se sabe sobre como essa reprogramação ocorre, e também se mantêm desconhecidas as razões pelas quais a replicação da maioria dos cromossomos humanos falha e eles são perdidos nesses híbridos com células de roedores.

O uso de linhagens de carcinoma humano, da mesma forma, não representa um modelo celular capaz de mimetizar o funcionamento normal de todas as funções celulares, já que alterações globais nos padrões de modificações epigenéticas são frequentemente relacionadas à carcinogênese.

Dessa forma, é indispensável a busca por alternativas para o estudo da estrutura da cromatina em células mais parecidas com o estado natural, encontrado *in vivo*. Assim, foi objetivo desse capítulo caracterizar um modelo celular de fibroblastos não transformados para o estudo da ICX humana quanto à presença de SNPs localizados em regiões expressas de genes ligados ao X.

Encontramos 15 polimorfismos informativos, a partir dos quais foi identificada a expressão alelo-específica de genes ao longo do cromossomo X nos fibroblastos. Dessa forma, uma poderosa ferramenta para estudos de perturbações na manutenção da ICX foi otimizada já que esse número de genes é suficientemente grande para detectar eventuais distúrbios na manutenção da ICX, o que pode ser notado pela eventual re-ativação de genes normalmente silenciados.

Comparado ao perfil de inativação traçado em híbridos somáticos (Carrel e Willard, 2005), encontramos dois genes que se comportam de maneira diferente à previamente descrita. Segundo esses autores, *MAOA* e *GYG2* escapam à ICX, mas nossos resultados em células humanas normais claramente demonstram que esses genes são submetidos a esse processo. Nosso resultado não é surpreendente, uma vez que *MAOA* não possui homólogo funcional do Y e está no meio de uma ilha de genes que são submetidos à ICX (Fig. 7).

Recentemente, uma análise de expressão gênica em grande escala mostrou que a expressão total dos cromossomos X das células femininas é apenas pouco maior que nas masculinas, e que essa diferença se deve principalmente pela maior expressão nas fêmeas de somente 5% dos genes ligados a esse cromossomo (Johnston *et al.*, 2008). Isso sugere que a potencial contribuição

dos genes que escapam à ICX nas diferenças fenotípicas entre os sexos é mais limitada do que se imaginava, e será importante determinar mais precisamente quais genes de fato participam dessas características, preferencialmente em linhagens humanas normais. Nesse trabalho, nós apresentamos dois genes que se pensava contribuir, mas de fato não contribuem para os mecanismos responsáveis pelas desigualdades fenotípicas entre homens e mulheres, e nem para os fenótipos envolvidos em aneuploidias do X.

CAPÍTULO III

ANÁLISE DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DO GENE *XIST* EM CÉLULAS HUMANAS

O papel de *XIST* na iniciação do processo de ICX é indispensável, uma vez que o acúmulo de seu RNA em *cis* desencadeia a série de modificações epigenéticas que caracterizam o X inativo. Dada a sua expressão constitutiva e sua constante associação com aquele cromossomo ao longo de toda a vida celular sugere um papel do gene *XIST* na manutenção do estado silenciado.

Tanto em humanos quanto em camundongos poucos trabalhos foram realizados para averiguar essa possível função de *XIST/Xist*, e os resultados encontrados não levam a definição de uma conclusão nesse sentido.

Foi objetivo deste trabalho estudar o possível envolvimento de *XIST* na manutenção da ICX em células humanas. Para isso, um modelo de fibroblastos não transformados e uma sub-linhagem de origem clonal das células 293 foram empregados junto com vetores que codificam shRNAs com código para inativação desse gene.

Utilizando um vetor com uma sequência alvo eficiente em inativar pós-transcricionalmente o *XIST* não foi possível obter uma linhagem de fibroblastos deficiente em *XIST*, sugerindo que a inativação deste gene seja letal nessas células.

Nas células 293, embora o nível do RNA circulante de *XIST* tenha sido diminuído em 84%, não se detectou re-ativação de genes submetidos ao processo de inativação, nem um número aumentado de células onde esse RNA falhou em se acumular no X inativo. Além da hipótese de que *XIST* não tenha papel na

manutenção da inativação do cromossomo X humano, outras possibilidades de interpretações são discutidas.

INTRODUÇÃO

A inativação do cromossomo X (ICX) é o fenômeno através do qual um dos cromossomos X das fêmeas de mamíferos é silenciado para atingir compensação de dose em relação aos machos. Trata-se de um processo complexo e finamente regulado, que necessita de um centro de inativação (XIC/Xic) localizado em Xq13 em humanos (Brown *et al.*, 1991) e na região sintênica em camundongos. Esta região abriga diversos *loci* de RNAs não codificantes importantes para esse processo.

O mais importante gene para o estabelecimento da ICX é *XIST/Xist* (do inglês, *X inactive-specific transcript*), cuja expressão é exclusiva do X inativo (Xi) (Borsani *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991). Seu RNA não é traduzido e desempenha a função biológica desse gene se espalhando gradualmente a partir de XIC para cobrir todo o cromossomo Xi. Subseqüente a esse passo, o Xi adquire uma série de modificações epigenéticas que resultam no seu silenciamento transcricional.

Dessa forma, o papel de *XIST/Xist* é indispensável na iniciação da ICX, mas levando-se em conta sua expressão constitutiva durante toda a vida celular e a sua contínua associação com o cromossomo Xi, seria esperado que esse gene tivesse um papel também no processo de manutenção da inativação. Os resultados até hoje obtidos propiciam incerteza acerca dessa função.

Brown e Willard (1994) analisaram a atividade transcricional de sete genes submetidos à ICX em alguns híbridos somáticos camundongo/humano que mantiveram fragmentos do Xi humano onde o XIC foi deletado. Esses genes se mantiveram silenciados, mesmo na ausência dessa região, mostrando que sua presença, e conseqüentemente a de *XIST*, não é necessária para a manutenção da ICX.

Em outro trabalho, foram descritas células de leucemia que possuíam um cromossomo isodicêntrico derivado do Xi com ponto de quebra resultando na deleção de *XIST*. Esse cromossomo replicava tardiamente e também mantinha seu estado silenciado (Rack *et al.*, 1994).

Com a disponibilidade da manipulação do genoma do camundongo, estudos mais complexos foram desenvolvidos para esclarecer o envolvimento de *Xist* na manutenção da ICX. Nesse sentido, Csankovszki e colaboradores (1999) demonstraram, através de uma deleção no *Xist* em fibroblastos primários de camundongos, que a perda da expressão desse gene não afeta o estado silenciado já estabelecido no Xi. Após sua deleção, entretanto, as histonas macroH2A1.2 não se encontravam mais preferencialmente associadas ao Xi, sugerindo que o RNA de *Xist* é necessário para a concentração delas nesse cromossomo. Ainda assim, este cromossomo se manteve inativo.

Pouco depois, o mesmo grupo (Csankovszki *et al.*, 2001) obteve novos resultados, mostrando que o RNA do *Xist* contribui para a manutenção do silenciamento gênico em células somáticas de camundongos, onde já ocorreu a ICX. Estes autores demonstraram que a perda da expressão de *Xist* leva a uma desestabilização do estado inativo do cromossomo Xi, levando a um aumento da freqüência de reativação de um transgene (*GFP*) e um gene endógeno (*Hprt*)

ligados ao X. Eles desenvolveram diferentes experimentos combinando desmetilação do DNA (seja pela introdução de uma mutação no gene da DNA metil-transferase Dnmt1 ou pelo uso do agente desmetilador 5-azadC) e inibição da hipoacetilação das histonas (pelo uso de tricostatina A), nas células mutantes para *Xist*. Os autores demonstraram que existe um sinergismo entre *Xist*, metilação do DNA e desacetilação das histonas no silenciamento e manutenção da ICX, uma vez que a soma destes fatores aumenta e assegura a estabilidade da repressão dos genes no Xi.

Trabalhos envolvendo construções onde a expressão de cDNAs de *XIST* e *Xist* podiam ser moduladas também apresentaram resultados distintos entre si. Em camundongos, a expressão de *Xist* só foi capaz de levar ao silenciamento nas primeiras 48 horas após a indução da diferenciação de células ES. Além disso, essa inativação era reversível apenas inicialmente, e após 72 horas de diferenciação o silenciamento se tornava irreversível, independente da perda de expressão de *Xist*, o que é condizente com o não envolvimento desse gene na manutenção do Xi (Wutz e Jaenisch, 2000).

Por outro lado, modelos indutíveis com a versão humana de *XIST* foram capazes de silenciar genes na região flanqueadora mesmo em células somáticas. Adicionalmente, mesmo após o estabelecimento de algumas mudanças na cromatina da região, o silenciamento pode ser revertido desligando-se o *XIST*, mostrando um envolvimento desse gene na manutenção do estado silenciado (Hall *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2007).

Assim, pode-se perceber que o papel do *XIST/Xist* no processo de manutenção da inativação do cromossomo X ainda é conflitante. Mais especificamente em humanos, estudos nesse sentido nunca foram feitos em células normais, o que

pode ainda ser investigado. Foi objetivo desse trabalho, então, avaliar o papel desse gene na manutenção do estado silenciado de Xi em células humanas.

A limitação de qualquer sistema baseado em plasmídeos ou oligonucleotídeos para o estudo de função gênica é a dependência da transfecção. Somente certas linhagens celulares podem ser transfectadas, e transfecções eficientes em células primárias são virtualmente impossíveis (Barton e Medzhitov, 2002). Por outro lado, a entrega retroviral de genes é efetiva para a maioria das linhagens, incluindo muitas células primárias, o que expande grandemente os tipos celulares onde se pode inativar genes pelo uso de sistemas baseados na expressão de shRNAs. Dessa forma, com o intuito de inativar pós-transcricionalmente o gene *XIST* nos fibroblastos humanos GM135-Tel (Vasques 2003), foram produzidas construções utilizando o vetor retroviral pRETRO-SUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002b).

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos fibroblastos humanos e das células 293, o protocolo de transdução de partículas retrovirais, a extração de ácidos nucléicos, o tratamento com DNase e a síntese de cDNA, as PCRs em tempo real, as amplificações dos genes ligados ao X com os SNPs analisados bem como seu seqüenciamento, e as transfecções com lipossomos da linhagem 293 foram descritos no Material e Métodos do Capítulo I.

- PLAQUEAMENTO EM CONCENTRAÇÃO LIMITANTE

Para obtenção de uma sub-linhagem clonal, diluições seriadas de células 293 foram distribuídas em uma placa de 96 poços, de forma que cada coluna (ou seja, 8 poços), contivesse uma das seguintes quantidades de células: 2000, 200, 20, 8, 4, 2, 1, 1/2 (ou 1 célula a cada 2 poços), 1/4 (ou 1 célula a cada 4 poços, etc.), 1/8, 1/16, 1/32. Os poços foram monitorados e somente foram mantidos em cultura aqueles onde uma única célula deu origem a uma sub-população clonal.

- FISH DE RNA

As células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e cresceram até atingir aproximadamente 80% de confluência. As células foram lavadas por 5 minutos com PBS gelado, lavadas por 30 segundos com tampão CSK (100 mM NaCl, 300 mM sacarose, 10 mM PIPES, 3 mM $MgCl_2$), 1 minuto com CSK com 0,5 % de triton, 1 minuto novamente com CSK, e foram fixadas com 4% paraformaldeído por 20 minutos a 37°C. Após um banho de 70 % etanol gelado por 5 minutos, as células foram desidratadas em banhos seriados de 80, 90 e 100% etanol por 2 minutos cada. Com as lamínulas secas, as células foram colocadas em contato com a solução de hibridação [2x SSC; 50% formamida; 10% dextran sulfato; 2mM vanadil ribonucleosídeo (Invitrogen); 0,02% BSA; 1µg/ml tRNA de levedura (Invitrogen)] na qual foi adicionada 200ng de sonda previamente marcada com o kit Dig Nick Translation conforme instruções do fabricante (Roche), desnaturada por 5 minutos a 95°C. A hibridação foi feita durante uma noite a 37°C em câmara umidificada com uma solução 2X SSC, 50% formamida, e para minimizar a evaporação as células foram cobertas com uma

lamínula plástica. No dia seguinte, as células foram lavadas 2 vezes por 5 minutos cada com uma solução 2X SSC, 50% formamida a 45°C, e 2 vezes por 5 minutos cada com uma solução 2X SSC a 45°C. Após um bloqueio por 10 minutos em solução 1% BSA, 2x SSC, 2mM vanadil ribonucleosídeo, 0,02% BSA; 1µg/ml tRNA de levedura (Invitrogen), as células foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina marcado com rodamina na proporção 1:50 em solução 2x SSC, 2mM vanadil, 1% BSA por 30 minutos no escuro. A lamínula com as células foi então lavada 2 vezes por 5 minutos cada com uma solução 4X SSC; 0,1 % tween a 45°C, e montada em lâmina com Vectashield-DAPI. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), do Laboratório de Genética Humana II, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP. Para documentação, as imagens foram capturadas por câmara CCD e processadas utilizando-se o software ISIS (MetaSystem, Altlussheim, Alemanha). Em todos os experimentos foram incluídos um controle sem sonda, somente com o anticorpo anti-digoxigenina e um controle somente com Vectashield-DAPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA INATIVAÇÃO DE *XIST*

O vetor pRETRO-SUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002b) (Fig. 10) foi gentilmente cedido pela Dra Silvia Soddu, do Regina Elena Cancer Institute (Roma, Itália). Esse vetor é baseado no pMSCV e no pSUPER, este último produzido previamente pelo mesmo grupo (Brummelkamp *et al.*, 2002). Ele inclui uma

origem de replicação bacteriana e um gene de resistência a ampicilina para propagação e seleção em *E. coli*. O vetor contém um promotor humano H1, que é dependente da polimerase III e específico para dirigir a expressão de pequenos RNAs, e um gene de resistência a puomicina, permitindo a seleção das células transfectadas em culturas celulares.

Figura 10 – Desenho esquemático do vetor retroviral de interferência por RNA pRETRO-SUPER. Ver texto para descrição dos elementos funcionais.

Foram desenhados oligonucleotídeos a partir da sequência do cDNA de *XIST*, seguindo orientações previamente estabelecidas para localização dos melhores alvos (Shi, 2003; Elbashir *et al.*, 2001b; Brummelkamp *et al.*, 2002), e com as extremidades coesivas em relação ao vetor digerido. Os pares de oligonucleotídeos foram então anelados, formando dois tipos de insertos,

denominados segundo a posição do primeiro nucleotídeo da seqüência alvo: XIST 502 e XIST 850.

O plasmídeo pRETRO-SUPER foi duplamente digerido com *Bgl* II e *Hind* III, e submetido a uma reação de ligação com os oligonucleotídeos previamente anelados. Os produtos das ligações foram digeridos com *Bgl* II, cujo sítio é perdido caso tenha ocorrido a entrada do inserto, permitindo uma triagem mais eficiente de clones positivos assim, já que em caso de re-ligação do vetor sem inserto, este seria digerido. Esses produtos foram transformados em bactérias termo-competentes, e a partir das colônias isoladas obtidas foi preparado DNA plasmideal em pequena escala.

Para testar quanto à presença do inserto, os vetores foram digeridos com *Eco* RI e *Hind* III: o vetor sem inserto gera um fragmento de 227 pb, enquanto as construções geram um fragmento de 295 pb. As construções que apresentaram padrão correto de digestão foram seqüenciadas para confirmação mais precisa da sua integridade.

Para selecionar o vetor cuja seqüência de shRNA podia inativar mais eficientemente o gene alvo, as construções foram primeiramente testadas em uma linhagem celular de fácil transfecção, fácil cultivo, e alta taxa de proliferação: as células transformadas HEK 293 (ou simplesmente 293). Uma curva de resistência a puomicina permitiu determinar a concentração ideal da droga para ser utilizada nas transfecções.

As células foram transfectadas utilizando lipofectamina, e ao final do período de seleção, ao redor de 20 colônias resistentes de cada tipo de transfecção foram isoladas, dissociadas e transferidas para áreas exclusivas de cultivo. Para

confirmar a presença do vetor nestas células, a partir de uma fração delas foi extraído DNA, que foi amplificado com *primers* específicos para o pRETRO-SUPER (Fig. 11).

Figura 11 – Amplificação do vetor sem inserto pRETRO-SUPER (pRS) e de alguns clones celulares positivos. A banda do vetor sem inserto contém 385 pb, e dos clones com as construções, 447 pb. Na primeira canaleta, marcador de peso molecular 1Kb *ladder* (Invitrogen).

Dessa forma, foram obtidos 4 clones celulares com vetor sem inserto, 5 com pRS-XIST-502 e 4 com pRS-XIST-850.

O método quantitativo utilizado foi a PCR em tempo real, amplamente utilizada por sua rapidez na geração de dados quando comparado com outros métodos quantitativos, combinando amplificação e detecção num único passo. Devido à sua alta precisão e sensibilidade em detectar a expressão de mRNAs cujos níveis são usualmente muito baixos (Giulietti *et al.*, 2001), o seu emprego na detecção da inativação pós-transcricional dos genes-alvo pelas construções de shRNA é bastante apropriado e confiável.

Nos testes de validação obteve-se eficiências de amplificação dos genes alvo e controle aproximadamente iguais, e o método de análise comparativo utilizado foi o $\Delta\Delta C_T$ (Applied Biosystems User Bulletin # 2) (disponível em <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/04303859.pdf>).

Todos os clones transfectados com as construções com alvo para inativar o gene *XIST* foram então testadas, juntamente com os clones transfectados com o vetor sem inserto e as células da linhagem 293, ambos como controles (Fig. 12). O clone L3 foi utilizado como amostra calibradora da análise por possuir o valor mais intermediário dentre os demais controles.

Figura 12 – Compilação dos resultados de PCR em tempo real para quantificação relativa de *XIST* em diferentes colônias de células 293 transfectadas com vetores para inativação desse gene. *18S* foi usado como controle endógeno, e a amostra pRS 3 como calibradora. pRS 1 a 4 correspondem aos clones celulares transfectados com o vetor pRETRO-SUPER sem inserto. X5 1 a 4 correspondem aos clones celulares transfectados com a construção *XIST* 502. X8 1 a 5 correspondem aos clones celulares transfectados com a construção *XIST* 850. A amostra NTC (do inglês, *no template control*) é o controle negativo da reação.

Segundo esses resultados, a construção com alvo a partir do nucleotídeo 850 do gene *XIST* não se mostrou efetiva em inativá-lo. Por outro lado, em dois dentre os quatro clones celulares transfectados com a construção *XIST* 502 houve uma

diminuição significativa na expressão do gene (no clone X5 3 houve 79% de inativação, e em X5 4, 78%). Dessa maneira, essa construção se mostrou mais eficiente em inativar pós-transcricionalmente o gene alvo.

A partir da construção pRS-XIST502 e do vetor sem inserto pRETRO-SUPER, a equipe do Dr. Bryan Strauss (Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - InCor-FM-USP) gentilmente colaborou com esse trabalho produzindo as partículas retrovirais.

Uma curva de resistência a puomicina foi feita para determinar a concentração ideal da droga a ser utilizada nos fibroblastos humanos.

O protocolo de transdução das partículas retrovirais nos fibroblastos foi otimizado quanto à concentração de células e de polibreno, e o tempo de transdução. (Esta explicação toda não está adequada para uma tese – vamos conversar.) Dez experimentos de transdução foram realizados, mas em somente 4 foram isoladas células resistentes à puomicina, porém não se obteve colônias isoladas para o estudo de clones de fibroblastos. No caso da eficiência de transdução ser muito baixa, as poucas células resistentes não se proliferavam; e no caso da eficiência ser alta, não se obteve colônias isoladas após o período de seleção, e sim um *pool* de células resistentes.

Esses foram analisados, e os resultados dos experimentos de quantificação relativa de *XIST* por PCR em tempo real foram resumidos na figura 13.

Figura 13 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para quantificação relativa de *XIST* em diferentes pools de fibroblastos humanos transduzidos com pRS-*XIST*502. A coluna pRS indica as células controle, transduzidas com o vetor sem inserto, utilizadas em cada um dos experimentos para representar 100% de expressão do gene. X-, X3A, X3B e X3C se referem aos pools celulares transduzidos com pRS-*XIST*502. Foi utilizada uma média dos valores dos genes normalizadores de *GAPD* e *HMBS*.

Embora tenhamos provado que o alvo *XIST* 502 é capaz de desencadear o silenciamento do gene em pelo menos 57% na média, chegando até a inativações de 78 e 79% em dois clones celulares da linhagem 293 (Fig. 12), todos os experimentos feitos na tentativa de inativar o mesmo gene nos fibroblastos humanos foram insatisfatórios. Somente em um dos quatro pools celulares observou-se uma pequena diminuição de apenas 15% no nível do RNA de *XIST* (Fig. 13).

Uma hipótese que poderia explicar esse fenômeno é que de alguma forma, as células transduzidas podem ter conseguido burlar o processo de interferência

desse RNA. Talvez de maneira similar ao observado em camundongos transgênicos pela microinjeção do vírus da hepatite C (Kato *et al.*, 1996) e em células de carcinoma embrionário murino transduzidas com vetores lentivirais (He *et al.*, 2005), pode ter havido uma hipermetilação do DNA e/ou alguma modificação de histonas nesse fragmento exógeno, levando à inibição da expressão do mesmo. Esse controle na expressão do DNA do nosso vetor retroviral teria que ser tão específico quanto os descritos nesses trabalhos, somente no promotor do shRNA nele codificado, já que as células se mantiveram resistentes à puromicina após algumas passagens, demonstrando ainda haver expressão dessa porção da construção.

Ainda sobre essa hipótese, podemos dizer que ou essas células com o vetor silenciado no DNA genômico apresentariam uma vantagem proliferativa, se tornando preponderantes na cultura, ou pensando de forma mais drástica, somente essas células seriam capazes de sobreviver. Segundo essa última possibilidade, a função de *XIST* em células normais humanas seria de extrema importância mesmo após o pleno estabelecimento da ICX, indicando não só um papel desse gene na manutenção desse processo, como também na viabilidade das células humanas normais, divergindo de trabalhos desenvolvidos tanto em células murinas (Csankovski *et al.*, 1999), quanto em híbridos somáticos camundongo/humano (Brown e Willard, 1994) e células humanas de leucemia (Rack e colaboradores, 1994).

Para investigar esta última hipótese, entretanto, um desenho experimental diferente seria necessário, onde a expressão dos shRNAs para inativação de *XIST* estivesse controlada por um promotor indutível. Somente dessa forma, após a obtenção de células positivas para a presença do vetor, a indução ou não de

morte celular modulada pela indução da inativação desse gene esclareceria indubitavelmente se *XIST* possui função na manutenção da ICX e na viabilidade das células.

- ANÁLISE DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DE *XIST* EM FIBROBLASTOS HUMANOS

Apesar da baixa taxa de silenciamento do gene *XIST* obtida na linhagem de fibroblastos humanos (15%), decidimos testá-los em busca de algum efeito biológico que essa modificação no estado normal das células pudesse haver gerado. Como é a própria molécula de RNA quem desempenha a função biológica, talvez uma pequena alteração pudesse causar algum efeito celular. Aliás, já foram publicados trabalhos que notaram perturbações decorrentes de mudanças também pequenas no nível circulante do RNA alvo. Por exemplo, Di Stefano e colaboradores (2004) observaram um efeito biológico em células de carcinoma de cólon causado por uma pequena inibição da expressão do gene *HIPK2*.

Investigamos se a alteração encontrada no nível do RNA *XIST* foi suficiente para perturbar o estado inativo dos genes submetidos ao processo de ICX levando à expressão bi-alélica dos genes que apresentavam expressão mono-alélica na situação controle. Alguns genes que escapam à ICX também foram incluídos na análise para certificar os resultados da metodologia utilizada. Além disso, como já citado, pools de células transduzidas com o vetor sem inserto também foram seqüenciados como controles (dados não mostrados). Não houve re-ativação de nenhum dos 9 genes submetidos à ICX, nem alteração no padrão de expressão de *XIST* (Tab. 2).

Esses resultados indicam que a manutenção do processo de ICX não é perturbada por esse nível de diminuição da expressão de *XIST*. Imaginamos que a alteração na quantidade desse RNA foi mesmo muito pequena e insuficiente para se permitir a definição de conclusões a respeito do seu papel na manutenção da ICX.

Tabela 2 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel (DNA e cDNA) e em sua sub-linhagem X3A (cDNA X3A).

Gene	SNP	DNA	cDNA	cDNA X3A
GYG2	A/T	A/T	T	T
FAM16AX	C/T	C/T	C/T	C/T
TBL1X	A/G	A/G	A	A
PIGA	A/T	A/T	A	A
ZFX	C/T	C/T	C/T	C/T
TCTE1L	A/T	A/T	T	T
MAOA (W)	T/C	T/C	T	T
MAOA (M)	A/G	A/G	A	A
SUV39H1	C/T	C/T	C	C
Centrômero				
XIST (1)	A/G	A/G	A	A
XIST (2)	G/A	G/A	G	G
XIST (4)	C/A	C/A	A	A
ARMCX3	A/G	A/G	G	G
TCEAL4	C/T	C/T	T	T
GPC4	C/T	C/T	T	T
Heterozigotos 15/38				

Para excluir a possibilidade de ter ocorrido re-ativação do Xi em uma porcentagem muito pequena de células, o que poderia não ter sido detectado nas análises de expressão alelo-específica, submetemos a linhagem X3A a um período de tratamento com o suplemento HAT. Como anteriormente citado, devido a uma seleção prévia das células aqui utilizadas, trabalhamos com uma sub-população celular que apresenta um fenótipo HPRT⁻, já que essas células são heterozigotas para esse gene mas toda a sub-população apresenta o alelo mutado do gene no Xa. Dessa forma, somente eventuais células que apresentassem reativação do Xi, e conseqüente reativação do alelo normal do gene, seriam resistentes ao meio seletivo com HAT. Dois experimentos independentes, realizados em triplicatas, e utilizando 10⁶ células não geraram nenhuma colônia resistente.

Sabendo, então, que essa pequena diminuição da quantidade de XIST não foi suficiente para causar um distúrbio na manutenção da ICX, procuramos uma maneira para verificar se ao menos a cinética de ligação desse RNA ao cromossomo X pudesse ter sido modificada. Escolhemos o FISH de RNA como metodologia, para mostrar qualitativamente se a marcação de *XIST* nas células estava alterada.

Três sondas diferentes foram testadas, cada uma referente a uma porção distinta do cDNA de *XIST* (Fig. 14A) para escolha daquela que produzia um sinal de marcação mais intenso e gerava menos marcação inespecífica de background. Os vetores contendo esses fragmentos clonados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Brian Hendrich, da Case Western Reserve University (EUA). Uma vez definida a melhor sonda, 150 intérfases da linhagem controle e dos fibroblastos onde a expressão de *XIST* se encontra diminuída (X3A) foram observadas sobre

microscópio de fluorescência e em todas elas foi encontrada uma área de marcação de *XIST* (Fig. 14B). Uma análise qualitativa da marcação não foi possível de ser realizada devido à grande variação de intensidade e tamanho do sinal entre as células de um mesmo experimento que se encontrou nesse tipo de protocolo.

Dessa forma, nenhuma alteração na manutenção da ICX, nem na ligação do RNA de *XIST* ao cromossomo Xi pode ser encontrada quando esse gene teve sua expressão diminuída em 15% em fibroblastos humanos.

Figura 14 – FISH de RNA utilizando sondas contra *XIST*. Em A, posição e tamanho dos fragmentos testados como sondas em relação ao cDNA desse gene, cujos exons se encontram enumerados. O fragmento C14 foi o que apresentou os melhores resultados. Em B, análise dos fibroblastos GM135-Tel com marcação de *XIST* em rosa; em azul, marcação dos núcleos celulares com DAPI.

- ANÁLISE DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DO GENE *XIST* NA MANUTENÇÃO DO PROCESSO DE ICX EM CÉLULAS 293

Como não foi possível obter células normais com uma alta inibição do RNA de *XIST*, utilizamos um modelo celular alternativo para analisar o papel desse gene na manutenção do estado inativo do Xi em humanos. Mesmo em sistemas tumorais, esta possível função desse gene foi pouco explorada até hoje, e um único trabalho foi descrito nesse sentido (Rack *et al.*, 1994).

Escolhemos utilizar a linhagem de células transformadas derivadas de rim embrionário HEK-293 (ou simplesmente 293) por ser de fácil manuseio em cultura. Trata-se de uma linhagem hipotriplóide, com cerca de 30% das células apresentando 64 cromossomos, dentre eles algumas translocações comuns a todas as células e outros marcadores menos freqüentes, e com 3 cromossomos X (ATCC #CRL-1573, www.atcc.org).

Para obtermos uma sub-linhagem com o mesmo X ativo em todas as células, foi realizado um plaqueamento limitante das células 293, de modo que uma linhagem clonal foi obtida com desvio completo de ICX (293 F6). Com isso, de forma similar ao modelo de fibroblastos até então utilizado, seríamos capazes de detectar a reativação de qualquer um dos Xi_s presentes nessas células.

Para certificar que a sub-linhagem 293 F6 possui uma origem clonal, ela foi genotipada para os mesmo SNPs nos genes do cromossomo X previamente utilizados, e para aqueles informativos, a expressão alelo-específica foi determinada. Conforme esperado, detectamos expressão de um só alelo dos genes submetidos à ICX, confirmando a origem clonal da sub-linhagem. Assim, um painel de expressão também foi construído para essas células (Anexo 4).

Embora possuam origem clonal, a análise do cariótipo das células 293 F6 pelo Laboratório de Genética Humana do IB-USP mostrou variação quanto ao número de cromossomos presentes similar ao descrito em bancos de células (www.atcc.org). Aproximadamente 30% delas apresentavam 64 cromossomos (34%), e o restante possuía 62 (10%), 63 (43%) ou 65 cromossomos (13%). Várias translocações foram observadas, mas não caracterizadas. Quanto ao número de X, 77% das células possuíam 3 destes cromossomos (ou 2 mais uma translocação com fragmento deles derivados); aproximadamente 17% das células possuíam 2 X_s, e uma baixa porcentagem delas possuía 1 ou 4 X_s (3% de cada).

Como a análise da expressão alelo-específica do X mostrou desvio de inativação, com o mesmo Xa presente em todas as células, essa variação do cariótipo deve ter ocorrido após a derivação da linhagem clonal devido à instabilidade do genoma, característica de linhagens transformadas.

A sub-linhagem 293 F6 foi, então, transfectada com o vetor que codifica shRNAs com alvo em *XIST* (pRS-XIST502) ou com o vetor sem inserto (pRETRO-SUPER). Após um período de seleção, 6 colônias contendo o vetor sem inserto e 22 colônias contendo o vetor para inativação do gene foram isoladas.

Com a observação dos clones celulares de pRS-XIST502, notou-se que alguns apresentavam crescimento notavelmente mais lento (X- 13, X- 16, X- 17, e principalmente X- 12 e X- 23) quando comparados ao restante deles. A busca por clones que apresentavam maior eficiência de inativação pós-transcricional de *XIST* foi iniciada por esses clones, então, e mais alguns aleatoriamente escolhidos (X- 1 e X- 2). A análise dos níveis do RNA de *XIST* foi feita por PCR em tempo real e os resultados desses experimentos se encontram sintetizados na figura 15.

Figura 15 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para quantificação relativa de *XIST* nos clones celulares da sub-linhagem clonal 293 F6. A coluna pRS indica a média da expressão desse gene nos clones transduzidos com o vetor sem inserto, usada como amostra calibradora. Foi utilizada uma média dos valores dos genes normalizadores *HPRT1*, *GAPD* e *HMBS*.

Condizente com os resultados preliminares obtidos nos testes de eficiência dos alvos para inativação de *XIST* (Fig. 12), foram obtidos clones celulares da linhagem clonal 293 F6 com redução de até 84% nos níveis desse RNA. Interessante notar que os clones de crescimento mais lento (X- 12 e X- 23) foram aqueles que apresentaram os menores valores de expressão de *XIST* (Fig. 15).

A expressão alelo-específica do clone X- 23 foi analisada com o uso dos SNPs, mas nenhuma alteração na manutenção da ICX foi encontrada, já que os genes heterozigotos submetidos a esse processo mantiveram expressão mono-alélica (Tab. 3).

Tabela 3 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem 293 F6 (DNA e cDNA) e em sua sub-linhagem X- 23 (cDNA X- 23).

Gene	SNP	DNA	cDNA	cDNA X- 23
FAM16AX	C/T	C/T	C/T	C/T
TM4SF2	A/G	A/G	A	A
MAOA (W)	T/C	T/C	T	T
MAOA (M)	A/T	A/T	A	A
Centrômero				
OPHN1	C/T	C/T	C	C
XIST (1)	A/G	A/G	G	G
XIST (3b)	A/G	A/G	A	A
ATRX	C/G	C/G	C	C
ATP7A	C/G	C/G	C	C
ARMCX3	A/G	A/G	A	A
ZNF75	A/G	A/G	A	A
CXORF6	A/G	A/G	G	G
VBP1	A/G	A/G	A	A
CLIC2	G/T	G/T	G	G
Heterozigotos 15/34				

De forma semelhante ao investigado nos fibroblastos, uma análise quantitativa por FISH de RNA usando uma sonda para *XIST* foi realizada para investigar se a ligação desse RNA aos cromossomos X_i pudesse ter sido modificada no clone celular X- 23. Duzentos e quarenta intérfases da linhagem controle (293 F6) e desse clone foram avaliadas sobre microscópio de fluorescência (Fig. 16). Exemplos de células com nenhum, 1, 2 ou 3 sinais de *XIST* podem ser vistos na figura 17.

Figura 16 - Avaliação do número de sinais de *XIST* por FISH de RNA em células 293 F6 e no clone X- 23. A barra representa o desvio da média dos valores obtidos em dois experimentos independentes.

Figura 17 – FISH de RNA das células 293 F6 utilizando como sonda um fragmento do cDNA de *XIST* (marcação em rosa). Em azul, marcação do núcleo celular com DAPI.

As diferenças na quantidade de células 293 F6 e X-23 contendo os distintos números de sinais de marcação de *XIST* não são significativas, exceto para a categoria com nenhuma marcação, onde foi encontrado $p=0,029$ utilizando teste T student (Fig. 16).

Os únicos dois trabalhos que avaliaram o papel de *XIST* na manutenção do estado inativo do Xi humano foram realizados em sistemas celulares talvez não adequados. Brown e Willard (1994) utilizaram híbridos somáticos contendo diferentes deleções no Xi. Os fragmentos derivados do Xi humano dessas células se encontravam fora de seu contexto natural, e há possibilidade de que eles estivessem hiper-metilados, de forma similar ao que já foi observado com a introdução de outras seqüências exógenas em núcleos celulares murinos (Kato *et al.*, 1996; He *et al.*, 2005). A favor dessa hipótese, tratamentos dessas células híbridas com os agentes desmetilantes 5-aza-citidina e 5-aza-deoxicitidina feitos pelos autores não levaram a um aumento na freqüência da re-ativação de genes (Brown e Willard, 1994), conforme se esperaria encontrar (Mohandas *et al.*, 1981). O segundo trabalho (Rack *et al.*, 1994) estudou a atividade de um cromossomo X isodicêntrico com deleção de XIC, concluindo que naquelas condições o X se mantinha inativo mesmo na ausência de *XIST*. No presente trabalho, pretendia-se re-avaliar o papel de *XIST* na manutenção do Xi em células humanas.

Apesar de conseguirmos isolar clones de células transformadas 293 com até 84% de redução de RNA de *XIST*, não foi possível obter-se nenhum clone ou pool celular de fibroblastos não transformados com a mesma diminuição daquele RNA. Isto sugere que a expressão de *XIST* seja importante para a viabilidade de células 46,XX, porém esta hipótese deve ser testada com outro desenho experimental. Mesmo assim, pode-se ver que 15% de redução da expressão de *XIST* naquelas

células não leva à desassociação do RNA do *XIST* com o Xi e nem à expressão gênica a partir daquele cromossomo.

Por outro lado, a diminuição de 84% do RNA de *XIST* não levou a distúrbios na manutenção na ICX em células 293, onde também não se observou um número menor de núcleos com a ligação de *XIST* nos Xi e nem reativação deste cromossomo. É interessante notar que as células com menor expressão de *XIST* eram as de crescimento mais lento (dados não mostrados).

Em conjunto, esses dados mostram que uma pequena expressão de *XIST* é suficiente para seu RNA se manter associado ao Xi, e sugerem um papel importante deste gene na viabilidade celular que deve ser mais bem investigado.

CAPÍTULO IV

ANÁLISE DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DO GENE

DNMT1 EM FIBROBLASTOS HUMANOS

RESUMO

O papel de DNMT1 na manutenção do processo de inativação do cromossomo X humano ainda é conflitante, tanto na repressão dos genes submetidos a esse processo, quanto no controle transcricional do gene *XIST*, e foi objetivo desse trabalho tentar elucidar essas funções. Para isso, um modelo de fibroblastos não transformados foi empregado junto com vetores que codificam shRNAs com código para inativação desse gene.

Foi possível demonstrar que *DNMT1* é necessária para a manutenção da metilação global do genoma em células humanas não transformadas, e que existe um mecanismo de compensação da inibição desse gene que leva ao aumento da expressão de *DNMT3B*. Ainda se observou que a repressão de *DNMT1* não é suficiente para levar à reativação de genes no cromossomo X inativo. Além disso, a desmetilação encontrada nos promotores de *MAOA* e *XIST* não foi suficiente para levar à expressão destes genes nos cromossomo X inativo e ativo, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A metilação das citosinas presentes em dinucleotídeos CpG é crítica na regulação temporal e espacial da expressão dos genes. Ela está envolvida em diferentes processos biológicos como a embriogênese, tumorigênese e o *imprinting*, além de possuir um importante papel na manutenção da estabilidade do genoma (revisto em Hermann *et al.*, 2004; e Robertson, 2005).

Essa modificação epigenética desempenha uma função importante também no processo de ICX, em particular na manutenção do silenciamento gênico no Xi, onde as seqüências promotoras dos genes encontram-se fortemente metiladas, em contraste ao Xa, que é hipometilado (Yen *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1984).

Até hoje, cinco genes pertencentes à família das DNA metiltransferases foram descritos em camundongos e humanos: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3L (Bestor *et al.*, 1988; Yoder e Bestor, 1998; Okano *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 1998b; Robertson *et al.*, 1999; Aapola *et al.*, 2000; Bourc'his *et al.*, 2001). Dnmt2 possui baixa atividade de metil-transferase, que só foi detectada *in vitro* (Hermann *et al.*, 2003), e sua função parece estar mais relacionada à metilação de um tRNA ao invés de DNA (Jeltsch *et al.*, 2006). Dnmt3a e Dnmt3b são metilases *de novo*, ou seja, estabelecem novos padrões de metilação e, portanto, são importantes no início do desenvolvimento (Okano *et al.*, 1999). Já Dnmt3L não possui o motivo catalítico característico, presente nas outras metiltransferases; seu papel na repressão da transcrição parece estar ligado ao fato que ela se liga à histona desacetilase HDAC1 mais propriamente do que pela metilação do DNA (Aapola *et al.*, 2000; Bourc'his *et al.*, 2001).

A enzima DNA (citosina-5) metiltransferase 1 (DNMT1/Dnmt1) é tida como a principal metilase de manutenção, apresentando uma forte preferência por DNA hemi-metilado (revisto em Bestor, 2000). Ela é expressa constitutivamente e é responsável por copiar os padrões de metilação para a nova fita depois da replicação do DNA (Goyal *et al.*, 2006).

Estudos com células ES e animais nocautes foram essenciais para identificar as funções da Dnmt1 em camundongos. A letalidade observada nos embriões Dnmt1^{-/-} (Li *et al.*, 1992) pode ser explicada pela desmetilação global do DNA,

assim como pela expressão bialélica de genes que sofrem *imprinting* (Li *et al.*, 1993). Observou-se, também, reativação de um marcador no X em tecidos derivados do epiblasto (Sado *et al.*, 2000).

A investigação de células ES nocautes para Dnmt1 mostrou ainda de-repressão do *Xist* em células XY e sua expressão bialélica em células XX devido à ausência de metilação diferencial na região 5' (Beard *et al.*, 1995; Panning e Jaenisch, 1996; revisto em Pereira e Vasques, 2000). Como consequência, ocorre inativação do único X presente nas células masculinas e dos dois X das femininas.

Esses resultados levaram à conclusão que em camundongos a atividade da Dnmt1 é responsável pela metilação global do DNA e é importante na ICX, tanto pelo controle da iniciação desse processo, uma vez que controla a expressão de *Xist*, quanto pelo controle transcricional de genes ligados ao Xi.

A alteração dos padrões normais de metilação dos promotores de oncogenes e genes supressores de tumor são eventos comuns no processo carcinogênico (revisto em Grønbaek *et al.*, 2007), e dessa forma o estudo das metilases humanas tem sido amplamente realizado em linhagens tumorais.

Rhee e colaboradores (2000) inativaram o gene da DNMT1 por recombinação homóloga na linhagem de carcinoma HCT116. Diferentemente do encontrado em camundongos, na ausência dessa enzima apenas 20% da metilação do DNA foi perdida, e os padrões de metilação foram mantidos nos elementos *Alu*, e nos genes *TIMP-3* e *p16^{INK4a}*, um supressor de tumor.

Em um trabalho complementar, o mesmo grupo (Rhee *et al.*, 2002) inativou o gene da DNMT3B, uma metilase *de novo*, e observaram que apenas 3% da

metilação global foi perdida. Porém, células duplo-nocaute para DNMT1 e DNMT3B apresentaram desmetilação de cerca de 95% do DNA, incluindo as seqüências Alu e Satélite 2, e a ilha CpG de dois genes analisados. Os autores concluíram que, pelo menos nessas células humanas, DNMT1 e DNMT3B têm funções sobrepostas e cooperam para manter a metilação global do DNA.

Posteriormente, diversos estudos foram relatados envolvendo o silenciamento de DNMT1 através do uso de siRNAs em diferentes linhagens de carcinoma humano. Robert e colaboradores (2003) também estudaram os efeitos da inibição desse gene na mesma linhagem HCT116, e observaram que houve grande redução na metilação global do DNA, o que indicaria que, contrário às conclusões de Rhee e colaboradores (2000; 2002), essa enzima é suficiente na manutenção da metilação global do genoma, como descrito para camundongos. Entretanto, estudando células de carcinoma de ovário, Leu e colaboradores (2003) observaram que DNMT1 tem um papel importante na manutenção da metilação do DNA, mas a deficiência da DNMT1 e da DNMT3B levou a uma desmetilação global duas vezes maior que a observada com a supressão da DNMT1 somente. Por outro lado, Ting e colaboradores (2004) demonstraram que a inibição da expressão de *DNMT1* na mesma linhagem celular HCT116 não afetou a metilação global do DNA, corroborando os resultados de Rhee e colaboradores (2000; 2002).

Com a repressão dessa enzima também foi relatada a diminuição da metilação nos promotores de diversos genes, com suas respectivas de-repressões em células de carcinoma de pulmão, mama e pâncreas (Suzuki *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003; Sowińska *et al.*, 2007).

Em 2006, entretanto, um trabalho inusitado de Egger e colaboradores identificou uma forma truncada, porém ativa, da proteína DNMT1 nas células HCT116 onde esse gene havia sido nocauteado por Rhee e colaboradores (2000; 2002). Esta hipoforma apresenta partes do domínio regulatório N-terminal deletadas, entretanto possui preservado o domínio C-terminal catalítico. Inativando essas formas truncadas de DNMT1 com siRNAs, os autores observaram diminuição da viabilidade das células e dos níveis de metilação de diferentes tipos de seqüências. Dessa forma, os autores concluíram que DNMT1 pode ser essencial para manutenção da metilação do DNA, proliferação celular e sobrevivência de células de câncer. Os autores argumentam, então, que a presença dessas hipoformas mascarou o fenótipo real que a ausência de DNMT1 deveria causar; eles também sugeriram que um fenótipo nulo completo não deveria produzir células viáveis, de forma similar ao observado nos estudos com camundongos.

De fato, pouco tempo depois Chen e colaboradores (2007) geraram um novo nocaute por recombinação homóloga de *DNMT1* nas células HCT116. Além de um alelo nulo para esta enzima, um alelo condicional para deleção de *DNMT1* foi gerado com a inserção de sítios de *loxP* entre os vários exons que codificam o domínio catalítico da proteína. A deleção dessas regiões pelo uso de uma recombinase *Cre* levou a um fenótipo grave, com a permanência das células na fase G2 do ciclo celular. Mesmo escapando aos poucos desta fase, as células continuaram mostrando defeitos mitóticos e sofreram apoptose.

Frente a tantos resultados conflitantes em linhagens de carcinoma humano, ainda permanece incerto o papel de DNMT1 na manutenção da metilação global do DNA em humanos, principalmente em células normais, onde nenhum estudo foi realizado.

O papel da DNMT1 e DNMT3B no controle da expressão de *XIST* foi investigado por Vasques e colaboradores (2005). Utilizando as células HCT116 nocautes para esses genes (Rhee *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2002), foi observada manutenção da repressão de *XIST*, mesmo com uma desmetilação parcial da região 5' desse gene nas células duplo nocaute. Esses resultados demonstram que, embora causem a desmetilação global do DNA, a inativação dessas enzimas não foi suficiente para modificar o padrão de metilação de *XIST* a ponto de alterar seu padrão de expressão (Vasques *et al.*, 2005), talvez pela ação residual desempenhada pelas hipoformas de DNMT1 presentes nessas células (Egger *et al.*, 2006). Pode-se resumir que as conclusões a respeito do papel da metiltransferase DNMT1 na manutenção global da metilação do DNA ainda são controversas, incompletas a respeito do controle da expressão do gene *XIST*, e inexploradas no processo de manutenção da ICX. Além disso, todos os trabalhos feitos com células humanas envolviam células de carcinoma, tornando necessária a investigação dessas funções em células normais, o que pode vir a auxiliar no esclarecimento das diferenças encontradas com o uso de diferentes metodologias e linhagens celulares. Dessa maneira, foi objetivo desse trabalho analisar os efeitos biológicos advindos da repressão de DNMT1 em células humanas não-transformadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo dos fibroblastos humanos e das células 293, as transfecções com lipossomos, o protocolo de transdução de partículas retrovirais, a extração de

ácido nucléicos, o tratamento com DNase e a síntese de cDNA, as PCRs em tempo real, as amplificações dos genes ligados ao X com os SNPs analisados bem como seu seqüenciamento, as informações gerais do seqüenciamento após tratamento de bissulfito de sódio e a análise do promotor de *MAOA* estão descritos no Material e Métodos do Capítulo I.

- ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO GLOBAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

10^6 células em tubos de 1,5 ml foram lavadas com 1 ml de tampão PBSTB (tampão PBS suplementado com 0,1% Tween 20; 1% BSA), fixadas com 200 μ l de 0,25% paraformaldeído em PBS a 37°C por 10 minutos, lavadas novamente com 1 ml de PBSTB e fixadas com metanol 88% em H₂O a -20°C por pelo menos 30 min. Após nova lavagem com PBSTB, as células foram tratadas com 200 μ l de 2 N HCl a 37°C por 30 min e neutralizadas com o mesmo volume de 0,1M borato de Na (pH 8,5). Após uma lavagem com PBSTB, as células foram bloqueadas com soro de camundongo 10% em PBSTB a 37°C por 20 minutos, incubadas em 100 μ l do anticorpo anti-5-metil-citosina (Calbiochem, 1 μ g/ml em PBSTB, ou 1/5000) a 37°C por 45 minutos, seguida de uma lavagem com PBSTB e marcação com 100 μ l de anticorpo anti-mouse IgG conjugado com Alexa 488 (1/1000 em PBSTB) por 30 a 45 minutos. Finalmente as células foram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspendidas em 400 μ l de PBS para leitura no FACS. Como controle, células foram marcadas somente com o anticorpo secundário.

- DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMA SENSÍVEL À METILAÇÃO

5 µg de DNA de cada um dos pools celulares com diminuição da expressão de DNMT1 foi digerido overnight com 40U da enzima *Hpa* II ou da enzima *Msp* I, utilizando tampão fornecido pelo fabricante (New England Biolabs). As amostras foram separadas em gel de agarose 0,8% 1X TAE, em solução 1X TAE a 35V a por aproximadamente 6 horas, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen) e observado sob luz UV.

- SEQÜENCIAMENTO APÓS TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

- AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5' DO GENE *XIST*

Primers específicos para uma região de aproximadamente 1 Kb compreendendo 29 dinucleotídeos CpG entre o promotor e o primeiro exon do gene *XIST* foram desenhados com o auxílio do grupo da Dra. Anamaria A. Camargo, do Hospital A. C. Camargo. A amplificação utilizando os *primers* externos F1 e R1 gera um fragmento de 997pb; o uso da dupla interna F2 e R3 gera um fragmento de 433pb, e da dupla F3 e R2, um de 511pb (fig. 18). A seqüência dos iniciadores segue abaixo.

RAQXISTF1	5' – TTAGTTAATGTTTTTTTTTGGTATG – 3'
RAQXISTR1	5' – CACCACCAAATAATCAACAAC – 3'
RAQXISTF2	5' – ATTTTTTTTTTTTTGTTTTTATTGGG – 3'
RAQXISTR2	5' – TTCCAAAAAATACAACAACCC – 3'
RAQXISTF3	5' – GGAATTATTTTTTGGTGATATTTTTG – 3'
RAQXISTR3	5' – CAAAAATATCACCAAAAATAATTCC – 3'

O programa de amplificação inclui 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de um ciclo (94°C por 30 segundos, A por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), 5 ciclos (94°C por 30 segundos, B por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), e 35 ciclos (94°C por 30 segundos, C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), seguido de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Para a amplificação com os *primers* F1/R1, A = 45°C, B = 48°C e C = 50°C. Para as PCRs com os *primers* F2/R3 e F3/R2, A = 52°C, B = 54°C e C = 55°C.

Figura 18 – Representação da sequência da região 5' e início do primeiro exon do gene *XIST*. A posição dos *primers* está sublinhada na sequência, e os dinucleotídeos CpG analisados estão destacados em vermelho e numerados. Também estão assinalados os dinucleotídeos previamente analisados por ensaios com enzima de restrição por Vasques e colaboradores (2005).

- CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA INATIVAÇÃO DE *DNMT1*

Dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados a partir da sequência do cDNA de *DNMT1*, e após serem então anelados, formaram dois tipos de insertos, denominados segundo a posição do primeiro nucleotídeo da sequência alvo: DNMT1-377 e DNMT1-515. Esses insertos foram ligados ao plasmídeo pRETRO-SUPER e as construções obtidas foram transfectadas na linhagem celular 293 para determinar qual alvo seria mais eficiente em inativar *DNMT1*, usando como controle a transfecção do vetor sem inserto.

Dessa forma, foram obtidos 4 clones com vetor sem inserto, quatro com DNMT1-377, cinco com DNMT1-515, além de pools celulares com cada um desses vetores, e os níveis de RNA DNMT1 foram medidos por PCR em tempo real. Os resultados de quantificação relativa das diferentes amplificações usando os genes *GAPD*, *HPRT1* ou *HMBS* como controles endógenos foram bastante similares, e foram reunidos para se gerar um valor único que pudesse representá-los. Em testes preliminares, quase não houve diferença de expressão de *DNMT1* entre a linhagem parental e os clones de células transfectados com o vetor sem inserto. Dessa forma, somente o clone pRS 4 foi aqui mostrado para representá-los, por apresentar valores de quantificação relativa muito similares à média dos outros clones. O pool dos clones celulares transfectados com o vetor sem inserto se mostrou bastante condizente com os clones individuais, e foi, portanto, utilizado como amostra calibradora (Fig. 19).

Figura 19 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para quantificação relativa de *DNMT1* em diferentes colônias de células 293 transfectadas com vetores para inativação desse gene. *GAPD*, *HPRT1* e *HMBS* foram usados como controles endógenos, e a amostra pRS pool como calibradora. pRS 4 corresponde a um dos clones celulares transfectados com o vetor pRETRO-SUPER vazio. D3 1 a 4 correspondem aos clones celulares transfectados com a construção DNMT1-377. D5 1 a 5 correspondem aos clones celulares transfectados com a construção DNMT1-515. A amostra NTC é o controle negativo da reação.

Ambas as construções interferiram na expressão do gene alvo, mas DNMT1-515 se mostrou muito mais eficiente em inativá-lo, chegando a diminuir sua expressão em até 78%, como no caso do clone celular D5 2.

Assim, a partir da construção pRS-DNMT1-515 e do vetor sem inserto pRETRO-SUPER, partículas retrovirais foram produzidas pela equipe do Dr. Bryan Strauss (Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - InCor-FM-USP).

Apesar das otimizações no protocolo de transdução, de 10 experimentos somente 5 foram bem sucedidos e resultaram em pools celulares de fibroblastos humanos resistentes à puromicina. Os resultados dos experimentos de quantificação relativa de *DNMT1* foram resumidos na figura 20.

Figura 20 - Compilação dos resultados de PCR em tempo real para quantificação relativa de *DNMT1* nos diferentes pools de fibroblastos humanos transduzidos com pRS-DNMT1-515 (D-, D-2, D3A, D3B e D3C). A coluna pRS indica as células controle, que foram transduzidas com o vetor sem inserto, utilizadas em cada um dos experimentos como amostra calibradora para representar 100% de expressão do gene. Foi utilizada uma média dos valores dos genes normalizadores de *GAPD* e *HMBS*.

O pool celular D3B foi escolhido para as análises posteriores dos efeitos do silenciamento de *DNMT1*, já que se obteve uma diminuição de 68% na expressão desse gene (Fig. 20). Esse valor é bastante similar ao que havia sido previamente

determinado como eficiência desse alvo nos experimentos pilotos em células 293 (onde se obteve uma média de 48% de inativação, com um clone celular apresentando 78%) (Fig. 19).

Para certificar que essa diminuição dos níveis de RNA se refletiu ao nível das proteínas, foi realizado western blot de algumas dessas células utilizando anticorpo monoclonal anti-DNMT1 (Fig. 21). Como pode ser claramente observado, D3B de fato apresenta quantidades reduzidas dessa enzima.

Figura 21 – Análise por Western blot de extratos celulares dos pools de fibroblastos com DNMT1 reprimida. No quadro superior, marcação com anticorpo anti-DNMT1; no quadro inferior, controle de aplicação com anticorpo anti-β actina.

Para averiguar se haveria algum efeito compensatório dos outros membros da família das DNMTs pela diminuição de expressão de DNMT1, foi quantificada por PCR em tempo real a expressão dos genes DNMT2, 3A e 3B (Fig. 22).

Figura 22 – Quantificação relativa de outras DNA metil-transferases nos fibroblastos humanos da linhagem D3B, onde DNMT1 foi inativada pós transcricionalmente.

Como podemos notar, nessas células onde a expressão de *DNMT1* foi reprimida, ocorreu um aumento da expressão de *DNMT3B*. Este resultado é surpreendente, uma vez que esta última é tida como uma metilase *de novo*, e por isso não se esperava que ela pudesse compensar alguma diminuição da metilase de manutenção DNMT1, embora diferentes trabalhos já tenham relatado um papel sobreposto dessas duas enzimas em diferentes linhagens de carcinoma humano (Rhee *et al.*, 2002; Leu *et al.*, 2003). Aparentemente, então, na falta de DNMT1, DNMT3B assume parte de sua função em metilar seqüências hemi-metiladas.

Como DNMT2 possui baixa atividade de metil-transferase, é compreensível que seu nível de expressão não tenha sido alterado na falta de DNMT1, assim como a DNMT3A, cuja função é sobreposta à de DNMT3B.

- ANÁLISE DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DE *DNMT1* EM FIBROBLASTOS HUMANOS

Nas células do pool de fibroblastos D3B queríamos investigar três possíveis tipos de efeitos biológicos advindos da diminuição de DNMT1: alteração no padrão de metilação global do DNA, alteração na estabilidade da manutenção do processo de ICX e mudanças no padrão de metilação do promotor do gene *XIST*.

Para avaliar o nível de metilação global do DNA foi feita uma análise da marcação das células com um anticorpo monoclonal específico contra 5-metil-citosina por citometria de fluxo (Milutinovic *et al.*, 2003). Esse procedimento foi desenvolvido em colaboração com a Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis, na Universidade Federal de São Paulo. Foi comparado o estado de metilação das células com diferentes níveis de expressão de DNMT1 com aquelas da linhagem original (GM135-Tel G9). Foi observado um nível de marcação do anticorpo contra 5-metil-citosina (5-mC) condizente com o nível de expressão dessa metiltransferase: quanto menor a expressão desse gene, menor a porcentagem de células marcadas pelo anticorpo (Fig. 23).

Figura 23 – Estado de metilação dos fibroblastos humanos com diferentes níveis de silenciamento de *DNMT1*. Resultado da análise das células por citometria de fluxo após marcação com anticorpo anti-metil-citosina (gráficos à direita). Células marcadas somente com o anticorpo primário foram usadas como controle negativo (gráficos à esquerda). O valor apresentado em cada quadro representa a porcentagem de células positivas da amostra.

A porcentagem de células marcadas da linhagem não transfectada foi menor que a esperada, o que seria em torno de 70%. Porém, essa população de células apresentou um perfil bastante diferenciado comparado às outras amostras, com células de tamanho e granulosidade heterogêneos, o que poderia justificar esse resultado.

Ainda que consideremos o pool celular D3A como controle desse experimento, já que nessa população de células a expressão de DNMT1 apresenta-se somente 14% silenciada, mesmo assim os clones D3B e D3C exibiriam uma baixa taxa de marcação do anticorpo (22,44% e 35,86%, respectivamente). De qualquer maneira, esse resultado é extremamente interessante, já que pela primeira vez algum estudo analisa os efeitos biológicos da ausência e/ou diminuição dessa metiltransferase em células humanas de uma linhagem normal, e não derivadas de tumores.

Com esse mesmo intuito, também analisamos o padrão de digestão do DNA dessas células por enzimas de restrição sensíveis à metilação (Rhee *et al.*, 2000 e 2002), em experimentos bastante simples, mas ilustrativos nesse sentido. Os DNAs dos pools foram digeridos com a enzima *Hpa* II, que não cliva sítios metilados, e DNA das células controle também foi digerido com seu isoquísômero *Msp* I, insensível à metilação, que mostra qual o padrão esperado de digestão total (Fig. 24). A comparação entre as amostras revela uma desmetilação crescente das amostras D3A, C e B, corroborando os dados encontrados na citometria de fluxo.

Figura 24 – Padrão de digestão dos pools celulares com a enzima de restrição sensível à metilação *Hpa* II. Fib é a linhagem GM135-Te; pRS é um pool transduzido com o vetor pRETRO-SUPER vazio; D3A, B e C são os pools citados anteriormente no texto. Na primeira canaleta, padrão de peso molecular 1KB *ladder* (Invitrogen); na segunda, DNA de GM135-Tel não digerido.

Dessa forma, corroborando a idéia de Egger e colaboradores (2006) que DNMT1 devesse ter um papel fundamental na metilação global do DNA, nossos resultados mostram que somente com a diminuição dos níveis dessa enzima, não sendo necessária a observação de um fenótipo nulo, efeitos no padrão de metilação do genoma já podem ser encontrados.

Uma vez demonstrado o efeito global da repressão de DNMT1, analisamos de maneira mais focada os efeitos desta inibição na manutenção da ICX. Para isso,

foi monitorado o aparecimento de alguma expressão bi-alélica dos genes que apresentavam SNPs informativos no DNA e expressão mono-alélica na situação controle (sem silenciamento da metilase). Apesar da considerável desmetilação no genoma das células dos pools analisados, não houve re-ativação de nenhum dos genes ligados ao X analisados (Tab. 4).

Tabela 4 – Análise da expressão alelo-específica de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-Tel (DNA e cDNA) e em sua sub-linhagem D3B (cDNA D3B).

Gene	SNP	DNA	cDNA	cDNA D3B
GYG2	A/T	A/T	T	T
FAM16AX	C/T	C/T	C/T	C/T
TBL1X	A/G	A/G	A	A
PIGA	A/T	A/T	A	A
ZFX	C/T	C/T	C/T	C/T
TCTE1L	A/T	A/T	T	T
MAOA (W)	T/C	T/C	T	T
MAOA (M)	A/G	A/G	A	A
SUV39H1	C/T	C/T	C	C
Centrômero				
XIST (1)	A/G	A/G	A	A
XIST (2)	G/A	G/A	G	G
XIST (4)	C/A	C/A	A	A
ARMCX3	A/G	A/G	G	G
TCEAL4	C/T	C/T	T	T
GPC4	C/T	C/T	T	T
Heterozigotos 15/38				

Esses resultados indicam que, diferente de camundongos, em humanos a manutenção do processo de ICX não é perturbada pela diminuição da expressão da metilase DNMT1.

De fato, não se pode afirmar se houve alteração ou não do padrão de metilação específico dos promotores desses genes analisados, mas sim que no caso de algum distúrbio ter ocorrido nessa forma de controle de expressão gênica, outras modificações epigenéticas garantiram que não houvesse re-ativação desses genes. Uma análise mais detalhada sobre o estado de metilação do promotor de alguns desses genes seria interessante para responder essa pergunta e, nesse sentido, pudemos caracterizar o padrão de metilação do gene *MAOA* nas células D3B (Fig. 25).

Figura 25 – Análise de seqüenciamento após tratamento de bissulfito da região 5' do gene *MAOA* em fibroblastos humanos controle (Fib, painel superior) e deficientes em DNMT1 (D3B, painel inferior). Cada linha representa uma molécula de DNA, e cada coluna um dinucleotídeo CpG da seqüência analisada. Círculos pretos e vazios representam CpGs metilados e desmetilados, respectivamente. No alto da figura se encontra um mapa esquemático da região analisada, onde a barra preta grossa corresponde à ilha CpG, e as pequenas barras vermelhas mostram a posição dos *primers* internos utilizados para amplificação do fragmento.

Claramente se observa na linhagem de fibroblastos a presença de duas populações de amostras correspondendo aos alelos diferencialmente metilados do gene. Nas células com a DNMT1 inativada, pode-se notar que ocorreu a desmetilação dos dinucleotídeos CpG de números 6 a 9 no alelo originalmente mais metilado, que deve corresponder ao cromossomo Xi. Entretanto, essa desmetilação não levou à de-repressão de *MAOA* nesse cromossomo, como pôde ser constatado por sua expressão mono-alélica (Tab. 4).

Esses resultados abrem uma nova perspectiva de estudo no laboratório. É possível que as células deficientes em DNMT1 sejam mais propensas à reativação de genes submetidos à ICX. Assim, tratamentos com tricostatina A, por exemplo, poderiam ser utilizados para investigar um possível papel sinérgico da metilação do DNA e da hipoacetilação de histonas na manutenção da ICX humana, assim como foi estudado em camundongos (Csankovszki *et al.*, 2001).

A terceira abordagem utilizada para avaliar os efeitos da diminuição da DNMT1 nos fibroblastos humanos foi a análise do padrão de metilação da região 5' de *XIST*.

Um estudo prévio do nosso grupo avaliou alguns dinucleotídeos CpG da região 5' desse gene nas linhagens de carcinoma humano HCT116 deficientes para DNMT1, DNMT3B ou ambas (DKO, de duplo nocaute) (Rhee *et al.*, 2000 e 2002; Vasques *et al.*, 2005). Experimentos de Southern Blot após digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação mostraram uma desmetilação parcial somente nas células DKO, e a manutenção da repressão de *XIST* na ausência dessas duas enzimas. Este estudo identificou dois sítios de metilação necessários para a inibição do *XIST*. Porém, a metodologia utilizada permitiu a análise de

somente 4 sítios. Seria importante obter dados mais precisos a respeito do padrão de metilação de *XIST*.

A partir das seqüências do promotor desse gene e de sua porção codificante (números de acesso M97168 e U50908 no NCBI, respectivamente), uma região de aproximadamente 1Kb, rica em dinucleotídeos CpG foi selecionada para verificar alterações no padrão de metilação do DNA, tanto naquelas linhagens de carcinoma quanto nos nossos fibroblastos com DNMT1 suprimida (Fig. 26).

Figura 26 – Padrão de metilação do fragmento compreendendo a região 5' do gene *XIST* (representação gráfica na figura 18). Em A, mapa esquemático da região analisada, onde a barra preta grossa corresponde às regiões ricas em dinucleotídeos CpG, e as pequenas barras vermelhas e verdes mostram a posição dos *primers* internos utilizados para amplificação dos fragmentos 1 e 2 assinalados. Em B, resultados dos fibroblastos controle GM135-TEL (Fib) e do pool celular com DNMT1 suprimida (D3B); em C, das linhagens de carcinoma humano controle (HCT116) e deficiente para DNMT1 (1KO); em D, das linhagens deficiente para DNMT3B (3BKO) e duplo nocaute (DKO). Círculos pretos e brancos representam, respectivamente, CpGs metilados e desmetilados. Cada linha representa uma molécula de DNA.

Consistente com a presença de dois alelos diferencialmente metilados, a região 5' de *XIST* apresenta dois padrões distintos de metilação nos fibroblastos humanos: uma parcela das moléculas se encontra mais densamente metilada, correspondendo ao alelo que não expressa *XIST*, no Xa, e outra mais desmetilada, correspondendo ao alelo ativo do gene, no Xi. A repressão de DNMT1 nessas células levou à desmetilação total do promotor desse gene (Fig. 26B). Porém, consistente com a manutenção da repressão de *XIST* no Xa encontrada pela análise da expressão alelo-específica (Tab. 4), não houve alteração no nível de expressão de *XIST* quando investigado por PCR em tempo real nas células D3B em relação ao controle (dados não mostrados).

Nas linhagens derivadas de HCT116, um só padrão de metilação era mesmo esperado por se tratarem de células masculinas. Devido à hemizigose de *XIST*, presente somente na forma inativa no único cromossomo Xa, se esperava um único padrão intensamente metilado, como foi observado. Diferente do encontrado nos fibroblastos, os efeitos do nocaute de DNMT1 e DNMT3B foram discretos, e levaram à desmetilação de poucos sítios e em poucas amostras (Fig. 26C e D). Já no duplo-nocaute, uma alteração um pouco mais significativa pode ser observada (Fig. 26D). Esses resultados confirmam aqueles previamente obtidos por Vasques e colaboradores (2005), uma vez que o dinucleotídeo CpG de número 6 se encontra desmetilado nas células DKO, assim como havia sido descrito pela digestão desse gene com a enzima de restrição *Ava* I (Fig. 18). De forma similar, o sítio de *Sac* II⁽¹⁾ que se encontrava parcialmente desmetilado, exhibe aqui essa mesma característica, que pode ser observada nos dinucleotídeos 15 e 16. Dessa maneira, nossos resultados estendem aqueles previamente obtidos, mostrando um perfil mais completo das discretas alterações

no promotor de *XIST* advindas da diminuição das enzimas nessas linhagens celulares.

Diferentes trabalhos encontraram desmetilação de promotores de genes, com conseqüente de-repressão dos mesmos, em decorrência de baixos níveis de DNMT1 (Robert *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2003; Ting *et al.*, 2004; Egger *et al.*, 2006). Entretanto, todos esses grupos analisaram o papel dessa enzima no controle transcricional de genes supressores de tumor em linhagens diversas de carcinoma. Além disso, nenhum estudo da supressão de DNMT1 analisou a função desse gene no controle de *XIST* ou de genes submetidos à ICX. Embora tenhamos encontrado desmetilação do DNA global, e de dois *loci* no cromossomo X (MAOA e *XIST*), não observamos re-ativação de nenhum dos genes analisados. Estes resultados indicam que a manutenção da ICX envolve o efeito aditivo de uma série de modificações epigenéticas no Xi para garantir que o estado silenciado seja fielmente transmitido pelas mitoses. Dessa forma, é aceitável que a retirada de apenas uma dessas modificações da cromatina, a metilação de MAOA e *XIST*, não resulte na re-ativação desses genes.

De forma similar ao descrito em camundongos (Csankovszki *et al.*, 2001), então, é possível que a metilação do DNA atue em sinergia com as modificações de histona, e talvez também com o RNA de *XIST*, para garantir o estado silenciado dos genes submetidos à ICX. Ao menos no caso do controle de *XIST*, fica claro que outras modificações epigenéticas estão garantindo sua repressão no Xa na ausência da metilação do DNA.

Acredita-se que a metilação do DNA possa levar à repressão transcricional por meios distintos: pelo bloqueio do acesso de fatores de transcrição pela alteração da estrutura da cromatina da região ou pela presença de dinucleotídeos CpG

metilados no sítio de ligação do fator (Watt e Molloy, 1988), ou pelo acúmulo de proteínas que possuem afinidade por DNA metilado e recrutam outros modificadores de histonas (Boyes e Bird, 1991). No primeiro caso, a metilação por si seria suficiente para manter dado gene reprimido, o que pode estar ocorrendo nos genes supressores de tumor das linhagens de carcinoma, onde a limitação dessa única modificação epigenética leva à perda do controle da transcrição desses genes. No segundo caso, a perda da metilação do DNA pode não levar à desregulação do padrão de expressão do gene, uma vez que outras modificações estão impostas à cromatina da região. É mais provável que esse mecanismo ocorra tanto no controle de *XIST*, quanto dos genes submetidos à ICX. Como já citado, a redundância das modificações epigenéticas características do Xi argumentam a favor desse modelo em humanos, diferente do que ocorre em camundongo, onde a desmetilação do DNA pode levar à de-repressão de *Xist* e de genes ligados ao cromossomo Xi (Beard *et al.*, 1995; Panning e Jaenisch, 1996; Sado *et al.*, 2000).

Em camundongos a Mbd2, um repressor transcricional que é uma das proteínas de ligação a DNA metilado, parece ser o mediador para garantir a estabilidade do silenciamento de *Xist* pelo recrutamento de desacetilases de histona (Barr *et al.*, 2007). Seria interessante analisar nos fibroblastos humanos aqui descritos, então, se as histonas H4 e H3 se mantêm desmetiladas em *XIST* mesmo com a ausência da metilação de DNA nesse *locus*.

Podemos concluir ainda, que apesar da expressão de DNMT3B se encontrar aumentada nos fibroblastos humanos com DNMT1 reprimida, essa metilase *de novo* não é capaz de desempenhar a função de metilação de manutenção de maneira eficiente em fibroblastos humanos, uma vez que se pode observar

diminuição na metilação global do DNA. Em conjunto, essas conclusões ajudam elucidar o papel de DNMT1 na metilação global do DNA, que parece ocorrer como em camundongos, e no processo de ICX humano, onde a função desempenhada por essa enzima não atua isoladamente para garantir a manutenção desse processo, de forma oposta ao observado em murinos.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Estudos das modificações epigenéticas que caracterizam o cromossomo Xi em humanos foram, em grande parte, desenvolvidos em células híbridas somáticas humano/roedor ou em linhagens de carcinomas. Embora muito úteis e indicadas para responder algumas perguntas biológicas, essas células não são os modelos ideais para análise de processos como a Inativação do cromossomo X, já que tanto a fusão celular quanto o processo carcinogênico são freqüentemente associados com alterações epigenéticas dos cromossomos humanos das células.

A detecção de um padrão diferente de expressão dos genes *MAOA* e *GYG2* no modelo celular de fibroblastos humanos aqui otimizado deu mais ênfase à necessidade do uso de sistemas *in vitro* apropriados nos estudos envolvendo padrões de modificações da cromatina. Análises em grande escala do perfil de atividade gênica do Xi usando este tipo de sistema experimental deverão ser realizadas para identificarmos os genes que de fato escapam à ICX, e que por isso podem estar envolvidos nos fenótipos associados às aneuploidias do X e às diferenças entre os sexos.

Com o estudo do papel de *XIST* na manutenção da ICX em células humanas não transformadas, foi sugerido que esse gene deve ser essencial para a viabilidade celular. Foi enfatizada a necessidade do uso de vetores cuja expressão de shRNAs com código para inativação desse gene seja indutível, já que somente assim poder-se-á chegar a uma conclusão definitiva acerca dessa hipótese.

Ao analisar células humanas transformadas, pode-se concluir que uma pequena expressão de *XIST* é suficiente para que seu RNA se mantenha associado ao X inativo, indicando uma grande plasticidade das células quanto aos níveis desse RNA imprescindíveis para manter sua ligação a esse cromossomo.

Foi aqui demonstrado que a enzima DNMT1 é necessária para a manutenção da metilação global do genoma em células humanas não transformadas, e que existe um mecanismo de compensação celular na inibição dessa enzima com o aumento da expressão de *DNMT3B*. Como perspectivas para enriquecer esses nossos resultados, o padrão de metilação das seqüências repetitivas *A/u*, LINE-1 e Satélite-2 está sendo avaliado. Visto que a porcentagem do genoma humano coberta por seqüências repetitivas é bastante alta, esses elementos podem ser usados como marcadores da metilação global do DNA, e dessa forma poderá ser mais bem evidenciado o papel de *DNMT1* nesse processo em células humanas normais.

Ainda se observou que a repressão de *DNMT1* não é suficiente para levar à reativação de genes no cromossomo X inativo, o que difere de muitos trabalhos que encontraram re-expressão de genes supressores de tumor silenciados em linhagens de carcinoma. Destaca-se, então, que as outras modificações da cromatina têm papel mais importante na manutenção do cromossomo X inativo que na alteração transcricional imposta durante o processo carcinogênico.

Além disso, a desmetilação encontrada nos promotores de *MAOA* e *XIST* não foi suficiente para levar à expressão destes genes nos cromossomo X inativo e ativo, respectivamente. No caso de *XIST*, mesmo com a desmetilação total de seu promotor seu padrão de expressão não foi alterado, destacando também o papel das outras modificações epigenéticas no controle de sua transcrição.

De forma geral, foi enfatizada a importância em células humanas não transformadas da redundância das modificações epigenéticas na manutenção da inativação do cromossomo X, já que alterações em um desses fatores não parecem ser suficientes para causar distúrbios nesse processo.

RESUMO E ABSTRACT

A inativação do cromossomo X (ICX) é o fenômeno através do qual um dos cromossomos X das fêmeas de mamíferos é silenciado para atingir compensação de dose em relação aos machos. Ela envolve a expressão do gene *XIST* exclusivamente no X inativo, e a associação em *cis* de seu RNA nesse cromossomo. Isso inicia a imposição de várias marcas epigenéticas no cromossomo X inativo, que garantem a manutenção deste estado de silenciamento transcricional de maneira estável durante todas as mitoses num organismo. Uma dessas modificações epigenéticas é a metilação do DNA, desempenhada principalmente pela enzima DNMT1. Os papéis de *XIST* e *DNMT1* na manutenção da inativação do cromossomo X ainda são controversos em humanos, e nesse sentido foi objetivo desse trabalho analisar a possível função desses genes nesse processo em células humanas não transformadas.

Foi otimizado um sistema experimental para o estudo de possíveis perturbações na manutenção da inativação do cromossomo X, onde a re-expressão de genes submetidos a esse processo pode ser monitorada. Nesse sistema foram identificados dois genes, *MAOA* e *GYG2*, cujo padrão de expressão no X inativo difere do previamente descrito.

Demonstrou-se que baixos níveis de expressão do gene *XIST* foram suficientes para manter seu RNA associado ao X inativo, conservando o estado silenciado desse cromossomo. Além disso, foram obtidos indicativos de que a inibição de *XIST* em fibroblastos humanos gera uma diminuição da viabilidade celular.

Foi possível demonstrar que *DNMT1* é necessária para a manutenção da metilação global do genoma em células humanas não transformadas, e que existe um mecanismo de compensação da inibição desse gene que leva ao aumento da expressão de *DNMT3B*. Ainda se observou que a repressão de *DNMT1* não é suficiente para levar à reativação de genes no cromossomo X inativo. Além disso, a desmetilação encontrada nos promotores de *MAOA* e *XIST* não foi suficiente para levar à expressão destes genes nos cromossomo X inativo e ativo, respectivamente.

Estes resultados enfatizam a necessidade de se estudar os mecanismos moleculares da ICX em humanos utilizando sistemas experimentais adequados para a análise de herança epigenética.

X chromosome inactivation (XCI) is the phenomenon through which one of the X chromosomes in female mammals is silenced to achieve dosage compensation related to males. It involves the expression of *XIST* gene exclusively from the inactive X, and the association of its RNA in *cis* in this chromosome. This leads to a series of epigenetic modifications in the chromatin of the inactive X (Xi) that guarantee a stable maintenance of the transcriptional silence through all the mitoses in the organism. One of these epigenetic modifications is DNA methylation, achieved mainly by the maintenance DNA methylase DNMT1. The roles of *XIST* and *DNMT1* in the maintenance phase of XCI are controversial in humans. Therefore, the main goal of this present work was to analyze some of the possible functions of these genes in this process in untransformed human cells.

An experimental system was optimized to study possible disturbances in maintenance of XCI, where the re-expression of genes submitted to this process could be monitored. In this system we identified two genes, *MAOA* and *GYG2*, whose pattern of expression on the Xi, differed from what had been previously described.

It was demonstrated that low levels of *XIST* expression were sufficient to keep its RNA associated to the Xi, assuring the silenced state of this chromosome. Besides, evidences have been found that *XIST* inhibition in human fibroblasts reduces cellular viability.

It was possible to demonstrate that *DNMT1* is necessary to the maintenance of global genome methylation in untransformed human cells, and the existence of a compensation mechanism involving *DNMT3B* upregulation. It was also observed that repression of *DNMT1* was not sufficient to reactivate genes of the Xi chromosome. Additionally, demethylation of *MAOA* and *XIST* promoters was not enough to cause expression of these genes on the inactive and active Xs, respectively.

All these results emphasize the requirement of studying the molecular mechanisms of XCI in humans using experimental systems appropriate for the analysis of epigenetic inheritance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*, 2000. 65(3): 293-8.

Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, Eichler EE. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(12):6634-9.

Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 1949. 163(4148):676.

Barton G. M. & Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *PNAS*, 2002. 99: 14943 - 45.

Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev*, 1995. 9(19): 2325-34.

Benjamin D, Van Bakel I, Craig IW. A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes. *Eur J Hum Genet*, 2000. 8:103-8.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 2000. 9(16):2395-402.

Blau HM, Chiu CP, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 1983. 32(4):1171-80.

Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, 2002. 30(1):73-6.

Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, et al. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991. 351(6324):325-9.

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

Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*, 1992. 11(1):327-33.

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, Cooper P, Smith S, McCabe VM, Norris DP, Penny GD, Patel D, Rastan S. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991. 351(6324):329-31.

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S, Rastan S. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 1992. 71(3):515-26.

Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature*, 1991. 349(6304):82-4.

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991.349(6304):38-44.

Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 1992.71(3): 527-42.

Brown CJ, Willard HF. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature*, 1994. 368: 154 - 6.

Brummelkamp TR., Bernards R & Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2002. 2: 243-7.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002. 296(5567):550-3.

Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 2005. 434: 400 - 4.

Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, Ueda Y, Li E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer. *Cells Nat Genet*, 2007. 39(3):391-6.

Chow JC, Hall LL, Baldry SE, Thorogood NP, Lawrence JB, Brown CJ. Inducible XIST-dependent X-chromosome inactivation in human somatic cells is reversible. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(24): 10104-9.

Chureau C, Prissette M, Bourdet A, Barbe V, Cattolico L, Jones L, Eggen A, Avner P, Duret L. Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome Res.* 2002. 12(6): 894-908.

Clemson CM , McNeil JA , Willard HF, Lawrence JB. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol*, 1996. 132(3): 259-75.

Clerc P, Avner P. Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. *Curr Opin Genet Dev.* 2006.16 (3): 246-53.

Csankovszki G., Panning B., Bates B., Pehrson J.R. & Jaenisch R. Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nature Genetics*, 1999. 22: 323 - 324.

Csankovszki G., Nagy A. & Jeanisch R. Synergism of imprinted X-chromosome, DNA methylation and histone hypoacetylation in maintaining X-chromosome inactivation. *J Cell Biol* 2001. 153: 773 - 783.

Daly RF, Patau K, Therman E, Sarto GE. Structure and Barr body formation of an Xp + chromosome with two inactivation centers. *Am J Hum Genet*, 1977. 29(1): 83-93.

Deng X & Meller VH. Non-coding RNA in fly dosage compensation. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(9):526-32.

Di Stefano V, Rinaldo C, Sacchi A, Soddu S, D'Orazi G. Homeodomain-interacting protein kinase-2 activity and p53 phosphorylation are critical events for cisplatin-mediated apoptosis. *Exp Cell Res*, 2004. 293: 311 - 20.

Disteche CM. Escapees on the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): 14180-2.

Do JT, Schöler HR. Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006;(60):35-45.

Ellis N, Keitges E, Gartler SM, Rocchi M. High-frequency reactivation of X-linked genes in Chinese hamster X human hybrid cells. *Somat Cell Mol Genet*, 1987. 13(3):191-204.

Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y, Yoo CB, Jones PA, Liang G. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(38):14080-5.

Filippova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong JP, Hu YJ, Nguyen DK, Tsuchiya KD, Disteche CM. Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell*, 2005. 8(1):31-42.

Fournel M, Sapieha P, Beaulieu N, Besterman JM, MacLeod AR. Down-regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16(ink4A) and p21(WAF/Cip1) by distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 1999. 274: 24250 - 6.

Gartler SM, Goldman MA. Reactivation of inactive X-linked genes. *Dev Genet*, 1994. 15(6): 504-14.

Gilbert SL, Sharp PA. Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(24): 13825-30.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001. 25(4): 386-401.

Goodfellow PJ, Mondello C, Darling SM, Pym B, Little P, Goodfellow PN. Absence of methylation of a CpG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(15): 5605-9.

Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 2006.34(4):1182-8.

Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*, 2007. 115(10):1039-59.

Hall LL, Byron M, Sakai K, Carrel L, Willard HF, Lawrence JB. An ectopic human XIST gene can induce chromosome inactivation in postdifferentiation human HT-1080 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(13):8677-82.

He J, Yang Q, Chang L.J. Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. *J Virol*, 2005. 79: 13497 - 508.

Heard E, Disteche CM. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev*, 2006. 20(14):1848-67.

Hendriks RW, Chen ZY, Hinds H, Schuurman RK, Craig IW. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene. *Hum Mol Genet*, 1992. 1(8):662.

Hendrich BD, Brown CJ, Willard HF. Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine XIST genes. *Hum Mol Genet*, 1993. 2(6):663-72.

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20):2571-87.

Hong YK, Ontiveros SD, Chen C, Strauss WM. A new structure for the murine Xist gene and its relationship to chromosome choice/counting during X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(12):6829-34.

Hong YK, Ontiveros SD, Strauss WM. A revision of the human XIST gene organization and structural comparison with mouse Xist. *Mamm Genome*, 2000. 11(3):220-4.

Jeanpierre M. Human satellites 2 and 3. *Ann Genet*, 1994. 37(4): 163 - 71.

Johnston CM, Lovell FL, Leongamornlert DA, Stranger BE, Dermitzakis ET, Ross MT, Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete. *PLoS Genet*, 2008. 4(1) e9.

Kato T, Ahmed M, Yamamoto T, Takahashi H, Oohara M, Ikeda T, Aida Y, Katsuki M, Arakawa Y, Shikata T, Esumi M. Inactivation of hepatitis C virus cDNA transgene by hypermethylation in transgenic mice. Arch Virol, 1996. 141: 951 - 8.

Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001. 409(6822):860-921.

Lee JT, Jaenisch R. Long-range cis effects of ectopic X-inactivation centres on a mouse autosome. Nature. 1997 Mar 20;386(6622):275-9.

Lee, J. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin-effects at Tsix. Cell, 2000.103:17-27.

Lee JT, Davidow, LS & Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to XIST at the X-inactivation centre. Nature Genetics 1999; 21: 400-404.

Lee JT, Lu N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. Cell. 1999. 99(1): 47-57.

Lee JT. Homozygous Tsix mutant mice reveal a sex-ratio distortion and revert to random X-inactivation. Nat Genet, 2002. 32(1): 195-200.

Leu YW, Rahmatpanah F, Shi H, Wei SH, Liu JC, Yan PS, Huang TH. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation. Cancer Res, 2003. 63: 6110 - 5.

Lewin B. Genes VI. Oxford : Oxford University Press, 1997 1260 p.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992. 69(6): 915-26.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 1993. 366(6453):362-5.

Lyon MF. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*, 1998.(1-4):133-7.

Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 1961. 22; 190: 372-3.

Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 2004. 303(5658):666-9.

Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev*, 1997.11(2):156-66.

Migeon BR. X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency: detection of heterozygotes by selective medium. *Biochem Genet*, 1970. 4: 377 - 83.

Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I. Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *Am J Hum Genet*, 2001. 69(5):951-60.

Migeon BR, Lee CH, Chowdhury AK, Carpenter H. Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*, 2002. 71(2): 286-93.

Milutinovic S., Zhuang Q., Niveleau A., Szyf M. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem*, 2003. 278: 14985 – 95.

Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science*, 1981.211(4480):393-6.

Morey C, Bickmore W. Sealed with a X. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(3):207-9.

Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A. Xist and the order of silencing. *EMBO Rep*, 2007.8(1):34-9.

Nordquist N, Orelan L. Monoallelic expression of MAOA in skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 348(2): 763 - 7.

Nordquist N, Orelan L. Monoallelic expression of MAOA in skin fibroblasts. *J Neural Transm.*, 2007. 114(6): 713 - 6.

Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA, Rastan S. Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell*, 1994. 77(1):41-51.

Nyhan WL. Inherited hyperuricemic disorders. *Contrib Nephrol*, 2005. 147: 22 - 34.

Ohhata T, Hoki Y, Sasaki H, Sado T. Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. *Development*, 2008. 135(2):227-35.

Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res*, 1959.18:415-8.

Ohno S, Hauschka TS. Allocyclization of the X-chromosome in tumors and normal tissues. *Cancer Res*, 1960. 20:541-5.

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004; 303:644-649.

Okamoto I, Heard E. The dynamics of imprinted X inactivation during preimplantation development in mice. *Cytogenet Genome Res*, 2006. 113: 318 - 24.

Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*, 1996. 10(16):1991-2002.

Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 1996.379(6561):131-7.

Pereira LV, Stabellini R. Initiation of X chromosome inactivation. In: Michael J. Dunn MJ, Jorde LB, Little PFR, Subramaniam S (editors). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, John Wiley & Sons, 2005.

Pereira LV, Vasques LR. X-chromosome inactivation: lessons from transgenic mice. *Gene*, 2000.255(2):363-71.

Rack KA, Chelly J, Gibbons RJ, Rider S, Benjamin D, Lafreniere RG, Oscier D, Hendriks RW, Craig IW, Willard HF, et al. Absence of the XIST gene from late-replicating isodicentric X chromosomes in leukaemia. *Hum Mol Genet*, 1994. 3: 1053 - 9.

Rastan S, Robertson EJ. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol*, 1985. 90:379-88.

Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(7):2725-8.

Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB & Schuebel KE. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, 2000. 404: 1003 - 7.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair K-W, Yen R.-WC, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB & Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 2002. 416: 552 – 556.

Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A & MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature Genetics*, 2003. 33: 61 - 65.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(8):597-610

Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*, 2003.33(1):61-5.

Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, Bestor TH. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res.*, 2006. 16: 157 - 63.

Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; 434:325-337.

Russell LB and Montgomery CS. The use of X-autosome translocations in locating the X-chromosome inactivation centre. *Genetics*, 1965. 52: 470–471.

Sado T., Fenner M.H., Tan S.S., Tam P., Shioda T. & Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol*, 2000. 225: 294 - 303.

Salstrom JL. X-inactivation and the dynamic maintenance of gene silencing. *Mol Genet Metab*, 2007. 92(1-2):56-62.

Sambrook J & Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Sharman GB. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature*, 1971. 26;230(5291):231-2.

Shih JC, Thompson RF. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet.*, 1999. 65(3):593-8.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003. 19;423(6942):825-37.

Sowińska A, Jagodzinski PP. RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B induces CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer and AsPC1 pancreatic carcinoma cell lines. Straub T, Becker PB. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat Rev Genet*, 2007. 8(1):47-57.

Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res*, 2004.64(9):3137-43.

Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.*, 1997. 3;16(21):6510-20.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.*, 2001. 2;11(19):1553-8.

Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 1975. 21;256(5519):640-2.

Takagi N. Variable X chromosome inactivation patterns in near- tetraploid murine EC x somatic cell hybrid cells differentiated in vitro. *Genetica*, 1993.88(2-3):107-17.

Therman E, Sarto GE, Patau K. Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq: a hypothesis. *Chromosoma*, 1974. 29;44(4):361-6.

Ting AH, Jair KW, Suzuki H, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1. *Nat Genet*, 2004.36(6):582-4.

Tsuchiya KD, Willard HF. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm Genome*, 2000. 11(10):849-54.

Vasques L.R. & Pereira L.V. Allele-specific X-linked gene activity in normal human cells assayed by expressed single nucleotide polymorphisms (cSNPs). *DNA Res*, 2001. 8: p. 173 - 177.

Vasques, LR. Análise funcional do gene *DNMT1* no controle da expressão do gene *XIST* e na manutenção do estado inativo do cromossomo X-inativo (Xi). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003.

Vasques LR, Klöckner MN, Pereira LV. X chromosome inactivation: how human are mice? *Cytogenet Genome Res*, 2002. 99(1-4):30-5.

Vasques LR, Stabellini R, Xue F, Tian XC, Soukoyan M, Pereira LV. XIST repression in the absence of DNMT1 and DNMT3B. *DNA Res.*, 2005. 12: 373 - 8.

Vucic EA, Brown CJ, Lam WL. Epigenetics of cancer progression. *Pharmacogenomics*, 2008. 9(2):215-34.

Wake N, Takagi N, Sasaki M. Non-random inactivation of X chromosome in the rat yolk sac. *Nature*, 1976. 12;262(5569):580-1.

Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.*, 1988. 2(9):1136-43.

Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.*, 2005. 33(21): 6823 - 36.

Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, Friedmann T, Migeon BR. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(9):2806–2810.

Wutz A, Rasmussen TP, Jaenisch R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nat Genet*, 2002. 30(2):167-74.

Wutz A, Xist function: bridging chromatin and stem cells. *Trends Genet*, 2007. 23(9):457-64.

Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell*, 2000. 5(4):695-705.

Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Daí Y, Levine H, Pereira L V & Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat. Genetics*, 2002. 31: 216-220.

Xu N, Donohoe ME, Silva SS, Lee JT. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nat Genet*, 2007. 11:1390-6.

Yan L, Nass SJ, Smith D, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Specific inhibition of DNMT1 by antisense oligonucleotides induces re-expression of estrogen receptor-alpha (ER) in ER-negative human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*, 2003. 2(5):552-6.

Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.*, 2004. 32(3): e38.

Yen PH, Patel P, Chinault AC, Mohandas T, Shapiro LJ. Differential methylation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase genes on active and inactive human X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 6: 1759-63.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002. 416(6880):545-8.

Yoshida I, Nishita Y, Mohandas TK, Takagi N. Reactivation of an inactive human X chromosome introduced into mouse embryonal carcinoma cells by microcell fusion with persistent expression of XIST. *Exp Cell Res*, 1997. 230(2):208-19.

Zabel BU, Baumann WA, Pirntke W, Gerhard-Ratschow K. X-inactivation pattern in three cases of X/autosome translocation. *Am J Med Genet*, 1978. 1(3):309-17.

Zeng SM & Yankowitz J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta*, 2003. 24(2-3):270-5.

Zhai L, Mu J, Zong H, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Structure and chromosomal localization of the human glycogenin-2 gene GYG2. *Gene*, 2000. 242(1-2):229-35.

ANEXOS

Anexo 1 - Lista de primers utilizados para amplificação de genes ligados ao cromossomo X usadas durante esse trabalho [descritos em Carrel e Willard (2005) ou desenhados ao longo desse projeto].

Gene	Primer F	Primer R	Primer cDNA (orientação)	Tamanho amplicon DNA	Tamanho amplicon cDNA
ARHGAP4	CCGAAGAAGCCAGCAGCTCG	TGGTGGAGGGCTGCACTGCCCA	CCCAGTCACACACGCGCCCCTT CCAGAAG (R)	123pb	377pb (DNA 2103pb)
ARMCX3	TGAGTAAGCTCCCTTCTGTC	CTGAAGGACAGGGATGGTTT	CAACGCCAGGC AAAAGA (F)	116pb	1875pb (DNA 2683pb)
ATP7A	CAGTTTTTCGGAGGCTGGTA	AGCATAGGGGGTGTGTCAAA	CAGGATTGTCTGTTATGAATTTG C (F)	188pb	241pb (DNA 1445pb)
ATRX	TGGTTTTGAGATGCTTGCTC	CAGCAGAAGGCACAGTTGAT	CCACTGTGACAGGCACTGA (F)	186pb	1111pb (DNA 6329pb)
CLCN4	GCATATGCGTTGTCAGTTGG	TGTCCTCCTGTGCTGTGATT	CTCAGCCCGTTTACAGTGA (F)	158pb	1558pb (DNA 14174pb)
CLIC2	CAGTGGACAGATTATTTATGGC	GCTAAACAGAAGAGTTAGGAGA GC	CTGAGTCCCAAGTACAAGGA (R)	183pb	608pb (DNA 2323pb)
CXORF6	AACCTTTCAGTCTCCGCTAGC	GGATACTCTAGCTCCTCCAG	GTGCCCCGCTCCACTACT (F)	185pb	
CXORF12	CACTTTGCGTTTTTGTCTGAC	CACACAGGATGTCTGACACT	CGAGTGAGGCGAAATAC (F)	168pb	1145pb (DNA 10134pb)
DLG3	GGATAAAGTGACAGCCGACT	TCTTTGTTTCTCTCCCTGGG	AATGAACCGAAGGCAGACAT (F)	130pb	2390pb (DNA 3563pb)
EBP	CCATCAGCCCACAAAGACAT	AGCCATGTGGTCACGACTAA	GCAAGCTGTGATGGTTTCCA (R)	261pb	451pb (DNA 3496pb)
FAM16AX	TCTCAGAAGTCAAGCTGATGGA	GCATGTAATGCCTACCTGCAT	CCGCCACAAGGAGTTCTTC (F)	117pb	680pb (DNA 27427pb)

Gene	Primer F	Primer R	Primer cDNA (orientação)	Tamanho amplicon DNA	Tamanho amplicon cDNA
GPC4	CACGTCGTTCCCATTGTATG	ACCTGTTTGCAGTGACAGGA	ATCGTTGCAAACGTTGCTC (R)	158pb	241pb (DNA 1624pb)
GPR143	TCCATTCTCACACGTGTGTGT	CTGTGTTCTCACCTTCCCAA	TCCGGGAAGGTGTCTCAA (R)	138pb	360pb (DNA 14004pb)
GYG2	CGCTGTTGAACCTTGTGCCT	ACCACCATCGAGAGTCTACT	TTCACCACTGGGTTCTAAC (F)	206pb	561/774pb (DNA 19890pb)
IL13RA1	TGATGACAACTACAGAAAAACC	AGACTGTAAACCCCTGGAAG	CCATGTTACTCATTGTTCCA (F)	236pb	1815pb (DNA 18815pb)
IRAK1	TCTGCAGCTGCTCTGCTGCCT	AGAAGCTGCAGGCAGTGGT	TGCCCCGAGGAGTACATCAAGAC (F)	183pb	335/567pb (DNA 3268pb)
MAOA M	GTAACATTCTATTTCAACTTCAG	GGGGAAAACAAGAGGTGGG	CCAGTGCATTATGAAGAGAAG (F)	362pb	1665pb (DNA 3809pb)
MAOA W	AAATGGTCTCGGGAAGGTGA	ACCGTGGCAGGAGCTTGTAT		395pb	201pb
MPP1	CGCCTTTATTTCAAGGAATgAC	AAGTCTCTTGGCACACTCACAA	GAAGAGCCCATGGGAATgAC (F)	223pb	220pb
OPHN1	GGATGTCACCAGTCTCTTAG	GCAAACCTGGGCTGGAAGATA	TCCTGGAGATGAAAGTTGAG (R)	251pb	3229pb (DNA 4481pb)
PIGA	CGACCAGTGCAAACCTGACAG	AGGTTTTAGAGGCATGCCAC		255pb	
RBM3	GTTGCAGTGAGCTAAGAT	AAAGCCAACCTCTTCTATATAATC	ACTATAATGGCAGAAACCAG (F)	154pb	252pb
SH3BGRL	CTCTCATTCTAAGTTGCCTCA	GAAGCTCAGAAAATCTGTGG	GAAAATAATGCAGTGTATGC (F)	199pb	663pb (DNA 19446pb)

Gene	Primer F	Primer R	Primer cDNA (orientação)	Tamanho amplicon DNA	Tamanho amplicon cDNA
SUV39H1	TTGTGCTCACCTGGTTC	GCATAGGGTTGAGGGGTGTA	TGCAGGTGTACAACGTCTTCA (F)	292pb	1653 pb (DNA 3309pb)
SYTL4	ATTAAAGCACACATACATGTCAG	ATGAACCGAATGGAGGAATG	TGAGGCTGGAAGATCTACAG (R)	136pb	1947pb (DNA 4161pb)
TBL1X	TGCTTGCGACACATCCCA	GACACCATCTCTACCCAC	CACGCTCACGAAGCATCAG (R)	147pb	2698pb
TCEAL4	TGGCTCATTACCTCAAGGAG	CTTGGACCTCTAGGGTAGAA	TCTGTCAATGCGAAGAATG (F)	186pb	916pb (DNA 10132pb)
TCTE1L	GCCAAAAACAAAGATCACTGC	GAGAGCGGAACCATAACTCA	AGAGCCGGCGCTACCAT (R)	200pb	1893pb (DNA 8478pb)
TIMP1	GCACATCACTACCTGCAGaTT	AGCCCACGATTTAGGGAATG	CTGTTCCCACTCCCATCTT (R)	169pb	335 pb (DNA 1545pb)
TM4SF2	CATTTGGTTTGATTTTCCCTC	ACAATAGCAATTAATTGGGGA	GGAGACTAACATGGGAATCA (F)	292pb	423pb (DNA 6998pb)
VBP1	AGTTTACTTTTTCCCTTTCaAT	GTAGTTAGTTATTCGTTAAGC	TCAATTTACTACCACAGAAG (F)	201pb	605 pb (DNA 3009pb)
XIST	TCATTCTATCTGTATAGAACTG TAGGaTT	AGCTATATCTGCTGAATGATCAT TGATTAC		139pb	
XIST1	CAGCATGGTTGGTGACACCTAAG	TGGAATGAGCAGTGTGCGAT		241pb	
XIST2	GGCATTATTTCTGACTTGGAGATG	CCTGCTTATCGTAGTGGCCAG		431pb	
XIST3	GATGGTTATGGAAAGGGTGACTG	CAAATGTAACTGCATGATTGCC		311pb	

Gene	Primer F	Primer R	Primer cDNA (orientação)	Tamanho amplicon DNA	Tamanho amplicon cDNA
XIST4	GTGACACAAGGCCAACGACC	GAATCAGGCTTAAAGATAAACAG GAG		369pb	
ZFX	TGGCAAACCTCTGAAGTGCT	ACATTATGGGGGCCAAGAAG		158pb	
ZNF75	GGAGACACTAGACATGCTTC	CACACAGGAGAGAAGCCCTT	GTGCAATTATTGAATCCT (R)	200pb	783pb (DNA 3939pb)

Anexo 2 – Artigo submetido para publicação no periódico *Genetics*.

MAOA and *GYG2* are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts.

Raquel Stabellini*, Joana Carvalho Moreira de Mello*, Lys Molina Hernandez*, Lygia V. Pereira*[∞]

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

[∞] To whom correspondence should be addressed. Rua do Matão, 277/350, São Paulo, SP, Brazil, CEP 05508-900. Tel. +55-11-30917476, Fax. +55-11-30917553. E-mail: lpereira@usp.br

Abstract

Epigenomics is the study of the chromatin modifications that do not alter gene sequences but, instead, gene expression pattern. It is one of the most exciting fields of research whose importance had grown tremendously in the wake of The Human Genome Project. Development of detailed maps of DNA methylomes and histone-modification patterns of cells in health and disease conditions are the main goals to this new “epigenome era”. X chromosome inactivation (XCI) is a comprehensively studied phenomenon that helped to highlight the heritable nature of epigenetic gene-regulation mechanisms. Although it consists of the transcriptional inactivation of a whole X chromosome in females, some genes are known to escape this process and present bi-allelic expression. *MAOA* and *GYG2* are two X-linked genes that were described to escape X chromosome inactivation in rodent/human somatic cell hybrids.

Using human fibroblasts with skewed inactivation we were able to monitor allele-specific X-linked gene expression, analyzing SNPs in expressed regions. In addition, we examined the pattern of DNA methylation of the 5' end of *MAOA* and *GYG2* genes through sodium bisulfite sequencing. We combined results from these complementary methodologies to conclude that both genes are subjected to XCI in normal human fibroblasts.

All the studies concerning epigenetic profiles of the cells demand a serious consideration in the choice of an appropriate *in vitro* system. Our results put emphasis on the need of an analysis of X inactivation using human cell lines that more accurately mimics the *in vivo* condition in order to determine which genes contribute in fact to X-linked expression differences among genders.

Introduction

X chromosome inactivation (XCI) occurs early in female mammalian development to achieve X-linked dosage compensation between the sexes, according to the hypothesis of Mary Lyon [1]. The process is initiated by transcription and cis-localization of the non-coding XIST RNA, which then recruits many of the epigenetic features generally associated with heterochromatin, including histone modifications, histone variants and DNA methylation, hallmarks of the inactivation process, rendering this chromosome transcriptionally silenced [2, for a review]. The inactive state of the inactive X (Xi) is maintained consistently during mitosis, so that all cells in a clonal population have the same Xi. The long-term and highly stable silencing responsible for clonality is mediated by the synergism of multiple epigenetic modifications that characterize the Xi.

XCI is an impressive example of epigenetic gene regulation, whereby the majority of genes on the approximately 160 Mb X chromosome is silenced in a strictly cis-limited fashion. However, it is now known that at least 15% of the genes on the human X chromosome always escape from XCI to some degree by unknown mechanisms, and another 10% show variable patterns of inactivation, which are likely to have medical relevance [3]. These genes, including many without functional equivalents on the Y chromosome, are probably related to the clinical abnormalities in patients with aneuploidies of the X chromosomes. At least some of the epigenetic marks that are characteristic to the Xi are missing in the genes escaping inactivation [4], what ascertain the importance of the analysis of these genes for the understanding of the mechanics of XCI itself. Differently from humans, in mouse there are only a few genes that are known to escape XCI [5, 6], what may explain the more severe phenotype and reproductive failure of human XO females.

Escape from X inactivation was first suspected based on the abnormal phenotype of Turner syndrome in female individuals with XO karyotype [7]. Since then, different methodologies were developed and used to study escape from XCI, from the early reports analyzing an X-linked erythrocyte surface antigen [8] or measuring enzymatic activities [9], to some important studies describing the use of somatic cell-hybrid systems [10, 11]. Alternatively, different groups analyzed X-linked polymorphisms in female cell lines with complete skewed X inactivation in order to determine the inactivation status of different genes [12, 13, 14, 15]. More recently, the sequencing of the human X chromosome [16] in parallel with the construction of a

comprehensive profile of the pattern of activity of X-linked genes throughout the entire chromosome [17] have taken the study of escapees from XCI, mostly based on somatic cell hybrids, to a much more complete, wide-ranging level.

Monoamine oxidase A (MAOA) is a major enzyme in the regulation of serotonin level, implicated in multiple psychiatric disorders and behavioral traits [reviewed in 18]. *MAOA* is located on Xp11.3, adjacent to *MAOB* gene. Monoallelic expression of *MAOA* had been reported in bovine [19], as well as in human cells [13, 20]; however according to Carrel and Willard [17], every rodent/human somatic cell hybrid analyzed (9 out of 9) displayed biallelic expression of this gene.

The human glycogenin-2 (GYG2) was identified due to a significant similarity to, although being distinct from, the muscle glycogenin-1, and is present preferentially in liver, heart, and, to a lesser extent, pancreas [21]. GYG2 self-glucosylates to form an oligosaccharide primer required for the initiation step of glycogen biosynthesis, serving as a substrate for glycogen synthase. Similar to *MAOA* gene, *GYG2* has been described to escape XCI in rodent/human somatic cell hybrids [17].

In this study, we have investigated the pattern of expression of *MAOA* and *GYG2* on human cells. In order to determine the X inactivation status of these genes, the allelic expression of different SNPs was analyzed on four human fibroblasts cell lines with non-random XCI. Bisulfite sequencing of the CpG islands from the genes distinguished two patterns of methylation, confirming distinct activities of the alleles.

Materials and methods

Cell lines. Four untransformed fibroblast cell lines (GM02226, GM00013, GM00135 and GM01661) derived from female carriers of Lesch-Nyhan Syndrome (MIM #300322) from the NIGMS Human Genetic Cell Repository were grown under the recommended conditions. Every cell line is heterozygous for a mutation in the *HPRT* gene, and subpopulations of cells with completely skewed XCI were obtained by selection in media containing 8-azaguanine (8-aza) or HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine), as described elsewhere [22].

Genotyping and analysis of allele-specific expression. Genomic DNA was extracted using standard phenol protocol [23]. Total RNA was prepared using Trizol (Invitrogen), according to manufacturer's protocol; after a rigorous DNase treatment with Turbo DNA-Free (Ambion), 2 µg were reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen). To control for DNA contamination of the samples, cDNA synthesis was also performed in the absence of reverse transcriptase. Fifty to 100ng of DNA or cDNA were used as templates for PCR amplification of the region surrounding each SNP, using primers listed in Table 1. The PCR conditions are available on request. PCR products were sequenced using those same primers and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with ABI3100 Prism Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

Table 1 – Primer sequences for amplification of regions including SNPs analyzed in this study. A. Primer set used to amplify SNPs rs3027407 and rs11544798; B. rs1137070 and rs1800466; C. rs211659. Primers specific for cDNA amplification are named properly. * Primers previously described on [17].

- A.** MAOA_M F – 5' GTAACATTCTATTTCAACTTCAG 3'
 MAOA_M_cDNA F – 5' CCAGTGCATTATGAAGAGAAG 3'
 MAOA_M R – 5' GGGGAAAACAAGAGGTGGG 3'
- B.** MAOA_W F – 5' AAATGGTCTCGGGAAGGTGA 3' *
 MAOA_W R – 5' ACCGTGGCAGGAGCTTGTAT 3' *
- C.** GYG2 F – 5' CGCTGTTGAACCTTGTGCCT 3' *
 GYG2_cDNA F – 5' TTCACCACTGGGTTCTAAC 3'
 GYG2 R – 5' ACCACCATCGAGAGTCTACT 3' *

Methylation analysis. Genomic DNA from GM00135 cell line was treated with sodium bisulfite using EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), based on the manufacturer's instructions. CpG islands were determinate according to the UCSC Genome Bioinformatics web site (<http://genome.ucsc.edu/>). DNA fragments were amplified by nested PCRs designed to analyze CpG islands within a 417bp fragment at the 5' end of MAOA gene, and a 443pb sequence at the 5' end and the first exon of GYG2 gene. PCR was performed using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and PCR products were cloned into a pGEM T Easy Vector (Promega). At least 30 random clones were PCR amplified using M13 standard primers and were analyzed by automatic sequencing using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with ABI3100 Prism Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The primer sequences for external (Ext) and internal (Int) PCRs are:

MAOA_Ext_F – 5' TttTGtAtttAGTAATttTTTttAG 3';
 MAOA_Ext_R – 5' aCCAAaCCATaaCTACACTACAC 3';
 MAOA_Int_F – 5' AtAtAAGGAtATTtTAAAtTAATAA 3';
 MAOA_Int_R – 5' ACCCCTCACTaaCCAaaaTC 3';
 GYG2_Ext_F – 5' TGtAtTtATTtATTtATTtAGTTTATG 3';
 GYG2_Ext_R – 5' AaaCCTCCTCCACTaCCCA 3';
 GYG2_Int_F – 5' TAAGtttTGtTTtTTtTTtTGG 3';
 GYG2_Int_R – 5' TCCCCTaCAaCCCCCTAC 3'.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

In order to examine the Xi gene activity, we used an *in vitro* system to monitor allele-specific X-linked gene expression which more accurately mimics this process *in vivo* [15]. Completely skewed populations of cells were generated by selection of untransformed human fibroblast cell lines heterozygous for mutations in the *HPRT* gene in media containing 8-aza or HAT. Death of all cells by counterselection with the opposite drug confirmed the nonrandom inactivation.

Cell lines were genotyped for 4 different SNPs in expressed regions of *MAOA* gene (rs3027407, rs11544798, rs1137070 and rs1800466), and 1 in *GYG2* (rs211659) (Table 2). Two cell lines were informative for the SNPs on *MAOA*, and both of them displayed monoallelic expression (Table 2, Fig. 1). For *GYG2*, GM135 was informative and showed expression of only one allele.

Table 2 – Genotype and allele-specific expression of SNPs expressed in human fibroblasts cell lines.

Gene	Xi hybrids expression*	Variant [†]	GM135	GM1661	GM13	GM2226
MAOA	escape (9/9)	rs3027407	A/G (A)	A	G	A/G (G)
		rs11544798	G	G	G	G
		rs1137070	T/C (T)	T	C	T/C (C)
		rs1800466	A	A	A	A
GYG2	escape (9/9)	rs211659	A/T (T)	A	A	A

* Expression results are listed as the no. of hybrids that expressed gene / no. of hybrids tested [17].

[†] Variant as identified in NCBI SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Letters in brackets indicate the expressed allele in informative SNPs.

Figure 1 - Examples of monoallelic expression of MAOA (A) and GYG2 (B) genes. Sequences of informative SNPs from genomic DNA are illustrated in upper panels and from cDNA in lower panels. Arrows indicate position of the polymorphisms.

The state of chromatin activity and DNA methylation patterns are closely correlated, where open active regions of chromatin are associated with hypomethylated DNA, and close inactive regions are associated with hypermethylated DNA [24]. Additionally, due to the XCI, active and inactive X alleles are differentially methylated [25]. However, chromatin of genes that escape the silencing process fail to present the methylated structure characteristic to the Xi [26, 27, 28, 29].

In order to complement our findings from the analysis of allele-specific expression, sodium bisulfite modification followed by sequencing of PCR products was used to determine the CpG methylation pattern of the 5' end of both *MAOA* and *GYG2* genes. Figure 2 illustrates representative results from methylation analysis of the cell line GM00135. In both cases, two patterns of methylation can be identified – on *MAOA* a highly methylated allele is opposed to a less methylated one (Fig. 2A), agreeing with previous report [30]; on *GYG2*, meanwhile, two clearly differentially methylated alleles are observed (Fig. 2B).

Figure 2 - Bisulfite sequencing analysis of 5' end of *MAOA* (A) and *GYG2* gene (B). Each line represents a single DNA template molecule and each circle represents a CpG dinucleotide. Black and open circles represent methylated and unmethylated CpGs, respectively. The methylation status of the missing circles was not determined due to sequencing failure. Over each diagram, a schematic map of the downstream region analyzed, where thick black bar denotes CpG island and little red bars correspond to primer positions.

Differently from results obtained in rodent/human somatic cell hybrids [17], taken together our analysis of allele-specific expression and pattern of methylation show

that *GYG2* and *MAOA* are subjected to XCI in normal human fibroblasts. These results confirm what had been previously described to the latter gene [13, 20].

GYG2 has been localized to Xp22.3, in a region close to, but outside of, pseudoautosomal region 1 (PAR1) [31]. This region contains several X-Y shared genes or genes that have closely related pseudogenes on the Y chromosome. Although one sequence from the Y chromosome (AC002992) includes regions that are over 90% identical to exons 1 to 3 of *GYG2* [31], this Y pseudogene neither contains the sequences that encode glycosyl transferase domain, nor the conserved region close to the COOH terminus of glycogenin proteins that is important for interaction with glycogen synthase. *GYG2*, then, does not share a similarity with other PAR1 genes, whose expression is similar in males and females due to their escape from XCI and expression in Xi in addition to the presence of functional Y similar genes; more alike the rest of X linked genes, dosage compensation of *GYG2* between the sexes is achieved through the process of XCI.

Somatic cell hybridization was an extremely important method developed for assigning human genes, sequence-tagged sites or biochemical markers to individual chromosomes or sub-chromosomal regions. Hybrids resulting from the fusion of human and rodent cells were extensively used in the past to these aims, but many different animal systems are employed to unravel genome maps still nowadays. By collecting hybrid cell lines with different chromosome contents from the species of interest, it is possible to generate hybrid cell panels that can be used to map any DNA sequence to a specific chromosome. Hybrid cells can also be a source of DNA for preparing chromosome-specific DNA libraries.

However, for some studies like those of patterns of expression and epigenetic characteristics of cells, this may be far from the ideal system. It has been well established that cell fusion is capable of inducing global alterations that can culminate in a remarkable change in the epigenotype of the somatic nucleus. Not only when a somatic cell is fused with a pluripotent cell [32, 33, 34], but also when different types of somatic cells are fused [35], dedifferentiation or alteration of a differentiated state can be observed. Changes in methylation and gene expression have been reported [32, 33], with re-activation of previously silent genes [32, 33, 35; for review 36]. Moreover, these modifications in the epigenetic program not only can be induced by the fusion nucleus from different species [35], but also by cells from the same organism [37]. More specifically in respect of XCI, cell fusion may present

the possible disadvantage of the inactivation status being altered. In fact, different anomalous behaviors had already been reported, for examples reactivation of inactive X-linked genes [38, 39] and failure in establishing or keeping the inactive state of Xi properly [40, 41].

Until now, not much is known about how somatic cells are in fact reprogrammed, as remain unknown the reasons why most human chromosomes fail to replicate and are lost in rodent-human hybrids. Therefore, it is indispensable that we look for alternatives to study epigenetic characteristics where the cells are more alike their natural, *in vivo* state.

Here we showed two examples of genes that were once described to escape from XCI in somatic-cell hybrids, but in fact do not in normal human fibroblasts. Based on the nature of the different experimental systems, it is quite understandable that, using untransformed human fibroblasts, our results differ from those obtained by Carrel and Willard with somatic cell hybrids [17].

Recently, Johnston *et al.* [42] demonstrated that the overall expression from the X chromosome is only slightly higher in females compared to males, and this difference can largely be accounted for by elevated female expression of just approximately 5% of X-linked genes. It will be important, then, to determine more accurately which genes contribute in fact to X-linked expression differences among genders, calling attention to the need of an extensive analysis of XCI in a normal clonal human cell line. We presented here at least two genes that were thought to, but do not contribute to the underlying mechanisms responsible for the myriad differences between the sexes. All the discrepancies in anatomy, physiology, cognition, behavior and disease susceptibility continues to represent a monumental challenge to different areas of research [43], but maybe with a lesser contribution of genes escaping from XCI.

References

- [1] M. Lyon, Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.), *Nature* 190 (1961) 372-373.
- [2] E. Heard, Recent advances in X-chromosome inactivation, *Curr Opin Cell Biol.* 16 (2004) 247-55.
- [3] L. Carrel, H.F. Willard, X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females, *Nature* 434 (2005) 400-4.
- [4] C.J. Brown, J.M. Greally, A stain upon the silence: genes escaping X inactivation, *Trends Genet.* 19 (2003) 432–438.
- [5] C.M. Disteche, Escapees on the X chromosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 14180–14182.
- [6] K.D. Tsuchiya, H.F. Willard, Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human, *Mamm. Genome* 11 (2000) 849–854.
- [7] M.A. Ferguson-Smith, Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations, *J Med Genet* 2 (1965) 142-155.
- [8] P.J. Fialkow, X-chromosome inactivation and the Xg locus, *Am J Hum Genet* 22 (1970) 460-463.
- [9] L.J. Shapiro, T. Mohandas, R. Weiss, Non-inactivation of an X-chromosome locus in man, *Science* 204 (1979) 1224-1226.
- [10] T. Mohandas, R.S. Sparkes, B. Hellkuhl, K.H. Grzeschik, L.J. Shapiro, Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse-human hybrid cells: further evidence for the noninactivation of the steroid sulfatase locus in man, *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (1980) 6759-6763.
- [11] C.J. Brown, L. Carrel, H.F. Willard, Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes, *Am J Hum Genet.* 60 (1997) 1333-43.
- [12] L. Carrel, H.F. Willard, Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 7364-7369.
- [13] D. Benjamin, I. Van Bakel, I.W. Craig, A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes, *Eur J Hum Genet.* 8 (2000) 103-8.

- [14] R. Kutsche, C.J. Brown, Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching, *Genomics* 65 (2000) 9-15.
- [15] L.R. Vasques, L.V. Pereira, Allele-specific X-linked gene activity in normal human cells assayed by expressed single nucleotide polymorphisms (cSNPs), *DNA Res.* 8 (2001) 173-7.
- [16] M.T Ross, D.V. Grafham, A.J. Coffey, *et al.*, The DNA sequence of the human X chromosome, *Nature*, 434 (2005) 325-337.
- [17] L. Carrel, H.F. Willard, X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females, *Nature* 434 (2005) 400-404.
- [18] J.C. Shih, R.F. Thompson, Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior, *Am J Hum Genet.* 65 (1999) 593-8.
- [19] F. Xue, X.C. Tian, F. Du, C. Kubota, M. Taneja, A. Dinnyes, Y. Daí, H. Levine, L.V. Pereira, X. Yang, Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones, *Nat. Genetics* 31 (2002) 216-220.
- [20] N. Nordquist, L. Orelund, Monoallelic expression of MAOA in skin fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun.* 348 (2006) 763-767.
- [21] J. Mu, A.V. Skurat, P.J. Roach, Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis, *J Biol Chem.* 272 (1997) 27589-27597.
- [22] B.R. Migeon, X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency: detection of heterozygotes by selective medium, *Biochem. Genet.* 4 (1970) 377-383.
- [23] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [24] A. Razin, H. Cedar, Distribution of 5-methylcytosine in chromatin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 2725-2728.
- [25] S.F. Wolf, D.J. Jolly, K.D. Lunnen, T. Friedmann, B.R. Migeon, Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyl transferase locus on the human X chromosome: implication for X chromosome inactivation, *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984) 2806-2810.
- [26] P.J. Goodfellow, C. Mondello, S.M. Darling, B. Pym, P. Little, P.N. Goodfellow, Absence of methylation of a CpG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5605-5609.

- [27] S.L. Gilbert, P.A. Sharp, Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13825-13830.
- [28] B.A. Boggs, P. Cheung, E. Heard, D.L. Spector, A.C. Chinault, C.D. Allis, Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes, *Nat Genet.* 30 (2002) 73-76.
- [29] G.N. Filippova, M.K. Cheng, J.M. Moore, J.P. Truong, Y.J. Hu, D.K. Nguyen, K.D. Tsuchiya, C.M. Disteché, Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development, *Dev Cell.* 8 (2005) 31-42.
- [30] R.W. Hendriks, Z.Y. Chen, H. Hinds, R.K. Schuurman, I.W. Craig, An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene, *Hum Mol Genet.* 1 (1992) 187-194.
- [31] L. Zhai, J. Mu, H. Zong, A.A. DePaoli-Roach, P.J. Roach, Structure and chromosomal localization of the human glycogenin-2 gene GYG2, *Gene* 242 (2000) 229-235.
- [32] M. Tada, T. Tada, L. Lefebvre, S.C. Barton, M.A. Surani, Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells, *EMBO J.* 16 (1997) 6510-6520.
- [33] M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, T. Tada, Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, *Curr Biol.* 11 (2001) 1553-1558.
- [34] Q.L. Ying, J. Nichols, E.P. Evans, A.G. Smith, Changing potency by spontaneous fusion, *Nature* 416 (2002) 545-548.
- [35] H.M. Blau, C.P. Chiu, C. Webster, Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons, *Cell* 32 (1983) 1171-1180.
- [36] H.M. Blau, B.T. Blakely, Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons, *Semin Cell Dev Biol.* 10 (1999) 267-272.
- [37] J.T. Do, H.R. Schöler, Cell-cell fusion as a means to establish pluripotency, in: J. Morser, S.-I. Nishikawa, H.R. Schöler (Eds.), *Stem Cells in Reproduction and in the Brain*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, v. 60, 2006, pp. 35-45.
- [38] N. Ellis, E. Keitges, S.M. Gartler, M. Rocchi, High-frequency reactivation of X-linked genes in Chinese hamster X human hybrid cells, *Somat Cell Mol Genet.* 13 (1987) 191-204.

- [39] S.M. Gartler, M.A. Goldman, Reactivation of inactive X-linked genes, *Dev Genet.* 15 (1994) 504-514.
- [40] I. Yoshida, Y. Nishita, T.K. Mohandas, N. Takagi, Reactivation of an inactive human X chromosome introduced into mouse embryonal carcinoma cells by microcell fusion with persistent expression of XIST, *Exp Cell Res.* 230 (1997) 208-19.
- [41] N. Takagi, Variable X chromosome inactivation patterns in near-tetraploid murine EC x somatic cell hybrid cells differentiated in vitro, *Genetica* 88 (1993) 107-17.
- [42] C.M. Johnston, F.L. Lovell, D.A. Leongamornlert, B.E. Stranger, E.T. Dermitzakis, M.T. Ross, Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete, *PLoS Genet.* 4 (2008) e9.
- [43] H. Skaletsky, T. Kuroda-Kawaguchi, P.J. Minx, H.S. Cordum, L. Hillier, *et al.*, The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes, *Nature* 423 (2003) 825-37.

Anexo 3 - Pannel de expressão de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de fibroblastos humanos GM135-TEL.

Ordem Citogenética#	Gene	Atividade no Xi*	Identificação do SNP\$	Alelos	DNA	cDNA
Xp22.23	GYG2	escapa	rs211659	A/T	A/T	T
Xp22.31	FAM16AX	escapa	rs10458	C/T	C/T	C/T
Xp22.22	TBL1X	(7/9)	rs7256	A/G	A/G	A
Xp22.22	GPR143	escapa	rs3044/976	C/T	T	
Xp22.22	CLCN4	(5/9)	rs1061191	A/C	C	
Xp22.22	PIGA	inativa	rs3087965	A/T	A/T	A
			rs1804165	G/T	G	
			rs11448948	o/A (in-del)	A	
Xp22.21	ZFX	escapa	rs5949242	C/T	C/T	C/T
Xp11.4	TCTE1L	inativa	rs12849	A/T	A/T	T
Xp11.4	TM4SF2	inativa	rs10333	A/G	G	
Xp11.3	MAOA	escapa	rs1801291 (W)	T/C	T/C	T/C
			rs3027407 (M)	A/G	A/G	A
			rs11544798	A/G	G	
Xp11.23	TIMP1	inativa	rs6520277	C/T	C	
Xp11.23	EBP	inativa	rs3048	G/T	G	
			rs1049367	A/G	A	
Xp11.23	RBM3	inativa	rs8931	C/G	G	
Xp11.23	SUV39H1	inativa	rs3373	C/T	C/T	C
Centrômero						
Xq13.1	OPHN1	inativa	rs492933	C/T	T	
			rs1064038	C/T	C	

Ordem Citogenética#	Gene	Atividade no Xi*	Identificação do SNP\$	SNP	DNA	cDNA
Xq13.1	DLG3	inativa	rs1044422	A/G	A	
Xq13.3	XIST	-	rs1620574	C/T	C	
			rs1894271 (1)	A/G	A/G	A
			rs16992436 (2)	G/A	G/A	G
			rs34970367	(-/A)	A	
			rs1794213 (3)	G/T	T	
			rs16992442	A/G	A	
			rs12009304	C/T	C	
			rs16992443 (4)	C/A	C/A	A
			rs34986527	(-/A)	A	
Xq21.1	ATRX	inativa	rs3088074	C/G	C	
Xq21.1	ATP7A	(4/9)	rs2227291	C/G	G	
Xq21.1	SH3BGRL	escapa	rs1044828	C/T	T	
Xq22.1	SYTL4	escapa	rs8780	C/G	G (G)	
Xq22.1	ARMCX3	inativa	rs6995	A/G	A/G	G
			rs1058663	A/G	G	
Xq22.3	TCEAL4	inativa	rs11010	C/T	C/T	T
			rs221933	C/T	C	
Xq24	IL13RA1	inativa	rs2254672	G/T	T	
			rs12011190	A/G	G	
Xq26.2	GPC4	inativa	rs1048369	C/T	G/A	A
Xq26.3	ZNF75	inativa	rs1129093	A/G	C	
Xq28	CXORF6	inativa	rs567517	A/G	C	
Xq28	ARHGAP4	escapa	rs2070097	C/T	G	
Xq28	CXORF12	(5/9)	rs13397	A/G	G	

Ordem Citogenética#	Gene	Atividade no Xi*	Identificação do SNP\$	SNP	DNA	cDNA
Xq28	IRAK1	inativa	rs1059703	C/T	C	
Xq28	MPP1	inativa	rs2664162	G/T	C	
Xq28	VBP1	inativa	rs11887	A/G	C	
Xq28	CLIC2	inativa	rs559165	G/T	G	

De acordo com o mapa do VEGA.

Total: 15 heterozigotos/38 SNPs

* Carrel & Willard, 2005

\$ Segundo o NCBI.

SNPs com heterozigosidade desconhecida ou baixa, presentes no mesmo amplicom do SNP principal imediatamente acima.

Anexo 4 - Pannel de expressão de genes ligados ao cromossomo X na linhagem de células 293 clone F6.

Ordem Citogenética#	Gene	Atividade no Xi*	Identificação do SNP\$	Alelos	DNA	cDNA
Xp22.23	GYG2	escapa	rs211659	A/T	A	
Xp22.31	FAM16AX	escapa	rs10458	C/T	C/T	C/T
Xp22.22	TBL1X	(7/9)	rs7256	A/G	G	
Xp22.22	CLCN4	(5/9)	rs1061191	A/C	C	
Xp22.22	PIGA	inativa	rs3087965	A/T	A	
			rs1804165	G/T	G	
			rs11448948	o/A (in-del)	A	
Xp11.4	TCTE1L	inativa	rs12849	A/T	A	
Xp11.4	TM4SF2	inativa	rs10333	A/G	A/G	A
Xp11.3	MAOA	escapa	rs1801291 (W)	T/C	T/C	T
			rs3027407 (M)	A/G	A/G	A
			rs11544798	A/G	G	
Xp11.23	TIMP1	inativa	rs6520277	C/T	C	
Xp11.23	EBP	inativa	rs3048	G/T	G	
			rs1049367	A/G	A	
Xp11.23	RBM3	inativa	rs8931	C/G	G	
Xp11.23	SUV39H1	inativa	rs3373	C/T	T	
Centrômero						
Xq13.1	OPHN1	inativa	rs492933	C/T	C/T	C
			rs1064038	C/T	C	
Xq13.1	DLG3	inativa	rs1044422	A/G	G	
Xq13.3	XIST	-	rs1620574	C/T	C	
			rs1894271 (1)	A/G	A/G	G

Ordem Citogenética#	Gene	Atividade no Xi*	Identificação do SNP\$	Alelos	DNA	cDNA
Xq13.3	XIST	-	rs16992436 (2)	G/A	A	
			rs34970367	(-/A)	-	
			rs1794213 (3)	G/T	T	
			rs16992442	A/G	A/G	A
			rs12009304	C/T	C	
			rs16992443 (4)	C/A	C	
			rs34986527	(-/A)	-	
Xq21.1	ATRX	inativa	rs3088074	C/G	C/G	C
Xq21.1	ATP7A	(4/9)	rs2227291	C/G	C/G	C
Xq22.1	ARMCX3	inativa	rs6995	A/G	A/G	A
			rs1058663	A/G	G	
Xq22.3	TCEAL4	inativa	rs11010	C/T	T	
Xq24	IL13RA1	inativa	rs2254672	G/T	T	
			rs12011190	A/G	G	
Xq26.2	GPC4	inativa	rs1048369	C/T	T	
Xq26.3	ZNF75	inativa	rs1129093	A/G	A/G	A
Xq28	CXORF6	inativa	rs567517	A/G	A/G	G
Xq28	CXORF12	(5/9)	rs13397	A/G	G	
Xq28	IRAK1	inativa	rs1059703	C/T	T	
Xq28	MPP1	inativa	rs2664162	G/T	G/T	G
Xq28	VBP1	inativa	rs11887	A/G	A/G	A
Xq28	CLIC2	inativa	rs559165	G/T	G/T	G

De acordo com o mapa do VEGA.

* Carrel & Willard, 2005

\$ Segundo o NCBI.

Total: 15 heterozigotos/34 SNPs

SNPs com heterozigosidade desconhecida ou baixa, presentes no mesmo amplicom do SNP principal imediatamente acima.