

Joana Carvalho Moreira de Mello

Estudos da inativação do cromossomo X em  
humanos: iniciação e *imprinting*

X-chromosome inactivation in humans: initiation  
and imprinting

São Paulo

2015

Joana Carvalho Moreira de Mello

Estudos da inativação do cromossomo X em  
humanos: iniciação e *imprinting*

X-chromosome inactivation in humans: initiation  
and imprinting

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia 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

2015

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro das agências de fomento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
Fundação Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROEX)

# Ficha Catalográfica

---

Moreira de Mello, Joana Carvalho  
Estudos da inativação do  
cromossomo X em humanos: iniciação e  
imprinting  
142 páginas

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

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

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra.

Orientadora

*À minha família, por estarem sempre ao meu lado.*

# Agradecimentos

---

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho e com o meu desenvolvimento científico, intelectual e emocional. Isso inclui colaboradores, colegas, amigos e familiares, obrigada!

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Lygia Pereira por enfrentar comigo o desafio que este projeto nos trouxe, confiando em mim por todos esses anos, me dando toda a liberdade para trabalhar e me ajudando a buscar soluções. Obrigada, Lygia.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Vibranovski, que aceitou me co-orientar, colaborando com extrema dedicação para a realização deste e projeto. Sem sua ajuda não teríamos chegado tão longe. Obrigada, Maria.

Agradeço a Profa. Dra. Wendy Robinson que me entregou as chaves de seu laboratório e à toda a sua equipe. Em especial à Maria Peñaherrera e à Ruby Jiang.

Agradeço aos Drs. Noboru Sakabe e Gustavo Ribeiro pela infinita paciência que tiveram em me ajudar ao explicar detalhes da Bioinformática e da estatística.

Um agradecimento muito especial à profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes e à pesquisadora Dra. Danyella Dogini, ambas do laboratório de genética molecular da FCM-UNICAMP, que muito gentilmente cederam amostras de cérebros humanos. Sei como são preciosas, obrigada.

Agradeço à Profa. Dra. Estela Bevilacqua e sua equipe que me ajudou com as amostras de placentas e me acolheu com tanto carinho.

Sou muito grata também à profa. Dra. Tatiana Torres e ao Dr. Jorge E. S. Souza pelas discussões sugestões e opiniões tão pertinentes.

Agradeço também aos fóruns de bioinformática e à toda comunidade que deles participam fazendo e respondendo perguntas, dando dicas e explicando minuciosamente os detalhes ocultos da bioinformática.

Aos professores do departamento de Genética e Biologia Evolutiva deste Instituto, em especial à prfa. Dra. Angela Morgante, ao prof. Dr. Paulo Otto, e ao prof, Dr. Luis Netto, prfa. Dra. Regina Mingroni e prof. Dr. Eduardo Gorab.

Aos funcionários e colegas deste mesmo departamento, Fátima, Mara, Maraísa, Deyse e Helenice, Lilian, Fernando, Juliana, Débora.

Aos meus colegas de laboratório, passados e presentes, Giovana, Luis, Max, Gustavo, Patrícia, Juliana, Elisa, Lucas, Fabiano, Mari, Gisele, Fernando, Sofia, Fernanda, Simone, Roberta, Luciana, Claudia e Amanda. Em especial minhas amigas e mentoras, Raquel, Ana, Erica e Rafa.

Aos colegas de trabalho em outras terras Ilse, Cindy, Marjon e claro Dra Hikke.

E finalmente à minha família, sobretudo ao Ruggero por todo o seu amor e sua paciência. Mas agradeço especialmente aos meus pais, aos quais tenho grande admiração. Amantes do fascinante mundo da epigética, desde o meu mestrado, sempre interessados em minhas descobertas e me apoiando em todas as minhas decisões.

# Índice

---

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Lista de Tabelas .....   | 10                                  |
| Lista de figuras.....  | 11                                  |
| Capítulo I .....   | 13                                  |
| ESTUDOS SOBRE A INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X: INÍCIAÇÃO E <i>IMPRINTING</i> .....  | 13                                  |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....   | 14                                  |
| 2. JUSTIFICATIVAS .....  | 20                                  |
| 3. OBJETIVOS GERAIS .....  | 21                                  |
| Capítulo II .....  | 22                                  |
| ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO CROMOSSOMO X HUMANO EM ESTÁGIOS PRÉ-IMPLANTACIONAIS,<br>UMA ANÁLISE <i>IN SILICO</i> ..... | 22                                  |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 23                                  |
| 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 27                                  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 28                                  |
| 3.1. Obtenção dos dados .....  | 28                                  |
| 3.2. Bancos de dados: .....  | 29                                  |
| 3.3. Plano geral do processo de alinhamento e identificação das variantes .....  | 31                                  |
| 3.4. Seleção dos SNPs .....  | 40                                  |
| 3.5. Determinação do sexo cromossômico das amostras.....   | 40                                  |
| 3.6. Expressão de <i>XIST</i> .....  | 42                                  |
| 3.7. Genotipagem .....   | 42                                  |
| 3.8. Determinação do padrão de inativação do cromossomo X.....   | 43                                  |
| 3.9. Razão entre o nível de expressão gênica dos genes do cromossomo X e<br>aquela dos autossomos.....                 | 45                                  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.1. Qualidade, alinhamento das reads e variantes anotadas.....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.2. Determinação do sexo cromossômico das amostras.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.3. Expressão de <i>XIST</i> .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.4. Desvios de alinhamento em favor do alelo de referência.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.5. Inativação do cromossomo X pela análise de expressão alelo específica.....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5. Razão da expressão global entre genes do cromossomo X e autossômicos.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5. CONCLUSÕES .....  | 46                                  |
| Capítulo III .....   | 49                                  |
| GENES REGULADOS POR <i>IMPRINTING</i> NO CROMOSSOMO X HUMANO .....   | 49                                  |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 50                                  |
| 2. Objetivos específicos .....   | 55                                  |
| 3. Material e métodos .....  | 56                                  |
| 3.1. Laboratórios.....   | 56                                  |
| 3.2. Seleção dos polimorfismos e síntese dos iniciadores .....   | 56                                  |



|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| 3.3. Obtenção das amostras .....                                       | 58                                  |
| 3.4. Obtenção dos ácidos nucléicos .....                               | 59                                  |
| 3.5. Genotipagem do DNA genômico e verificação do alelo expresso ..... | 61                                  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.1. Análise de expressão alelo-específica em placenta humana a termo  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.1.1. Genotipagem .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4.2. Análise de expressão alelo-específica em cérebro humano:          | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5. CONCLUSÃO .....   | 65                                  |
| Conclusões gerais .....  | 67                                  |
| Resumo .....   | 69                                  |
| Abstract .....   | 71                                  |
| Referências bibliográficas .....                                       | 73                                  |
| Endereços na internet .....  | 82                                  |
| Anexos .....   | 83                                  |

# Capítulo I

---

ESTUDOS SOBRE A INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X: INÍCIAÇÃO E  
*IMPRINTING*

A definição contemporânea de epigenética faz referência a mecanismos bioquímicos de modificações no DNA que são transmitidas mitoticamente sem, no entanto, alterar sua sequência original de nucleotídeos. Todas essas mudanças bioquímicas têm uma substancial influência na estrutura da cromatina e função gênica, que difere de acordo com o tipo e localização da modificação. A reprogramação epigenética é o processo pelo qual o genótipo do organismo é modulado pelo ambiente para produzir seu fenótipo. Este fenômeno também ajuda a explicar as variações individuais e a singularidade de células, tecidos e órgãos apesar de possuírem uma informação genética idêntica.

As modificações epigenéticas melhor caracterizadas hoje são a metilação do DNA, as modificações das histonas que compõem os nucleossomos (Jenuwein and Allis, 2001) e ainda a ação de RNAs não-codificadores (ncRNA - do inglês, *non-coding RNA*) (revisto por Richards, 2006)).

Os processos epigenéticos são hoje reconhecidos como fundamentais durante o desenvolvimento e envelhecimento (revisto por Calvanese *at al.*, 2009), e cada vez mais estão associados a mecanismos de doenças como o câncer, doenças auto-imunes e síndromes como a de Prader-Willi e de Angelmann (Ballestar *at al.*, 2006; Butler, 2009; Tang and Ho, 2007). Já foi também demonstrado que mudanças ambientais são capazes de interferir e modificar o padrão de metilação em regiões específicas do DNA, caracterizando o complexo sistema de comunicação entre fatores externos e a epigenética (Postovit *at al.*, 2007).

Os fenômenos epigenéticos mais reconhecidos são:

- aqueles que levam à diferenciação celular durante o desenvolvimento, responsáveis pelo padrão coordenado de controle da expressão de um zigoto indiferenciado a um adulto com diferentes tecidos e tipos celulares (Surani *at al.*, 2007). Uma vez diferenciada, a identidade celular é mantida e cada tipo terá seu padrão único de expressão gênica derivado de seu perfil epigenético, possuindo assim um epigenoma próprio;
- aqueles que determinam o padrão de expressão monoalélico de um gene como a expressão monoalélica aleatória e o imprinting genômico, onde o alelo expresso é determinado de acordo com a origem parental;
- a inativação do cromossomo X, que também resulta em expressão monoalélica dos genes deste cromossomo.

### A inativação do cromossomo X

A inativação do cromossomo X (ICX) é um impressionante exemplo de modificação e regulação epigenética nos mamíferos. O evento é responsável por garantir a compensação de dose em relação à transcrição gênica nos cromossomos sexuais entre fêmeas (XX) e machos (XY) (LYON, 1961; OHNO *at al.*, 1959).

O processo tem início nas primeiras etapas do desenvolvimento do embrião feminino, com a transcrição do gene XIST, a partir do futuro X inativo (Xi). Este gene exclusivo de mamíferos eutérios transcreve para um ncRNA e suas moléculas se depositam em *cis* e então recrutam todas as modificações epigenéticas associadas a heterocromatina, incluindo modificações de histona e metilação de DNA deixando o cromossomo num estado transcricional inativo (revisto em (Okamoto *at al.*, 2004).

Um *locus* chave para a ICX é o Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC – do inglês, *X Inactivation Centre*) (Brown *at al.*, 1991; Rastan and Cattanch, 1983). Antes de se estabelecer a inativação, em cada célula do embrião, ocorre uma íntima

interação entre os XICs homólogos (Bacher *at al.*, 2006; Xu *at al.*, 2006). Essa interação está diretamente relacionada aos processos de contagem, escolha e iniciação do silenciamento, sendo que cada célula irá inativar todos menos um cromossomo X por genoma diploide.

No XIC de camundongos existe um outro importante gene com atividade relacionada à supressão de *Xist*, mantendo o X ativo (*Xa*), o *Tsix* (do inglês, *X (inactive)-specific transcript, antisense*) (Lee *at al.*, 1999). Este gene também produz um ncRNA e sua sequência apresenta sobreposição à toda a extensão de *Xist* (Lee and Lu, 1999). Apesar de o homólogo humano *TSIX* ter sido descrito em 2001 (Migeon *at al.*, 2001), estudos sobre sua existência e sua função continuam gerando controvérsias (Lee, 2011; Migeon, 2003; Payer and Lee, 2008). Em extensão, o *TSIX* humano não cobre a região promotora de *XIST* (fundamental para sua repressão em camundongos), pois possui uma extremidade 3' truncada, e ainda, suas ilhas CpG (essenciais na expressão de *Tsix*) são incompletas se comparadas às de camundongos (Migeon *at al.*, 2001).

Embora ainda não se tenha evidências claras sobre alguma função envolvendo o *TSIX* humano no processo de ICX, um estudo de 2013 identificou outro ncRNA, sem homólogo em camundongos: o gene *XACT* (do inglês, *X active coating transcript*). Em linhagens de células tronco pluripotentes este gene é expresso a partir do *Xa* e seu RNA também se deposita em *cis*, entretanto ao contrário do que ocorre com *XIST*, a expressão e o acúmulo de *XACT* só pode ser observado em células indiferenciadas em estágio pré-ICX (Vallot *at al.*, 2013).

Como característica de um fenômeno epigenético, o estado inativo do cromossomo X é firmemente mantido através das mitoses, e assim as células pertencentes a uma população clonal devem possuir sempre o mesmo Xi. A estabilidade do silenciamento observado durante as mitoses é resultado de um

sinergismo entre múltiplos fatores epigenéticos que caracterizam o estado inativo do cromossomo X (Csankovszki *at al.*, 2001).

A ICX pode ocorrer basicamente de duas maneiras: aleatória, onde cada célula escolhe ao acaso qual será o cromossomo Xi, paterno ou materno; ou de forma dependente da origem parental, “imprintada” (adaptado do inglês, *imprinted*) (Boumil and Lee, 2001). As células somáticas das fêmeas dos mamíferos eutérios são exemplos inativação aleatória, onde qualquer um dos seus dois cromossomos X pode ser inativado (Lyon, 1961). Já as células somáticas de fêmeas marsupiais são um clássico exemplo de inativação “imprintada”, nas quais o X de origem paterna é sempre inativado (Sharman, 1971).

Durante o desenvolvimento embrionário de camundongos a ICX ocorre em duas etapas: a primeira tem início no embrião em estágio de duas células e o X de origem paterna é preferencialmente inativado (ICX “imprintada”). Na fase de blastocisto as células da massa celular interna reativam o cromossomo X paterno e o processo de inativação se inicia novamente naquelas células, desta vez com escolha aleatória do Xi (Mak *at al.*, 2004; Okamoto *at al.*, 2004). Por consequência deste fenômeno, o que se observa em camundongos é a ICX “imprintada” nos tecidos extra-embrionários e aleatória no embrião propriamente dito (Takagi e Sasaki, 1975; West *at al.*, 1977). Em humanos até o momento foi observado apenas o padrão de ICX aleatória tanto em tecidos extra-embrionários quanto no organismo adulto (Amos-Landgraf *at al.*, 2006; Moreira de Mello *at al.*, 2010).

Dados relacionados aos mecanismos de ICX no início do desenvolvimento humano são difíceis de serem obtidos não apenas por causa das restrições éticas feitas a estudos que envolvem embriões humanos, mas também pela dificuldade em se obter e manipular o material. Entretanto dois importantes estudos buscaram determinar em que momento a ICX teria início em embriões em estágio pré-implantacional. Através de experimentos com hibridação fluorescente *in situ* (FISH,

sigla em inglês para *fluorescent in situ hybridization*) de RNA van den Berg e colaboradores (2009) e Okamoto e colaboradores (2011) detectaram a presença do RNA de XIST e seu acúmulo se intensificando em embriões a partir do estágio de oito células. Além disso, van den Berg e colaboradores (2009) foram capazes de detectar expressão monoalélica do gene *CHIC1* no X ativo, enquanto Okamoto e colaboradores (2009) observaram expressão bialélica para os genes *ATRX*, *FGD1* e *HUWE1*. Assim, a extensão do silenciamento transcricional dos genes no cromossomo X no estágio de blastocisto não foi conclusiva.

Em células adultas humanas, nas quais a ICX já se estabeleceu, cerca de 15% dos genes se mantém transcricionalmente ativos a partir do Xi, mostrando expressão bialélica e outros 10% apresentam padrões de atividade que podem variar entre tecidos e até mesmo entre os indivíduos (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005). Muitos desses genes que escapam à ICX estão presentes nas regiões pseudoautosômicas ou apresentam homólogos no cromossomo Y, e assim são expressos de forma bialélica em ambos os gêneros. Já àqueles genes do X que escapam à ICX sem equivalentes funcionais no cromossomo Y, foram atribuídas funções relacionadas com as diferenças entre os gêneros, e podem também explicar as anormalidades clínicas reconhecidas em pacientes com aneuploidias do cromossomo X. Assim, acredita-se que os produtos transcricionais dos genes que escapam à ICX devem ter papel nos fenótipos encontrados em indivíduos com a síndrome de Klinefelter (47,XXY) e a síndrome de Turner (45,X) (Berletch *at al.*, 2011).

Além disso, diferenças observadas no fenótipo de mulheres com síndrome de Turner com diferentes origens parentais do cromossomo X herdado sugerem a existência de regulação por imprinting em algum(ns) dos gene(s) do cromossomo X (revisto por Lee and Bartolomei, 2013). Entretanto, até o momento, não foi descrita a ocorrência de nenhum gene assim regulado no cromossomo X humano.

# Capítulo II

---

ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO CROMOSSOMO X HUMANO EM  
ESTÁGIOS PRÉ-IMPLANTACIONAIS, UMA ANÁLISE *IN SILICO*



Após mais de meio século desde a proposição de Mary Lyon sobre a existência de compensação de dose através da inativação transcricional global de um dos cromossomos sexuais de mamíferos eutérios (Lyon, 1961 e 1962) podemos dizer que muito se avançou no conhecimento das etapas e mecanismos que envolvem o silenciamento transcricional de um cromossomo X em todas as células das fêmeas. Entretanto, a maioria do que se sabe hoje sobre o início do processo de ICX está baseada em estudos envolvendo camundongos, e cada vez mais evidências surgem mostrando que humanos e camundongos diferem substancialmente quanto ao início do processo de inativação e à escolha do X inativo em certas fases do desenvolvimento (Okamoto *at al.*, 2011, Moreira de Mello *at al.*, 2010).

Tanto em humanos como em camundongos, sabe-se que o início do processo de ICX depende da expressão e super-regulação de um gene em especial, o *XIST/Xist* localizado no centro de inativação do cromossomo X (XIC) (Payer and Lee, 2008). Nas duas espécies, este gene transcreve um lncRNA (do inglês, *long non-coding RNA*) que é depositado em *cis* no Xi mantendo esse padrão ao longo de toda a vida da célula (Brockdorff *at al.*, 1992; Brown *at al.*, 1992; Clemson *at al.*, 1996). Este fenômeno pode ser observado através de técnicas de FISH de RNA como um forte acúmulo de suas moléculas sobre o Xi em células adultas. Genes importantes relacionados ao Xa foram descritos em camundongos e humanos, *Tsix* e *XACT* respectivamente (Lee *at al.*, 1999; Stavropoulos *at al.*, 2001; Vallot *at al.*, 2013). Apesar de terem atividade funcional exclusiva em cada uma das espécies onde foram descritos, ambos foram relacionados ao Xa no início do processo de ICX, como apresentado na introdução geral.

Uma vez que o cromossomo X é silenciado, ele é mantido neste estado nas células somáticas durante toda a vida do organismo de maneira estável, mesmo após

as sucessivas mitoses. Em termos gerais, o estado inativo do X é mantido por uma ação conjunta de mecanismos como metilação de suas ilhas CpG, a constante transcrição de *XIST/Xist*, modificações das histonas (metilação e hipoacetilação), e a presença da variante de histona macroH2A (Csankovszki *at al.*, 2001; Mietton *at al.*, 2009).

Em camundongos, o gene *Xist* tem sua transcrição iniciada no embrião em estágio pré-implantacional ainda na fase de duas células, o que coincide com a ativação do genoma embrionário (EGA - do inglês, *Embryonic genome activation*). Nesta fase, o gene é expresso a partir de ambos os cromossomos. Entretanto, sua expressão é rapidamente estabilizada e seu RNA se acumula apenas sobre o cromossomo X paterno (Payer and Lee, 2008). No estágio de blastocisto, nas células da massa celular interna, o que se observa é a reativação do X paterno e uma segunda etapa de ICX - desta vez a escolha do Xi é aleatória, e se mantém nas células do embrião até a fase adulta (Deng *at al.*, 2014; Patrat *at al.*, 2009). Em humanos pouco se sabe sobre os estágios iniciais de ICX: em que momento se inicia a transcrição de *XIST*, se no início a ICX ocorre de maneira “imprintada”, e se existem dois momentos de ICX como observado em camundongos.

Dois estudos entretanto, tiveram acesso a embriões humanos em estágio pré-implantacional e por técnica de FISH de RNA buscaram responder às questões pendentes no processo de ICX no início do desenvolvimento: van den Berg e colaboradores (2009) apresentam resultados de embriões a partir do estágio de oito células e Okamoto e colaboradores (2011) investigaram a expressão de *XIST* em embriões em estágio de mórula e blastocisto. van den Berg e colaboradores (2009) concluíram em seu estudo que um leve acúmulo de *XIST* pode ser detectado já no embrião de oito células e que em blastocisto o X coberto pelo RNA de *XIST* já apresenta o gene *CHIC1* inativado, sugerindo que neste estágio do desenvolvimento a ICX já tenha acontecido. Okamoto e colaboradores (2011) entretanto reportam que os genes *ATRX*, *FGD1* e *HUWE1* se mantêm ativos mesmo no X com acúmulo de *XIST*

em fase de blastocisto. Especula-se que a disseminação dos sinais para o silenciamento transcricional dos genes no Xi ocorra de maneira paulatina e que os genes próximos ao XIC sejam os primeiros a serem inativados (Pinter *at al.*, 2012). Assim, o fato de *CHIC1* encontrar-se na mesma banda cromossômica que *XIST* (Xq 13.2, montagem genômica de referência GRCh38) e os genes estudados por Okamoto e colaboradores (2011) estarem mais distantes (*FGD1* (Xp11.21, GRCh38), *HUEW1* (Xp11.22, GRCh38) e *ATRX* (Xq21.1, GRCh38), pode explicar a divergência entre os resultados dos dois estudos – em blastocistos humanos a ICX estaria se estabelecendo e os sinais para inativação transcricional se disseminando, logo *CHIC1*, mais próximo de *XIST* já estaria inativado, enquanto que aqueles genes mais distantes ainda estariam ativos.

Em camundongos é possível reproduzir *in vitro* o processo de ICX ao longo do desenvolvimento ao se diferenciar *in vitro* células de linhagens de células tronco embrionárias (CTEs) femininas (que apresentam dois X ativos, XaXa) (revisto em Bermejo-Alvarez *at al.*, 2012). Em humanos porém, o estado de inativação do X em CTEs indiferenciadas parece ser muito mais complicado: por FISH de RNA foram descritos três tipos de linhagens de acordo com o padrão de acúmulo de *XIST* antes e depois da diferenciação *in vitro*: classe I, sem sinal de *XIST* em células indiferenciadas e como sinal após diferenciação; classe II com sinal de *XIST* antes e depois da diferenciação; e classe III sem sinal de *XIST* antes ou depois da diferenciação (Silva *at al.*, 2008). Sob a ótica do estado transcricional dos genes do cromossomo X em CTEs humanas, um outro trabalho também definiu três tipos de linhagens: classe I, dois X ativos; classe II, inativação parcial; e classe III, inativação total de um dos homólogos (Bruck and Benvenisty, 2011). Assim, ao contrário do observado em camundongos, organismo utilizado universalmente como modelo, em humanos ainda não é possível reproduzir *in vitro* fielmente o processo de inativação do cromossomo X.

Em agosto de 2013, foram publicados dois estudos envolvendo sequenciamento de última geração de RNA total (RNA-Seq) de embriões humanos em diferentes

estágios pré-implantacionais (Xue *at al.*, 2013 e Yan *at al.*, 2013). Estes trabalhos tornaram públicos dados de RNA-Seq de células únicas isoladas de embriões em estágio de 2, 4 e 8 células, e em estágio de mórula e de blastocisto, bem como de oócitos e zigotos humanos gerados a partir de técnicas de fertilização *in vitro*.

Ambos os estudos apresentam como objetivo comum estudar a variação no transcriptoma ao longo do desenvolvimento humano. Para tanto, eles realizaram análises similares que os levaram às mesmas conclusões, corroborando de maneira independente os resultados dos dois trabalhos. Entre os principais resultados estão a identificação de genes chave no controle do desenvolvimento, novos lncRNAs com expressão específica em determinados estágios, início de ativação do genoma embrionário, degradação dos mRNAs maternos estocados durante a gametogênese, entre outros. Embora muito detalhados, nenhum dos dois trabalhos se interessou em estudar especificamente a atividade transcricional do cromossomo X durante o desenvolvimento pré-implantacional humano. Assim, esses dados públicos gerados propiciam uma oportunidade única de se estudar o início da ICX em diferentes estágios do desenvolvimento. O fato de os dois estudos supramencionados terem realizado os experimentos em células únicas permite análises ainda mais detalhadas do que aquelas propostas originalmente, sendo possível determinar se todas as células de um determinado embrião dão início à ICX em um mesmo momento, discriminando individualmente as células da massa celular interna e as da trofoectoderme no estágio de blastocisto; além disso, pode-se avaliar ainda se a inativação do cromossomo X ocorre de maneira “imprintada” ou aleatória nesta fase do desenvolvimento.

Apesar de apenas um blastocisto ter tido o sexo cromossômico determinado como XX, os resultados apresentados neste capítulo contribuem significativamente para a compreensão do início e estabelecimento da inativação do cromossomo X em humanos. Alguns poucos estudos tentaram observar o início da transcrição de *XIST* em estágios pré-implantacionais: por PCR convencional, Daniels e colaboradores (1997) e Ray e colaboradores (1997) detectaram a expressão de *XIST* em embriões em diferentes fases pré-implantacionais tanto femininos quanto masculinos. Porém, na PCR convencional o grande número de ciclos utilizados na amplificação do material obtido pode mascarar a verdadeira intensidade de sinal resultado da expressão de *XIST* nos diferentes estágios e gêneros, o que pode justificar a detecção de RNA de *XIST* já em zigotos por Daniels e colaboradores (1997). Todavia, ambos os trabalhos relatam aumento de expressão de *XIST* dependente da fase do desenvolvimento (Daniels *at al.*, 1997; Ray *at al.*, 1997).

Uma técnica mais sensível é a de FISH de RNA, utilizada por van den Berg e colaboradores (2009) e Okamoto e colaboradores (2011). Apesar de concordarem em alguns aspectos, os resultados desses trabalhos divergem em outros. Em blastocistos femininos, van den Berg e colaboradores (2009) encontraram 90% das células com acúmulo de *XIST* em um único cromossomo X; já Okamoto e colaboradores (2011) observaram dois acúmulos de sinal moderado de *XIST* em 85% das células (Figura 9). Os resultados divergentes podem ser explicados por variações nas condições de cultura e qualidade dos embriões utilizados, bem como em diferenças nos protocolos dos ensaios de FISH de RNA (Payer *at al.*, 2011). Porém, desde então não houve novas publicações sobre a questão do início da ICX em humanos.

A tecnologia de RNA-Seq utilizada no presente trabalho se mostrou bastante sensível e corroborou os achados dos estudos de FISH de RNA de *XIST* de van den

Berg e colaboradores (2009), pois sua expressão foi detectada apenas em embriões a partir do estágio de oito células (Figura 9). Porém, não podemos afirmar se o gene é expresso a partir de um único ou dos dois cromossomos X, pois não foram detectados polimorfismos informativos em *XIST*.

A identificação de genes do cromossomo X que apresentam expressão monoalélica independente da origem parental foi de fundamental importância para se elucidar as questões ainda existentes sobre o estabelecimento e o padrão de ICX em estágios iniciais do desenvolvimento pré-implantacional humano. O gráfico construído com os embriões femininos mostra claramente que há genes já inativados no cromossomo X (Figura 12, em vermelho). Além disso, esta inativação é independente da origem parental, pois existem células que expressam um alelo enquanto outras, de um mesmo embrião, expressam o outro alelo, ao contrário do observado nas células masculinas, onde todas as células expressam predominantemente o mesmo alelo.

O sequenciamento em larga escala do transcriptoma de células únicas pode apresentar muita variação devido à escassa quantidade de material inicial. Mas os dados apresentados aqui são bastante consistentes principalmente entre as amostras do estudo GSE36552, se observarmos as diferentes células de um mesmo embrião ou ainda os oócitos e zigotos nas diversas análises feitas ao longo deste capítulo.

Podemos assim concluir que o gene responsável pelo início da inativação do cromossomo X em humanos, *XIST*, começa a ser expresso em embriões no estágio de oito células, coincidindo com a ativação do genoma do embrião; este gene pode ter a sua expressão detectada tanto em embriões femininos quanto masculinos, mas sua expressão é estabilizada na fase de blastocisto sendo altamente expresso principalmente em embriões femininos (Figura 9). Entretanto, apesar da expressão de *XIST* aumentada em blastocisto, o silenciamento transcricional de todo o cromossomo X ainda não pode ser observado nas células de embriões desta fase.

Mesmo assim, a análise de expressão alelo-específica mostrou que alguns genes do X já apresentam expressão monoalélica, e que a ICX ocorre de forma aleatória (Figura 12).

Adicionalmente, as análises de expressão global, relacionando o nível de expressão dos genes do X com aqueles autossômicos, indicam que como proposto por Susumo Ohno (1967) células masculinas apresentam um aumento de expressão dos genes ligados ao X – resultado do mecanismo de compensação de dose entre o seu único X e os autossomos (Figuras 14 e 15: hESCp0). É interessante notar também que todas as amostras classificadas como masculinas apresentaram razão X:A menor do que aquelas femininas (Figuras 14 e 15: 8-cél#3, Blastocistos #1 e #2), reflexo dos dois X ativos nas femininas.

Infelizmente não podemos dizer nada a respeito da expressão de *XIST* em estágio de mórula pois os embriões disponíveis nessa fase são muito provavelmente XY (Figura 8 A e tabela 4) e ainda apresentam aneuploidias e/ou deleções envolvendo cromossomos autossomos (Figura 13: Mórula#1) e mesmo o cromossomo X (Figura 6: *boxplot* 'cromossomo X' e figura 16: Mórula#2, células #3, #4, #6 e #7).

O que se pôde observar aqui foi a presença de dois X ativos em embriões femininos em estágio de oito células e o início efetivo da inativação aleatória no estágio de blastocisto ao menos nas células do epiblasto e endoderme primitiva como foram classificadas as células sequenciadas do blastocisto#3 no estudo de Yan e colaboradores (2013).

---

## Capítulo III

---

GENES REGULADOS POR *IMPRINTING* NO CROMOSSMO X HUMANO



Ainda que células diploides tenham dois alelos de cada gene em seu genoma nuclear, nem todos exibem expressão bialélica: cerca de 0,5 a 15% dos genes presentes nos autossomos são expressos a partir de um único alelo revisto em (Eckersley-Maslin and Spector, 2014). A exemplo do que ocorre com os cromossomos X d e mamíferos eutérios, esses genes têm seus alelos inativados de maneira independente da origem parental; este padrão de expressão é comumente identificado como **expressão monoalélica aleatória**.

Classicamente os genes de expressão monoalélica aleatória foram estudados em grandes grupos gênicos como os genes olfatórios, das protocaderinas e das imunoglobulinas (revisto em Eckersley-Maslin and Spector, 2014). Mais recentemente, têm sido encontrados em humanos alguns genes isolados de expressão monoalélica aleatória de funções diversas, como *BCLAF1* (cromossomo 6) envolvido no processo de apoptose; *ABP1* (cromossomo 7) de ação metabólica, com propriedades deaminase oxidativa; *ZFAT* (cromossomo 8) também envolvido com apoptose e angiogênese na placenta; e *IFI30* (cromossomo 19) envolvido no controle intracelular de proteases (Metsalu *at al.*, 2014).

Outro fenômeno que resulta em expressão monoalélica é o *imprinting* genômico, resultado de marcas epigenéticas adicionadas durante a gametogênese masculina e feminina que ocasionam expressão **monoalélica dependente da origem parental**. No início dos anos 90 foram identificados os primeiros genes autossômicos regulados por *imprinting* (em inglês, *imprinted genes*). Atualmente, conhecemos cerca de 70 genes humanos assim regulados e outros 200 são candidatos aguardando validação (Wei *at al.*, 2014).

Genes “imprintados” podem ocorrer de forma isolada, mas em geral estão agrupados e compartilham elementos regulatórios em *cis*. O cromossomo 7 de

camundongos, por exemplo, apresenta pelo menos cinco domínios de *imprinting* que concentram quase metade dos genes “imprintados” da espécie. Dentre os elementos regulatórios, existem sequências de DNA responsáveis pelo *imprinting* genômico, chamadas de regiões controladoras de *imprinting* (ICRs - do inglês, *Imprinting Control Regions*). Os dinucleotídeos CpG das ICRs são submetidos a padrões de metilação diferenciados dependendo da gametogênese ser feminina ou masculina (revisto por Wood and Oakey, 2006).

Apesar da marca epigenética para o *imprinting* genômico ser definida na gametogênese, é muito comum que genes se comportem de maneira “imprintada” em um tecido, e em outro apresentem expressão bialélica (Schulz *at al.*, 2006). Um exemplo intrigante é o do gene humano *GRB10* (*Growth Factor Receptor-bound protein 10*). Este gene, localizado no cromossomo 7 possui um padrão complexo de expressão que combina variantes de *splicing* e expressão diferencial dependendo do tecido (Monk *at al.*, 2009). Os autores confirmaram expressão do alelo paterno exclusiva no cérebro, mas também demonstraram pela primeira vez *imprinting* materno para o mesmo gene nas vilosidades trofoblásticas da placenta.

Não são raras as evidências na literatura de que placenta e cérebro estejam relacionados evolutivamente no que diz respeito à conservação de regulação de expressão gênica por *imprinting* genômico, à qual foram atribuídos valores adaptativos (revisto em Keverne, 2012; Renfree *at al.*, 2013). Esta hipótese é apoiada pelo fato de que a maioria dos genes submetidos a *imprinting* identificados são assim regulados na placenta e no cérebro, e estão geralmente associados ao comportamento materno, lactação, transferência materno-fetal de nutrientes e desenvolvimento da placenta (revisto em Renfree *at al.*, 2013).

A identificação de genes regulados por *imprinting* no cromossomo X é um desafio, pois este passa por um processo de inativação no qual o cromossomo inteiro é transcricionalmente silenciado (inativação do cromossomo X, ou ICX). Isso dificulta

a identificação de um gene ligado ao X que tenha sua expressão regulada por *imprinting* e não pela ICX.

No embrião de camundongo, em estágios pré-implantacionais até a fase de mórula e nos tecidos extra-embrionários, a ICX é “imprintada” e o cromossomo de origem paterna é preferencialmente silenciado. Entretanto nesses animais alguns genes ligados ao X foram descritos como regulados por *imprinting*. É o caso da família de genes *Xlr*: em 2005, o gene *Xlr3b* foi descrito como regulado por *imprinting* em cérebro de camundongo, sendo expresso a partir do alelo materno (Davies *at al.*, 2005). No mesmo volume do periódico, foi publicado um artigo de outro grupo que verificou que, além de *Xlr3b*, os parálogos também ligados ao X *Xlr4b* e *Xlr4c* são igualmente expressos exclusivamente a partir do alelo de origem materna em células do cérebro (Raefski and O’Neill, 2005). Já na placenta, Davies e colaboradores (2005) não observaram evidências de *imprinting* e os resultados expostos por Raefski e O’Neill (2005) não foram conclusivos.

Por haver inativação preferencial do cromossomo X de origem paterna em camundongos nos estágios iniciais do desenvolvimento e em seus tecidos extra-embrionários, os genes *Xist* e *Tsix*, intimamente envolvidos no início do processo de ICX, também são considerados como regulados por *imprinting*, sendo *Xist* expresso a partir do alelo paterno e *Tsix* do alelo materno (GF *at al.*, 1994; Lee, 2000; Sado *at al.*, 2001; Zuccotti and Monk, 1995)

Os trabalhos de Kobayashi e colaboradores (2006, 2010, 2013) trouxeram grandes contribuições à lista de genes “imprintados” no cromossomo X de camundongos. Nesses três trabalhos o grupo identificou sete genes com expressão de origem paterna em embriões de camundongo em estágios pré-implantacionais. São eles, *Rhox5* (Kobayashi *at al.*, 2006), *Fthl17* (Kobayashi *at al.*, 2010), e mais cinco genes mapeados na região que compreende o centro de inativação do cromossomo X (*Jpx*, *Ftx*, *Zcchc13* e os microRNAs *miR-374-5p* e *miR-421-3p*) (Kobayashi *at al.*, 2013).

Os três genes e os dois microRNAs identificados estão envolvidos com o processo de ICX “imprintada” (Kobayashi *at al.*, 2013; Okamoto *at al.*, 2005); tendo sido *Jpx* e *Ftx* relacionados à regulação positiva da expressão de *Xist* tanto na ICX aleatória (Chureau *at al.*, 2011; Tian *at al.*, 2010) quanto na “imprintada” (Kobayashi *at al.*, 2013).

Em humanos, há muito se especula sobre a existência de genes do cromossomo X que possam ser regulados por *imprinting*. Entretanto, até o momento, as evidências são apenas indiretas e estão baseadas em traços fenotípicos de pessoas portadoras da síndrome de Turner (monossômicas para o cromossomo X ou com grandes deleções de parte deste cromossomo) (Bishop *at al.*, 2000; Kesler *at al.*, 2004; Skuse *at al.*, 1997). Em um primeiro trabalho publicado em 1997, Skuse e colaboradores analisaram competências sociais de mulheres portadoras da síndrome de Turner relacionando o resultado dos testes com a origem parental do único cromossomo X. Eles observaram que as habilidades sócio-cognitivas ficam prejudicadas naquelas que possuem apenas o X de origem materna em comparação com as que possuem unicamente o X de origem paterna. Dada essa diferença, os autores especulam a existência de um ou mais genes regulados por *imprinting* no cromossomo X, inativados no X materno. Além disso, ao verificarem que mulheres portadoras de deleções parciais envolvendo o braço curto do cromossomo X paterno também apresentam o fenótipo daquelas com monossomia do X (Skuse *at al.*, 1997), os autores propuseram a localização de um *locus* imprintado em Xp.

Em outro trabalho com a participação do mesmo grupo (Good *at al.*, 2003), foram observadas alterações no volume de massa cinzenta na amígdala e do córtex orbitofrontal de mulheres com síndrome de Turner quando comparadas a mulheres normais, sugerindo mais uma vez que deve haver um *locus* regulado por *imprinting* no cromossomo X. Mais especificamente, os autores identificaram três genes no braço curto deste cromossomo relacionados ao desenvolvimento estrutural e funcional dessas áreas do sistema nervoso, *MAOA* (Xp11.3, montagem genômica de

referência GRCh38), *MAOB* (Xp11.23, GRCh38) e *USP9X* (Xp11.4, GRCh38), e propuseram que esses sejam genes candidatos a sofrerem *imprinting* no cromossomo X humano.

Em minha dissertação de mestrado, foi aplicada uma nova abordagem para a análise de expressão alelo-específica de genes presentes no cromossomo X, utilizada para estudar o padrão de ICX em placenta a termo (Moreira de Mello, 2010; Moreira de Mello *et al.*, 2010). No presente trabalho, essa mesma estratégia foi empregada para investigar o padrão de expressão alelo-específico desses genes ligados ao X candidatos a serem regulados por *imprinting*.

Em concordância ao que foi apresentado por Moreira de Mello e colaboradores (2010) pode-se observar aqui que a placenta humana a termo se apresenta como um mosaico em relação à inativação do cromossomo X, e que vilos não adjacentes podem apresentar padrões distintos de ICX.

Apesar de, no total, este trabalho apresentar dados de apenas seis amostras de placenta informativas, a interpretação dos resultados de sequenciamento tipo Sanger e pirosequenciamento torna evidente que *MAOA*, *MAOB* e *USP9X* não são regulados por *imprinting* na placenta humana a termo, pois os níveis alelo-específicos de sua expressão seguem o padrão de ICX de cada vilos, (Tabelas 9 e 10 e figuras 17 e 19). As análises em cérebro tampouco indicam *imprinting* para *MAOA* e *MAOB*. Assim, podemos afirmar que estes genes não possuem expressão dependente de origem parental nas duas principais fontes de identificação de genes “imprintados”, cérebro e placenta.

Como descrito, genes presentes no cromossomo X inativo podem ainda assim escapar à inativação apresentando expressão bialélica (Carrel and Willard, 2005), fato que pode ser facilmente confundido com ICX aleatória quando se determina o padrão de ICX pela expressão de um pequeno número de genes (Moreira de Mello *at al.*, 2010). Sabe-se também que os genes que escapam à ICX não são necessariamente os mesmos entre indivíduos e até mesmo entre tecidos de uma mesma pessoa (Berletch *at al.*, 2011; Cotton *at al.*, 2013). Ao propor que *MAOA*, *MAOB* e *USP9X* fossem genes candidatos a serem regulados por *imprinting* Skuse e colaboradores (1997) e Good e colaboradores (2003) ressaltaram que estes genes escapam à ICX como publicado por Distèche e colaboradores (1999) e por Carrel e Willard (2005). Em 2009 Stabellini e colaboradores mostraram que *MAOA* é submetido à inativação em fibroblastos humanos e os resultados aqui expostos

também indicam que na placenta humana a termo os genes *MAOA*, *MAOB* e *USP9X* não escapam à ICX pois foi possível identificar expressão monoalélica em 11 das 13 amostras heterozigotas para *MAOA*, duas das três para *MAOB* e seis das sete para *USP9X* (Tabelas 9 e 10 e figura 17). Nas amostras de cérebros humanos, entretanto, não é possível afirmar se os genes escapam ou não à ICX, pois para apenas uma amostra foi possível determinar ICX aleatória de acordo com a expressão de *XIST* e todas apresentaram expressão de ambos os alelo para os genes *MAOA* e *MAOB* (Figura 20 e tabela11).

# Conclusões gerais

---

Desde a proposição de Mary Lyon, em 1961, de que mamíferos apresentam um mecanismo de compensação de dose dos cromossomos sexuais entre fêmeas e machos, a inativação do cromossomo X (ICX) tem se tornado um campo bastante empolgante da ciência básica e aplicada. Muito do conhecimento que se tem hoje advém de estudos em organismos modelo como os camundongos. Entretanto, ao longo dos últimos cinquenta anos foram observadas diferenças expressivas entre humanos e camundongos: diferenças entre genes regulatórios envolvidos no início processo de ICX (como *XIST/Xist*, *Tsix* e *XACT*); entre a escolha do X inativado (“imprintada” em tecidos extra-embrionários de camundongo e aleatória em humanos); entre o poder que as células tronco embrionárias murinas tem em recapitular o processo de ICX *in vitro* enquanto que as humanas não, são apenas alguns exemplos.

Ao se avaliar o perfil de atividade alelo-específico de genes do cromossomo X de embriões humanos em diferentes estágios pré-implantacionais o presente estudo trouxe contribuições significativas à compreensão do início do processo de ICX e escolha do X inativo:

– Foi identificado aqui que o gene *XIST*, responsável pelo início do processo ICX, somente é expresso no estágio de oito células, ao mesmo tempo em que se observa a ativação do genoma próprio do embrião;

– Este mesmo gene pode ter seus transcritos detectados em células femininas ou masculinas, entretanto sua expressão é estabilizada nas células femininas no estágio de blastocisto onde ocorre regulação positiva do gene;

– O silenciamento transcricional dos genes do cromossomo X tem início no estágio de blastocisto e a escolha do X inativo se dá de forma aleatória.



Entretanto, a propagação global do sinal de silenciamento gênico deve ocorrer em estágio pós-implantacional;

–Adicionalmente foi demonstrada pela primeira vez que em células embrionárias a proporção de genes autossômicos com expressão monoalélica é muito maior do que se esperava coerente com o observado recentemente para células adultas.

Em relação à existência de genes regulados por *imprinting* no cromossomo X humano, resultados fenotípicos de mulheres com síndrome de Turner parecem apontar para tal fenômeno. Foram testados no presente trabalho três genes do cromossomo X candidatos a serem assim regulados (*MAOA*, *MAOB* e *USP9X*) entretanto, não se observou qualquer evidência de que estes fossem genes “imprintados” em amostras de cérebro ou de placenta humanos. A falta de evidência de que estes sejam genes regulados por *imprinting* não invalida as observações feitas em mulheres com síndrome de Turner que indicam a presença de genes “imprintados” no X. São cada vez mais abundantes dados de sequenciamento de última geração de exoma e transcriptoma humanos depositados em bancos públicos, utilizados nas buscas por genes expressos de acordo com a origem parental. As técnicas de bioinformática aqui aplicadas se mostraram eficientes em estudar genes do cromossomo X a partir e dados de RNA-Seq, em geral negligenciados nesses tipos de estudo dada a existência da ICX.

# Resumo

---

Eventos epigenéticos como o *imprinting* genômico e a inativação do cromossomo X (ICX), já foram amplamente estudados em camundongos. Nesses animais muitos dos processos epigenéticos que levam à ICX já estão profundamente esclarecidos. Em humanos entretanto, o conhecimento sobre a ICX é mais limitado, em particular os eventos iniciais do processo durante o desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento e aprimoramento de ensaios que envolvem o sequenciamento em larga escala do transcriptoma (RNA-Seq) de células únicas iniciam uma nova era nos estudos sobre a ICX. São crescentes os dados de RNA-Seq depositados em bancos de dados públicos e em 2013 os trabalhos de Xue e colaboradores e de Yan e colaboradores tornaram disponíveis os resultados de RNA-Seq de células individuais isoladas de embriões humanos a partir do estágio de duas células até a fase de blastocisto. Através de técnicas de bioinformática avaliamos o nível de expressão do gene *XIST*, intimamente envolvido no processo de ICX, nos diferentes estágios do desenvolvimento. Alinhamos também as leituras geradas por RNA-Seq contra o genoma humano de referência no intuito de se identificar variantes em regiões transcritas e assim verificar a origem do alelo expresso. Com isso, pudemos observar que o gene *XIST* tem sua expressão iniciada em embriões humanos no estágio de oito células, e que o silenciamento transcricional dos genes do cromossomo X já se iniciou no estágio de blastocisto de forma aleatória mas ainda não se disseminou, *i.e.* a ICX não está completa.

Devido ao fenômeno de ICX, a caracterização de genes “imprintados” neste cromossomo é desafiadora. Ainda assim em camundongos foram relatados alguns genes do X que são assim regulados. Mulheres portadoras da síndrome de Turner (45,X) apresentam diferenças fenotípicas dependentes da origem parental do

cromossomo X herdado, sugerindo a existência de genes “imprintados” no X humano. Em particular os genes *MAOA*, *MAOB* e *USP9X* foram indicados como candidatos a serem regulados por *imprinting*. Através do sequenciamento de regiões transcritas contendo SNPs em heterozigose foram avaliados o padrão de expressão alelo-específico dos três genes indicados. Nenhum sinal de regulação por *imprinting* pôde ser detectado nem em placenta nem em cérebro humano, pois a procedência dos alelos expressos era independente da origem parental. Isso não significa que a variabilidade fenotípica em mulheres com Turner não possa ser explicada por *imprinting* em genes do X. Experimentos de RNA-Seq em diversos tecidos humanos ou a partir de células únicas são uma abordagem conveniente para se elucidar este fenômeno.

# Abstract

---

Epigenetic phenomena as genomic imprinting and X chromosome inactivation (XCI) have been widely studied in mice. While most of the processes and steps involved in XCI in mice are well studied, in humans our knowledge is still very limited, specially during early embryo development.

Advances in single-cell whole transcriptome high throughput sequencing techniques (RNA-Seq) bring a new era to the XCI field. Single-cell RNA-Seq results of from 2-cell to the blastocyst stage of human embryos were published by Xue et cols and Yan et cols in 2013.

Using bioinformatics techniques we searched for the *XIST* gene expression level (a gene closely involved in XCI) throughout the human pre-implantation embryo development. We aligned reads generated by RNA-Seq assays to the human reference genome looking for variants in gene transcriptional regions and to identify the origin of the expressed allele. Our results show that *XIST* expression starts from the 8-cell stage and is stabilized and upregulated at the female blastocyst stage. We also show that the transcriptional silence of X-linked genes started at the blastocyst stage and is independent of parental origin but this does not apply for all genes. We concluded that the completion of the transcriptional silence step is probably established during post-implantation stage.

The search for X-linked imprinted genes is challenging due to the XCI phenomenon. Nevertheless, X-imprinted genes were reported in mice. In humans, no X-imprinted genes were found so far, but phenotypic differences reported in Turner's syndrome (45,X) women was related to the parental origin of the X chromosome inherited. This suggests the existence of X-linked imprinted genes, in particular *MAOA*, *MAOB* and *USP9X* seemed good candidates. By sequencing transcript regions

containing heterozygous SNPs in these genes we could access their expression pattern. Our results show no sign of imprinting regulation of *MAOA*, *MAOB* or *USP9X*, neither in human brain nor in human term placenta. This does not rule out the possibility that the phenotypic differences observed in Turner's syndrome women could be the consequence of other unknown X-linked imprinted genes. RNA-Seq of different human female tissues is a powerful approach to finally find the genes involved in such phenotypes.

# Referências bibliográficas

---

- Amos-Landgraf, J.M., Cottle, A., Plenge, R.M., Friez, M., Schwartz, C.E., Longshore, J., and Willard, H.F. (2006). X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 493–499.
- Anderson, C.L. e Brown, C.J. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999. 65:699-708.
- Avner, P. and Heard E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature Reviews. Genetics* 2, 59–67.
- Bacher, C.P., Guggiari, M., Brors, B., Augui, S., Clerc, P., Avner, P., Eils, R., and Heard, E. (2006). Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat. Cell Biol.* 8, 293–299.
- Ballestar, E., Esteller, M., and Richardson, B.C. (2006). The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 176, 7143–7147.
- Berletch, J.B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L., and Disteche, C.M. (2011). Genes that escape from X inactivation. *Hum. Genet.* 130, 237–245.
- Bermejo-Alvarez, P., Ramos-Ibeas, P., and Gutierrez-Adan, A. (2012). Solving the “X” in embryos and stem cells. *Stem Cells Dev.* 21, 1215–1224.
- Bishop, D., Canning, E., Elgar, K., Morris, E., Jacobs, P., and Skuse, D. (2000). Distinctive patterns of memory function in subgroups of females with Turner syndrome: evidence for imprinted loci on the X-chromosome affecting neurodevelopment. *Neuropsychologia* 38, 712-721.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*.
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M.L., King, J., Shih, J.C., Blakely, R.D., Deneris, E.S., and Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 472, 347–350.
- Borel, C., Ferreira, P.G., Santoni, F., Delaneau, O., Fort, A., Popadin, K.Y., Garieri, M., Falconnet, E., Ribaux, P., Guipponi, M., *et al.* (2015). Biased allelic expression in human primary fibroblast single cells. *Am. J. Hum. Genet.* 96, 70–80.
- Bortolato, M., Chen, K., and Shih, J. (2008). Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1527–1533.
- Boumil, R.M., and Lee, J.T. (2001). Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2225–2232.
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S., and Rastan, S. (1992). 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* 71, 515–526.

- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., and Willard, H.F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349, 38–44.
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., and Willard, H.F. (1992). 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* 71, 527–542.
- Bruck, T., and Benvenisty, N. (2011). Meta-analysis of the heterogeneity of X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 6, 187–193.
- Butler, M.G. (2009). Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26, 477–486.
- Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A., and Fraga, M.F. (2009). The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 8, 268–276.
- Carrel, L., and Willard, H.F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434, 400–404.
- Chureau, C., Chantalat, S., Romito, A., Galvani, A., Duret, L., Avner, P., and Rougeulle, C. (2011). Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Hum. Mol. Genet.* 20, 705–718.
- Clemson, C., McNeil, J., Willard, H., and Lawrence, J. (1996). XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *The Journal of Cell Biology*.
- Cotton, A.M., Ge, B., Light, N., Adoue, V., Pastinen, T., and Brown, C.J. (2013). Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol.* 14, R122.
- Csankovszki, G., Nagy, A., and Jaenisch, R. (2001). Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 153, 773–784.
- Daniels, R., Zuccotti, M., Kinis, T., Serhal, P., and Monk, M. (1997). XIST expression in human oocytes and preimplantation embryos. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 33–39.
- Davies, W., Isles, A., Smith, R., Karunadasa, D., Burrmann, D., Humby, T., Ojarikre, O., Biggin, C., Skuse, D., Burgoyne, P., *et al.* (2005). Xlr3b is a new imprinted candidate for X-linked parent-of-origin effects on cognitive function in mice. *Nature Genetics* 37, 625–629.
- Degner, J., Marioni, J., Pai, A., Pickrell, J., Nkadori, E., Gilad, Y., and Pritchard, J. (2009). Effect of read-mapping biases on detecting allele-specific expression from RNA-sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25, 3207–3212.
- Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., and Sandberg, R. (2014). Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343, 193–196.
- Disteche, C.M. (1999). Escapees on the X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14180–14182.

- Dupont, C., and Gribnau, J. (2013). Different flavors of X-chromosome inactivation in mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 314–321.
- Eckersley-Maslin, M., and Spector, D. (2014). Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends in Genetics* 30, 237244.
- Ge, B., Gurd, S., Gaudin, T., Dore, C., Lepage, P., Harmsen, E., Hudson, T.J., and Pastinen, T. (2005). Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res.* 15, 1584–1591.
- Kay, G.F., Barton, S.C., Surani, M.A., and Rastan, S. (1994). Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine Xist expression in early mouse development. *Cell* 77, 639–650.
- Good, C.D., Lawrence, K., Thomas, N.S., Price, C.J., Ashburner, J., Friston, K.J., Frackowiak, R.S., Orelund, L., and Skuse, D.H. (2003). Dosage-sensitive X-linked locus influences the development of amygdala and orbitofrontal cortex, and fear recognition in humans. *Brain* 126, 2431–2446.
- Gupta, V., Parisi, M., Sturgill, D., Nuttall, R., Doctolero, M., Dudko, O., Malley, J., PS, E., and Oliver, B. (2006). Global analysis of X-chromosome dosage compensation. *Journal of Biology* 5, 3.
- Homan, C.C., Kumar, R., Nguyen, L.S., Haan, E., Raymond, F.L., Abidi, F., Raynaud, M., Schwartz, C.E., Wood, S.A., Gecz, J., *at al.* (2014). Mutations in USP9X are associated with X-linked intellectual disability and disrupt neuronal cell migration and growth. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 470–478.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Johnston, C., Lovell, F., Leongamornlert, D., Stranger, B., Dermitzakis, E., and Ross, M. (2008). Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete. *PLoS Genetics* 4, e9.
- Kesler, S., Garrett, A., Bender, B., Yankowitz, J., Zeng, S., and Reiss, A. (2004). Amygdala and hippocampal volumes in Turner syndrome: a high-resolution MRI study of X-monosomy. *Neuropsychologia* 42, 19711978.
- Keverne, E.B. (2012). Significance of epigenetics for understanding brain development, brain evolution and behaviour. *Neuroscience*.
- Kobayashi, S., Fujihara, Y., Mise, N., Kaseda, K., Abe, K., Ishino, F., and Okabe, M. (2010). The X-linked imprinted gene family *Fthl17* shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos. *Nucleic Acids Res.* 38, 3672–3681.
- Kobayashi, S., Isotani, A., Mise, N., Yamamoto, M., Fujihara, Y., Kaseda, K., Nakanishi, T., Ikawa, M., Hamada, H., Abe, K., *at al.* (2006). Comparison of Gene Expression in Male and Female Mouse Blastocysts Revealed Imprinting of the X-Linked Gene, *Rhox5/Pem*, at Preimplantation Stages. *Current Biology*.
- Kobayashi, S., Totoki, Y., Soma, M., Matsumoto, K., Fujihara, Y., Toyoda, A., Sakaki, Y., Okabe, M., and Ishino, F. (2013). Identification of an imprinted gene cluster in the X-inactivation center. *PLoS ONE* 8, e71222.



- Koboldt, D., Chen, K., Wylie, T., Larson, D., McLellan, M., Mardis, E., Weinstock, G., Wilson, R., and Ding, L. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25, 2283–2285.
- Koboldt, D., Zhang, Q., Larson, D., Shen, D., McLellan, M., Lin, L., Miller, C., Mardis, E., Ding, L., and Wilson, R. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research* 22, 568–576.
- Kocabas, A.M., Crosby, J., Ross, P.J., Otu, H.H., Beyhan, Z., Can, H., Tam, W.-L.L., Rosa, G.J., Halgren, R.G., Lim, B., *at al.* (2006). The transcriptome of human oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14027–14032.
- Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10, R25.
- Lee, J. (2000). Disruption of Imprinted X Inactivation by Parent-of-Origin Effects at Tsix. *Cell* 103.
- Lee, J. (2011). Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, 815–826.
- Lee, J.T., and Bartolomei, M.S. (2013). X-Inactivation, Imprinting, and Long Noncoding RNAs in Health and Disease. *Cell* 152, 1308–1323.
- Lee, J.T., and Lu, N. (1999). Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 99, 47–57.
- Lee, J.T., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature Genetics* 21, 400–404.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Lopez-Gines, C., Gil-Benso, R., Ferrer-Luna, R., Benito, R., Serna, E., Gonzalez-Darder, J., Quilis, V., Monleon, D., Celda, B., and Cerdá-Nicolas, M. (2010). New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod. Pathol.* 23, 856–865.
- Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373.
- Mak, W., Nesterova, T.B., de, N.M., Appanah, R., Yamanaka, S *at al* Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 2004. 303:666-669.
- Metsalu, T., Viltrop, T., Tiirats, A., Rajashekar, B., Reimann, E., Kõks, S., Rull, K., Milani, L., Acharya, G., Basnet, P., *at al.* (2014). Using RNA sequencing for identifying gene imprinting and random monoallelic expression in human placenta. *Epigenetics* 9, 1397–1409.

- Lyon, M.F. (1962). Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *American Journal of Human Genetics* 14, 135–148.
- Mietton, F., Sengupta, A., Molla, A., Picchi, G., Barral, S., Heliot, L., Grange, T., Wutz, A., and Dimitrov, S. (2009). Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. *Molecular and Cellular Biology* 29, 150–156.
- Migeon, B.R. (2003). Is Tsix repression of Xist specific to mouse? *Nat. Genet.* 33, 337; author reply 337–8.
- Migeon, B.R., Chowdhury, A.K., Dunston, J.A., and McIntosh, I. (2001). Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 951–960.
- Monk, D., Arnaud, P., Frost, J., Hills, F., Stanier, P., Feil, R., and Moore, G. (2009). Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. *Human Molecular Genetics* 18, 3066–3074.
- Moreira de Mello, J. C. Estudo do padrão de inativação do cromossomo X em tecido extra-embriônico humano. 2010. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moreira de Mello, J.C., de Araújo, E.S.S., Stabellini, R., Fraga, A.M., de Souza, J.E., Sumita, D.R., Camargo, A.A., and Pereira, L.V. (2010). Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PLoS ONE* 5, e10947.
- Moreira de Mello, J.C., de Araújo, E.S.S., Stabellini, R., Fraga, A.M., de Souza, J.E., Sumita, Nguyen, D.K., and Disteche, C.M. (2006). Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nat. Genet.* 38, 47–53.
- Ohno S (1967) Sex chromosomes and sex linked genes. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ohno, S., Kaplan, W.D., and Kinoshita, R. (1959). Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell Res.* 18, 415–418.
- Okamoto, I., Arnaud, D., Le Baccon, P., Otte, A.P., Disteche, C.M., Avner, P., and Heard, E. (2005). Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature* 438, 369–373.
- Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., and Heard, E. (2004). Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303, 644–649.
- Okamoto, I., Patrat, C., Thépot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.-P.P., Renard, J.-P.P., Duranthon, V., *et al.* (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472, 370–374.
- Patrat, C., Okamoto, I., Diabangouaya, P., Vialon, V., Baccon, P., Chow, J., and Heard, E. (2009). Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5198–5203.

- Payer, B., and Lee, J. (2008). X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annual Review of Genetics* 42, 733–772.
- Payer, B., Lee, J.T., and Namekawa, S.H. (2011). X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum. Genet.* 130, 265–280.
- Pessia, E., Engelstädter, J., and Marais, G.A. (2014). The evolution of X chromosome inactivation in mammals: the demise of Ohno's hypothesis? *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1383–1394.
- Pinter, S., Sadreyev, R., Yildirim, E., Jeon, Y., Ohsumi, T., Borowsky, M., and Lee, J. (2012). Spreading of X chromosome inactivation via a hierarchy of defined Polycomb stations. *Genome Res.*
- Postovit, L.-M.M., Costa, F.F., Bischof, J.M., Seftor, E.A., Wen, B., Seftor, R.E., Feinberg, A.P., Soares, M.B., and Hendrix, M.J. (2007). The commonality of plasticity underlying multipotent tumor cells and embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 101, 908–917.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Raefski, A.S., and O'Neill, M.J. (2005). Identification of a cluster of X-linked imprinted genes in mice. *Nat. Genet.* 37, 620–624.
- Rastan, S., and Cattanaach, B.M. (1983). Interaction between the Xce locus and imprinting of the paternal X chromosome in mouse yolk-sac endoderm. *Nature* 303, 635–637.
- Ray, P.F., Winston, R.M., and Handyside, A.H. (1997). XIST expression from the maternal X chromosome in human male preimplantation embryos at the blastocyst stage. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1323–1327.
- Genet. 6, 1323–1327.
- Renfree, M.B., Suzuki, S., and Kaneko-Ishino, T. (2013). The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 368, 20120151.
- Richards, B., Skoletsky, J., Shuber, A.P., Balfour, R., Stern, R.C., Dorkin, H.L., Parad, R.B., Witt, D., and Klinger, K.W. (1993). Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Mol. Genet.* 2, 159–163.
- Richards, E. (2006). Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nature Reviews. Genetics* 7, 395–401.
- Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H., and Li, E. (2001). Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. *Development* 128, 1275–1286.
- Santos, F.R., Pena, S.D., and Epplen, J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.* 90, 655–656.

- Schultz, R.M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update* 8, 323–331.
- Schulz, R., Menheniott, T.R., Woodfine, K., Wood, A.J., Choi, J.D., and Oakey, R.J. (2006). Chromosome-wide identification of novel imprinted genes using microarrays and uniparental disomies. *Nucleic Acids Res.* 34, e88.
- Sharman, G. (1971). Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* 230, 231–232.
- Silva, S.S., Rowntree, R.K., Mekhoubad, S., and Lee, J.T. (2008). X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4820–4825.
- Sivasubramaniam, S.D., Finch, C.C., Billett, M.A., Baker, P.N., and Billett, E.E. (2002). Monoamine oxidase expression and activity in human placentae from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 23, 163–171.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., *et al.* (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837.
- Skuse, D.H., James, R.S., Bishop, D.V., Coppin, B., Dalton, P., Aamodt-Leeper, G., Bacarese-Hamilton, M., Creswell, C., McGurk, R., and Jacobs, P.A. (1997). Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 387, 705–708.
- Stabellini, R. Análise funcional dos genes XIST e DNMT1 na manutenção do processo de inativação do cromossomo X humano através do silenciamento gênico por RNAi. 2008. 143f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Stabellini, R., Vasques, L.R., de Mello, J.C., Hernandez, L.M., and Pereira, L.V. (2009). MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts. *Epigenetics* 4, 388–393.
- Stavropoulos, N., Lu, N., and Lee, J. (2001). A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*
- Surani, M.A., Hayashi, K., and Hajkova, P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747–762.
- Takagi, N e Sasaki, M Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 1975. 256:640-642.
- Talebizadeh, Z., Simon, S.D., and Butler, M.G. (2006). X chromosome gene expression in human tissues: male and female comparisons. *Genomics* 88, 675–681.
- Tang, W.Y., and Ho, S.M. (2007). Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 173–182.

- Tian, D., Sun, S., and Lee, J. (2010). The Long Noncoding RNA, Jpx, Is a Molecular Switch for X Chromosome Inactivation. *Cell* 143.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115.
- Vallot, C., Huret, C., Lesecque, Y., Resch, A., Oudrhiri, N., Bennaceur-Griscelli, A., Duret, L., and Rougeulle, C. (2013). XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat. Genet.*
- van den Berg, I.M., Laven, J.S., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R.-J.J., Gribnau, J., and van Doorninck, J.H. (2009). X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 771–779.
- Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 138, 3699–3709.
- Veitia, R., Veyrunes, F., Bottani, S., and Birchler, J. (2015). X chromosome inactivation and active X upregulation in therian mammals: facts, questions and hypotheses. *J Mol Cell Biol.*
- Wang, X., Sun, Q., McGrath, S.D., Mardis, E.R., Soloway, P.D., and Clark, A.G. (2008). Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. *PLoS ONE* 3, e3839.
- Wang, X., Soloway, P.D., and Clark, A.G. (2011). A survey for novel imprinted genes in the mouse placenta by mRNA-seq. *Genetics* 189, 109–122.
- Wang, X., Miller, D.C., Harman, R., Antczak, D.F., and Clark, A.G. (2013). Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10705–10710.
- Wang, C.C., Billett, E., Borchert, A., Kuhn, H., and Ufer, C. (2013). Monoamine oxidases in development. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 599–630.
- Wang, X., Miller, D.C., Clark, A.G., and Antczak, D.F. (2012). Random X inactivation in the mule and horse placenta. *Genome Res.* 22, 1855–1863.
- Wei, Y., Su, J., Liu, H., Lv, J., Wang, F., Yan, H., Wen, Y., Liu, H., Wu, Q., and Zhang, Y. (2014). Metalprint: an information repository of mammalian imprinted genes. *Development* 141, 2516–2523.
- West, J.D., Frels, W.I., Chapman, V.M., and Papaioannou, V.E. Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. *Cell*, 1977. 12:873-882.
- Wood, A.J., and Oakey, R.J. (2006). Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet.* 2, e147.
- Xu, N., Tsai, C.-L.L., and Lee, J.T. (2006). Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 311, 1149–1152.
- Xue, Z., Huang, K., Cai, C., Cai, L., Jiang, C.-Y.Y., Feng, Y., Liu, Z., Zeng, Q., Cheng, L., Sun, Y.E., *et al.* (2013). Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature*.

Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., Liu, P., Lian, Y., Zheng, X., Yan, J., *at al.* (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

Zuccotti, M., and Monk, M. (1995). Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted Xist expression and paternal X-inactivation. *Nat. Genet.* 9, 316–320.