CAROLINA PURCELL GOES

Regulação pré- e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

> São Paulo 2019

CAROLINA PURCELL GOES

Regulação pré- e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas — Biologia Celular e Tecidual Orientação: Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan

Versão original

São Paulo 2019 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Goes, Carolina Purcell Regulação pré- e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior / Carolina Purcell Goes; orientador Chao yun Irene yan. -- São Paulo, 2019. 188 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Neurogênese. 2. Scratch. 3. Regulação Gênica. 4. Elementos cis. 5. miRNA. I. Irene yan, Chao yun, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Purcell Goes

Título da Tese: Regulação pré- e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior.

Orientador: Chao Yun Irene Yan

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitària "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone ::55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icis.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 025 nas fls. 04 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Chao Yun Irene Yan, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Embriologia muscular do sistema nervoso de vertebrados" do qual participam o(s) aluno(s), Felipe Vieceli, Maraysa de Oliveira Melo, Tatiane Kanno, Carolina Purecell,, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 29.04.2013, com validade de 4 anos.

São Paulo, 29 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA - ICB/USP

AULA rofa. Dra. AN Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.020.2017

São Paulo, 04 de abril de 2017

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Embriologia muscular do sistema nervoso de vertebrados*", registrado sob o protocolo nº *025/2013* e aprovado em 29/04/2013 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 29/04/2021**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Gallus gallus	Leghorn		0-7 dias	1º: 176 dúzias 2º: 176 dúzias 3º: 176 dúzias
				4º: 176 dúzias

Solicito o envio de documentação comprobatória da origem dos animais (ovos embrionados) utilizados no protocolo, em virtude de alteração da legislação, no decorrer do seu projeto, que obriga ao arquivamento dessa informação junto ao protocolo.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Lucine Valiria Sta Prof. Dr. Luciane Valéria Sita

Vice-coordenadora - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Chao Yun Irene Yan** Departamento de **Biologia Celular e do Desenvolvimento** Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Com muito bom humor, dedico às minhas lágrimas, ao déficit de sono, à cortisona exacerbada, às horas em cetose e aos neurônios que entraram em apoptose.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Irene Yan pelos 6 anos de investimento e preocupação no meu crescimento profissional, pela confiança, parceria e ensinamentos. Eu não poderia ter feito escolha melhor em alguém para poder transferir toda a bagagem de conhecimento e preparo para essa carreira, sempre sendo desafiada a ser crítica e investigativa. Obrigada pelo crescimento pessoal que a convivência e sua experiencia me ensinou.

Ao meu, marido Fernando, que acompanhou toda essa trajetória de 4 anos e 3 meses de luta diária, toda a minha gratidão pelo suporte, amor, incentivo, terapia e por nunca me deixar esquecer da força que tenho para buscar meus objetivos. Você foi fundamental nessa conquista!

Agradecimentos mais que especiais à minha família (pais, irmão e avós) e amigos de longe por todo o amor, apoio, incentivo e investimento no sonho alheio: o meu. Amo vocês!

Aos laboratórios parceiros e seus coordenadores: Profa. Dra. Edna Kimura, Prof. Dr. Luiz Roberto de Britto, Prof. Dr. Anselmo Moriscot, Profa. Dra. Ana Lepique, Profa. Dra. Patrícia Coltri, Profa. Dra. Dânia Hamassaki, Profa. Dra. Marilene Hohmuth, Prof. Dr. Ruy Jaeger, Profa. Dra. Telma Zorn, Prof. Dr. Emer Ferro, Prof. Dr. José Roberto, Prof. Dr. Federico Brown, Profa. Dra. Marinilce Fagundes, Profa. Dra. Lygia Veiga, Prof. Dr. Niels Olsen, Profa. Dra. Nathalie Cella, Profa. Dra. Maria Inês Borella e à Profa. Dra. Estela Bevilacqua pela contribuição em tempo, equipamentos e/ou reagentes necessários para a conclusão desse trabalho. Sem o apoio de vocês, essa tese levaria 10 anos. Obrigada! (Mentira, o Janus me chutaria antes).

Ao Prof. Dr. Marcos Simoes-Costa, Ana Azambuja e todos do Simoes-Costa Lab. na Cornell University em Nova Iorque, pela recepção, convívio, aprendizado, rotina e experiência em um laboratório internacional de ponta. Esse período foi muito valioso na minha formação!

Aos funcionários e técnicos, que sempre colaboram para tornar nosso trabalho mais fácil. Especialmente aos funcionários do CEFAP/USP – Mário e Fernando - e dos setores de sequenciamento de DNA IB/USP – Vanessa - e Central Analítica IQ/USP – Adriana e Wilton -, e aos técnicos Gabi, Fernanda, Rose, Adilson e, especialmente à Marley por ser tão carinhosa e ser sempre um ombro amigo para todos os momentos, inclusive para comer temaki e ir na Daiso. Ah, sem esquecer que me emprestou o Kazinho azul muitas vezes para eu ir ao ICB III fazer experimento.

Aos alunos do Prof. Carlos Menck pelos reagentes e maravilhoso protocolo para bactérias competentes <3

À secretária Tânia, sempre muito prestativa e eficiente acerca das burocracias e desesperos da pós-graduação, nos ajudando em tudo.

Aos colegas que o ICB e a USP me deram. Obrigada pela convivência, risadas, conversas de corredor e suporte nos bons e maus momentos. Luciana e Cibele pelo tráfico de drogas lícitas, vulgo açúcar, no departamento – sempre salvavam o dia! Aos amigos de laboratório - atuais e antigos - pela paciência, momentos de descontração, ajuda, troca de conhecimento e crescimento pessoal e profissional – meninas, vocês são demais!

À CAPES/DS e FAPESP (2017/07405-7) pelo financiamento da mão-de-obra (euzinha) e reagentes utilizados neste trabalho, tanto no Brasil quanto durante o período sanduíche na Cornell University (NY, EUA; nº 47/2017).

RESUMO

Goes, CP. Regulação pré- e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior. [tese (Doutorado em Biologia de Sistemas)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

Scratch2 é um fator de transcrição expresso em células recém-egressas do ciclo celular e tem um papel conservado na sobrevivência, diferenciação e migração celular. Scrt2 é expresso em uma população bem restrita de células localizadas na camada interna da zona intermediária do tubo neural em embriões de galinha, e seu padrão de expressão se mantem conservado em vertebrados. Os mecanismos que controlam a sua expressão ainda são desconhecidos e podem contribuir no entendimento sobre regulação gênica durante a diferenciação neural. Aqui, investigamos os mecanismos regulatórios pré- (enhancers e fatores de transcrição) e pós-transcricionais (miRNAs) envolvidos na expressão de cScrt2. Realizamos uma análise in silico e identificamos 1) um potencial elemento-cis conservado (E1), presente tanto em galinha quanto em camundongo, que pode estar envolvido na expressão de Scrt2; 2) Ascl1, Brn2 e Sox2 como fatores de transcrição candidatos a controladores à montante de Scrt2 na cascata gênica, e 3) sítios de ligação para miR-125b, -200b, -429, -211 e -204 na região 3'UTR de cScrt2. Testamos a função biológica da região regulatória candidata E1 e da região 3'UTR de Scrt2 pela eletroporação no tubo neural embrionário de galinha. A modulação de transcrição modulada por fatores de transcrição via E1 foi testada em ensaio luciferase em células HEK293T. Além disso, realizamos Chromosome Conformation Capture (3C) para verificar interações entre E1 e a região promotora de cScrt2, e utilizamos a metodologia CRISPR/Cas9 para editar E1 e sítios-alvo de miRNAs na 3'UTR de cScrt2. Nossos resultados indicam que E1 é m enhancer neural, que dirige a expressão de Scrt2 possivelmente no domínio equatorial do tubo neural. A superexpressão dos fatores de transcrição selecionados, aumentou a expressão de cScrt2 na região dorsal do tubo neural e reduziu o número de subpopulações de células neurais diferenciadas. Além disso, a edição de sítios de miRNA mediada por CRISPR, aumentou a expressão de Scrt2, sugerindo um possível papel de miR-125b e -200b na regulação pós-transcricional de cScrt2. Por fim, propomos que o domino de expressão de cScrt2 seja gerado pela conjunção dos mecanismos de regulação pré- e póstranscricionais. Neste cenário, E1 modula a transcrição de cSrt2 mediada pelos fatores de transcrição Ascl1 e Brn2. Após a transcrição, os níveis de cScrt2 seriam então delimitados pela ação de miR-125b e -200b na sua 3'UTR.

Palavras-chave: Neurogênese. Scratch. Regulação gênica. Elementos-cis. miRNA.

ABSTRACT

Goes, CP. Pre- and Post-transcriptional Regulation of *cScratch2* during neurogenesis in the posterior neural tube. [Doctoral thesis (Systems Biology)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

Scratch2 is a transcription factor expressed in early post-mitotic neural cells that has a conserved role in survival, differentiation and migration. Scrt2 is expressed in a very restricted population of cells in the inner layer of the intermediate zone in the chick embryo, and this pattern remains conserved in vertebrates. The mechanisms that control its expression remain unknown and could contribute towards to our understanding of gene regulation during neural differentiation. Here we investigate the pre (enhancers and transcription factors) and posttranscriptional (miRNAs) regulatory mechanisms involved in Scrt2 regulation. We performed an in silico analysis and identified 1) a potential conserved cis-element (E1) in both chicken and mouse genome that could be involved in Scrt2 expression; 2) Ascl1, Brn2 and Sox2 as putative upstream TFs in the gene cascade, and 3) binding sites in the Scrt2 3'UTR for miR-125b, -200b, -429, -211 and -204. We tested the biological function of the candidate regulatory region E1 and 3'UTR through electroporation in chick embryos. Modulation of E1driven transcription via TFs was tested in luciferase reporter assay in HEK293T cells. We also performed Chromosome Conformation Capture (3C) to verify interactions between E1 and cScrt2 promoter and CRISPR/Cas9 methodology to edit E1 and miRNAs target sites in cScrt2 3'UTR. Our results indicate that E1 is a neural *enhancer*, driving *Scrt2* expression, possibly in the equatorial neural tube domain. The overexpression of selected TFs in the neural tube increased cScr2 expression in the dorsal portion of the neural tube and decreased the size of some differentiated cells subpopulations in the neural tube. Moreover, the CRISPR-mediated edition of miRNAs target sites increased Scrt2 expression, suggesting a possible role for miR-125b and -200b in post-transcriptional regulation of cScrt2. In conclusion, we propose that Scrt2 expression domain is generated by the conjunction of pre and post-transcriptional regulatory mechanisms. In this scenario, E1 could modulate cScrt2 transcription through Ascl1 and Brn2 transcription factors. After transcription, the levels of cScrt2 transcripts would be further delimited by the binding of miR-125b and -200b in the 3'UTR.

Keywords: Neurogenesis. Scratch. Gene regulation. Cis-elements. miRNA.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL	
Figura 1: Ilustração de corte transversal do tubo neural	26
Figura 2: Esquema da estrutura proteica dos membros da superfamília Snail/Slug	30
Figura 3: Resumo da cascata gênica ao gual Scratch2 está inserido. com alvos de diverso	bs
modelos	31
Figura 4: Expressão embrionária de <i>cScrt2</i>	
CAPÍTULO 1 - Controle genômico da expressão de SCRATCH2	
Figura 1, 1: Modelo do processo de ativação de transcrição via interação <i>enhancer</i> -promotor.	41
Figura 1, 2: Análise in silico para perfil epigenético de mE1 e cE1 e validação de enhancers	
Figura 1, 3: Padrão temporal da ativação de transcrição mediada por mE1 e cE1	
Figura 1 4. Interação de cE1 com o promotor de cScrt2 verificada por Chromosome Conformatio	n
Canture (3C)	
Figura 1 5: Maninulação genômica e enigenômica de cE1	71
Figura 1.6: Manipulação enigenômica de USE	74
Figura 1.7: Construções desenhadas para fragmentação e determinação do core cE1	/ 4
rigura 1.7. Construções desenhadas para fragmentação e determinação do tore tel	/ J
CADÍTULO 2 Modulação da expressão do SCRATCH2 por fatoros do transcrição pouroi	ic
CAPITOLO Z - Modulação da expressão de SCRATCHZ por Tatores de transcrição neural	1 3 0 Г
Figura 2.1: Padrao de expressão de Ascil e Briz	85
Figura 2.2: Fatores de transcrição com sitios putativos em CE1	96
Figura 2.3: Ensaio luciferase para a atividade dos fatores de transcrição mAsci1, mBrn2	e
mAscl1+mBrn2 sobre mE1 e cE1	98
Figura 2.4: Teste in embrio de modulação de atividade de enhancer por FTs	101
Figura 2. 5: Ascl1 e mBrn2 reduzem a expressão de cScrt2 e de marcadores de diferenciação	105
Figura 2. 6: Coeletroporação de Ascl1 e mBrn2 aumenta a expressão de cScrt2 no domínio dorsa	al
do tubo neural.	109
Figura 2. 7: Atuação de Sox2 sobre cE1 e cScrt2	112
CAPÍTULO 3 – Regulação pós-transcricional da expressão de SCRATCH2	
Figura 3. 1: Análise in silico para miRNAs	126
Figura 3. 2: Quantificação de expressão de miR-125b, 200b e cScrt2, e modulação de 3'UTR i	in
vivo	127
Figura 3. 3: Superexpressão de miRNAs altera expressão de cScrt2 in vivo.	128
Figura 3. 4: Modulação de cScrt2 por inibição da atividade de miRNAs por esponjas	e
CRISPR/Cas9	131
Figura 3. 5: Modelo hipotético baseado nos dados obtidos neste trabalho	139
- ·	
CAPÍTULO 4 – Funcão de cSCRATCH2 no tubo neural posterior	
Figura 4. 1: Delineamento experimental e análise dos dados	147
Figura 4. 2: cScrt2 potencialmente modula genes associados a diversos processos	148
······································	

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Controle genômico da expressão de SCRATCH2
Tabela 1. 1: Primers utilizados para a clonagem dos fragmentos utilizados para testes in vivo 46
Tabela 1. 2: Oligonucleotídeos utilizados para guia no método CRISPR/Cas9
Tabela 1. 3: Primers utilizados para clonagem dos fragmentos controle para o ensaio 3C
Tabela 1. 4: Sequências dos primers utilizados para RT-qPCR
CAPÍTULO 2 - Modulação da expressão de SCRATCH2 por fatores de transcrição neurais
Tabela 2. 1: Primers utilizados para detecção de fragmentos pós-ChIP. 92
Tabela 2. 2: Primers utilizados para construção dos vetores utilizados neste capítulo. 89
CAPÍTULO 3 – Regulação pós-transcricional da expressão de SCRATCH2
Tabela 3. 1: Primers utilizados para clonagem da região 3'UTR de cScrt2
Tabela 3. 2: Sequência das "esponjas" para miR-125b e -200b, sintetizada para teste in vivo 122
Tabela 3. 3: Oligonucleotídeos utilizados como guia para deleção de alvos de miRNA na porção
3'UTR de <i>cScrt2</i> pelo método CRISPR/Cas9
CAPÍTULO 4 – Função de cSCRATCH2 no tubo neural posterior
Tabela 4. 1: Alvos de cScrt2 no tubo neural posterior, identificados após C&R e chamada de
picos
APÊNDICE
Tabela 1: Genes neurais com sítios identificados em cE1 após intersecção dos dados de Gene
Onthology e JASPAR
Tabela 2: Genes neurais com sítios identificados em mE1 após intersecção dos dados de Gene
Onthology e JASPAR
Tabela 3: Genes presentes no desenvolvimento renal e adrenal com sítios identificados em cE1,
M1 e M2 após intersecção dos dados de Gene Onthology e JASPAR 183

INTRODUÇÃO GERAL	25
Neurogênese no tubo neural	25
Egresso do ciclo e destino celular	26
Cascata gênica no desenvolvimento neural	28
Scratch2 no desenvolvimento neural	29
OBJETIVOS	
CAPÍTULO 1 - Controle genômico da expressão de SCRATCH2	
1 INTRODUÇÃO	
1.1.1 Elementos epigenéticos da expressão gênica	
1.1.2 Modelo do mecanismo de ativação da expressão gênica	
1.1.3 KRAB – Um mecanismo indireto	41
1.1.4 Definição epigenética de elementos regulatórios	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	
1.2.1 Análise in silico	45
1.2.2 Clonagem	45
1.2.3 Transformação de bactérias e purificação	47
1.2.4 Sequenciamento Sanger	48
1.2.5 Incubação e coleta de embriões de Gallus gallus	48
1.2.6 Eletroporação no embrião in ovo	48
1.2.7 Dissociação de tecido e FACS	49
1.2.8 CUT and RUN (C&R)	50
1.2.9 Chromosome Conformation Capture (3C)	51
1.2.10 Hibridação in situ	54
1.2.11 Imunohistoquímica	55
1.2.12 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)	56
1.2.13 Imagens	57
1.2.14 Análise estatística	57
3 RESULTADOS	59
1.3.1 Análise in silico e validação in vivo	59
1.3.2 Interação promoter-enhancer e novos elementos regulatórios	65
1.3.3 Modulação funcional de elementos regulatórios	69
4 DISCUSSÃO	77
1.4.1 Padrão de expressão gerado por E1	77
1.4.2 Modulação de USE e cE1 por CRISPR/Cas9 no tubo neural	
1.4.3 Modulação de USE e cE1 por CRISPR/Cas9 no GRD	80
1.4.4 Papel de USE3	80

SUMÁRIO

CAPÍTULO 2 - Modulação da expressão de SCRATCH2 por fatores de transcrição neurais	81
1 INTRODUÇÃO	81
2.1.1 Elementos moduladores transcricionais	. 81
2.1.2 Fatores de transcrição e seu papel na neurogênese	. 83
2 MATERIAL E MÉTODOS	87
2.2.1 Análise in silico	. 87
2.2.2 Clonagem	. 87
2.2.3 Eletroporação no embrião in ovo	. 89
2.2.4 Ensaio BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina)	. 90
2.2.5 Hibridação in situ	. 90
2.2.6 Imunohistoquímica	. 90
2.2.7 Dissociação de tecido e FACS	. 90
2.2.8 ChIP-qPCR (Chromatin ImmunoPrecipitation-qPCR)	. 90
2.2.9 Cultura de Células e Transfecção	. 93
2.2.10 Ensaio de luciferase	. 93
2.2.11 Gráficos e Contagem celular	. 94
1.2.12 Imagens	. 94
1.2.13 Análise estatística	. 94
3 RESULTADOS	95
2.3.1 Análise in silico	. 95
2.3.2 Modulação da expressão gênica por Ascl1 e Brn2	. 97
2.3.3 Modulação da expressão gênica por Sox21	110
4 DISCUSSÃO1	13
2.4.1 Modulação de gene repórter por FTs in vitro1	113
2.4.2 Modulação de gene repórter por FTs in vivo1	114
2.4.3 Efeito da superexpressão de Ascl1 e Brn21	114

CAPÍTULO 3 – Regulação pós-transcricional da expressão de SCRATCH2	117
1 INTRODUÇÃO	117
3.1.1 Regulação pós-transcricional	
3.1.2 Papel de miRNAs na regulação neural	
2 MATERIAL E MÉTODOS	121
3.2.1 Análise in silico	
3.2.2 Clonagem	
3.2.3 Eletroporação in ovo	
3.2.42 RT-qPCR	
3.2.5 Hibridação in situ	

3.2.6 Imunohistoquímica	123
3.2.7 Ensaio Luciferase	124
3.2.8 Validação de edição por CRISPR/Cas9	124
3.2.9 Análise estatística	124
3 RESULTADOS	125
3.3.1 Análise in silico	125
3.3.2 Expressão gênica no tubo neural	126
3.3.3 Superexpressão de miRNAs no tubo neural	
3.3.4 Modulação por inibição da ação de miRNAs no tubo neural	128
4 DISCUSSÃO	133
3.4.1 Efeito da modulação de miRNAs sobre cScrt2	133
5 MODELO HIPOTÉTICO	137

CAPÍTULO 4 – Função de cSCRATCH2 no tubo neural posterior	139
1 INTRODUÇÃO	139
2 MATERIAL E MÉTODOS	141
4.2.1 Clonagem de cScrt2	141
4.2.2 Eletroporação in ovo	141
4.2.3 RNA-Seq	141
4.2.4 CUT and RUN (C&R)	142
3 RESULTADOS	143
4 DISCUSSÃO	151

CONCLUSÃO GERAL	. 155
REFERÊNCIAS	. 157
APÊNDICE	. 179
ANEXO I - LISTA DE VETORES	. 183

INTRODUÇÃO GERAL

Neurogênese no tubo neural

O processo de neurogênese ocorre inicialmente pela ação inibitória de proteínas secretadas pela notocorda subjacente sobre proteínas da família BMP localizadas na ectoderme. A porção da ectoderme BMP-negativa - e centralizada -, agora passa a chamar-se de neuroectoderme ou placa neural. Com a progressão do desenvolvimento, as células mais mediais da placa neural sofrem constrição apical, invaginando e formando o sulco neural, ao passo que as bordas da placa neural se elevam para fundir-se na região dorsal. Com a fusão das dobras neurais, há a formação da epiderme (oriunda da ectoderme não-neural lateral à placa neural) na região dorsal, fechamento do tubo neural e, posteriormente, a liberação de um grupo de células migratórias localizadas na região dorsal do tubo neural, chamadas de células da crista neural (Bronner-Fraser, 1986).

Histologicamente, a placa neural é formada por células colunares, espessadas após indução pela notocorda (Smith e Schoenwolf, 1997), e que conferem ao tecido a caracterização de epitelial pseudoestratificado, também conhecido como neuroepitélio. As células neuroepiteliais possuem prolongamentos que as mantêm aderidas desde a membrana basal (mais periférica) até a membrana apical (mais interna), além de possuírem núcleos migratórios. A migração dos núcleos ao longo do citoplasma e sua posição no eixo centroperiférico do tubo neural varia extensivamente de acordo com o ciclo celular, estando ambos fortemente correlacionados no processo chamado migração nuclear intercinética (Ashwell, 2009). Durante a fase S do ciclo celular, o núcleo se desloca para a margem oposta e, ao atingila, sofre mitose (fase M). Estas células são responsáveis pela autorrenovação da zona ventricular, além de gerar progenitores intermediários. A decisão de qual destino celular tomar, é dado pela orientação do fuso mitótico e expressão da via Notch, que mantém as células em estado proliferativo.

Após início do processo de diferenciação, pode-se observar a regionalização do tubo neural em camadas, sendo a camada inicial formada por células neuroepiteliais. Posteriormente, essa camada localizada ao redor do canal neural, passa a ser chamada de zona ventricular (Fig. 1). As células engajadas a diferenciar-se, saem do ciclo celular e migram para camadas mais periféricas. O progressivo acúmulo de células pós-mitóticas logo após a zona ventricular caracteriza a zona intermediária (Fig. 1). À medida em que mais células se diferenciam e migram, novas camadas mais periféricas são criadas. A camada seguinte à zona intermediária é chamada de zona do manto (Fig. 1), onde são encontradas células diferenciadas, tanto neurônios quanto células da glia, e corpos celulares de motoneurônios (Ashwell, 2009).



Figura 1: **Ilustração de corte transversal do tubo neural. (A)** Indicação das subdivisões adquiridas pelo tubo neural com a progressão do desenvolvimento. Centralmente está localizado o canal neural (em marrom escuro), seguido da zona ventricular, contendo as células proliferativas (em preto). Adjacente a esta última, no sentido centro-periférico, estão as zonas intermediária e do manto, respectivamente.

Egresso do ciclo e destino celular

A divisão celular e a diferenciação não ocorrem simultaneamente, havendo diversos mecanismos envolvidos desde o ciclo celular até a célula diferenciada. A transição de uma célula proliferativa para o estado pós-mitótico é um processo intensamente regulado, com vários pontos de checagem, e coordenado pela atividade de ciclinas e quinases (Molina e Pituello, 2017). Nesse processo, os reguladores-chave são expressos em tipos celulares específicos, mas algumas vias como Notch, Wnt e seus fatores de transcrição (FTs) estão presentes em diversos tecidos (Kaldis e Richardson, 2012). No contexto neural, foi proposto durante a neurogênese em *zebrafish* e em galinhas que a migração apicobasal do núcleo expõe o núcleo a variações de sinais da via Notch, regulando a neurogênese (Murciano *et al.*,2002; Del Bene *et al.*,2008).

Além disso, é sabido que a via Notch também está intimamente envolvida na ativação paralela de genes proneurais, determinando o conceito de "inibição lateral". Células que expressam o transcriptoma proneural (ex. *Ascl1*, Ngn2; Bertrand, Castro and Guillemot, 2002),

ativam a expressão do ligante Delta que, por ser uma proteína de membrana, sinaliza a ativação da via Notch na célula lateral. Notch é uma proteína transmembrana, evolutivamente conservada, que atua por interações celulares locais (Rand, Lake e Artavanis-Tsakonas, 1999). Dentre os alvos dessa via, estão os FTs *Hes* (*Hairy-Enhancer of Split*) que inibem a expressão de genes proneurais, mantendo as células em estado indiferenciado (Louvi e Artavanis-Tsakonas, 2006). Nesse contexto, foi visto em *Drosophila* que *Scrt* reprime a expressão de genes-alvo da via Notch interagindo em regiões promotoras (Fig. 3; Ramat *et al.*,2016). A consequência desse processo de inibição lateral é o egresso do ciclo celular.

Outro fator responsável pela repressão da via Notch são os fatores de transcrição bHLH Neurogenina 1/2 (*Ngn1* ou *Ngn2*). É sabido que esses FTs controlam múltiplos passos da neurogênese, incluindo a saída do ciclo celular, comprometimento neuronal e início da diferenciação neural (Perez, Rebelo e Anderson, 1999; Bertrand, Castro e Guillemot, 2002). Quando os níveis de *Ngn 1/2* aumentam, ativa a expressão dos ligantes de Notch, como *Delta1* (*Dll1*), *Jagged1* (*Jag1*) e *Jagged2* (*Jag2*) que por sua vezestas ativam a sinalização da via Notch nas células vizinhas (Madarsz, 2013). Ao mesmo tempo em que dispara a manutenção do estado proliferativo nas células vizinhas, atua na determinação do destino neural na célula em que está sendo expresso. Do mesmo modo atua *Ascl1*, outro FT do tipo bHLH.

O ciclo celular tem sido descrito como um processo que determina o destino celular. Foi visto que *Ngn2* atua na repressão de outros diversos alvos envolvidos na progressão do ciclo celular, como Ccnd1 e das ciclinas Ccne1/2 (Ciclina E1 e E2). Essas ciclinas estão envolvidas nas fases G1 e S do ciclo celular, e tiveram sua expressão reduzida por *Ngn2* (Lacomme *et al.*,2012). Assim, a saída do ciclo celular ocorre inicialmente pela repressão de ciclinas específicas nas fases G1 e S, por *Ngn2*, seguida da ativação de genes para diferenciação tardia, como *Pax6 e Olig2*, em um estado pós-mitótico. Um estudo em *Xenopus*, demonstrou que células progenitoras neurais apresentam altos níveis de Cdks. Essas enzimas atuam na fosforilação de *Ngn2*, tornando-a inativa no seu papel de determinar o início da diferenciação neural. A atividade de *Ngn2* gradualmente retorna à medida em que as Cdks perdem atividade e *Ngn2* é desfosforilada (Ali *et al.*,2011; Hardwick e Philpott, 2014). Com a *Ngn2* inativa, a fase G1 é estendida. De forma oposta, com o aumento da atividade de *Ngn2*, a fase G1 é reduzida e há a ativação de genes-alvo proneurais, levando à diferenciação.

Uma outra família gênica que participa no processo de determinação do estado proliferativo é a Sox (Sry-related HMG box). Basicamente, essa família é subdividida em dos grupos: B1, com Sox1 a Sox3 e B2, contendo Sox14 e Sox21. O primeiro grupo é conhecido por manter as células em estado proliferativo, enquanto o segundo, em promover a diferenciação neural. Sox2 é um dos fatores determinantes, junto a Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), Klf4 (Kruppel-like factor 4) e Myc (Myelocytomatosis) na conversão de células somáticas ao estado pluripotente (Takahashi and Yamanaka, 2006). Nesse sentido, foi visto que Sox2 é capaz de atuar como fator pioneiro, durante a reprogramação celular, acessando a cromatina ainda fechada, assim como Ascl1 (Soufi, Donahue e Zaret, 2012). Em Xenopus, a superexpressão de Sox3 aumenta a expressão de Sox2 e geminina, uma proteína inibidora da replicação do DNA (Rogers et al., 2009), expressa nas fases S a M do ciclo celular, especialmente na neurogênese (Kroll, Kristen, 2007). Por outro lado, foi visto em células tumorais que Sox2 causa a redução da proliferação pela inibição da via mTor (Liu et al., 2013). Um outro trabalho, também em câncer, demonstrou que a superexpressão de Sox2 promove a saída do ciclo celular por reprimir a ciclina D1 (Ccnd1), além de inibir a migração e invasão (Luo et al., 2018).

De modo geral, isso sugere que a saída do ciclo celular e a determinação de subtipos celulares no início do processo de diferenciação dá-se pelo acoplamento desses processos ocorrendo em paralelo.

Cascata gênica no desenvolvimento neural

Concomitante à migração radial de células recém-egressas do ciclo celular e a disposição centro-periférica, há a padronização de diferentes tipos neuronais no eixo dorsoventral do tubo neural através da atuação conjunta de morfógenos produzidos na ectoderme (dorsal) e na notocorda (ventral). De modo geral, a porção dorsal do tubo neural irá gerar neurônios sensoriais. Ventralmente a estes são caracterizadas seis camadas de diferenciação em interneurônios, uma camada de motoneurônios e uma última de interneurônios comissurais. Os eventos para geração de subtipos neurais específicos são regidos por uma cascata molecular bem definida, que também está intimamente ligada ao processo de migração neural (Ge *et al.*,2006). Em paralelo a este processo migratório, há a ativação sequencial e precisa de genes que regulam a transição do estado proliferativo para a

28

diferenciação pós-mitótica (Corral e Storey, 2001). Dessa forma, o destino das células proliferativas poderá ser determinado de acordo com seu perfil particular de expressão gênica resultante da ativação e/ou repressão de genes. Isto, posteriormente, definirá a localização espaço-temporal de subtipos neurais específicos que subdividem o tubo neural em domínios distintos.

Este tipo de organização permite a segregação espacial de genes marcadores e atuantes para etapas distintas da neurogênese, como por exemplo, a expressão de Notch em células progenitoras, localizadas na zona ventricular; *Sox3* e *Ngn2*, em células recém-egressas do ciclo celular, nas zonas subventricular e intermediária, imediatamente mais externa ao domínio de expressão de Notch; *Brn2*, uma proteína da família POU de fatores de transcrição, é expressa desde a zona ventricular até a intermediária, sendo responsável pelo egresso do ciclo celular de progenitores neurais e pelo início da diferenciação neural e migração radial (Fig. 3; Tanaka *et al.*,2004; Castro *et al.*,2006). Outro exemplo é *NeuroD4/NeuroM*, uma proteína expressa na zona intermediária, em células pós-mitóticas e em início de diferenciação (Fig. 3).

E por último, há a expressão de beta-Tubulina III (Lee *et al.*, 1990), um marcador de diferenciação tardia, expresso por células localizadas na região mais periférica do tubo neural, ou *IsletI* (Ericson *et al.*, 1992), na região ventral da zona do manto onde contém os precursores de motoneurônios.

Scratch2 no desenvolvimento neural

Incluído neste contexto de diferenciação centro-periférica, encontramos o gene *Scratch2* (*Scrt2*). Este gene pertence à família Scratch, inserida na superfamília Snail/Slug de fatores de transcrição, juntamente à família Snail. A primeira possui os membros *Scratch1* e *Scratch2*, enquanto a segunda possui os fatores *Snail1*, *Snail2/Slug* e *Snail3/Smuc* (Fig. 2; Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005; Chiang e Ayyanathan, 2012).

Os membros desta superfamília possuem a região C-terminal conservada, apresentando 4 a 6 domínios *zinc-fingers*, que auxiliam na ligação da proteína na curvatura maior do DNA em sítios E-box (CAGGTG) (Nakakura *et al.*,2001; Nieto, 2002) e, que também são reconhecidos por fatores de transcrição bHLH (Nakakura *et al.*,2001). Na outra extremidade, há a presença conservada do domínio SNAG presente em vertebrados (Grimes *et al.*,1996; Eric K. Nakakura *et al.*,2001), em *Snail1* de equinodermos e cefalocordados (Langeland *et al.*,1998) e em *Scratch* de *Drosophila* (Roark *et al.*,1995). Este domínio é necessário para que *Scrt* atue como repressor transcricional (Grimes *et al.*,1996; Dam *et al.*,2011). E ainda, o que diferencia a família Scratch das outras proteínas da família Snail é a presença do domínio SCRATCH entre os domínios SNAG e *zinc-finger* (Fig. 2; Manzanares, Locascio e Nieto, 2001; Vieceli *et al.*,2013).



Figura 2: **Esquema da estrutura proteica dos membros da superfamília Snail/Slug.** Todos genes que compõem esta superfamília apresentam o domínio repressor SNAG na região N-terminal e na extremidade C-terminal, de 4 a 6 domínios zinc-finger de ligação ao DNA. Os domínios Scratch e Slug são os diferenciais entre as famílias Scratch e Snail, respectivamente, sendo o domínio Slug presente apenas em Snail2.

A expressão de *Scrt2* tem sido relatada relacionada ao desenvolvimento do sistema nervoso. Trabalhos anteriores caracterizaram *Scrt2* como um elemento relevante na diferenciação neural pós-mitótica inicial e na migração celular. O primeiro relato demonstra a redução do número de células fotorreceptoras nos olhos de moscas adultas nocauteadas para *Scrt2* (Roark *et al.*, 1995). Esse fenótipo pôde ser agravado com o duplo *knockout* para o gene *deadpan (dpn),* homólogo de membros da família HES de fatores de transcrição bHLH em vertebrados (Roark *et al.*, 1995; Wallace, Liu e Vaessin, 2000), havendo redução drástica no número de neurônios (Roark *et al.*, 1995).

Além disso, a expressão ectópica de *Scrt2* dispara a formação de neurônios supranumerários provenientes do surgimento precoce de progenitores neurais (Roark *et al.*, 1995). Já mais recentemente, Ramat *et al.*, (2016), demonstraram que Scrt regula o destino de precursores neurais, mantendo as células fora da via de sinalização Notch, por se ligar à região promotora de genes-alvo da via e reprimi-los.

Em outro invertebrado, no nemátodo *C. elegans*, foi visto que o homólogo de *Scrt2*, Ces-1 (Metzstein e Horvitz, 1999), está relacionado à inibição da apoptose de neurônios na região da faringe, possivelmente pela repressão de dois outros genes que atuam na morte celular, *ced-3* e *ced-4* (Ellis e Horvitz, 1991; Liu e Hengartnet, 1999). Além disso, o processo de apoptose programada foi inibido por Ces-1 após a divisão celular assimétrica dos progenitores neurais (Hatzold e Conradt, 2008), gerando mais neurônios. Um outro mecanismo recentemente descrito em *C. elegans* é o bloqueio da progressão do ciclo celular em progenitores motoneurais pela ligação a um elemento *cis* localizado a 4.8 kb acima de Cdc-25.2 e, consequentemente, reprimindo a transcrição desse gene (Yan *et al.*,2013).



Figura 3: Resumo da cascata gênica ao qual Scratch2 está inserido, com alvos de diversos modelos. Na zona ventricular (VZ, azul) ocorre a expressão de genes associados à proliferação. Na zona intermediária (IZ, amarelo), os genes associados à transição da saída do ciclo celular e início de diferenciação. Scratch2 está inserido nesse domínio. Na zona do manto (MZ, rosa), estão os genes associados à diferenciação neural.

Em vertebrados, especificamente em *zebrafish* (*Danio rerio*), a expressão de *Scrt2* é restrita à população em início de diferenciação (Dam *et al.*,2011). Em camundongos, m*Scrt2* está presente em células recém-egressas do ciclo celular, na zona intermediária do tubo neural e também do telencéfalo (Marín e Nieto, 2006; Paul *et al.*,2012; Itoh *et al.*,2013). Além disso, m*Scrt2* também foi observado no epitélio retiniano (Nakakura *et al.*,2001). *Scrt2* tem sido descrito como uma molécula antiapoptótica (Metzstein e Horvitz, 1999; Nakakura *et al.*,2001; Hatzold e Conradt, 2008). Contudo, a expressão de *Scrt2* em camundongos está associada a um novo papel, atuando no início da migração de células do neocórtex e da zona subventricular do hipocampo, sendo estas últimas as responsáveis pela origem de células da glia (Paul *et al.*,2012; Itoh *et al.*,2013), demonstrando sua importância na neurogênese.

Por fim, em galinha (*Gallus gallus*) *cScrt2* foi descrito, assim como nos outros modelos, como uma proteína restrita ao sistema nervoso, expressa em toda a extensão do tubo neural, além de gânglios craniais e da raiz dorsal (Fig. 4F; Vieceli *et al.*,2013). Em estágios iniciais do desenvolvimento (HH15), *Scrt2* é expresso em células pós-mitóticas do tubo neural, numa população muito restrita (Fig. 4A) localizadas na periferia do tubo neural. Posteriormente, com a progressão do desenvolvimento, as células pós-mitóticas migram centrifugamente, ocupando camadas cada vez mais externas do tubo neural (Fig. 4C). Após o início da diferenciação das células pós-mitóticas, há a migração e sublocalização na zona do manto e deslocamento do padrão de expressão de *cScrt2*, antes periférico, para a zona intermediária. Por meio de hibridação *in situ* dupla para marcadores moleculares conhecidos, Vieceli e colaboradores (2013), verificaram que a expressão de *cScrt2*, de fato, ocorre em células pós-mitóticas e em início de diferenciação por não possuir sobreposição de *cScrt2* com marcadores de proliferação (ex. BrdU e Sox3) ou de diferenciação (SCG10).



Figura 4: Expressão embrionária de *cScrt2*. (A-F) Hibridação *in situ* para *cScrt2* em cortes transversais de embriões de galinha em HH15 (A), HH17 (B), HH19 (C), HH20 (D), HH22 (E) e HH23 (F). Em (B) foi utilizada uma sonda senso para *cScrt2* como controle. grd, gânglio da raiz dorsal. Adaptado de: Vieceli *et al.*,2014.

O padrão espacial bem delimitado de *Scrt2* sugere que sua expressão seja regulada em diversos níveis durante a neurogênese. Os elementos envolvidos na regulação da expressão gênica representam a manutenção, refinamento ou aquisição de novos papéis para os genes aos quais estão associados. Evolutivamente, isso significa que um gene pode ter sua função

ou local de expressão modificados de acordo com os elementos que o regulam, levando à processos de adaptação e, cumulativamente, especiação.

Dessa forma, aqui investigamos possíveis mecanismos de regulação de expressão pré e pós-transcricional. Buscamos identificar tanto elementos *cis* quanto *trans* em mecanismos de regulação pré- e pós-transcricionais envolvidos na expressão de *Scrt2*. Elementos *trans* são também conhecidos como fatores de transcrição (FT), ou seja, proteínas que reconhecem sequências específicas de DNA, atuando junto à maquinaria de transcrição na ativação ou repressão gênica. As sequências de DNA/sítios-alvo que os FTs reconhecem também são denominadas de *motifs* e estão inseridas em fragmentos maiores de DNA com papel regulatório, os elementos *cis*. Esse último, por sua vez, é também conhecido como *enhancer*, regiões de DNA que atuam na modulação da expressão gênica pela ação combinada de elementos *trans* e maquinaria de transcrição.

O mecanismo de regulação pós-transcricional aqui abordado é centrado em miRNAs. Diferentemente dos fatores de transcrição, a maioria dos miRNAs atua póstranscricionalmente, impedindo a tradução do mRNA-alvo através da sua hibridação com a porção 3'UTR do mRNA e direcionando este para degradação. Considerando esse contexo, os miRNAs também são considerados elementos *trans*, e seus sítios-alvo como *elementos cisregulatórios*.
OBJETIVOS

Considerando o padrão de *cScrt2* descrito acima, sua expressão espaço-temporal estritamente delimitada e a importância de *Scrt2* para a neurogênese, aqui buscamos entender o processo de regulação da expressão de *cScrt2*.

Especificamente, este trabalho teve por finalidade identificar e compreender os seguintes mecanismos:

- a) Identificação de elementos *cis*-regulatórios na região genômica de *cScrt2* e teste para confirmação da sua função biológica.
- b) Verificação do efeito da superexpressão dos fatores *trans* a montante: *Ascl1, Brn2* e *Sox2* na expressão endógena de *cScrt2*.
- c) Efeito de miR-125b e -200b na regulação pós-transcricional de *cScrt2*.

CAPÍTULO 1 - Controle genômico da expressão de SCRATCH2

1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Elementos epigenéticos da expressão gênica

A cromatina é formada por DNA enrolado a um complexo de 2 unidades de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, formando o nucleossomo. Além dessas, a histona H1 liga-se covalentemente ao nucleossomo, atuando na sua estabilidade e na organização da cromatina (Misteli *et al.*,2000). Regiões inacessíveis, ou de heterocromatina, afetam o processo de regulação gênica de modo que impedem o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA alvo (Rothbart e Strahl, 2014). Por outro lado, genes transcricionalmente ativos estão situados em regiões de cromatina desenovelada, ou eucromatina. A transição para o estado transcripcionalmente ativo da cromatina, é determinada por complexos remodeladores de cromatina, isoladores e modificação pós-traducional de histonas (Shlyueva, Stampfel e Stark, 2014).

As histonas sofrem modificações na porção N- terminal de sua "cauda" e que afetam a interação entre histonas e/ou entre DNA e histonas (Strahl e Allis, 2000). As modificações de histonas conhecidas que atuam na regulação gênica incluem acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinização, sumoilação, deaminação, crotonilação, citrulinação, glicosilação, hidroxilação, propionilação, butirilação e ADP-ribosilação (Kouzarides, 2007; Arnaudo e Garcia, 2013; Rothbart e Strahl, 2014; Kebede, Schneider e Daujat, 2015; Lawrence, Daujat e Schneider, 2016). Dentre as modificações mais estudadas estão a acetilação e metilação devido a sua ocorrência frequente no epigenoma e importância para repressão e ativação gênica (Grunstein, 1997; Rothbart e Strahl, 2014), sendo também as primeiras modificações de histonas relatadas na literatura (Allfrey, Faulkner e Mirsky, 1964).

Interessantemente, as modificações de histonas são apenas mensagens de comando deixadas por proteínas escritoras, como um informe de atividades deixado a funcionários. Em outras palavras, as marcas epigenéticas são depositadas por proteínas e sinalizam para outras proteínas efetoras e complexos proteicos o que deve ser realizado no determinado trecho da cromatina que foi modificado: bloqueio ou permissão do acesso ao DNA, remodelamento de cromatina, ou permissão de acesso a especialistas terceirizados (fatores de transcrição, FT) (Lawrence, Daujat e Schneider, 2016).

As proteínas "escritoras" têm sido descritas à medida que foram surgindo novas marcas epigenéticas, pela necessidade de entender o mecanismo envolvido no processo de regulação gênica. Dentre as conhecidas, iremos abordar sobre as envolvidas nos eventos de acetilação e metilação.

As proteínas histona acetiltransferases (HATs) são responsáveis pela acetilação de resíduos de aminoácidos na cauda das histonas, transferindo um grupo acetil do acetil-CoA para o grupo amino do resíduo de histona. Essa modificação neutraliza a carga positiva do octâmero de histona, facilitando o acesso para o complexo remodelador de cromatina e maquinaria de transcrição (Fan, Baeza e Denu, 2016). As HATs podem ser categorizadas em dois grandes grupos baseado na sua localização subcelular. O tipo A está localizado no núcleo e acetila histonas associadas à cromatina. Já o tipo B, está localizado no citoplasma e modifica histonas recém-sintetizadas (Richman *et al.*, 1988).

Outra categorização mais usual é baseada na similaridade estrutural e funcional. Assim, são descritas cinco famílias: duas maiores, a Gcn5/PCAF (GNAT) (Neuwald e Landsman, 1997) e MYST; e outras três menores, as p300/CBP, HAT1 e Rtt109 (Torchia, Glass e Rosenfeld, 1998; Marmorstein e Zhou, 2014). Dentre as famílias descritas, as HATs p300/CBP são as mais frequentemente associadas a acetilação para ativação de *enhancers* (Jin *et al.*,2011; Raisner *et al.*,2018), e são reconhecidas pela acetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27ac) (Rada-Iglesias *et al.*,2011). No entanto, já foi relatada a ligação de p300 em regiões enhancers sem sobreposição de marcação para H3K27ac, sugerindo que o mecanismo de acetilação de enhancers seja regulado por múltiplos passos (Rada-Iglesias *et al.*,2011). Para prevenir acetilação prematura, existe a atuação de mecanismos de inibição de p300, metilação de histonas e a atuação de proteínas histona deacetilases (HDACs) (Calo and Wysocka, 2013), que fazem o papel da remoção das marcas epigenéticas aplicado pelas HATs.

A metilação de H3K4 – mono- (me), di- (me2) ou tri- (me3) – não sofre alterações eletrostáticas (Hyun *et al.*,2017), ao contrário do descrito para acetilação de H3K27. Interessante destacar que enquanto acetilação de H3K27 indica regiões ativas, metilação de H3K27 sugere o oposto (Hyun *et al.*,2017). Ainda diferente de outras modificações de histonas, que apenas sinalizam estados "ON" ou "OFF" da cromatina, metilações de lisinas em histonas

38

indicam ativação ou repressão dependendo da sua posição e tipo de metilação (Black, Van Rechem e Whetstine, 2012), sendo H3K4me3 usualmente descrita como cromatina ativa em regiões promotoras (Heintzman *et al.*,2007; Hyun *et al.*,2017). Além disso, a metilação de histonas está intimamente ligada à metilação de DNA, o que torna a regulação gênica um processo mais refinado. O estado transcricional pode ser desencadeado através de metilações nas histonas que guiam para as metilações no DNA, consequentemente alterando a estrutura da cromatina e, culminando no silenciamento ou ativação transcricional (Cedar e Bergman, 2009; Szyf, 2015). Neste processo, a inserção das metilações é realizada por uma família de Histona Metiltransferases bastante conservada, conhecidas por SET1/MLL (Hyun *et al.*,2017). Em mamíferos, SET1 forma complexos com outras proteínas que conferem atividade diferenciada de acordo com a combinação. Um exemplo é a associação da subunidade WRAD com o domínio SET de MLL1 (uma proteína do complexo SET1), que aumenta a eficiência da inserção de mono- e dimetilação em histonas (Patel *et al.*,2009).

Nesse contexto, a remoção de modificações é realizada por demetilases. Uma bastante conhecida e atualmente muito utilizada associada à técnica de CRISPR/Cas9 é a enzima *Lysine-Specific histone Demethylase 1* (LSD1) (Kearns *et al.*,2015; Williams *et al.*,2018). LSD1 demetila marcas em H3K4 e H3K9 (Shi *et al.*,2004) e já foi relatada atuando no silenciamento de gênico em colaboração com complexos associados ao fator de transcrição CoREST (REST correpressor) em células neurais de *Drosophila* (Dallman *et al.*,2004; Lee *et al.*,2005) e também no silenciamento de enhancers, necessário para a diferenciação (Whyte *et al.*,2012). Por outro lado, também já foi relatado o papel de LSD1 em alvos diferentes de histonas, como p53 e DNMT1 (Kong *et al.*,2011).

1.1.2 Modelo do mecanismo de ativação da expressão gênica

A atividade da expressão gênica pode ser definida em 4 diferentes estados: inativo, iniciado, pré-ativado e ativado (Figura 1.1). No estado inativo, as regiões genômicas acima e abaixo do gene silenciado são identificadas pela presença de H3K27me3 (Fig. 1.1A). Posteriormente, após a sinalização da necessidade de expressão do gene em questão, fatores pioneiros interagem com a região genômica para o estabelecimento do estado iniciado. Exemplos deste processo são ilustrados por *Ascl1* no contexto neural (Raposo *et al.*,2015) e FOXA no desenvolvimento hepático (Gualdi *et al.*,1996; Cirillo *et al.*,2002; Zaret e Carroll,

2011). A presença destes fatores pioneiros no *enhancer*, inicia a ativação do *enhancer*, indica a localização genômica do gene a ser expresso (Levine, Cattoglio e Tjian, 2014) e a chegada da maquinaria de desenovelamento (do qual a DNAse I faz parte), que reconhece os sítios flanqueando o local de ligação do fator pioneiro, auxiliando no remodelamento da cromatina (Fig. 1.1B). Concomitantemente, proteínas modificadoras de histonas e remodeladores de cromatina são recrutados, tornando acessíveis os *motifs* de ligação para a atuação de FTs tardios e determinantes (junto aos enhancers) do padrão de expressão tecido-específico.

O estado de pré-ativação é iniciado após o remodelamento da cromatina e abertura da região genômica do *enhancer* havendo, posteriormente, a remarcação do *enhancer* por acetil e/ou metiltransferases, adicionando às histonas H3K27 um grupo acetil e à H3K4 um grupo metil, sinalizando como "ativo" ou "ON" essa região genômica (Fig. 2.1C). Além disso, nesse momento, há o acoplamento da RNA polimerase II ao *core* do promotor, permanecendo em pausa até o início da transcrição (Fig. 1.1C).

Por fim, em um estado ativo, há saída dos fatores pioneiros do *enhancer*, dando lugar às enzimas modificadoras de histona, que adicionam uma nova marcação à H3, a acetilação da lisina 27, reforçando o sinal de ativação do *enhancer* (Fig. 1.1D). Além disso, há também a trimetilação de H3K4 na região promotora para indicar um sítio promotor e TSS ativos do gene que está prestes a ser transcrito (Fig. 1.1D). Em seguida, há a ligação dos FTs tardios aos seus *motifs* específicos no *enhancer*. O condensamento e dobramento da cromatina lateral ao *enhancer*, promove a aproximação dessa região ao promotor, acoplando o FT ligado ao *enhancer* à maquinaria basal e seus fatores iniciadores (ex. TFIID) aderidos ao promotor e TSS (Fig. 1.1D). Nesse momento, há a liberação da RNA polimerase II para o início da transcrição. Atuando acessoriamente nesse processo, está a proteína coesina, que realiza a estabilização das interações entre *enhancer* e promotor (Guo *et al.*,2012).



Figura 1. 1: Modelo do processo de ativação de transcrição via interação enhancer-promotor. (A) Estado inativo da trasncrição. O gene X está silenciado e os enhancers proximais e distais possuem marcas epigenéticas de repressão "H3K27me3" (cauda em vermelho). (B) Estado iniciado. O fator pioneiro (PF) liga-se à cromatina, sinalizando o recrutamento de remodeladores de cromatina e modificadores de histona, além de indicar os sítios com hipersensibilidade à DNAse I (DHS) para clivagem do DNA e remodelamento da cromatina. (C) Estado de pré-ativação. Os modificadores de histona adicionam marcações de ativação no enhancer (H3K4me1, cauda verde escuro) e a RNA polimerase II (Pol II) liga-se ao core do promotor, permanecendo em pausa. Nesse passo, a cromatina lateral ao enhancer se condensa e se dobra para aproximar o enhancer do promotor. (D) Estado ativo de transcrição. Há a saída do PF e chegada do fator de transcrição (FT) ao seu motif no enhancer. Outras enzimas modificadoras de histonas adicionam a marca H3K27ac (cauda verde claro) no enhancer e no H3K4me3 (cauda azul escuro) promotor, reforçando o estado ativo. Além disso, recruta o restante da maquinaria basal para a região promotora, liberando a Pol II para transcrição. A coesina (Cohesin; azul escuro) atua na estabilização do complexo proteico. Adaptado de Levine, Cattoglio e Tijan, 2010.

1.1.3 KRAB – Um mecanismo indireto

O fator de transcrição *Krüppel-associated box* (KRAB) é uma proteína do tipo *C2H2-zinc finger* bastante conservada entre os tetrápodes (Urrutia, 2003). É composta por um forte domínio repressor (KRAB) e vários domínios *zinc fingers* (ZNFs) *in tandem*, assim como *Scrt2*. Seu mecanismo de ação é curiosamente diferente dos demais FTs da superfamília, pois tem a capacidade de fazer combinações de até 12 módulos de ZNFs para atingir um fragmento maior de DNA (Mandell e Barbas, 2006; Wolf, Greenberg e Macfarlan, 2015). Quando o ZNF associase ao DNA, sua ligação é estabilizada por íons de zinco, enquanto o domínio KRAB reprime a maquinaria basal quando ativada, de modo dose-dependente (Margolin *et al.*, 1994) por meio de interação com o FT correpressor *Transcriptional Intermediary Factor 1 β* (TIF1β) também conhecido por KAP1.

O mecanismo de repressão ocorre de forma indireta, atuando no silenciamento gênico. Inicialmente, KRAB-ZNF se liga ao DNA, recrutando o correpressor TIF1β /KAP1. Este, por sua vez, compacta a cromatina por meio do recrutamento de modificadores de histona como a HDAC NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) e a metiltransferase SETDB1, que remove marcas de acetilação indicativas de acetilação e substitui pela metilação em H3K9, sinalizando repressão gênica (Schultz *et al.*,2002). Além disso, KAP1 também recruta HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), que se associa a DNMTs reforçando o fechamento da cromatina. Outro mecanismo também relacionado a KRAB é o recrutamento da subunidade EZH2 (*enhancer-of-zest homolog 2*) do complexo proteico PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) que, consequentemente, metila H3K27 (Hyun *et al.*,2017). Também foi visto que há interação entre os dois mecanismos descritos acima, onde EZH2 e PRC2 são necessárias para a estabilidade de HP1 e manutenção da atividade repressora na presença de H3K27me3 (Boros *et al.*,2014). Por outro lado, um outro trabalho demonstrou que H3K27me3 inibe a ação de SETDB1, impedindo a metilação da lisina 9 em células-tronco de camundongos (Fei *et al.*,2015).

Apesar de sua atividade repressora, um ponto negativo acerca do uso de KRAB é que já foi relatado uma intensa heterocromatinização a longas distâncias, ou seja, KRAB é capaz de expandir a compactação por longos trechos do DNA, não somente no ponto onde foi induzido, o que pode afetar regiões promotoras adjacentes (Groner *et al.*,2010).

1.1.4 Definição epigenética de elementos regulatórios

A expressão gênica delimitada e pontualmente determinada está intimamente relacionada com a modulação de histonas de modo histologica-, cronologica- e espacialmente específicos, modulando o destino e formação de linhagens celulares. Esse processo é muito bem orquestrado, havendo além da atuação de regiões promotoras, isoladores, modificadores de histonas (Heintzman *et al.*,2007), a atuação de FTs, remodeladores de cromatina e outras proteínas de complexos ativadores ou repressores.

Elementos cis são módulos de sequências específicas de DNA genômico frequentemente localizados relativamente perto de um gene regulado, sendo também chamados de enhancers. Os enhancers participam de um processo de ativação e silenciamento contínuo, indicando locais específicos para a expressão de determinado gene. Atrelado a este mecanismo, encontramos diversos tipos de modificações de histonas. As marcações H3K4me1 e H3K27ac são abrangentemente utilizadas para indicar enhancers ativos (Karlic et al., 2010; Zentner, Tesar e Scacheri, 2011; Levine, Cattoglio e Tjian, 2014), sendo H3K27ac necessária para a função do enhancers (Raisner et al., 2018). Além dessas, H3K18ac e H3K9ac também já foram relatadas associadas a presença de HATs em enhancers (Jin et al., 2011; Karmodiya et al., 2012). No entanto, outros fatores devem ser considerados, como sítios responsivos a DNasel, expressão e ligação de FTs e outros coativadores (Heintzman et al., 2007). Além disso, muitos desses enhancers são sequências evolutivamente conservadas, o que sugere e muitas vezes permite, a manutenção da função gênica tecidoespecífica em diferentes organismos por não terem sofrido pressões seletivas negativas. Mais recentemente, também foi demonstrada a hiperfrequência de novos elementos transposíveis em humanos, na sua maioria intrônicos, associados a H3K27ac e a possíveis novas funções de genes adjacentes, sugerindo que esses elementos têm papel enhancer (Trizzino, Kapusta e Brown, 2018).

Por fim, os elementos *cis* são reconhecidos por FTs (ou elementos *trans*). Como mencionado acima, a expressão de FTs e de seus alvos é mediada de forma tecido-específica, gerando um efeito cascata de regulação gênica. Abordaremos sobre elementos *trans* no próximo capítulo.

No presente capítulo, demonstraremos a identificação de elementos s *cis*-regulatórios por análise *in silico* e sua validação *in vivo*. Além disso, verificamos a interação do elemento candidato com o promotor de *cScrt2* por ensaio 3C e sua atividade sobre cScrt2 com edição gênica e epigenética pela metodologia CRISPR/Cas9. , na região genômica de *cScrt2* e teste para confirmação da sua função biológica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Análise in silico

A sequência genômica de *cScrt2* foi analisada *in silico* para busca de região *cis*regulatória previamente descrita no genoma de camundongos (mm9). O *motif* (ATT[A/T]NCAT[A/T/G]CAG[C/G]TG) relatado por Castro e colaboradores (2006) foi identificado utilizando a ferramenta BLAT na plataforma aberta *online* Genome Browser (GB), e está localizado a 13kb acima de m*Scrt2* (chr2:151,894,401-151,896,000). Após, analisamos o perfil epigenético desta sequência na mesma plataforma para identificar seu potencial regulatório pela marcação para H3K27ac e H3K4me3. Além disso, analisamos os dados para sítios responsivos a DNAseI. Foi realizado *download* dos dados epigenéticos do cérebro de camundongos em E14,5 obtidos no GB para análise no software IGV v2.5.3.

Para identificarmos a sequência homóloga em galinha, utilizamos a mesma ferramenta da plataforma GB. A sequência acima, de camundongo, foi alinhada ao genoma de galinha (galgal5) identificando uma sequência localizada a 2.6kb acima de *cScrt2* (chr20:10,115,996-10,116,474). Da mesma forma que para mE1, analisamos cE1 o perfil epigenético para H3K27ac nesta região. Como ainda não havia dados disponíveis no GB, a análise de perfil epigenética foi realizada por experimentos de CUT and RUN em tubos neurais dissecados de embriões em HH23 em colaboração com o laboratório do Prof. Marcos Simoes-Costa (Cornell University, EUA).

1.2.2 Clonagem

As sequências identificadas, tanto de camundongo (mE1) quanto de galinha (cE1) foram clonadas utilizando os primers descritos na Tabela 1.1, no vetor pTKmRFP nos sítios de restrição das enzimas KpnI (Thermo Fisher, cat. ER0521) e XhoI (Thermo Fisher, cat. ER0691), localizados nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Já as sequências USE1, USE, USE3, Ep2 e C1 a C5, foram clonadas utilizando o kit HiFi DNA Assembly Master mix (NEB, cat. E2621) no sítio de restrição Smal (NEB, cat. R0141) para USE, USE1 e USE3, e em KpnI e XhoI para C1 a C5, ambos no vetor pTKmRFP. Os primers estão indicados na Tabela 1.1.

Nome	Sequência
mE1-F	5' GGTACCCACATGTATTCATTAAGTGGATGA
mE1-R	5' CTCGAGCAGCTGCTTCTCGGCCCCAGCTGCAC
cE1-F	5' GGTACCGGCACACGGGTCCCCAAAGTC
cE1-R	5' CTCGAGGAACGGGCGATTACTTACGCC
USE-F	5' TCTTACGCGTGCTAGCCCCTCAGCACCCTTGGGAGC
USE-R	5' ATCCGAGATCTCGAGCCCACTCCCGTTCCCAGCCTG
USE1-F	5' TCTTACGCGTGCTAGCCCGACCTGCTGCTTTCCACCTC
USE1-R	5' ATCCGAGATCTCGAGCCCTGGGACGGGCAAGGAGCA
USE3-F	5' TCTTACGCGTGCTAGCCCTGCAAACGTGCCTTCAAGA
USE3-R	5' ATCCGAGATCTCGAGCCCACTCCCGTTCCCAGCCTGGGGC
Ep2-F	5' TCTTACGCGTGCTAGCCCAGGAGCGCATCATGCAGGCACT
Ep2-R	5' ATCCGAGATCTCGAGCCCGCTCACAGCCCTGCTTCCCCTC
C1-F1	5' TTCTCTATCGATAGGTACGGCACACGGGTCCCCAAAGTC
C1-R1	5' CCAGGCTGTGGTGTAATAAGGAATTCCTGCTCGCTCGCGGGG
C1-F2	5' CCTTATTACACCACAGCCTGG
C2-R2	5' TTAGATCGCAGATCTCGAGAACGGGCGATTACTTACGCC
C2-F	5' GGTACCATTTCCATACAGCTGCTCGGGA
C2-R	5' CTCGAGGAACGGGCGATTACTTACGCC
C3-R1	5' TAACCTGCAATCAGTCCTGCGAATTCCTGCTCGCTCGCGGGG
C3-F2	5' CGCAGGACTGATTGCAGGTTA
C4-R1	5' CCAGGCTGTGGTGTAATAAGGGAGCTGTGCTAATATTGCTGA
C5-F	5' GGTACCGGCACACGGGTCCCCAAAGTC
C5-R	5' CTCGAGGAGGTAATTAAGTGTAAAAGA

Tabela 1. 1: Iniciadores utilizados para a clonagem dos fragmentos em testes in vivo. Exxtend (Campinas, Brasil)

Os guias para ensaio de CRISPR/Cas9 foram desenhados adjacentes às sequências PAM contidas em USE e cE1 e sintetizados (IDT) com as extremidades contendo sítios complementares para a enzima de restrição BsmBI (NEB, cat. R0580S). Os oligonucleotídeos foram hibridizados e clonados no vetor pcU6.3-sgRNA. Os oligonucleotídeos *scrambled* foram gerados utilizando a ferramenta "RNA sequence scrambler" (GenScript, EUA, <u>https://www.genscript.com/</u>), tendo o genoma de galinha para análise de *off-targets*. Os oligonucleotídeos encontram-se descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1. 2. Oligonucleotideos utilizados para guia no metodo CRISPR/Cas9. Exxtend (Campinas, Brasil)				
Nome	Sequência			
cE1 sgRNA1-F	5' AGTCGCCTGCCCGTCCCAGGCACAC			
cE1 sgRNA1-R	5' AAACGTGTGCCTGGGACGGGCAGGC			
cE1 sgRNA2-F	5' AGTCGGCCGTGGTGGGGGGCAGGTTT			
cE1 sgRNA2-R	5' AAACAAACCTGCCCCACCACGGCC			
cE1 sgRNA3-F	5' AGTCGAGGCAAGCTCGGCCCAACTA			

Tabela 1. 2: oligonucleotídeos utilizados para guia no método CRISPR/Cas9. Exxtend (Campinas, Brasil)

cE1 sgRNA3-R	5' AAACTAGTTGGGCCGAGCTTGCCTC
cE1 sgRNA1 Scrambled-F	5' AGTCGGCCAACGCCTCGTCCGCACC
cE1 sgRNA1 Scrambled-R	5' AAACGGTGCGGACGAGGCGTTGGCC
cE1 sgRNA2 Scrambled-F	5' AGTCGGGTTGTGGTGCGCGGTAGGC
cE1 sgRNA2 Scrambled-R	5' AAACGCCTACCGCGCACCACAACCC
cE1 sgRNA3 Scrambled-F	5' AGTCGGCAAGCCGAACCTAACGTGC
cE1 sgRNA3 Scrambled-R	5' AAACGCACGTTAGGTTCGGCTTGCC
USE1 sgRNA1-F	5' AGTCGGGACACAGGCCCAGCGGGAA
USE1 sgRNA1-R	5' AAACTTCCCGCTGGGCCTGTGTCCC
USE1 sgRNA2-F	5' AGTCGCCTGGTACCCGACTGCACCT
USE1 sgRNA2-R	5' AAACAGGTGCAGTCGGGTACCAGGC
USE1 sgRNA3-F	5' AGTCGGGCGGATGCGGGGGCACCGT
USE1 sgRNA3-R	5' AAACACGGTGCCCCGCATCCGCCC
USE1 sgRNA1 Scrambled-F	5' AGTCGGACAAGGCAGGACCGCCAGG
USE1 sgRNA1 Scrambled-R	5' AAACCCTGGCGGTCCTGCCTTGTCC
USE1 sgRNA2 Scrambled-F	5' AGTCGGTCCTCCAATCGGCCTCCAG
USE1 sgRNA2 Scrambled-R	5' AAACCTGGAGGCCGATTGGAGGACC
USE1 sgRNA3 Scrambled-F	5' AGTCGGCGGTGGCGCGAGTGCGGAC
USE1 sgRNA3 Scrambled-R	5' AAACGTCCGCACTCGCGCCACCGCC
USE3 sgRNA1-F	5' AGTCGTTGGACTTGGATTGACGTCA
USE3 sgRNA1-R	5' AAACTGACGTCAATCCAAGTCCAAC
USE3 sgRNA1 Scrambled-F	5' AGTCGGATACTCGATTGGCGTATTG
USE3 sgRNA1 Scrambled-R	5' AAACCAATACGCCAATCGAGTATCC

1.2.3 Transformação de bactérias e purificação

O DNA (vetor+inserto) e as bactérias (*E. coli*) foram descongelados em gelo. Foi adicionado o DNA à suspensão de bactérias, sendo o volume deste de até 10% do volume de bactérias. A suspensão bacteriana com o DNA foi incubada por 30 minutos em gelo. Para introduzir o DNA nas bactérias, aplicamos um choque térmico de 42 °C por 1 minuto, seguido de imersão em gelo. Após, adicionamos 450 μL de SOB sem antibiótico e incubadas no agitador a 37 °C por 1 hora. Após esse intervalo, plaqueamos em placa de Petri contendo LB e ágar e o antibiótico de seleção.

No dia seguinte, verificamos as colônias positivas por PCR de colônia e eletroforese em gel de agarose. As colônias positivas foram cultivadas em tubos de 3 mL de LB com antibiótico de seleção *overnight*. No dia seguinte, o DNA dessas culturas foi extraído com um kit de Miniprep (*PureLink HiPure Plasmid Miniprep*) (Invitrogen, Waltham, MA, USA – protocolo de

acordo com o fornecido juntamente ao produto) e uma outra porção foi estocada em 15-25% de glicerol em freezer -80°C.

1.2.4 Sequenciamento Sanger

A inserção do fragmento foi verificada por sequenciamento através do Serviço de Sequenciamento do Instituto de Química (SSDNA – IQ-USP/SP, Brasil) ou do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (IB-USP/SP, Brasil).

Os arquivos resultantes do sequenciamento foram analisados nos softwares UniPro UGENE v1.29.0 e confirmados por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Uma vez confirmada a ligação, o clone positivo selecionado foi cultivado em 100 mL de meio LB líquido e teve seu DNA extraído através de um kit de Midiprep baseado no processo de lise alcalina (*PureLink HiPure Plasmid Midiprep*, Invitrogen – protocolo de acordo com o fornecido juntamente ao produto).

1.2.5 Incubação e coleta de embriões de Gallus gallus

Os ovos utilizados nos experimentos *in vivo* são da raça White Leghorn e foram obtidos a partir de produtores de aves da região de São Paulo (Granja Yamaguishi, Jaguariúna, SP, Brasil ou Departamento de Ciências Animais, Universidade de Connecticut), os quais possuem qualidade já testada. Estes foram incubados à temperatura de 37 °C e umidade do ar de 50% controladas para obtenção de embriões em estágio HH11-12 (Hamburger e Hamilton, 1951), sendo estes necessários para início dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética animal (CEUA-ICB/USP nº 025/2013).

1.2.6 Eletroporação no embrião in ovo

Antes da abertura, a casca dos ovos foi limpa com etanol 70%. Em seguida, os ovos, um a um, tiveram sua albumina aspirada com o auxílio de uma seringa de 5 mL através de um orifício realizado no polo mais largo do ovo, seguido de vedação com fita adesiva. Com uma tesoura, abrimos uma janela oval na região superior da casca do ovo para aplicação da eletroporação no embrião. Com uma seringa de insulina (1 mL) em forma de gancho, injetamos nanquim estéril a 10% (diluído em solução salina de Howard Ringer), abaixo do embrião para contrastar e facilitar a visualização e estagiamento do mesmo.

Os plasmídeos-teste (mE1, cE1, USE, USE1, USE3, Ep2, C1 a C5 e pTKmRFP vazio (controle; 3 μ g/ μ L; fornecido pelo Dr. Hisato Kondoh, Universidade de Osaka, Japão) e o controle positivo para eletroporação pcDNA3.1-mGFP foram misturados, em uma proporção de 1:1 e diluídos em *Fast Green* 0.2% (Sigma, St. Louis, MI, EUA). Para os ensaios com CRISPR/Cas9, utilizamos os vetores pCAG-Cas9:2A:Citrine, pCAG-dCas9:KRAB:2A:EGFP, pX330-dCas9:LSD1 e pcU6.3-sgRNA (fornecidos pela Dra. Tatjana Sauka-Spengler, Universidade de Oxford, UK). Os vetores contendo os sgRNAs para cE1 (sgRNA1 a 3) ou USE (USE1sgRNA1 a 3 + cE1sgRNA1 a 3 + USE3sgRNA) ou a versão *scrambled* (controle) desses guias, foi coeletroporado com cada um dos vetores descritos anteriormente (Cas9 ou dCas9:LSD1 ou dCas9:KRAB). No caso do dCas9:LSD1, esse vetor não possui gene repórter para acompanharmos a eficácia da eletroporação. Dessa forma, adicionamos o vetor pCDNA3.1-mGFP (2 μ g/ μ L) ao *mix* para controle da eletroporação.

Após a microinjeção da mistura de plasmídeos na luz do tubo neural através do neuróporo posterior, os eletrodos foram posicionados paralelos ao tubo neural, estando o eletrodo positivo situado no lado direito do embrião. Após, aplicamos uma descarga elétrica, que atuou na desestabilização da membrana celular e na formação de poros, possibilitando a entrada do DNA para o interior das células. Somente a metade do tubo neural que esteve em contato com o eletrodo positivo deve apresentar expressão dos plasmídeos injetados. Assim, foram aplicados 5 pulsos de 20 V, com 50 ms de duração e 100 ms de intervalo entre eles. Após a eletroporação, os embriões foram reincubados para dar continuidade ao desenvolvimento e posterior análise e coleta em estágio HH22-23.

1.2.7 Dissociação de tecido e FACS

Os tubos neurais de embriões em HH23 foram dissecados utilizando agulha de tungstênio 0,125mm em solução de Ringers. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 3 min e removido o sobrenadante. Após, adicionamos 200 µl de Accumax (Invitrogen) e incubamos por aproximadamente 40 min em Thermomixer C a 24 °C agitando a 450 rpm. Após aproximadamente 30 min, posicionamos as peneiras para células de 40 µm (Pluriselect USA, Mini Cell Strainer II, 45-09840-50) em tubos de 1,5 mL de baixa retenção e

adicionamos 100 µl de Solução de Hanks (10x HBSS, EDTA 0.5M, HEPES 1M pH 8, 25 mg de BSA, Mq H₂O) em temperatura ambiente nas peneiras. Em seguida, adicionamos a suspensão de células dissociadas às peneiras e centrifugamos por 1 min em temperatura ambiente a 400 g. Removemos as peneiras e centrifugamos o eluato por 10 min a 400 g em temperatura ambiente. Ao final desse passo, removemos o sobrenadante, adicionamos 200 µl de solução de Hanks e ressuspendemos as células, transferindo-as posteriormente para tubos longos para FACS.

Para os ensaios de C&R para H3K27ac, utilizamos um pool de 5 tubos neurais em HH23. Já para qPCR, os lados dos tubos neurais (experimental vs. Controle) foram separados individualmente. Para o 3C foram usados ambos os lados da porção truncal de 3 tubos neurais em HH23.

1.2.8 CUT and RUN (C&R)

Resumidamente, após a dissociação como descrito na sessão 1.3.10, as células foram lavadas e incubadas às microesferas magnéticas conjugadas com concanavalina-A por 10 minutos em temperatura ambiente, agitando. Após, foi adicionado ao tubo o anticorpo para o alvo de interesse e incubamos 12h a 4 °C. Neste caso, utilizamos anticorpo policional anti-H3K27ac de coelho (Abcam, cat. Ab4729). No dia seguinte, as amostras foram colocadas na estante magnética para concentração das microesferas magnéticas e o líquido removido. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de tampão Dig-Wash (DW; Digitonina 5%, HEPES 1M, pH7.5, NaCl 5M, Spermidina 2M, Complete Protease Inhibitor EDTA-free tablet, água ultrapura). Em seguida, adicionamos a proteína A-MNase e incubamos por 1 hr a 4°C. Após esse intervalo, as amostras foram novamente lavadas na estante magnética com o tampão DW por 2 vezes. Adicionamos 100 μl de tampão DW às amostras e as colocamos no bloco metálico em gelo (temperatura proxima de 0 °C) por 45 min para digestão dos fragmentos. Em seguida, adicionamos tampão de parada (NaCl 5M, EDTA 0.5M, EGTA 0.5M, Digitonina 5%, RNAseA, Glicogênio 20mg/mL, spike in DNA 1:10, água ultrapura) e removemos por duas vezes, incubando posteriormente por 10 min a 37 °C. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 16,000 g em 4 °C e colocadas na estante magnética para extração dos fragmentos de DNA. As células foram digeridas com Proteinase K por 10 min a 70 °C, seguindo para precipitação por fenol-clorofórmio e 2 ml/mL de glicogênio. Após as lavagens,

ressuspendemos o DNA em água ultrapura e quantificamos no equipamento Qubit (invitrogen) com o kit dsDNA HS Assay (Invitrogen, cat. Q32851). Por fim, as bibliotecas foram preparadas com o kit NEBNext Ultra II DNA Library (NEB, cat. #E7645S) e sequenciadas no equipamento NextSeq500 (Illumina, EUA). Os dados gerados foram alinhados ao genoma de galinha (galgal5) com a plataforma Bowtie2, v2.5.5 e a chamada de picos em C-Shell com *script* disponível no *github* (Fred Hutchinson Câncer Research Center, Seattle, Washington, USA), sendo normalizados pelos picos para anti-IgG (controle negativo processado igualmente; Millipore, cat. #CS200621) e com q-value cutoff de 0,05. Esta etapa experimental foi realizada durante a visita para o laboratório do Prof Marcos Simões Costa da Universidade de Cornell, NY, EUA.

1.2.9 Chromosome Conformation Capture (3C)

As regiões de interesse foram selecionadas baseada nos dados de C&R obtidos para H3K27ac. Na análise *in silico* prévia, definimos a enzima de restrição e os primers para qPCR a serem utilizados baseados em alguns critérios descritos por Naumova e colaboradores (2012): 1) utilizar uma enzima que possua sítios de restrição com 6 bases. No DNA humano, por exemplo, a frequência do sítio de restrição para enzimas "6-cutter" é, em média, a cada 4kb, o que gera uma resolução de análise aceitável para detecção das interações entre sequências; 2) a região analisada deve gerar fragmentos de tamanhos aproximados após a digestão com a enzima de restrição; 3) a enzima não deve cortar dentro dos picos para a marcação epigenética (regiões de interesse); e 4) enzimas que deixam as extremidades coesivas são preferíveis, pois este tipo possui maior eficiência na religação. No nosso caso, escolhemos a enzima Ncol, que fragmenta nossa sequência de 62kb em 51 fragmentos.

Ao final do ensaio 3C, os fragmentos obtidos são quantificados por qPCR. Para isso, desenhamos primers (IDT, EUA) que seguiram alguns critérios: 1) pelo menos dois primers forward, chamados de "fixos", localizados de 30 a 70bp abaixo (3') do primeiro corte de Ncol após o fim da região promotora de *cScrt2*; 2) os primers para cada um dos picos foram desenhados com as mesmas especificações dos primers fixos (forward), mas agora ficam de 30 a 70bp acima (5') do corte de Ncol após o pico da marcação epigenética associada ao *enhancer*, e 3) os primers possuíam 28–30bp e conteúdo de GC de aproximadamente 50%. O desenho dos primers pode ser melhor entendido em Naumova *et al.*,2012.

51

Para dissociação do tubo neural, adicionamos 973 μ L de Accumax (Sigma Aldrich, cat. A7089) e incubamos em agitador orbital por 30 min, pipetando periodicamente. Após esse intervalo, adicionamos 27 μ L de formaldeído 37% por 10 min em agitador. Em seguida, acrescentamos 143 μ L de Glicina gelada a 1M e centrifugamos por 4 min a 2000 g a 4°C. Gentilmente, ressuspendemos as células em PBS gelado com inibidores de proteases (1 Complete EDTA-free mini tablet, 10 μ L 1M DTT e 20 μ L 0.2M PMSF), deixando sempre em gelo. Centrifugamos novamente e repetimos a lavagem 2 vezes, removendo o PBS na última. Em seguida, para obtenção do extrato nuclear, ressuspendemos o *pellet* cuidadosamente em tampão de lise (Tris-HCl 1M, pH8, NaCl 5M, PI 50x, NP-40 10%, água ultrapura) e incubamos por 10 min no gelo, seguido de centrifugação por 4 min a 2000 g a 4 °C.

Os núcleos foram ressuspendidos em 0,5 mL de tampão de restrição (acompanha enzima de restrição, NEB) 1.2×, adicionado 7.5 µL de SDS 20% e incubados no Thermomixer C (Eppendorf) a 37 °C por 1 h a 900 rpm. Acrescentamos 50 µL de Triton X-100 20% e incubamos novamente por mais 1 h a 900 rpm. Foram adicionados 400 U da enzima de restrição Ncol e incubado overnight a 37 °C no Thermomixer a 900 rpm. No dia seguinte, adicionamos 40 µL de SDS 20% e incubamos por 25 min a 65 °C agitando a 900 rpm. Ao final desse passo, transferimos as amostras para tubos cônicos de 50 mL, adicionamos 6,125 mL de tampão de ligação T4 (NEB) 1,15×, 375 µL de Triton X-100 20% e incubamos por 1 h a 37 °C em agitador horizontal. Após, adicionamos 16.75 µL de T4 DNA ligase (400,000 U/mL) e incubamos a 16 °C overnight. Para liberação dos framentos de DNA e purificação, adicionamos 30 µL de 10 mg/mL de Proteinase K e incubamos overnight a 65 °C. Em seguida, adicionamos 30 µL de 10 mg/mL de RNAse e incubamos por 45 min a 37 °C, seguido de purificação pelo método Fenol-Clorofórmio-Isoamilálcool (25:24:1). Ao final desse processo, ressuspendemos o pellet em 500 µL de TE e incubamos por 30 min a 37 °C. Transferimos as amostras para colunas Amicon ultra-0.5 30 K (Merck-Millipore) e seguimos de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, quantificando as amostras em Qubit ao final desse passo.

Para detecção da frequência de interações, realizamos qPCR utilizando Power SyBr Green (Applied Biosciences, cat. 4368577) com os primers listados na Tabela 1.4. Esses primers foram desenhados a partir das conclusões derivados dos dados obtidos de C&R. Em outras palavras, identificamos como sequências candidatas as regiões com altos níveis de H3K27Ac contidas dentro uma extensão de 62 kb ao redor da região genômica do promotor

52

de *Scrt2* de galinha. A curva de eficiência dos primers e o limite de detecção da reação de qPCR destes primers foi testada com DNA modelo-controle. Na ausência de um cromossomo bacteriano artificial (BAC) contendo a região genômica do promotor de *Scrt2*, o DNA modelo-controle foi construído a partir de 11 fragmentos clonados do genoma de galinha da região de 62kb ao redor da região genômica de Scrt. Esses fragmentos foram ampliados por PCR utilizando os primers listados na Tabela 1.3 e a enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, cat. M0491) ou Q5 High-Fidelity 2x Master Mix (NEB, cat. M0492). Os fragmentos obtidos incluem extremidades que se sobrepõem em média 100 bases, de tal forma que podem se combinar aleatoriamente, simulando *in vitro* o processo de interação *in vivo* capturado no 3C. Para isto, fizemos uma mistura equimolar dos 11 fragmentos em diversas diluições e realizamos o protocolo de 3C, seguido de qPCR com os primers listados na tabela 1.4. Este passo determinou a curva de eficiência dos primers associada a frequência de interações aleatórias no DNA controle. O método de análise da frequência de interações ocorreu de acordo com (Splinter et al., 2003).

Nome	Sequência
FRAG1-F	5' TAGAACAGGAGGGGACACAG
FRAG1-R	5' GCTGCGTGTGAGAAATGGGG
FRAG2-F	5' CACTGTAGGGGCTGCAAAGAG
FRAG2-R	5' AGAGGAGGAAAGTGAAGGAGAG
FRAG3-F	5' GTTCCAGCACCAAACTTCCC
FRAG3-R	5' CATCCCAATGGCAGAGAAAC
FRAG4-F	5' TAATTAAAGCGGCTCAGAACG
FRAG4-R	5' ACGAAGGTGTAGCTGCAGTG
FRAG5-F	5' CACTGCAGCTACACCTTCGT
FRAG5-R	5' GTCCCCACTGCATCTCCATG
FRAG6-F	5' GCAATAAGGCTGAAGGATTTC
FRAG6-R	5' TTCAGCAGAAGGGACAGAAT
FRAG7-F	5' ATTCTGTCCCTTCTGCTGAA
FRAG7-R	5' CTTCCTCCCCTTCCATTCTC
FRAG8-F	5' GCCTAACACAGCCTGGTATG
FRAG8-R	5' CTTTTGGCTCACGGTCTCAT
FRAG9-F	5' GTTTATCCCATCCCAAGAGC
FRAG9-R	5' GAAGACGGAGCAGGAAGACT
FRAG10-F	5' CAGCGATTCTATGCAACCCC
FRAG10-R	5' GCATATCACCATGTCCCTCC

Tabela 1. 3: Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos controle para o ensaio 3C.

FRAG11-F	5' CCTGCAGTGTGATTTACGGG
FRAG11-R	5' CAAGGTTAAACTGCGGAGAG

1.2.10 Hibridação in situ

Os experimentos de comparação de expressão por hibridação *in situ* foram realizados em embriões eletroporados e controles com 4 dias embrionários. O estágio embrionário da coleta depende do padrão de expressão temporal do gene endógeno avaliado. Os embriões foram coletados em PBS-DEPC (*Phosphate Buffered Saline-Diethylpyrocarbonate*) e fixados em paraformaldeído-DEPC 4% por 2 horas em temperatura ambiente ou a 4 °C *overnight*. Após, os embriões foram limpos, sendo removidas as membranas extraembrionárias e a porção cervico-cranial, deixando apenas a região truncal. Na sequência, os embriões foram lavados três vezes de 10 minutos cada em PBST-DEPC (PBS 1x, Tween 0,1%) e passaram por uma série de desidratação em metanol (PBST-DEPC, metanol 25%, 50% e 75%), sendo cada lavagem de 15 minutos e finalizando com duas lavagens de 10 minutos em metanol absoluto, sendo armazenados também em metanol absoluto. Os embriões foram, então, estocados em freezer -20 °C até a realização do ensaio de hibridação.

No primeiro dia do processo, os embriões foram reidratados em série de PBS-DEPCmetanol, permeabilizados com Triton X-100 (Sigma) 0,3% em PBS por 15 minutos e Proteinase K (Roche) 5 µg/mL em TE (Tris-EDTA) a 37 °C por 10-30 minutos. Em seguida, o material foi novamente fixado em PFA-DEPC 4% a 4 °C por 5 minutos e acetilado com anidrido acético 0,25% em trietanolamina 0,1 M por 10 minutos. A pré-hibridação foi realizada em formamida 50%, SSC 5x, Denhardt's 5x, RNAt de levedura 250 µg/mL, DNA de esperma de salmão 500 µg/mL por 20-24 horas. As ribossondas *cScrt2* senso e antisenso (JN982016) foram sintetizadas *in vitro* na presença de nucleotídeos marcados com DIG (digoxigenina-11-UTP; Life, Waltham, MA, EUA).

No segundo dia, a hibridação foi realizada utilizando a sonda diluída a 200-400 ng/mL em solução de pré-hibridação a 72 °C por 20-24 h e as lavagens pós-hibridação foram feitas com SSC 0,2x a 72 °C por duas vezes de 1 hora, no terceiro dia. O material foi, então, bloqueado com solução de bloqueio 1% (Boehringer Manheim) e soro de ovelha 20% em MAB (*Maleic Acid Buffer*) por 1 hora e incubado com anticorpo anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina (Roche, Grenzacherstrasse, Basel, Suíça) 1:5000 em solução de bloqueio a 4 °C overnight.

No quarto e último dia, o sinal foi revelado com NBT-BCIP (nitro blue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) diluído em NTMT (Tris pH 9,5 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl2 50mM) por 4-6 horas em temperatura ambiente, no escuro. Lavamos por 3x de 5 minutos em PBST, no escuro. Após, os embriões são fixados em paraformaldeído 4% em PSB por 2 horas em temperatura ambiente, ainda no escuro. Os embriões foram lavados por 3x de 10 minutos em PBST, no escuro. Para retirar o excesso de sonda e estocar os embriões, submetemos à desidratação em série de metanol 25%, 50% e 75% em PBST por 10 minutos cada. Após, lavamos em metanol 100% por 2x de 10 minutos. Para obtenção de imagens e inclusão, os embriões foram reidratados em série de metanol 75%, 50% e 25% em PBST por 10 minutos, seguido de 2x de 10 minutos em PBST. Os embriões, por fim, foram fotografados e seguiram para inclusão. Foram incubados por 4 horas em sacarose 5% em PBS a 4 °C, depois em sacarose 15% em PBS a 4 °C overnight e, por último, por 4 horas em gelatina, sacarose 20% a 37 °C. Os moldes tiveram o fundo coberto de gelatina e os embriões foram posicionados. Os moldes sofreram banho de nitrogênio líquido e estocados em freezer -80 °C. Os cortes transversais da região truncal com 25 µm de espessura foram coletados em lâminas SuperFrost Plus (Fisher Scientifics, Waltham, MA, EUA). Em seguida, as lâminas foram secas em estufa a 37 °C overnight e tiveram a gelatina removida por lavagem em PBST pré-aquecido a 37 °C por 30 minutos. Após, os cortes foram lavados em PBS por 3x de 10 minutos e seguiram para imunohistoquímica.

As imagens dos embriões inteiros foram captadas em estereomicroscópio (Nikon SMZ1500).

1.2.11 Imunohistoquímica

Os embriões tiveram a região truncal coletada, definida como a porção entre os brotos dos membros anteriores e posteriores, e fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 20 minutos. Após, os embriões fixados foram lavados três vezes em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e crioprotegido em sacarose 20% *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, os embriões foram embedidos em sacarose 20%, TissueTek OCT (Sakura, Alphen aan den Rijn, South Holland, Holanda) e colocados em formas de inclusão para realização de cortes histológicos. Os criocortes de 12 ou 25 µm de espessura, foram realizados em criostato (Leica, CM1850 UV), sendo coletados em lâminas gelatinizadas ou SuperFrost (Fisher). Por fim, as lâminas com os

criocortes foram congeladas e estocadas a -20 °C, sendo retiradas somente para realização de ensaio de imunohistoquímica.

Os criocortes foram descongelados e secos em estufa a 37 °C por 30-60 minutos, seguidos de fixação em paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após, as lâminas foram lavadas três vezes de 10 minutos com PBS e os cortes colocados em solução de bloqueio com NGS 3% (Normal Goat Serum, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) diluído em PBST (PBS com Triton X-100 0,2%, Sigma) por 1hr em temperatura ambiente em câmara úmida. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio e incubado overnight em câmara úmida. Os anticorpos primários utilizados foram: mouse anti-DsRed2 (diluição 1:50; Santa Cruz Biotechnology, cat. Sc-101526), rabbit anti-GFP IgG (diluição 1:200, Molecular Probes, cat. A-6455), mouse anti-HNK-1 IgM (DSHB, cat. 3H5). No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido através da tripla lavagem das lâminas com PBS por 10 minutos cada, seguido da aplicação do anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente e em câmara úmida. Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa 488 goat anti-mouse IgM (diluição 1:200, Molecular Probes, cat. A-21042), Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:200, Molecular Probes, cat. A-11008), Alexa 647 donkey anti-rabbit IgG (diluição 1:800, cat. A31573), Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:500, cat. A11011) e Alexa 658 goat anti-mouse igG (diluição 1:500, cat. A11004). Por fim, as lâminas foram novamente lavadas em PBS por três vezes de 10 minutos, montadas em FluoroShield Mounting (com DAPI, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK) e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager.D2 com câmera Axiocam 503 Color ou Zeiss Imager.Z2 com câmera Zeiss Axiocam 506 mono) ou microscópio ZeisscAxioVert.A1 com câmera Zeiss AxioCam ICm1 acoplada (CEFAP, USP).

1.2.12 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

As amostras foram coletadas em tampão de lise próprio do kit Cell to cT (Invitrogen, cat. 4402953) para síntese de cDNA. Os procedimentos seguintes foram de acordo com o manual do fabricante. Para a reação de qPCR, utilizamos Power SyBr Green (Applied Biosciences, cat. 4368577) e *primers* (Tabela 1.4) com concentração de 10 µM. O programa foi realizado em 40 ciclos, com temperatura de amplificação de 60 °C.

Primer	Sequência
cHPRT-F	5' TGGTGAAAGTGGCCAGTTTG
cHPRT-R	5' TCATTGTAGTCGAGGGCGTATC
cScrt2-F	5' CTGCTGCAGGGCCACATGCGTTCGCACA
cScrt2-R	5' GCACTGCTTGCACTTGTAGTGCTT
Fixo-F	5' TGACGCAGGTCAAGAGTCAA
Pico1-F	5' TGGATCCCGCAAACCAATG
Pico2-F	5' GGGCTGGCTCTGTCTGTG
Pico3-F	5' CTGGCAGAGAGCAGGATGT
Pico4-F	5' GGCTTCAGCTGGAAAAACAG
Pico5-F	5' ACAGGTGACCTTGGACTTGG
Pico6-F	5' ATCCTCATCCCTCCTGTG

Tabela 1. 4: Sequências dos primers utilizados para RT-qPCR. IDT (EUA)

Os *primers* para HPRT foram utilizados para detecção de expressão de proteína constitutiva, sendo um controle endógeno. Este ensaio foi realizado no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados gerados foram analisados e os cálculos realizados através do método 2^{-ΔΔCt} (Livak e Schmittgen, 2001) e demonstrados como expressão relativa a amostra controle.

1.2.13 Imagens

Todas as imagens obtidas e figuras deste trabalho foram analisadas e produzidas no software Adobe Photoshop CC 2018.

1.2.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 7 e usado o teste t de Student não-pareado para dados paramétricos.

3 RESULTADOS

1.3.1 Análise in silico e validação in vivo

Iniciamos nossa busca por elementos genômicos regulatórios de *Scrt2* embasados em relatos anteriores. Castro e colaboradores (2006) identificaram um *motif* próximo ao gene *Scrt2* potencialmente reconhecido pelos fatores de transcrição proneural *Ascl1/Brn2*. O padrão de expressão de *Ascl1/Brn2* durante o desenvolvimento da medula indica que possivelmente regulam a expressão de *Scrt2* (Tanaka *et al.*,2004; Le Dreau *et al.*,2012). Assim, investigamos com mais detalhes o *motif* descrito na sequência genômica de camundongo (mm9). Utilizamos aqui o genoma de camudongo porque este tem muito mais anotações do que o de galinha, e também porque o padrão de expressão de *Scrt2* em embriões de camudongo e de galinha é bastante conservado (Sakurai and Osumi, 2008).

Primeiramente, analisamos in silico o perfil epigenético desta seguência na plataforma aberta online Genome Browser para identificar seu potencial regulatório. Para isso, utilizando a ferramenta BLAT, localizamos o motif a aproximadamente 13kb acima do locus genômico de Scrt2 em camundongos (mm9). Nesta região, o perfil epigenético de amostras de cérebro de camundongo em E14.5 indicou a presença de H3K27ac e H3K4me3 em segmentos específicos (Creyghton et al., 2010; Kimura, 2013). H3K27ac é um indicativo de regiões ativas, enquanto que H3K4me3 é associado a regiões promotoras ativas e aqui foi utilizado como controle para eliminar a possibilidade de estarmos tratando de uma região promotora ainda desconhecida. Na nossa análise, ambos estão enriquecidos próximo a TSS (Transcription Start Site). Contudo, encontramos na sequência de camundongos, apenas sinal para H3K27ac, confirmando que não é uma região promotora e possivelmente é uma região enhancer. Além disso, verificamos se havia a presença de sítios de reconhecimento para DNAse I. Estes sítios também são reconhecidos como marcadores de regiões de transcrição ativa, uma vez que a transcrição ocorre em regiões de DNA acessível, clivado pela DNAse I em sítios que flanqueam o enhancer (Gross e Garrard, 1988). Os resultados indicaram a presença de marcação epigenética para H3K27ac e ausência para H3K4me3 na região genômica correspondente ao *motif* (Fig. 1.2A). As regiões sucetíveis a DNAse I se sobrepõem a marcação H3K27ac, o que nos sugere fortemente que se trata de uma região com função regulatória positiva (enhancer). Baseados nestas caracteristicas epigenéticas, a região que anteriormente era composta somente de um *motif* de 15nt foi extendida para 1600pb. Em diante, passamos a chamá-la de "mE1" (mouse *Enhancer* 1). Observamos ainda, que além do *motif* definido por Castro et al. (2006), encontramos em mE1 outros dois *motifs* (Fig. 1.2A) que seguiam a descrição do "*motif Ascl1/Brn*" (detalhes em Material e Métodos).

Considerando que a sequência codificante de *Scrt2* é conservada entre camudongo e de galinha (*Gallus gallus*), nós hipotetizamos que os elementos genômicos relevantes para regular sua expressão, também estariam evolutivamente conservados. Assim, buscamos no genoma de galinha (galgal5) uma região homóloga a mE1. O alinhamento indicou uma sequência de 289pb localizada 2600pb acima da região promotora de *cScrt2*. Esta região não apresenta uma sequência de homologia contínua. Os trechos de homologia estão distribuídos em quatro fragmentos conservados 100% conservados (Com 15bp, 35bp, 12 e 20bp; 27% de conservação do fragmento total), ou seja, mE1 não é integralmente conservada em *Gallus* (Fig. 1.2B). Doravante, a sequência em questão será referida como "cE1" (chicken *Enhancer* 1).

Como não estão disponíveis informações sobre perfil epigenético em genoma de galinha na plataforma Genome Browser e, para validar as análises in silico, realizamos o ensaio CUT & RUN (Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease; Skene, Henikoff e Henikoff, 2018; C&R). De forma resumida, este ensaio assemelha-se bastante com ChIP-Seq (Chromatin ImmunoPrecipitation and Sequencing) em que se analisa o DNA associado a um epítopo proteico após imunopreciptação. O diferencial deste ensaio é a ausência de fixação e a clivagem do DNA pela MNase, uma proteína com atividade endo-exonuclease, ao contrário do processo de sonicação encontrado no ChIP-seq. Neste ensaio, o anticorpo reconhece que como mencionamos anteriormente, está associado a regiões H3K27ac, transcricionalmente ativas. O anticorpo é acoplado a uma DNAse, que cliva o DNA genômico flanqueado às regiões enriquecidas para H3K27ac. Desta forma, apenas a região genômica associada a H3K27ac é precipitada e sequenciada. Neste caso, usamos o DNA genômico de tubo neural dissecado de embriões em estágio HH23 e analisamos os resultados após sequenciamento em larga escala (Next-Generation Sequencing) dos trechos genômicos precipitados. Da mesma forma que no ChIP-Seq, após sequenciamento os resultados são alinhados ao genoma de galinha (galgal5) e representados como gráficos de frequência. Detectamos um pico sobreposto a cE1 (Fig. 1.2B), indicando que assinatura epigenética de cE1

60

no tubo neural HH23 é enriquecido de H3K27ac. Este dado reforça a indicação de nossas análises *in silico* prévias de que essa região possa ter atividade *enhancer*. Além disso, observamos no cE1 a presença conservada do *"motif Ascl1/Brn"* e identificamos um outro sítio adicional que segue a definição de Castro et al. (2006) descrita em Material e Métodos (Fig. 1.2B).

Em seguida, verificamos que no genoma de galinha a presença epigenômica de H3K27ac se estendia em ambas as direções 5' e 3' de cE1. Desta forma, seguindo este perfil ampliamos a região genômica de interesse, agora chamado de USE (UpStream *Enhancer*), e com tamanho de 1714bp (Fig. 1.2C). O fragmento de USE localizado acima (5') de cE1, foi chamado de USE1 e possui 982bp, enquanto o fragmento abaixo (3'), USE3, possui 253bp (Fig. 1.2C).

Para determinar se estas sequências regulam a expressão gênica no tubo neural, o teste funcional dessas sequências *in vivo* constituiu em expressar no tubo neural o vetor de expressão pTKmRFP contendo mE1, USE1, USE, cE1 ou USE3. Este plasmídeo possui um fraco promotor basal de timidina quinase, e necessita da adição de um *enhancer* para que o repórter mRFP seja expresso (Uchikawa *et al.*,2003). Realizamos a coeletroporação de pTK-mRFP-inserto + mGFP, aqui usado como controle positivo da eletroporação, na região posterior do tubo neural de embriões de galinha em estágio HH11-12 (Hamburger e Hamilton, 1951) e foram analisados criocortes com imunomarcação para GFP e RFP em HH23. O vetor utilizado como controle positivo, o pCDNA3.1-mGFP, foi um constructo produzido em nosso laboratório e possui promotor CMV constitutivo. O produto protéico, a proteína fluorescente GFP, possui domínio de sinalização para sublocalização na membrana, marcando-a quase que integralmente quando a célula está eletroporada. Caso algum dos fragmentos em questão (USE, USE1, cE1, USE3 ou mE1) fosse um elemento regulatório de *cScrt2*, esperávamos que a expressão de mRFP, situado no plasmídeo de expressão e dirigida pelos fragmentos-teste, se assemelharia ao padrão de expressão de *cScrt2* endógeno.

Como resultado, observamos que ambos mE1 e USE possuem atividade *enhancer* no tubo neural (Fig. 1.2D'' e D*) quando comparados ao controle (pTKmRFP vazio+mGFP) (Fig. 1.2D'). O padrão de expressão promovido por mE1 e USE é similar, mas não restrito à zona intermediária onde *Scrt2* é expresso. mE1 gera expressão numa região mais restrita equatorialmente que USE e este, por sua vez, possui padrão mais disperso dorso-

61

ventralmente no tubo neural (Fig. 1.2D). Posteriormente, comparamos o padrão de mRFP controlados pelas subregiões de USE: USE1, cE1 e USE3. Devido a presença de H3K27ac por toda a extensão de USE, esperávamos que os três fragmentos fossem capazes de promover a expressão do repórter mRFP após eletroporação. De fato, USE1 e cE1 dirigiram a expressão de mRFP no tubo neural (Fig. 1.2E'' e E*), ambos com padrão de expressão semelhante à sequência completa (USE). No entanto, ao contrário do esperado, USE3 não apresentou qualquer atividade na expressão do repórter (Fig. 1.2E**).

A expressão de cScrt2 no tubo neural posterior começa no estágio HH15 e permanece presente pelo menos até HH30 (Vieceli et al., 2013). Durante esse período, seu padrão de expressão evolui da camada mais externa do tubo neural para a zona intermediária (Vieceli et al.,2013). Para verificar se mE1 e cE1 poderiam conduzir a expressão gênica durante todo o período em que o cScrt2 endógeno está presente, analisamos criocortes de embriões eletroporados em HH11-12, coletados nos estágios HH15, HH18, HH21 e HH23 e imunomarcados para GFP e RFP. De acordo com nossos dados de expressão espacial – descritos acima –, a porção central de USE, cE1, promoveu a expressão de mRFP em padrão similiar ao USE, o que sugere que este fragmento possa conter elementos regulatórios importantes e ser o core funcional de USE. Dessa forma, utilizamos o fragmento cE1 para realizar o ensaio temporal da atividade desse enhancer. Os dados obtidos demonstram que a expressão de mRFP já está presente em algumas células do domínio dorsal em HH15, tanto dirigido por mE1 quanto por cE1 (Fig. 1.3A e B). Esse padrão permanece em HH18, sendo mais restrito na porção equatorial em mE1 que cE1 (Fig. 1.3A' e B'). No embrião em HH21 eletroporado com mE1 (Fig. 1.3A"), o domínio de expressão manteve-se restrito equatorialmente, o que possa ser o início da definição do domínio visto em HH23 (Fig. 1.3A'''). Já cE1, expandiu-se por todo o tubo neural, possuindo atividade mais forte em HH21 (Fig. 1.3B") que em HH23 (Fig. 1.3B""). Assim, concluímos que o padrão de expressão temporal orientado por mE1 e cE1 é semelhante ao de cScrt2, uma vez que se inicia em HH15 e permanece até HH23 (Vieceli et al.,2013).

De acordo com Vieceli e colaboradores (2013), *cScrt2* está presente em toda a extensão do tubo neural anterior e posterior e também em alguns gânglios craniais e da raiz dorsal (GRD) ao longo do tubo neural posterior. Para verificarmos se mE1 e/ou cE1 atuam em outros tecidos neurais além do tubo neural, analisamos se havia expressão de mRFP no gânglio

da raiz dorsal. A partir deste momento em diante passaremos a trabalhar somente com cE1. A presença de mRFP foi analisada em conjunto com o anticorpo HNK-1, que marca um carboidrato presente na membrana celular de células da crista neural (Bronner-Fraser, 1986).



Figura 1. 2: Análise *in silico* para perfil epigenético de mE1 e cE1 e validação de enhancers. (A) Perfil epigenético de mE1 com dados de cérebro de camundongos em E14.5. A região genômica equivalente ao promotor de m*Scrt2* apresentou um pico para H3K27ac, sobrepondo-se ao perfil de H3K4me3. H27ac também está enriquecido na região localizada a 13 kb acima de m*Scrt2*, sobrepondo-se a pico para sítios responsivos para DNAse I. A região mE1 apresentou 3 *motifs "Ascl1/Brn2"* (barras verticais em azul claro). O primeiro descrito anteriormente (Castro *et al.*, 2006) e os outros dois identificados aqui. (B) Identificação de cE1 após alinhamento de mE1 no genoma de galinha galgal5, localizado a aproximadamente 2.6 kb acima de *cScrt2*. Perfil epigenético de cE1 adquirido por C&R, na região de cE1. (B') cE1 apresentou 2 *motifs "Ascl1/Brn2"*, sendo o primeiro em comum a mE1 (conservado) e o segundo relatado pela primeira vez neste trabalho. (C) Abrangência da marcação para H3K27ac e sua região validada *in vivo*, USE (roxo). As outras subdivisões correspondem a USE1, mais 5' (azul claro); cE1, intermediário (verde) e USE3, mais 3' (vermelho). (D) Validação de mE1 e USE, ambos inseridos no vetor pTK-mRFP no tubo neural truncal de embriões em HH23. Na primeira linha (D') pTKmRFP vazio, (D'') mE1 e (D*) USE. Na segunda linha, mGFP foi usado como controle positivo da eletroporação. (E) comparação de perfil de mRFP por (E') mE1 (n=9), (E'') USE1 (n=6), (E*) cE1 (n=9) e (E**) USE3 (n=5). mGFP foi utilizado como controle da eletroporação.

Apesar das células do gânglio (HNK-1 positivas) terem sido eletroporadas e apresentar células mGFP-positivas, não observamos marcação para mRFP, sugerindo que cE1 não promove a expressão de mRFP neste tecido (Fig. 1.3C''). Portanto, os resultados demonstraram que a expressão de mRFP dirigida por cE1 se dá apenas no tubo neural (Fig. 1.3C). Dessa forma, podemos sugerir que cE1 é uma sequência com atividade *enhancer*, que pode ter um papel na ativação da expressão de *cScrt2* somente no tubo neural, mas que não simula o padrão de expressão endógeno de *cScrt2*.

1.3.2 Interação promoter-enhancer e novos elementos regulatórios

O genoma de todas as células do tubo neural é o mesmo, mas o transcriptoma durante progresso da diferenciação de cada célula é dinâmico e determinado pelo estado heterogêneo da cromatina. Em outras palavras, genes ou sequências não-codificantes estão mais acessíveis à interação com proteínas de transcrição quando presentes em regiões de eucromatina (cromatina frouxa ou não-enovelada em octâmero de histonas) (Calo e Wysocka, 2013). Da mesma forma, a interação de regiões moduladoras (e.g. *enhancers* ou silenciadores) com o promotor depende da organização 3D da cromatina (Thibodeau *et al.*,2017). A relevância da conformação estrutural da cromatina para a regulação gênica tem sido investigada e confirmada com um painel crescente de metodologias moleculares. Dentro desse contexto, existem questões que sucedem imediatamente aos dados apresentados anteriormente. Primeiramente, apesar da sua atividade *enhancer*, o elemento cE1 não foi suficiente para recapitular o padrão de expressão de *Scrt2* no embrião, o que levanta duas possibilidades: a) cE1 não é um *enhancer* vinculado à transcrição de *cScrt2* e b) existem elementos genômicos adicionais que contribuem para o padrão de expressão de *cScrt2*.

Para responder ambas as questões, utilizamos o método 3C (*Chromosome Conformation Capture*). Esse ensaio permite verificar, através do crosslink de proteínas de transcrição, a interação entre regiões regulatórias candidatas e o promotor, com posterior detecção por qPCR (Hagege *et al.*,2007; Naumova *et al.*,2012). Resumidamente, após o crosslink das proteínas de transcrição com as sequências-alvo, o DNA é submetido à digestão por enzimas de restrição para, posteriormente, sofrer ligação intramolecular e detecção dos fragmentos por qPCR. Primeiramente, para identificar as enzimas de restrição apropriadas

65

para a digestão e desenhar os primers a serem utilizados no qPCR, precisamos identificar in silico possíveis



Figura 1. 3: Padrão temporal da ativação de transcrição mediada por mE1 e cE1. (A-A''') Expressão de mRFP dirigida por mE1 em algumas células localizadas no domínio dorsal do tubo neural de HH15 (A) (n=3). Nos estágios seguintes, (A') HH18 (n=3) e (A'') HH21 (n=5), a expressão de mRFP é localizada mais equatorialmente. (A''') em HH23, a expressão de mRFP está concentrada no domínio equatorial do tubo neural (n=6). (B-B''') A expressão de mRFP dirigida por cE1. (B) em HH15 (n=3) e (B') HH18 (n=4) a expressão de mRFP não se estende totalmente no eixo dorsoventral, assim como mE1. Nos estágios seguintes, (B'') HH21 (n=5) e (B''') HH23 (n=5), a expressão de mRFP é localizada mais ventralmente e tomando todo o tubo neural. Nas segunda e quarta filas está a expressão de pCDNA3.1-mGFP após imunodetecção (verde) como controle da extensão da região eletroporada. O lado direito é o eletroporado em todas as imagens. n varia de 4 a 6 para as condições testadas. (C-C''') Em HH23 pode-se se observar a ausência de mRFP no gânglio da raiz dorsal, lateral ao tubo neural, onde *Scrt2* também é expresso (Vieceli *et al.*,2013). Não houve sobreposição de atividade transcricional de cE1-mRFP com a marcação para identificação de GRD como anticorpo HNK1 (C''').

sítios genômicos que interagiriam com cE1. Para isso, utilizando nossos dados de perfil epigenético para H3K27ac em HH23 obtidos pelo C&R (vide acima), realizamos a análise de um fragmento de aproximadamente 62kb - sendo 43kb upstream e 17kb downstream ao promotor de *cScrt2* - no software IGV (*Integrative Genome Viewer*). Nesta análise, buscamos regiões do DNA genômico com esta marcação epigenética, para identificar possíveis sequências *enhancer*. Baseado neste parâmetro, foram selecionadas seis regiões, incluindo cE1, que classificamos numericamente (pico 1, pico 2, pico 3, etc.). Neste contexto, cE1 é representado pelo pico 5. Para complementar nossos dados e aumentar nossa confiança na escolha das regiões-alvo, alinhamos nossos dados de C&R para H3K27ac com dados de ChIP-Seq para H3K27ac em crista neural craniofacial de embriões HH20, publicados anteriormente por Rada-Iglesias ecolaboradores (2011).





Figura 1.4: Interação de CE1 com o promotor de *cScrt2* verificada por *Chromosome Conformation Capture* (3C). (A) Análise de frequência de interações relativa a região controle de 62 kb. Cada ponto analisado (1-6) sobrepõe-se com picos para H3K27ac observadas por C&R em HH23. As caixas verdes indicam a posição do pico no genoma e a seta preta, a localização dos primers para cada um dos pontos analisados. A caixa rosa indica a região promotora de *cScrt2*, e a seta branca a localização do primer fixo, que foi testado com cada um dos picos. O ponto mais alto (5), refere-se a CE1. O ponto 2 revelou uma nova região com possível interação com o promotor de *cScrt2*. (B) Validação da atividade modulatória de Ep2 (pico 2) dirigindo a expressão de mRFP no tubo neural em HH23 (n=4). mGFP foi utilizado como controle positivo da eletroporação.

Foram realizados dois ensaios de 3C-qPCR independentes, desde a coleta dos tubos neurais dissecados em HH23, até a realização do qPCR. Ambos experimentos geraram padrão similar em frequência de ligações entre cada um dos picos e a região promotora (Fig. 1.4A). O pico 5 (cE1), o ponto mais alto do gráfico, indica alto índice de associação entre cE1 e a região promotora de *Scrt2*.

Importantemente, nosso ensaio revelou um novo possível *enhancer* interagindo com a região promotora de *cScrt2* (Fig. 1.4A). O pico 2 também apresentou um aumento na frequência de interações, seguido de duas reduções (Fig. 1.4A). Esses dados sugerem que o pico 2 também possa estar interagindo com o promotor de *cScrt2*. O perfil de queda da curva dos demais pontos identificados na análise *in silico* em relação ao pico 5 (ponto mais alto e mais próximo do promotor) sugere que não haja interação entre os pontos analisados.

Para verificarmos se a região do pico 2, com 945b, possui atividade *enhancer*, a inserimos no vetor pTKmRFP, e a partir deste momento o denominamos de Ep2. Coeletroporamos o pTKmRFP-Ep2 com mGFP no tubo neural posterior em estágio HH11-12 e analisamos a expressão de RFP em HH23. De fato, Ep2 promoveu atividade transcricional no tubo neural (Fig. 1.4B), não apresentando atividade em nenhum domínio específico, mas expandido por todo o lado do tubo neural eletroporado. Dessa forma, nossos dados sugerem a presença de um novo elemento regulatório para *cScrt2*, que ainda necessita ser validado quanto a sua função estar atrelada a *Scrt2*. Além disso, a alta frequência de interações de cE1 com o promotor de *cScrt2* em uma resolução acima do usualmente descrito na literatura, sugere que há interação entre essas duas regiões.

1.3.3 Modulação funcional de elementos regulatórios

Para validar funcionalmente a conclusão dos experimentos anteriores de que cE1 é de fato um *enhancer* de *cScrt2*, removemos cE1 do genoma com CRISPR/Cas9 seguido da verificação da alteração da expressão de *cScrt2* por hibridação *in situ*. Essa metodologia vem
sendo amplamente utilizada para edição de DNA. Resumidamente, a enzima bacteriana Cas9 causa uma quebra na dupla fita de DNA, que ativa o sistema de reparo por terminações nãohomólogas (*Non Homologous End Joining, NHEJ*). Este tipo de reparo pode causar inserções ou deleções (InDels), podendo ser desde inserções de poucas bases a deleções de 1bp a até 80bp (Williams *et al.*,2018), com média observada de 20bp a 40bp em camundongos (Shin *et al.*,2017).

Mais recentemente, diversos grupos vêm trabalhando para melhorar e implementar novas ferramentas para o uso da tecnologia CRISPR/Cas9 em modelo embrionário de galinha (Gandhi *et al.*,2017; Williams *et al.*,2018). Williams e colaboradores disponibilizaram três dos constructos gerados que alteram a atividade da sequência-alvo, mais precisamente, no nosso caso, do *enhancer*. Dentre as alterações e melhorias, a enzima Cas9 agora está sob o controle do promotor de beta-actina de galinha. Sendo um promotor constitutivo, garante a expressão de Cas9 e do repórter Citrine em todas as células transformadas. Em outro ponto, o vetor pcU6.3 foi otimizado para expressar o RNA-guia (sgRNA) sob o controle do promotor dependente de polimerase-III, U6.3, e que apresenta uma maior eficiência de atividade no embrião de galinha (Williams *et al.*,2018).

Para realizarmos a deleção de cE1 e verificação da alteração do padrão de expressão de *cScrt2*, desenhamos manualmente três sgRNAs localizados em diferentes pontos de cE1 (PAM nos nucleotídeos 47-49, 239-241 e 477-479, Fig. 1.5A). Nenhum dos guias se sobrepunha aos motifs, apenas flanqueavam. Para os guias controle (scrambled), a sequência de cada um dos guias experimentais foi aleatorizada utilizando a ferramenta "RNA sequence scrambler" disponível no site GenScript, tendo o genoma de galinha para análise de offtargets. A coeletroporação de Cas9-2A-Citrine e de cada um dos 3 guias inseridos no vetor pcU6.3 foi realizada em HH11-12 e analisada em HH23. Após, realizamos hibridação *in situ* para detecção de *cScrt2* no lado eletroporado quando comparado com o lado contralateral (Fig. 1.5B). Em cortes transversais na região truncal, verificamos que o lado eletroporado do tubo neural apresenta um achatamento dorsoventral (Fig. 1.5B), aparentemente devido à perda da porção equatorial do tubo neural, quando comparado com o lado contralteral. Ainda, é possível observar uma diminuição do domínio ventral, local onde há a presença de motoneurônios. Em contrapartida, os embriões eletroporados com os sgRNAs scrambled não



apresentaram alteração macro ou microscópica (Fig. 1.5C).

Figura 1.5: Manipulação genômica e epigenômica de cE1. (A) Esquema do *enhancer* USE demonstrando os locais onde foram desenhados os guias para Cas9 em cE1. (B) Vista dorsal de embrião coeletroporado com Cas9 e os três sgRNAs para cE1 no lado direito, apresentando redução da espessura do campo de expressão de *cScrt2*. O corte transversal apresenta achatamento dorsoventral (linhas horizontais tracejadas) e confirma a redução da expressão de *cScrt2* (n=12). (C) Embrião eletroporado com os guias controle (*scrambled*) de cE1 não apresentando alteração na expressão de *cScrt2* (n=3). (D) RTqPCR de três embriões independentes demonstrando redução na expressão de *cScrt2* após interferência por CRISPR/Cas9. p<0.0001. (E-F) Modulação de *cScrt2* por LSD1:dCas9 e os mesmos guias utilizados em (B-C). (E) apresenta leve redução de *cScrt2* (n=15). (F) no controle não houve alteração tanto macro quanto microscópica de *cScrt2* (n=4). (G-H) modulação de cE1 por KRAB:dCas9. (G) leve redução de *cScrt2* vista em corte transversal e leve achatamento dorsoventral (seta preta; n=15). (H) na situação controle, utilizando os guias *scrambled* não houve alteração no padrão de expressão de *Scrt2* (n=2). Imunohistoquímica para GFP para controle da área eletroporada. A linha tracejada branca indica a altura do corte em todas as condições. As setas brancas no *inset* de (E) e (G) indica expressão de *cScrt2* no GRD. Além disso, para confirmarmos que houve redução na expressão de *cScrt2*, coletamos embriões coeletroporados com Cas9+3-cE1sgRNA e dissecamos a porção eletroporada do lado experimental e a mesma porção do lado controle. Em seguida, as células foram dissociadas e as positivas selecionadas por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), seguido de qPCR. Assim, das três amostras analisadas, duas apresentaram redução na expressão de *cScrt2* quando comparadas com o lado controle (Fig. 1.5D). O efeito varia de acordo com a eficácia de inserção de ambos os vetores (Cas9 + sgRNAs) nas células, o que pode explicar a ausência de efeito em uma das amostras (Fig. 1.5E).

A fim de modularmos epigeneticamente a atividade de cE1, utilizamos duas diferentes enzimas fusionadas a Cas9 com sítio catalítico inativo (dCas9), a lysine specific demethylase 1 (LSD1) e a Krüppel-associated box (KRAB). Alguns trabalhos sugerem que atividade de LSD1 está associada a remoção de H3K4me1/2 (Shi et al., 2004) e de H3K27Ac por interação com outras proteínas (Mendenhall et al., 2013) associadas a cromatina ativa. KRAB recruta o complexo empacotador de cromatina, tornando regiões regulatórias inativas (Sripathy, Stevens e Schultz, 2006) por acúmulo de marcações H3K27me3/H3K9me3 não necessariamente no alvo propriamente dito, mas no promotor cognato (Kearns et al., 2015). Na prática, o dCas9:LSD1 e o dCas9:RKAB inativam enhancers com sequência complementar ao sgRNA fornecido (Williams et al., 2018) Aqui, coeletroporamos dCas9:LSD1 ou dCas9:KRAB com os três sgRNAs para cE1 em HH11-12 e analisamos a expressão de Scrt2 em HH23. Nossos resultados sugerem que as duas metodologias possam ter eficácia diferentes. Nos embriões eletroporados com LSD1, não foram observadas alterações macroscópicas ou nos cortes transversais tanto nos experimentais quanto nos controles (scrambled) (Fig. 1.5E-F). Por outro lado, quando eletroporado com KRAB, os embriões apresentaram deslocamento do padrão de expressão de cScrt2 para camadas mais internas centro-perifericamente e uma pequena redução na expressão de cScrt2 (Fig. 1.5G) quando comparado com o lado não-eletroporado e com o embrião controle (scrambled) (Fig. 1.5H). Além disso, como citado anteriormente, cScrt2 também está presente nos GRDs. Interessantemente, observamos uma maior expressão de cScrt2 nos GRDs no lado eletroporado com KRAB (Fig. 1.5G), quando comparado com o lado contralateral e com o embrião scrambled (Fig. 1.5H), que não apresentou alguma alteração.

De acordo com nossos dados, cE1 faz parte de um domínio genômico maior: o USE (UpStream Enhancer, de 1714bp). USE é constituído de USE1, cE1 e USE3. Como mencionado anteriormente, USE apresenta assinatura epigenética para H3K27ac no tubo neural em HH23. Dessa forma, decidimos, então, investigar se a interferência com a assinatura epigenética de USE geraria efeito mais severo do que o encontrado com alterações em apenas cE1. Para isso, desenhamos quatro novos sgRNAs, sendo três localizados em USE1 e um outro em USE3 (Fig. 1.6A). Adicionamos ao pool de DNA a ser eletroporado, os outros três sgRNAs para cE1 e, assim, tinhamos guias em toda extensão de USE. Da mesma forma que cE1, utilizamos o site GenScript para gerar os sgRNAs aleatorizados (scrambled) para controle. Ao observarmos os embriões eletroporados com dCas9:LSD1+USEsgRNA (Fig. 1.6B) ou sgRNA-scrambled (Fig. 1.6C), não verificamos nenhuma alteração na expressão de cScrt2 após hibridação in situ para cScrt2. Já quando analisamos os embriões eletroporados com dCas9:KRAB, notamos macroscopicamente, que houve uma redução da expressão de cScrt2. Fato que foi possível visualmente confirmar após análise de criocorte transversal da região truncal (Fig. 1.6D). Assim como esperado, não observamos alterações nos embriões controle (scrambled) (Fig. 1.6E). Nossos dados sugerem que o empacotamento de USE leva à redução da expressão de *cScrt2* e que esteja, de fato, associado a expressão de *cScrt2*.

Os resultados obtidos com os experimentos de redução de atividade do cE1 são condizentes com papel regulatório na expressão de *Scrt2*. Então, nosso próximo passo foi identificar a sequência mínima (*core*) funcional deste fragmento, através da construção de diferentes combinações da sequência cE1. Para determinar possíveis unidades funcionais no cE1, realizamos uma análise *in silico* para identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição e dividimos a porção conservada de cE1 assimetricamente para que não houvesse a perda de nenhum sítio de reconhecimento previsto.

Inicialmente, para a clonagem de cE1, adicionamos 95 bases em ambas as direções 5' e 3' para assegurar que nenhuma região importante seria perdida (Fig. 1.7A; WT). Assim, os constructos gerados, chamados de C1 a C5, possuem as seguintes combinações: C1, apenas as expansões de 95 bases cada (fragmento preto); C2, porções conservadas 1 (azul claro) e 2 (azul escuro) e a expansão 3'; C3, perda do fragmento conservado 1; C4, perda do fragmento conservado 2 e; C5, ausência somente da expansão 3' (Fig. 1.7A).

73



Figura 1.6: **Manipulação epigenômica de USE.** (A) Esquema do *enhancer* USE demonstrando os locais onde foram desenhados os guias para dCas9: 3 guias em USE1, 3 guias em cE1 e 1 guia em USE3. (B) Vista dorsal de embrião coeletroporado com dCas9:LSD1 e os sete sgRNAs no lado direito (n=2). No corte da região pontilhada, observamos um leve aumento de *cScrt2* em corte transversal. Na condição controle (C) não houve alteração quando testado os guias *scrambled* (n=2). (D-E) modulação de USE por KRAB:dCas9 no lado eletroporado (direito). (D) drástica redução de *cScrt2* vista tanto macroscopicamente quanto em corte transversal, não havendo alteração na morfologia do tubo neural (n=2). A seta preta no *inset* indica redução de *cScrt2*. (E) na situação controle, utilizando os guias *scrambled* não houve alteração de expressão (n=2). Imunohistoquímica para GFP para controle da eletroporação. A linha tracejada branca indica a altura do corte em todas as condições.

Após, cada um desses constructos foi clonado no vetor pTKmRFP e testado *in vivo*, da mesma forma que cE1 foi anteriormente e realizados criocortes transversais da região truncal e imunomarcação para mRFP e mGFP. Ao analisarmos nossas amostras, não identificamos um padrão ou aumento/redução da expressão de mRFP associada a qualquer um dos constructos testados (Fig. 1.7B-G'), ou seja, todos os trechos de cE1 são capazes de mediar atividade *enhancer* similar a cE1 completo (WT). Portanto, não podemos concluir se uma delas é o *core* funcional de cE1.



Figura 1.7: **Construções desenhadas para fragmentação e determinação do** *core* **cE1. WT**, cE1 originalmente clonado; A região conservada foi dividida assimetricamente por não conter sítios de transcrição associados ao trecho de 260 a 265bp. A barra azul-clara indica a primeira porção contendo trechos conservados, e a azul-escura, a segunda porção. **C1**, com deleção das porções conservadas (azul claro e azul escuro); **C2**, com deleção da extensão 5' anterior ao segmento conservado (azul claro); **C3**, com deleção do fragmento conservado de 168bp; **C4**, com deleção da porção conservada de 121bp; **C5**, com deleção da extensão 3' a região conservada (azul escuro). (**B-G'**) testes *in vivo* da capacidade de ativar transcrição dos fragmentos (**B**) cE1 completo; (**C**) C1; (**D**) C2; (**E**) C3; (**F**) C4; e (**G**) C5. A segunda coluna apresenta imunomarcação para GFP como controle da eletroporação. n de pelo menos 3 embriões para cada condição.

4 DISCUSSÃO

1.4.1 Padrão de expressão gerado por E1

De acordo com nossos dados de validação *in vivo* de função biológica, tanto mE1 quanto cE1 possuem atividade *enhancer*, ou seja, são capazes de ativar a expressão de mRFP no tubo neural posterior embrionário (Fig. 1.2E). No entanto, o padrão de expressão de ambos diferiu do padrão endógeno de *cScrt2*, o que era esperado caso fossem enhancers de *cScrt2* (Fi. 1E, 2A-B). Diante disso, levantamos duas hipóteses: 1) ambos mE1 ou cE1 sozinhos não são suficientes para determinar o padrão de expressão de *cScrt2*; 2) cE1 não é uma região reguladora de *cScrt2*.

De fato, já são conhecidos vários genes que possuem múltiplos enhancers, cada um determinando a expressão de uma porção diferente do padrão total. Nesse cenário, cE1 atuaria em conjunto com outras regiões reguladoras ainda não identificadas para fornecer o espectro completo da dinâmica de expressão de *cScrt2*. Um exemplo disso ocorre, por exemplo, na regulação da expressão de Ngn2, que possui pelo menos três potenciadores controlando uma expressão espaço-temporal distinta no tubo neural (Simmons *et al.*,2001). O mesmo ocorre para Shh, um gene que tem vários reguladores bem estabelecidos, incluindo dois intrônicos e seis localizados a centenas de quilobases a montante de sua região codificadora (Jeong, 2006; Anderson *et al.*, 2014). Um outro ponto a ser considerado, é que nossos dados no ensaio 3C sugerem que haja a interação da região referente ao "pico 2" com o promotor de *cScrt2* (Fig. 1.4A). Essa região também foi testada *in vivo,* apresentando função ativadora de mRFP (Fig. 1.4B). Assim, tanto Ep2 quanto cE1 podem ser enhancers de *cScrt2*. Uma outra possibilidade é de que Ep2 possa ser *enhancer* de *cScrt2* também no tubo neural anterior, por exemplo, onde *cScrt2* é expresso.

Caso cE1 não seja uma região reguladora de *cScrt2*, há a possibilidade de que seja de outros genes localizados no mesmo cromossomo (cromossomo 20) e que possuam padrão de expressão semelhante a cE1, como por exemplo Pax6 (46Mb a montante de mE1), Ptf1a (132Mb a montante de mE1) e Id1 (668Kb a jusante de mE1). Ainda assim, nossos dados para 3C sugerem fortemente a interação de cE1 com o promotor de *cScrt2*, uma vez que observamos um alto nível frequência de interações, detectadas por qPCR (Fig. 1.4A); e pela alta resolução do nosso experimento. Essa alta frequência de interações já era esperada, uma

vez que cE1 está a aproximadamente 2.6 kb de distância do promotor de *cScrt2* e isso facilitaria a ligação intramolecular ou por não sofrer digestão por enzimas de restrição.

Além disso, trabalhos relataram (Hagege *et al.*,2007; Naumova *et al.*,2012) que uma resolução aceitável para o ensaio 3C é de 1 corte por enzima de restrição a cada 4 kb (estimativa aleatória com base no genoma humano). Nosso ensaio com a enzima Ncol (a enzima escolhida para o ensaio) apresentou 1 corte a cada 1.2 kb, ou seja, a frequência de cortes em nosso ensaio foi maior do que o é estimado aleatoriamente. Além disso, há um corte previsto entre cE1 e o promotor de *cScrt2*. Quanto menor o tamanho dos fragmentos analisados em uma região, mais próximos estamos da identificação dos reais *loci* que estão interagindo (Naumova *et al.*,2012). Portanto, a resolução aumentada do nosso ensaio, acrescenta nossa confiança nos resultados relatados.

1.4.2 Modulação de USE e cE1 por CRISPR/Cas9 no tubo neural

Ao modularmos os enhancers cE1 e USE genômica- e epigenômicamente, observamos efeitos distintos. Enquanto a deleção genômica de cE1 mediada por CRISPR/Cas9 levou a uma redução da expressão de *cScrt2* e achatamento dorsoventral do tubo neural (Fig. 1.5B), o fechamento da cromatina previsto pela utilização de LSD1:dCas9 ou KRAB:dCas9 gerou efeitos sutis (Fig. 1.5E, G).

Interessante notar que o achatamento dorsoventral observado pela deleção de cE1 sobrepõe-se ao padrão mais equatorial de expressão de mRFP quando dirigido por cE1, levando à redução de *cScrt2*. Isso sugere que a ausência de *cScrt2* na porção equatorial do tubo neural deva ser pela ausência de cE1, seu possível *enhancer*. Da mesma forma, o achatamento do tubo neural é possivelmente tanto devido à perda da porção equatorial de células, quanto a uma consequente redução no número de células diferenciadas. Por se tratar de uma perda genômica, esse efeito é passado para as células-filhas, refletindo na alteração da morfologia do tubo neural.

Enquanto a interferência por LSD1 não gerou efeitos em cE1 ou USE, quando utilizado KRAB vimos uma leve redução na expressão de *cScrt2* quando modulado por cE1, alterando o padrão de expressão de *cScrt2* para mais periférico (Fig. 1.5G); e um efeito mais acentuado em USE, com redução da expressão de *cScrt2* e leve modificação do padrão para a periferia do tubo neural (Fig. 1.6D). LSD1 está relacionado com a demetilação de H3K4me1/2 (Shi *et*

78

al.,2004) e modificação de H3K27ac por interação com deacetilases. Nos nossos ensaios, não realizamos detecção para H3K4me1/2 em cE1 ou USE. Neste caso, pode ser que LSD1 não tenha apresentado efeito sobre cE1 ou USE devido à ausência das marcações epigenéticas H3K4me1/2 nesta região. Uma outra hipótese é que mesmo LSD1 sendo capaz de modificar marcas K27ac e termos demonstrado a presença delas em cE1/USE (Fig. 1.2B), é possível que não haja proteínas acessórias efetoras no nosso contexto neural ou de outras proteínas intermediárias do complexo, não gerando o efeito esperado.

Em contraste, o efeito observado pela interferência de KRAB em cE1/USE, não alterou a morfologia do tubo neural como observado pela deleção genômica de cE1. No entanto, houve redução da expressão de *cScrt2* pela indução do fechamento da cromatina tanto em cE1 quanto em USE. É possível que tenha ocorrido uma redução do número de células diferenciadas, sugerido pelo deslocamento do padrão de expressão de *cScrt2* para a periferia do tubo neural (Fig. 1.5G). Ainda, observamos que a redução de *cScrt2* ocorreu de forma global, afetando sua expressão em todo o tubo neural, não somente na porção equatorial, como observado pela deleção genômica de cE1. Como KRAB possui efeito prolongador de fechamento de cromatina (Groner *et al.*,2010), e cE1/USE está a 2.6 kb de distância do promotor, é possível que o efeito observado, no entanto, tenha se estendido ao promotor ao invés das regiões *enhancer* em questão. O mesmo foi proposto por Kearns e colaboradores (2015) ao utilizar KRAB:dCas9 para o silenciamento gênico via promotor proximal de *Oct4* e *Tbx3* em células-tronco de camundongos e a verificação na redução de *Oct4*, sugerindo que KRAB não é *enhancer*-específico e que a redução observada foi devido ao silenciamento do promotor de ambos os genes.

Trabalhos sugerem que a repressão gênica por KRAB durante a embriogênese, se mantém e é passada para células-filhas devido à metilação do DNA, sugerindo que o silenciamento por KRAB seja epigeneticamente herdável no início do desenvolvimento (Wolf, Greenberg e Macfarlan, 2015). Assim, outra possibilidade é levantada, após a interferência por KRAB, seria de o efeito mais duradouro ter sido repassado para as células filhas, quando comparado com LSD1. Além disso, a metilação ocasionada por KRAB pode ser revertida somente de modo contexto dependente (Oleksiewicz *et al.*,2017).

1.4.3 Modulação de USE e cE1 por CRISPR/Cas9 no GRD

Interessantemente, observamos uma maior expressão de *cScrt2* nos GRDs no lado eletroporado com KRAB com alvo em cE1 (Fig. 1.5G). Da mesma forma, os embriões eletroporados com Cas9 com guias para cE1 também apresentaram aumento de expressão de *cScrt2* nos GRDs no lado direito do embrião. Uma hipótese é que cE1 possa ser um *enhancer* de *cScrt2* no tubo neural, mas também possa ser um silenciador, ou unidade repressora de *cScrt2* no GRD, pois quando inibido, aumenta a expressão de *cScrt2* nesse tecido. Uma outra possibilidade é de que cE1 interaja com outros elementos *cis* e sua deleção ou inacessibilidade provoque a perda dessa interação com outros elementos inibidores.

Trabalhos anteriores demonstram a presença de múltiplos enhancers para os genes Neurogenina 1 e 2 (*Ngn1/2*) (Scardigli *et al.*,2001; Simmons *et al.*,2001). Simmons e colaboradores relatam a identificação de múltiplos enhancers em um trecho de aproximadamente 14 kb, próximo a *Ngn1*, e que possui subfragmentos responsáveis pela expressão de Ngn1 em subdomínios, dorsal ou ventral, do tubo neural. Interessantemente, camundongos transgênicos para expressão de LacZ sob o comando de um desses fragmentos em quadruplicata (Bx4), apresentaram expressão de Ngn1 nos GRDs, tecido onde não havia expressão quando testado todos os subdomínios juntos (A+B+C). Um outro fator interessante é a perda de expressão de LacZ nos GRDs quando foram mutados os sítios para FTs no fragmento B, sugerindo que B tenha papeis em diferentes regiões do sistema nervoso. Em conjunto, esses dados sugerem que a expressão de Ngn2 ocorra em módulos e que cada um seja responsável por parte da expressão gênica e determinação final do padrão de expressão.

1.4.4 Papel de USE3

Após os testes *in vivo* dos fragmentos de USE, verificamos que USE3 não apresentou atividade na expressão do repórter mRFP. Dentre as hipóteses levantadas estão: 1) USE3 pode depender do restante da sequência (USE1+cE1); 2) USE3 pode ter função em outros tecidos, como GRD ou sistema nervoso anterior, 3) USE3 não tem, de fato, atividade; 4) USE3 pode ser um silenciador.

Referente ao segundo item, nossos resultados não apontam expressão de mRFP dirigida por USE3 no GRD, no entanto, não foi testada a sua atividade no sistema nervoso anterior, onde *cScrt2* também é expresso.

CAPÍTULO 2 - Modulação da expressão de SCRATCH2 por fatores de transcrição neurais 1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Elementos moduladores transcricionais

A transcrição gênica é um processo integrado de ação de diversas proteínas atuando sobre o DNA, como proteínas transcritoras (ex. RNA polimerase), facilitadoras (ex. Fatores de transcrição), pioneiras, iniciadoras (ex. TFIID), modificadoras (ex. DNMT), entre outras. Atualmente, são conhecidos diversos alvos dessas proteínas. Agora, passamos a chamar os elementos regulatórios, que são regiões do DNA com função específica e alvos dessas proteínas, pelo seu papel. O *core* do promotor, silenciadores, isoladores e enhancers são alguns deles.

O core do promotor é descrito como uma região de aproximadamente 40 bases acima ou abaixo do TSS (*Transcription Start Site*) (Atkinson e Halfon, 2014), contendo uma sequência iniciadora (ex. TATA box) e é onde a RNA polimerase II e fatores gerais de transcrição ligamse para iniciar a transcrição gênica (ex. mRNAs e miRNA; Chen e Rajewsky, 2007). O complexo de pré-iniciação, em eucariotos, é composto por um complexo de mais de 85 peptídeos (Levine, Cattoglio and Tjian, 2014), incluindo a RNA pol II e fatores de transcrição iniciadores, como TFIID, FTIIE, FTIIF e FTIIH e remodeladores de cromatina (Roeder, 1996).

Enhancers são segmentos de DNA com algumas centenas de bases de extensão, que atuam no recrutamento de FTs (co-ativadores/co-repressores) (Shlyueva, Stampfel and Stark, 2014) por meio de sequências curtas e específicas de DNA, conhecidos como *motifs*, para regular a transcrição gênica (Levine, 2010). Interessantemente, uma característica dos enhancers é a capacidade de atuar independentemente da distância e orientação do genealvo, localizando-se a milhões de bases de distância e entrando em contato com o promotor do gene-alvo ou outros elementos *cis* por dobramentos no DNA (Levine, Cattoglio e Tjian, 2014; Shlyueva, Stampfel e Stark, 2014). Importante destacar que, o entendimento da dinâmica envolvida na regulação gênica e nas mudanças no padrão de expressão gênica que acarretam na determinação de subtipos celulares e alterações em padrões corporais e geração de novas características, são produtos da modulação da atividade de enhancers e de sinais complexos bem definidos durante o processo evolutivo. Esse processo de determinação celular e escolhas moleculares já era descrito por Waddington (1942), inferindo destinos em uma célula plástica durante o desenvolvimento e levantando a hipótese de haver um controle epigenético envolvido. Um exemplo bem demonstrado é a expressão de *even-skipped* (*eve*) em *Drosophila. Eve* é expresso em um padrão de sete estrias transversais ao eixo embrionário, desencadeado pela ação de cinco enhancers individuais, dispostos tanto acima quanto abaixo do *locus* de *eve* (Stanojevic, Small e Levine, 1991; Small, Blair e Levine, 1992). Na definição de um determinado padrão de transcrição gênica, diversos genes possuem enhancers redundantes ou funcionalmente similiares, que atuam de forma complementar, reforçando a fidelidade e robustez da expressão gênica (Perry, Boettiger e Levine, 2011; El-Sherif e Levine, 2016).

A redução da transcrição é mediada por silenciadores, que inclui FTs repressores e RNAs não codificantes. Os FTs repressores causam silenciamento gênico ao interagirem com sítios-alvo. Os RNAs não codificantes mais conhecidos são os lncRNAs e miRNAs.

Outro exemplo de mecanismo silenciador seria o complexo *Polycomb* (PRC1/2), que reprime remodelando a cromatina. Um trabalho recente sugere que as regiões próximas às silenciadoras são enriquecidas em H3K27me3, mediando o silenciamento por dobramento e interações entre esses trechos de cromatina. Nos ensaios funcionais, a remoção desta marca epigenética aumentou a expressão dos em genes-alvo, confirmando seu possível papel silenciador (Cai *et al.*,2019).

Fatores de transcrição, por sua vez, são proteínas frequentemente conservadas evolutivamente, e sua sequência proteica pode ser subdividida em domínio de ligação ao DNA, que reconhece e interage com os *motifs* genômicos, e o domínio de ativação que interage com outras proteínas nucleares relevantes para modular a transcrição (Ong and Corces, 2011). Para iniciar sua função, os FTs precisam identificar seus sítios-alvo no genoma. O processo de reconhecimento de sítios-alvo por FTs não é limitada pela afinidade por um *motif* específico único. Cada FT possui uma gama de potenciais *motifs* com diferenças de afinidade de ligação para cada uma das variantes (Stormo and Zhao, 2010). Além disso, a ligação de um FT a seu *motif* previsto, precisa ser encaixada em um contexto específico e/ou necessitar da interação com outras proteínas (Shlyueva, Stampfel and Stark, 2014). Nesse sentido, diversos bancos de dados atualmente possuem informações dos *motifs* reconhecidos por vários FTs, nos mais diversos tipos celulares, identificados por meio de técnicas como ChIP-Seq e microarray.

82

A permanência de determinado FT no seu sítio-alvo é determinada pela quantidade de sítios-alvos disponíveis no genoma (Sandmann *et al.*,2006) e pela afinidade do FT pelos *motifs* (Gaudet e Mango, 2002). Consequentemente, a ocupação de sítios-alvo pode mudar caso haja alteração nos níveis expressão do FT. Assim, o processo de ligação temporalmente específico, seria modulado pela disponibilidade de sítios-alvo e pelos níveis de expressão do FT ligante. É necessário que o complexo FT-sítios-alvo atinja concentrações ótimas para que ocorra o recrutamento da ligação de outros FTs parceiros, determinando a modulação do gene-alvo (Spitz and Furlong, 2012). Esse mecanismo, por exemplo, ocorre em processos de sinalização por morfógenos (Briscoe and Small, 2015).

O posicionamento do *motif* também tem sido discutido, e são consideradas as características ordem, orientação e espaçamento dos *motifs* para que haja uma possível interação entre FTs parceiros. De modo geral, o posicionamento dos *motifs* assegura que haja a interação entre os FTs e atividade cooperativa, recrutamento de FTs parceiros e interação com a maquinaria basal. Não podemos descartar a ideia de que FTs também atuem de forma aditiva, quando a interação adiciona força ao efeito final; ou independemente, sem a interação com outras proteínas parceiras (Spitz e Furlong, 2012).

2.1.2 Fatores de transcrição e seu papel na neurogênese

Os fatores de transcrição são frequentemente classificados de acordo com o grau de homologia da sequência de aminoácidos do domínio de ligação ao DNA. Dentre as várias classes de fatores de transcrição, as mais bem caracterizadas durante a neurogênese são as superfamilias de proteínas *zinc-fingers* (ex. superfamília Snail), bHLH (basic Helix-Loop-Helix) (ex. *Ascl1/Ash1*, *Ngn1/2*, *Hes*) e POU (ex. *Brn*).

Os FTs do tipo bHLH atuam em múltiplos passos da neurogênese, desde a manutenção do estado proliferativo à diferenciação. Um exemplo já citado anteriormente são os membros da família Hes, que promovem a permanência das células progenitoras no ciclo celular. Dentre eles, *Hes1*, um efetor da via Notch, expresso na zona ventricular e que atua na regulação da autorrenovação das células proliferativas. A manutenção da autorrenovação por *Hes* é essencial para gerar o número correto de células nervosas e auxiliares (da glia) (Caviness, Takahashi e Nowakowski, 1995), tanto no desenvolvimento quanto na vida adulta.

A via de Notch/Hes1 ativa na zona ventricular, reprime a expressão de genes proneurais também do tipo bHLH, como Ascl1 e Neurogenina 2 (Ngn2), que promovem a diferenciação neural. A saída dos progenitores neurais da zona ventricular reduz a atividade de Hes. Em consequência, os níveis dos genes proneurais aumentam, determinando um destino neural. Ascl1 foi inicialmente identificado em Drosophila e tem um papel central no processo de neurodiferenciação. Em Xenopus, a superexpressão do seu ortólogo (xAsh1) induz a formação de neurônios ectópicos (Talikka et al.,2002). Em camundongos, mAscl1 é expresso na zona ventricular dorsal e na zona intermediária em todo o eixo dorsoventral. Em animais knockout para mAscl1 apresentam graves problemas na especificação de precursores neuronais do telencéfalo ventral e no epitélio sensorial olfativo (Casarosa, Fode e Guillemot, 1999). Mais recentemente, foi visto que Ascl1 atua como um fator pioneiro no processo de ativação da expressão gênica, inclusive na transformação de fibroblastos em neurônios, facilitando a transcrição de alvos neurais e na conversão dos tipos celulares (Wapinski et al.,2013).

Outro FT neural do tipo bHLH é *Ngn2*. Como esperado, devido ao seu papel compartilhado com *Ascl1* na neurogênese, *Ngn2* também atua na saída do ciclo celular e na diferenciação neural (Lai, Meredith e Johnson, 2013). Ambas as expressões de *Ngn1* e 2 são restritas à transição da zona ventricular para a zona intermediária no tubo neural posterior, indicando um papel na promoção da neurodiferenciação. No telencéfalo, a expressão de *Ngn2* é restrita à região dorsal, que possui células que dão origem às células piramidais, indicando que Ngn2 contribui na determinação de subtipos celulares específicos (Fode *et al.*,2000). Além disso, na ausência de *Ngn1*, *Ngn2* tem ação promotora da diferenciação aumentada, gerando mais neurônios (Dixit *et al.*,2014). Em um papel adicional, *Ngn2* é necessária para a migração correta de neurônios corticais (Mattar *et al.*,2004).

No mesmo contexto, a familia de FTs POU também é importante. Inicialmente identificado em *Drosophila*, os membros da familia POU apresentam o domínio evolutivamente conservado com cerca de 140 aminoácidos, conhecido como POU (Billin, Cockerill e Poole, 1991). Entre os membros está *Oct4*, importante na determinação da pluripotência em células-tronco (Takahashi e Yamanaka, 2006) e *POU3F2* (*Brn2*). Em camundongos e galinhas, *Brn2* é expresso estritamente na zona ventricular do tubo neural anterior e posterior (He *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2004). Foi visto no córtex de

84

camundongos, que *Brn2* é crucial na progressão da neurogênese e transição do estado proliferativo para início de determinação neural (Dominguez, Ayoub e Rakic, 2013). Na ausência de *Brn2*, a produção das camadas adjacentes do córtex é comprometida (Sugitani, 2002). Além de seu papel na proliferação e início de diferenciação, *Brn2* também tem função na migração radial e diferenciação, visto em defeitos nessas funções após *knockout* para *Brn2* (Dominguez, Ayoub e Rakic, 2013). Além disso, *Brn2* modula a expressão de Ngn2, ligando-se ao seu promotor (Dominguez, Ayoub e Rakic, 2013). Nesse mesmo estudo, foi demonstrada a repressão de Hes5 por *Brn2*, sugerindo que *Brn2* possa também estar envolvido na modulação de Ngn2 pela via Notch. Ainda, em um estudo anterior foi sugerido que *Brn2* interagia com *Sox2* na ativação de Notch1 em progenitores neurais, balanceando os estados diferenciado e indiferenciado de células neurais (Sunabori *et al.*,2008).



Figura 2. 1: Padrão de expressão de **(A)** Ascl1 e **(B)** Brn2 em estágio HH22. Imagens obtidas de Liu et al., 2000; Le Dréau and Martí, 2012.

Como proposto para outras proteínas do tipo bHLH, Castro e colaboradores (2006) demonstraram a atuação sinergística de *Ascl1* e *Brn2* (Fig. 2.1) em *motifs* adjacentes na promoção da transcrição de seus genes-alvo. A heterodimerização ocorre após o reconhecimento dos FTs de um *motif* composto pela combinação de um sítio E-box e um octâmero (*motif* consenso para proteínas POU). Além disso, uma análise *in silico* para identificação de novos alvos desse complexo, sugere que *Ascl1/Brn2* atuam na modulação de diversos processos celulares, envolvendo genes da via Notch (ex. Dll1/3, Jag2), do ciclo celular (ex. Cdc25b) e outros fatores de transcrição, como *Scrt2* (Castro *et al.*, 2006). Assim, é possível que haja uma cascata molecular envolvendo a regulação de alvos relacionados na proliferação, ciclo celular e diferenciação. Interessantemente, Cdc25b/Cdc25.2 também é alvo

de de *Scrt2*/ces-1 em *C. elegans*. Em conjunto, estes dados sugerem que *Ascl1/Brn2* e *Scrt2* estão vinculados geneticamente na regulação do ciclo celular através de Cdc25b.

Apesar de não pertencer à mesma superfamília, membros da superfamília Snail/Slug de FTs do tipo *Zinc-finger* também reconhecem sequências E-box (Chiang and Ayyanathan, 2012), como os FTs do tipo bHLH. Essa interação ocorre pelo domínio *zinc-finger*, que se liga ao DNA, modulando a transcrição. Os membros desta superfamília têm uma importância evolutivamente conservada no desenvolvimento neural. O modelo atualmente aceito para seu efeito é que os membros da superfamília Snail ajam competindo com fatores bHLH pela ligação aos E-box. Consistente com esta hipótese, *Scrt2* modula a atividade de ligação ao DNA e transcricional de fatores bHLH como Ngn2, NeuroD1 e *Ascl1* (E. K. Nakakura *et al.*,2001; Paul *et al.*,2012). Além disso, já se sabe que *Scrt2* reduz a transcrição de E-caderina e regula a migração neural durante o desenvolvimento do córtex de vertebrados (Paul *et al.*,2012; Itoh *et al.*,2013), e em embriões de *Drosophila*, *Scrt2* age em parceria com proteínas bHLH para promover diferenciação neural (Roark *et al.*,1995).

Aqui, demonstraremos o efeito dos FTs *Ash1, Brn2* e *Sox2* sobre *cScrt2*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além das consequências moleculares e celulares desencadeadas pela superexpressão desses FTs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Análise in silico

As análises *in silico* para busca de sítios de reconhecimento para FTs foi realizada na plataforma JASPAR (v. 2018; <u>http://jaspar.genereg.net</u>; Khan *et al.*,2017) considerando as matrizes para os 719 FTs disponíveis no banco de dados da plataforma. Utilizamos *thresholds* de 70 ou 80%, no caso de *Sox2*-2mut. As sequências mutantes de cE1, M1, M2, *Sox2*-2mut e *Sox2*-19mut foram geradas submetendo a sequência cE1 na plataforma como descrito acima.

Para filtragem dos FTs neurais identificados na plataforma anterior, submetemos os FTs identificados em cada sequência a análise de Venn (http://genevenn.sourceforge.net), QuickGO gênica obtida plataforma comparando com а lista na (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/), com os acessos "Nervous System Development" (GO:0007399), "Neural Tube Formation" (GO: 0001841) e "Neural Tube Development" (GO: 0021915) e submetemos no BioMart (ensembl.org/biomart). O mesmo procedimento foi realizado para identificação de FTs renais em células HEK293T, utilizando os acessos "Kidney Development" (GO:0001822) e "Adrenal Gland Development" (GO: 0030325), uma vez que essas células estão mais caracterizadas molecularmente com a glândula Adrenal (Lin *et* al.,2014).

2.2.2 Clonagem

A sequência de m*Brn2* foi adquirida no repositório online Addgene (<u>www.Addgene.org</u>; #19711; POU3F2 apresenta 71.8% de conservação entre camundongo e galinha) e subclonada por PCR no vetor pMES-IRES-GFP nos sítios de EcoRI e BamHI e no vetor pCI-IRES-H2B:RFP nos sítios XhoI e MluI. Em seguida, inserimos a sequência para o epítopo FLAG *in frame* com m*Brn2* no sítio SacI por DNA Assembly. Da mesma forma, c*Sox2* foi clonado por PCR de cDNA de embrião em HH10 e inserido no vetor pCI-IRES-H2B:RFP no sítio PmeI. O primer forward de clonagem de c*Sox2* continha a sequência para o epítopo FLAG in frame com *cSox2*.

Para os ensaios de luciferase, subclonamos as sequências cE1 e mE1 no vetor pGL3-Basic nos sítios KpnI e XhoI. Já M1, M2 e cE1-*Sox2*-19mut foram sintetizados (GenScript, EUA, <u>https://www.genscript.com/</u>) contendo os sítios para KpnI e XhoI. M1 e M2 foram subclonados

87

nos vetores pTKmRFP e pGL3-basic para os ensaios de eletroporação dupla e luciferase, respectivamente.

cE1

M1 - O sublinhado indica as mutações realizadas

M2 - O sublinhado indica as mutações realizadas

Sox2-2mmut foi sintetizado com primers contendo as mutações para os sítios de *Sox2* e amplificado por PCR. Posteriormente, "*Sox2*-2mut" e "*Sox2*-19mut" foram subclonados no vetor pTKmRFP em sítios KpnI/Apal de pTK-cE1-mRFP para *Sox2*-2mut e KpnI/XhoI para *Sox2*-19mut, para eletroporação *in embrio*. Todos os primers estão listados na Tabela 2.2.

Sequência de Sox2-19mut. O sublinhado indica as mutações realizadas

 $GGTACCGG\underline{cacacaca} TCC\underline{ggtttatg} CCTCGCCAGCC\underline{tatatata} CCCAGCACGGCACGGGGG\underline{tgtgtgt} CCT\\ CCGAGCCCCGCGAGCGAGCAGGAATTATTTCCATACAGCTGCTCGGGAAGGCAGGGATGGGGATGC\\ AGCCATCACCCAACCGCGCTCCGGGAGAACGCCCGGG\underline{agagagagagaga} TCCCCCCTCCCC\underline{tatata}\\ \underline{ta} GGGGCAGGTTTGGGGGGGGCCCAGCCGCCTGCAGTCAGCAATATTAGCACAGCTCCGCAGGACT\\ GATTGCAGGTT\underline{gtgtgtgtgagagaga} TCAGTa\underline{cgcgccgtatatatt} AGCCAGCTGGAGAGAGAAAAA\underline{tatata}\\ \underline{ta} GCAGCGGGCAGGCAGGCAGCAGCCCC\underline{tatatata} CGTAAGTAATCGCCCGTTCCTGAG\\ \\$

Os processos de transformação, PCR de colônia, crescimento do inóculo, mini e midiprep, e sequenciamento Sanger estão descritos no capítulo 1.

Tabela 2. 1: Primers utilizados para construção dos vetores utilizados neste capítulo. Exxtend (Campinas, Brasil) ou IDT (EUA).

Nome	Sequência
TAG-F	5' CCAAAAAAGAAGAGAAAGGTACGAATTCGCCGCCATGGCGACC
TAG-R	5' GGTCGCCATGGCGGCGAATTCGTACCTTTCTCTTTTTTGG
pMES-m <i>Brn2</i> -F	5' GAATTCGCCGCCATGGCGACCGCAGCGTCTAACCAC
pMES-m <i>Brn2</i> -R	5' GGATCCTCACTGGACGGGCGTCTGCACCCC
pCl-m <i>Brn2</i> -F	5' CTCGAGGCCGCCATGGCGACCGCAGCCTCCAAC
pCI-m <i>Brn2</i> -R	5' ACGCGTTCACTGCACGGGGGTCTGCACCCC
FLAG:Sox2-F	5' CGCGCCTTAATTAACGTTTGCCACCGACTACAAGGACGACGACGACGACAAGATGATGGAAACCGAGCTGAAACC
Sox2-R	5' GCCATTTGCATGCATGTTTTTACATATGTGATAGAGGGAGTGTGCC
Sox2-2mut-F1	5' TTCTCTATCGATAGGTACCGGCACACGGGTCCCCAAAGT
Sox2-2mut-R1	5' TGCTCGCTCGCGGGGCTCGtatatatatatatatataTGCCGTGCTGGGGAGAGAG
Sox2-2mut-F2	5' CGAGCCCCGCGAGCGAGCA
Sox2-2mut-R2	5' ACCACGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
Sox2-2mut-F3	5' CTCCCCCCCCCCGCCGTGGTGGGGGGGCAGGTTTGGGGGGGCCCAGCCGCGCTGCAGTCAGCAA
Sox2-2mut-R3	5' ттостоастосадсосососссссааасстосссссассасододододододододододододододо

2.2.3 Eletroporação no embrião in ovo

Para os ensaios de dupla eletroporação, primeiramente eletroporamos o lado esquerdo com os plasmídeos-controle (mGFP + pTK-cE1-mRFP ou pTK-M1-mRFP ou pTK-M2mRFP). Após 3 horas, eletroporamos o lado contralateral com os plasmídeos experimentais (m*Ascl1* + pTK-cE1-mRFP ou pTK-M1-mRFP ou pTK-M2-mRFP; m*Brn2* + pTK-cE1-mRFP ou pTK-M1-mRFP ou pTK-M2-mRFP) utilizando os mesmos parâmetros descritos no capítulo anterior. Após a eletroporação, os embriões foram reincubados e coletados em estágio HH18. Os embriões foram fixados e fotografados em Lupa de fluorescência Axiozomm V16 (Zeiss; Prof. Niels Olsen, Depto. de Imunologia – USP).

Nos ensaios de superexpressão, eletroporamos pCAGGS-*mAscl1*-IRES-*GFP* (fornecido pelo Dr. Diogo Castro, Instituto Gulbenkian, Portugal; Ascl1 apresenta 92% de conservação entre galinha e camundongo), pMES-*mBrn*-IRES-*GFP*, m*Ascl1*+m*Brn2* ou pCI-FLAG:c*Sox2*-IRES-H2B:RFP como descrito anteriormente e utilizando os mesmos parâmetros. Após a eletroporação, os embriões foram reincubados e coletados em estágio HH22-23. Os embriões foram fixados e processados para hibridação *in situ*.

2.2.4 Ensaio BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina)

Os embriões foram em HH11-12 foram eletroporados e incubados por 2 dias até atingirem o estágio HH23. BrdU concentrado a 10 mg/mL foi misturado a Fast Green 1% e injetado no canal neural pela região posterior. Após 2 horas de incubação, os embriões foram coletados e processados para hibridação *in situ* e posterior imunodetecção de BrdU.

2.2.5 Hibridação in situ

Ensaio realizado como descrito no capítulo 1.

2.2.6 Imunohistoquímica

Os cortes transversais pós-hibridação *in situ* foram processados como descrito anteriormente e coletados em lâmina SuperFrost.

Os anticorpos primários utilizados foram: mouse anti-DsRed2 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, cat. Sc-101526), rabbit anti-GFP IgG (1:400, Molecular Probes, cat. A-6455), mouse anti-FLAG M2 (1:500, Sigma Aldrich, cat. F3165), rabbit anti-pHH3 (1:500, Millipore, cat. M06570), rat anti-BrdU (1:500, Accu-Specs, cat. OBT0030), mouse anti-Pax7 (DSHB, cat. Pax7), mouse anti-IsletI (DSHB, cat. 39.4D5), mouse anti-TUJ1 (1:200, DSHB, cat. 6G7), mouse anti-HuC/D (1:200, Molecular Probes, cat. 21271) e rabbit anti-NeuN (1:50, Merck-Millipore, cat. MAB377). Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa 647 goat anti-mouse IgG (diluição 1:500, Invitrogen, cat. A-21235), Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:200, Molecular Probes, cat. A-11008), Alexa 488 goat anti-mouse IgG (diluição 1:500, Invitrogen, cat. A-11001), Alexa 647 donkey anti-rabbit IgG (diluição 1:800, cat. A31573), Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:500, cat. A11011) e Alexa 568 goat anti-mouse igG (diluição 1:500, cat. A11004).

2.2.7 Dissociação de tecido e FACS

Para o ensaio de ChIP, utilizamos um *pool* da porção truncal de 3 tubos neurais em HH23 e os procedimentos foram como descritos no Capítulo 1 (sessão 1.3.7).

2.2.8 ChIP-qPCR (Chromatin ImmunoPrecipitation-qPCR) Protocolo de acordo com Azambuja e Simoes-Costa, 2019. Para coleta das amostras, os tubos neurais foram dissociados e processados como descrito anteriormente. Posteriormente, ressuspendemos as células no tampão de extração nuclear (NP-40 0.5%, Triton X-100 0.25%, Tris-HCl 10mM, pH 7.5, CaCl2 3mM, sacarose 0.25M, inibidor de protease (1 mini tablet/10 ml), DTT 1mM e PMSF 0.2mM), transferindo para homogenizador de vidro no gelo para liberar os núcleos e evitar degradação de proteínas. Centrifugamos as amostras por 1 min em velocidade máxima a 4 °C. em seguida, removemos o sobrenadante e ressuspendemos o *pellet* em PBS gelado suplementado com inibidores de proteases. Uma vez ressuspendidas as amostras, adicionamos 140 µL de tampão de lise (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, Inibidor de Protease 1x) e incubamos no gelo por no máximo 1 h. Adicionamos 280 µL de tampão de diluição (SDS 0.01%, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl 16.7 mM, pH 8.0, NaCl 167 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.4mM e Inibidor de protease 1x) e sonicamos no gelo (Diagenode Bioruptor, parâmetros High, "30 ON", "30 OFF", por 15 min).

Em seguida, acrescentamos 42 μL de Triton X-100 10% e centrifugamos por 10 min a 4 °C em velocidade 20,000 g. Transferimos o sobrenadante para um novo tubo. Ressuspendemos o pellet com 500 μL de tampão de diluição com Triton (SDS 0.01%, Triton X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl 16.7 mM, pH 8.0, NaCl 167 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.4mM e Inibidor de protease 1x), seguido de centrifugação por 10 min a 4 °C a 20,000 g. Ao final, transferimos o sobrenadante para o mesmo tubo com o sobrenadante salvo no passo anterior.

Para o preparo das *beads* magnéticas, homogenizamos a solução de *beads* (Dynabeads – Proteína G). Para cada amostra, adicionamos 100 μ L de beads magnéticas e 1 mL de solução de bloqueio. Misturamos, e colocamos os tubos em estante magnética para recuperação das *beads*, removendo o sobrenadante após 3 min. Repetimos a lavagem mais duas vezes, sempre ressuspendendo as *beads* em 1 mL de solução de bloqueio. Após a última lavagem, ressuspendemos as *beads* em 250 μ L de solução de bloqueio, adicionamos 10 μ g do anticorpo primário (mouse anti-*Sox2*); mouse anti-IgG, Millipore, cat. #CS200621) e incubamos em agitador orbital em câmara fria *overnight*. No dia seguinte, lavamos as *beads* como descrito anteriormente e ressuspendemos com 100 μ L de solução de bloqueio. Adicionamos aproximadamente 400 μ L da amostra na solução de anticorpo+*beads* e incubamos *overnight* no agitador em câmara fria.

No dia seguinte, esfriamos a estante magnética e lavamos as amostras em câmara fria por 7 vezes, trocando o sobrenadante por 1 mL de RIPA a cada 3 min. Por último, lavamos 1 vez com 1 mL de TE/NaCl e passamos as amostras para tubos novos já gelados. Centrifugamos as amostras a 960 g por 3 min a 4 °C para remover o TE residual e adicionamos 220 μL de tampão de eluição (SDS 1%, EDTA 10mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0), incubando por 1 h a 65 °C no thermomixer a 1400 rpm. Centrifugamos as amostras novamente a 16,000 g por 1 min para remover as *beads*. Aspiramos o sobrenadante e transferimos para um novo tubo, incubando as amostras a 65 °C *overnight* para remover o *crosslink*.

Por fim, adicionamos 200 μ L de TE e 8 μ L de 10 mg/mL de RNAse A e incubamos a 37 °C por 1 h. Adicionamos 4 μ L de 20 mg/mL de Proteinase K e incubamos por 1 h a 55 °C. Prosseguimos com o protocolo de precipitação por fenol-clorofórmio, finalizando com ressuspensão dos pellets em TE.

Para o qPCR, utilizamos as amostras incubadas com tanto com anti-*Sox2* quanto com anti-IgG (controle) e os primers listados na Tabela 2.1. As análises foram de acordo com o método 2^{-ΔΔCt}. O Protocolo utilizado está detalhado em Azambuja e Simoes-Costa, 2019.

Primer	Sequência
cE1-F	5' GTGAGCCAAAAGGATGCAGC
cE1-R	5' CTCGGAGGCGATTGTTCCC
Chr.20-Ctrl-F	5' CTCCTTCGGCAACACGGAT
Chr.20-Ctrl-R	5' AGAGCCCTGGAGAGATCCC
Chr2nc-F	5' ACTGCAGGCTGGTGAGTCTT
Chr2nc-R	5' CTTCCAGTGCTGTCACTCCA
Chr2.NegB-F	5' TGGGTGCTTGCAAATTGAGC
Chr2.NegB-R	5' ACACTAACCAACTGCTGTGC

Tabela 2. 2: Primers utilizados para detecção de fragmentos pós-ChIP. IDT (EUA).

Este ensaio foi realizado no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os dados gerados foram analisados e os cálculos realizados utilizando o DNA não sonicado e outro submetido ao anticorpo IgG como normalizador e controle, respectivamente. Esses experimentos foram elaborados em colaboração com o laboratório do Prof. Marcos Simoes-Costa (Cornell University, NY, EUA).

2.2.9 Cultura de Células e Transfecção

Células HEK293T foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (estreptomicina 5 µg/mL e penicilina 5 U/mL), e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO2. Duas vezes por semana, o meio foi trocado e, imediatamente antes de uma dessas duas trocas semanais, uma porcentagem de células foi repicada para uma nova placa, mantendo a cultura em confluência média. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar.

Para transfecção, as células HEK293T foram transferidas para placas de 24 poços 18 a 24 horas antes da transfecção, na concentração de 3 X 10^5 células/poço. A transfecção para o ensaio de luciferase foi realizada em triplicata e com inserção simultânea de três tipos diferentes de plasmídeo: um contendo o gene que codifica para o fator de transcrição testado (m*Ascl1* ou m*Brn2* ou m*Ascl1*+m*Brn2* ou *Sox2*), um com o gene que codifica para a luciferase de vagalume sob o comando da sequência-teste (pGL3-basic) e um com o gene que codifica para o ensaio. A cotransfecção foi realizada com 3,3 µl/poço de PEI, 500 ng/poço fator de transcrição testado, 10 ng/poço de luciferase de Renilla e 500 ng/poço de pGL3-mE1 ou pGL3-cE1 ou pGL3-M1 ou pGL3-M2 em meio overnight.

2.2.10 Ensaio de luciferase

Após 24 horas de transfecção, as células coletadas foram lisadas e a luciferina, substrato da luciferase de vagalume (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, cat. E1910), foi adicionada ao meio utilizando luminômetro (Synergy HT, Biotek). Com a presença do substrato, a reação de oxidação é rapidamente iniciada e a luz emitida durante o processo é quantificada por um luminômetro. Após a leitura, a reação é interrompida e a coelenterazina, substrato da luciferase de Renilla, foi adicionada ao meio, dando início à segunda reação. A luz emitida nessa reação é também quantificada pelo luminômetro. As quantificações resultantes da atividade da luciferase de *Renilla* foram usadas como fator normalizador para o ensaio. Desta forma, variações na razão entre luciferase de vagalume/Renilla refletem diferenças na atividade enzimática/transcrição de luciferase de vagalume e não variações no índice de transfecção entre amostras diferentes.

2.2.11 Gráficos e Contagem celular

A contagem celular foi realizada utilizando a ferramenta de gráfico (Points > Events) e a curva de intensidade para GFP e mRFP com a ferramenta "Profile", ambos no software ZEN Blue v2.6 (Zeiss). Os dados foram plotados no software GraphPad Prism v.7.

1.2.12 Imagens

Todas as imagens obtidas e figuras deste trabalho foram analisadas e produzidas no software Adobe Photoshop CC 2018.

1.2.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 7 e usado o teste Mann-Whitney para dados não-paramétrico e teste t de Student pareado para dados paramétricos.

3 RESULTADOS

2.3.1 Análise in silico

Além de investigar por possíveis elementos cis-regulatórios na região genômica de cScrt2, também buscamos nessas regiões sítios de ligação evolutivamente conservados (presentes em mE1 e cE1), para fatores de transcrição já conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento do tubo neural. Consideramos na nossa seleção, domínios de expressão similar ou próximos a células Scrt2-positivas, o que sugere possível regulação da expressão. Especificamente, focamos no Brn2, Ascl1 e Sox2 (Tanaka et al., 2004; Le Dreau et al., 2012). Para essa análise, utilizamos somente a porção conservada de mE1 (mm9; chr2:151,894,704-151,895,205) e de cE1 e submetemos ao banco de dados público JASPAR (v. 2018). Essa plataforma possui matrizes de frequência de posição para fatores de transcrição para múltiplas espécies (Khan et al., 2017) e os dados podem ser tanto acessadas pelo JASPAR quanto pelo hub de dados no Genome Browser. Esta análise previu 10477 sítios de ligação para diversos FT em mE1 e 6218 sítios em cE1. Estes sítios previstos seriam reconhecidos por 719 FT distintos. Como nem todos os FTs analisados são expressos no tubo neural ou sistema nervoso em formação, realizamos outra análise para filtrar os FTs neurais. Para isso, buscamos na plataforma QuickGO (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/) o número de acesso para anotações de genes associados a determinado processo. No nosso caso, escolhemos "Nervous System Development", "Neural Tube Formation" e "Neural Tube Development" e submetemos no BioMart (ensembl.org/biomart). Para identificarmos quais dos potenciais FTs interatores de mE1 e cE1 são neurais, foram submetidas a análise de Venn (http://genevenn.sourceforge.net) a lista gênica gerada pelo GO, juntamente com os TFs obtidos no JASPAR (Apêndice, Tabelas 1 e 2). Desta forma, concluímos que 209 FT neurais reconheceriam mE1. Já para cE1, encontramos 193 FTs neurais. Após, realizamos novamente a análise de Venn entre os TFs neurais encontrados tanto para a porção conservada de mE1 quanto para cE1 e encontramos sítios para 191 diferentes FTs neurais em comum a ambos (Fig. 2.2A).

F	ł
	а

1							
alx1	e2f1	foxp1	hoxd3	myc	pax6	runx2	tead2
arntl	egr2	foxp2	hoxd9	mycn	pax7	runx3	tfap2b
arx	egr3	gata2	id2	neurod1	pbx1	rxra	tfap2c
ascl1	emx1	gata3	id4	neurod2	pbx3	rxrg	tgif1
ascl2	emx2	gbx1	insm1	neurog1	pdx1	shox2	tgif2
atf1	en1	gbx2	isl2	neurog2	phox2a	six1	twist1
atf4	en2	gcm1	jun	nfe2l2	phox2b	smad2/3/4	uncx
atoh1	eomes	gfi1	klf4	nfia	pitx1	sox10	vax1
barhl1	esr2	gli2	lbx1	nfix	pitx3	sox15	vax2
barhl2	ets1	glis2	lhx2	nkx2-5	plag1	sox17	vsx1
bcl6	etv1	grhl2	lhx3	nkx6-1	pou1f1	sox2	vsx2
bhlhe22	etv4	gsc	lhx4	nkx6-2	pou3f1	sox5	zbtb18
bhlhe23	etv5	gsx1	lhx6	nr2c2	pou3f2	sox6	zeb1
bhlhe40	etv6	gsx2	lhx8	nr2e1	pou3f3	sox9	zic1
bhlhe41	evx1	hes1	lhx9	nr2f1	pou3f4	srf	zic3
bsx	fev	hes2	lmx1a	nr2f2	prdm1	sry	zic4
cebpb	fos	hes5	mafb	nr4a2	prop1	stat3	
creb1	foxa1	hesx1	mafk	nrl	prox1	Tbx-T	
creb3l2	foxa2	hey2	mef2a	olig1	prrx1	tbr1	
crx	foxb1	hif1a	mef2c	olig2	rax	tbx20	
cux2	foxc1	hnf1b	mef2d	olig3	rbpj	tcf12	
dlx1	foxd1	hoxa2	meis1	otx1	rela	tcf3	
dlx2	foxg1	hoxb2	mnx1	otx2	rfx4	tcf4	
dmbx1	foxo3	hoxb3	msx1	pax3	rora	tcf7	
dmrt3	foxo6	hoxc10	myb	pax5	rorb	tcf7l2	

-

Ascl1	10 sítios
Neurog2	4 sítios
Pax6	1 sítio
POU3F2	4 sítios
Smad2/3/4	12 sítios
Sox2	19 sítios

Figura 2.2: Fatores de transcrição com sítios putativos em cE1. (A) Fatores de transcrição neurais com sítios identificados em cE1 após análise na plataforma JASPAR e intersecção com dados de GO. (B) fatores de transcrição destacados por sobreposição de padrão de expressão com cScrt2 e dados da literatura.

Na lista gerada, destacamos a presença de sítios para alguns FTs interessantes, como Ascl1 com dez sítios ao longo de cE1, Ngn2 com quatro sítios, Pax6 com somente um sítio, Brn2/POU3F2 com 4 sítios, Smad 2/3/4 com 12 sítios e Sox2 com 19 sítios (Fig. 2.2B). Interessantemente, a alta frequência de sítios para Ascl1 confirma análises in silico previamente publicadas para regiões cis-regulatórias reconhecidas por Ascl1 e Brn2, que indicaram Scrt2 como um possível gene-alvo (Castro et al., 2006). Além disso, os campos de expressão de Ascl1 e Brn2 se sobrepõem parcialmente com o de Scrt2 (Guillemot, Joyner, 1993; Tanaka et al., 2004). Brn2 é expresso mais internamente ao Scrt2 no tubo neural (Tanaka et al., 2004). Já Ascl1, está presente em todo domínio dorsal do tubo neural e sobrepõe com Scrt2 na zona intermediária (Le Dréau et al., 2012). Os campos de expressão de Ngn2 e Smad2/3/4 sobrepõem com o de cScrt2. Enquanto o padrão de Ngn2 é bastante similar ao de cScrt2, Smad2/3/4 está presente em um subdomínio do campo de Scrt2, que corresponde ao sítio de expressão induzida por cE1 (Le Dréau et al., 2012). Pax6 apresenta um único sítio em cE1, contudo, seu domínio de expressão no tubo neural é equatorial, sobrepondo-se ao padrão de expressão de mRFP submetido por cE1.

No capítulo anterior, usamos diferentes combinações de subregiões de cE1 para tentar identificar o *core* funcional. Analisamos cada uma das cinco combinações na plataforma JASPAR, buscando alterações de possíveis sítios-alvos de FTs. Dentre os FTs analisados, a presença dos sítios para *Sox2* foi o que se manteve presente em todas as combinações, sendo 19 sítios em cE1-WT (Fig. 2.2B), 7 em C1, 14 em C2, 15 em C3, 12 em C4 e 16 em C5.

Com base nesses dados, investigamos a contribuição de *Ascl1*, *Brn2* e *Sox2* na modulação da expressão de genes-alvo por meio de cE1 (sequência completa) tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

2.3.2 Modulação da expressão gênica por Ascl1 e Brn2

Nosso próximo passo foi determinar a função de *Ascl1* e *Brn2* sobre mE1 e cE1 *in embrio* e em linhagem celular HEK293T (*Human Embrionic Kidney*). Para os testes *in vitro*, ambas as sequências mE1 e cE1 foram subclonadas no vetor pGL3-basic. Este plasmídeo possui o gene da proteína luminescente luciferase, cuja transcrição é modulada pela sequência-alvo de interesse. A avaliação da interação de fatores de transcrição com seus potenciais sítios-alvo é realizada através da cotransfecção de pGL3-basic contendo a sequência-alvo e de outro plasmídeo contendo fatores de transcrição candidatos. A atividade transcricional é avaliada indiretamente pela medida de luminescência emitida pela atividade enzimática da luciferase. As variações no valor de luminescência emitida indicam se o fator de transcrição atua como ativador, repressor ou se não possui função na sequência-alvo. A eficiência de transfecção é normalizada por outra proteína luminescente cuja transcrição é constitutiva - a luciferase de *Renilla*.

Usando este paradigma experimental, avaliamos se os FTs m*Ascl1* e *mBrn2* seriam capazes de interagir com mE1 e cE1 e, consequentemente, modular a expressão de luciferase. A presença evolutivamente conservada dos *motifs* m*Ascl1/mBrn2* em mE1 e cE1 sugere que os resultados seriam semelhantes para ambos. Os dados obtidos demonstram que m*Ascl1* não teve efeito significativo em mE1 quando comparadocom as amostras controle (Fig. 2.3A). Em contraste, reduziu a atividade transcricional pela metade do valor observado para as amostras controle quando mediada por cE1 (Fig. 2.3B; p<0,0001). Já para m*Brn2*, observamos redução de aproximadamente 2/3 do da atividade transcricional mediada por mE1 (Fig. 2.3A;

p<0,0001) e cE1 (Fig. 2.3B; p<0,0001). Estes dados sugerem que ambos mAscl1 e mBrn2 modulam a expressão de luciferase tanto por mE1 quanto por cE1.

Castro e colaboradores (2006) demonstraram que há uma coparticipação de m*Ascl1* e m*Brn2* na ativação de transcrição através do "*motif Ascl1*/Brn". Assim, testamos a cotransfecção de ambos os FTs juntamente com pGL-mE1 ou -cE1 em células HEK293T. O que observamos, ao contrário do esperado, foi uma redução da atividade de luciferase tanto com mE1 (Fig. 2.3A; p<0,0001) quanto cE1 (Fig. 2.3B; p<0,0005) quando comparados com a atividade em amostras controle. Isso sugere que estes fatores podem estar envolvidos na repressão direta da expressão de *cScrt2* e que possivelmente estão atuando em ambas as sequências-alvo que identificamos. Uma outra possibilidade é de que haja uma atividade contexto-dependente, onde o perfil transcriptômico das células HEK293T pode conter algum FT que reconheça nossa sequência e altere os resultados esperados.



Figura 2.3: Ensaio luciferase para a atividade dos fatores de transcrição *mAscl1, mBrn2 e mAscl1+mBrn2* sobre **mE1 e cE1. (A)** histograma para mE1 dirigindo a atividade de luciferase no contexto de superexpressão de *mAscl1, mBrn2* ou ambos juntos. (B) histograma para cE1; (C) M1 e (D) M2. Os losangos vermelhos na sequência de M1 e M2 são as mutações geradas. Em M1, nos 2 *motifs*1; e em M2, nos 2 *motifs* e todos os outros sítios para *Ascl1*. Teste estatístico utilizado: Mann-Whitney, **p<0,01, ***p<0,001. n varia de 3 a 5 amostras biológicas. Cada amostra biológica foi realizada em triplicatas experimentais.

A análise *in silico* de cE1 na plataforma JASPAR indicou 14 sítios para ligação de *Ascl1* e 5 para *Brn2*. Para confirmar que *Ascl1* e *Brn2* estão interagindo com seus respectivos sítiosalvo previstos, geramos duas versões mutadas de cE1 e as chamamos M1 e M2. Em M1, foram mutados apenas os dois *motifs* identificados (ATTTCCATACAGCTG e ATATTAGCACAGCTC) (Fig. 1.1B') e que continham 1 sítio para *Ascl1* e 1 para *Brn2* cada. Já em M2, além dos *motifs* mutados em M1, foram mutados também todos os outros 12 sítios para ligação de *Ascl1*, mantendo os outros três sítios restantes de *Brn2*.

Caso Ascl1 e Brn2 estivessem modulando transcrição através da interação com cE1, esperávamos uma alteração na atividade de luciferase após a mutação dos *motifs*. Tanto *mAscl1*, quanto *mBrn2* ou ambos juntos aumentaram a transcrição de luciferase mediada por M1 (Fig. 2.3C; p<0,001, p<0,0001 e p<0,0005). Em conjunto, estes dados levantam algumas possibilidades sobre os sítios mutados em M1. Estes novos sítios podem ter alterado: a) a afinidade da sequência para outros fatores de transcrição endógenos presentes em HEK293T; b) a parceria de *Ascl1/Brn2* com outros cofatores nucleares; c) o número de sítios para *Ascl1/Brn2*. Para eliminar esta última possibilidade, verificamos no JASPAR o número de sítios de ligações para *Ascl1/Brn2* na sequência M1 e confirmamos que não foram criados novos sítios de reconhecimento para *Ascl1/Brn2*. Para verificar as duas outras possibilidades, comparamos as listas de FT s presentes em células HEK293T com os sítios obtidos após análise de cE1 no JASPAR, e em M1 houve a perda de 2 sítios para TCF21, antes presentes em cE1. Desta forma, concluímos que o paradigma experimental de ensaio de luciferase em células HEK293T são limitados, podendo gerar conclusões enviesadas sobre a modulação do gene repórter devido à possível interação de outros FTs endógenos não desejados.

Com a sequência M2, a presença de m*Ascl1* não alterou a atividade de luciferase significativamente (Fig. 2.3D). O mesmo foi observado quando transfectados ambos os FTs (Fig. 2.3D). Quando sob m*Brn2*, houve uma redução da atividade do gene repórter (Fig. 2.3D). Em conjunto, estes dados sugerem que m*Ascl1* interage com um dos seus 12 sítios-alvos previstos. Em contrapartida, é possível que *mBrn2* interaja com um dos sítios remanescentes. De qualquer modo, considerando que o contexto transcricional de células HEK293T é distinto das células embrionárias do tubo neural, havia a necessidade de teste dessas mutações, M1 e M2, no seu contexto endógeno, ou seja, no tubo neural embrionário.

Para isso, clonamos as mutações M1 e M2 no vetor pTKmRFP e realizamos coeletroporação dos plasmídeos mGFP + cE1-mRFP, mGFP + M1-mRFP ou mGPF + M2-mRFP no lado esquerdo do tubo neural de embriões em HH11-12. Após três horas, m*Ascl1*-GFP ou m*Brn2*-GFP juntamente com cE1-mRFP, M1-mRFP ou M2-mRFP foram eletroporados no lado direito do tubo neural. Desta forma, o lado esquerdo do tubo neural constituiu a condição de controle negativo e o lado direito, o experimental. Neste paradigma experimental, m*Ascl1* foi ativou a expressão de mRFP dirigida por cE1 (Fig. 2.4A). Além disto, o pico de expressão de mRFP mediada por cE1 acompanha a de m*Ascl1*-GFP (Fig. 2.4A'). Condizente com o que foi relatado anteriormente, a superexpressão de m*Ascl1* acelera a progressão da diferenciação de progenitores neurais (Nakada e Hunsaker, 2004; Castro *et al.*,2006). Em outras palavras, a expressão de m*Ascl1* direciona as células para início de diferenciação, o que as faz migrar e se localizar mais perifericamente no tubo neural (Fig. 2.4A). Estes dados sugerem que m*Ascl1* pode regular expressão gênica via cE1 no contexto do tubo neural embrionário.



Figura 2. 4: **Teste** *in embrio* de modulação de atividade de *enhancer* por FTs. Dupla eletroporação de CE1, M1 ou M2 sozinhos *versus* juntamente com os FTs *Ascl1* ou *mBrn2*. (A) Coeletroporação de CE1-RFP+mGFP no lado esquerdo *versus* cE1-mRFP+*mAscl1*-GFP no lado direito. Observa-se deslocamento do padrão de expressão de GFP e mRFP para a periferia do tudo neural, que coincide com a presença de m*Ascl1*-GFP (n=7). Em (A'), no lado direito do gráfico de intensidade de pixels por distância também há deslocamento e sobreposição de GFP e mRFP. Em (B) e (C), testamos respectivamente M1 (n=3) e M2 (n=2) com *Ascl1*, não houve alteração no padrão de cE1-mRFP no lado direito do tubo neural. A intensidade de mRFP na condição de superexpressão *Ascl1* é menor em (B-B'). (D) Embrião coeletroporado com cE1-mRFP+mGFP no lado esquerdo e cE1-mRFP+mBrn2-GFP no lado direito (n=4). Não houve diferença de intensidade de mRFP entre os lados controle e experimental (D'). Em (E-F), os embriões foram coeletroporados com M1-mRFP+m*Brn2*-GFP (n=8) e M2-mRFP+m*Brn2*-GFP (n=4), respectivamente. Não houve diferença de intensidade de mRFP em M1 ou M2 (E'-F'). O lado esquerdo é a condição controle e o direito a experimental. Os embriões foram coletados em HH18. A caixa tracejada indica o local do *inset* para a quantificação dos valores dos *pixels* nos canais verde, vermelho e da sobreposição.

Considerando-se que a hipótese anterior esteja correta, ao eletroporarmos M1-RFP + mAscl1-GFP, esperávamos observar uma redução da expressão de mRFP devido a perda dos *motifs*. De fato, observamos redução na expressão de mRFP quando mutado para os dois *motifs* encontrados, quando na presença de mAscl1 (Fig. 2.4B) e comparado ao lado contralateral controle. Além disso, não foi possível observar o padrão de expressão de mRFP se sobrepondo ao de GFP (Fig. 2.4B-B'), como visto anteriormente para cE1. Assim, nossos dados sugerem que, de fato, mAscl1 pode estar interagindo com cE1 por meio dos *motifs* identificados. Devido à ausência de sítios para mAscl1 em M2, esperávamos não observar diferença na expressão de mRFP. De fato, quando comparamos o lado eletroporado com o lado contralateral controle (esquerdo), não observamos alterações no perfil de expressão de mRFP submetida por mAscl1 em M2 (Fig. 2.4C).

No artigo supracitado, os experimentos propostos sugerem por meio de ChIP e leitura de luciferase, que há tanto ligação de m*Brn2* neste *motif*, quanto uma pequena taxa de ativação da transcrição de luciferase dirigida por esse FT. Dessa forma, esperávamos verificar um aumento da expressão de mRFP. No entanto, em todas as variações experimentais, cE1 (Fig. 2.4D-D'), M1 (Fig. 2.4E-E') ou M2 (Fig. 2.4F-F'), a expressão de mRFP dirigida por essas sequências-teste e m*Brn2* não apresentou qualquer alteração quando comparadas com o lado controle.

Nosso próximo passo foi investigar se m*Ascl1* e/ou m*Brn2* poderiam regular a expressão de *Scrt2*. Para isto, realizamos a superexpressão *in embrio* de ambos os FTs individualmente e juntos, seguida de hibridação *in situ* para *cScrt2*.

Ao analisarmos os embriões eletroprados somente com m*Ascl1*-GFP, não observamos alterações macroscópicas (Fig. 2.5Ab). O mesmo pode ser observado nos embriões coeletroporados com m*Ascl1*-GFP + FLAG:m*Brn2*-RFP (Fig. 2.6Ad). Do contrário, verificamos uma redução da expressão de *cScrt2* modulada pela superexpressão de m*Brn2*-GFP (Fig. 2.5Ac) quando comparado com o lado contralateral e com o embrião controle (Fig. 2.5Aa). Após a análise macroscópica, realizamos cortes transversais para observar com mais detalhes o padrão de expressão de *cScrt2*. Como esperado, não observamos alteração no padrão de expressão de *cScrt2* nos embriões controle (Fig. 2.5Ae). Já em condições experimentais, não houve alteração no perfil de células proliferativas (pHH3+; Fig. 2.5B-B'). Por outro lado, notamos que houve uma redução da expressão de *cScrt2* modulada tanto por *mAscl1* (Fig. 2.5Af) quanto por m*Brn2* (Fig. 2.5Ag). Nos embriões com superexpressão de *mAscl1*, houve redução da população de células na zona do manto externamente ao campo de expressão de *cScrt2*, quando comparado ao lado contralateral.



Figura 2. 5: *Ascl1* e *mBrn2* reduzem a expressão de *cScrt2* e de marcadores de diferenciação. (Aa-c) vista dorsal de embriões eletroporados com (Aa) pCIG (controle) (n=3), (Ab) *mAscl1* (n=5) e (Ac) *mBrn2* (n=4) no lado direito do tubo neural. (Ae-g) Cortes transversais na altura indicada nos embriões (Aa-c). (B) Imunomarcação para o marcador de proliferação fosfohistona H3 (pHH3) em corte transversal de embrião após superexpressão de *mAscl1*-GFP e hibridação *in situ* para *cScrt2*. (B') contagem de células pHH3 positivas no lado esquerdo (Ctrl, cinza escuro) e direito (*Ascl1*, cinza claro). Imunomarcação para os marcadores de diferenciação NeuN (C) e IsletI (D), após superexpressão de *mAscl1* (GFP). A seta branca em (D) ressalta a região ventral eletroporada. (D') contagem de células Islet1 positivas no lado esquerdo (Ctrl) e direito (*Ascl1*). (E-G) Cortes transversais de embriões eletroporados com *mBrn2*-GFP seguido de hibridação *in situ* para *cScrt2*. (E) Imunomarcação para pHH3 e GFP (controle da eletropração). (E') contagem de células pHH3 positivas no lado esquerdo (Ctrl) e direito (*mBrn2*). (F-G) Imunomarcação para NeuN (F) e IsletI (G). (G') contagem de células IsletI positivas, indicando redução no lado com superexpressão de *mBrn2* (p<0,01). Em verde está a marcação para GFP, controle da eletroporação. Todos os embriões foram eletroporados no lado direito do tubo neural. Cada ponto no gráfico indica um corte analisado. Estatística utilizada: teste paramétrico de t de Student pareado. **p<0,01.
Considerando a progressão centro-periférica das diversas etapas de diferenciação no tubo neural, isto sugere que o número de células diferenciadas reduziu. De fato, em imunomarcação para NeuN (neurônios em diferenciação; (Mullen, Buck e Smith, 1992) pós-hibridação *in situ*, há indicação de redução dos domínios de expressão desse fator marcador de células diferenciadas (Fig. 2.5C). No entanto, a imunomarcação para IsletI (motoneurônios; Bylund *et al.*,2003), localizada na região ventral do tubo neural, não apresentou redução no número de células, mas um deslocamento dorsal e estreito do domínio IsletI positivo (Fig. 2.5D-D').

Nos embriões eletroporados com *mBrn2*, também não houve alteração no perfil proliferativo (células pHH3+; Fig. 2.5E-E'). Mas, assim como nos embriões com *Ascl1*, a superexpressão de *mBrn2* causou repressão de *cScrt2* e redução de células diferenciadas quando comparado com o lado contralateral, observado tanto por marcação para NeuN (Fig. 2.5F) quanto para IsletI (Fig. 2.5G-G'). Curiosamente, *mBrn2* não provocou o mesmo efeito que *mAscl1* no domínio ventral, com redução significativa no número de células positivas (*p<0,05).

Ao analisarmos cortes de embriões eletroporados com *mAscl1-GFP* + *FLAG:mBrn2* (Fig. 2.6Aa-b), observamos alterações distintas em dois diferentes domínios de subpopulações neurais, uma dorsal e outra ventral. No domínio dorsal houve uma perda da expressão de *cScrt2* na placa do teto, seguida de expansão do domínio de expressão e dos níveis de *cScrt2* nos domínios pd1 a pd6 (Avilés, Wilson e Stoeckli, 2013; Fig. 2.6Ab). Enquanto na região ventral, houve uma redução do domínio de motoneurônios, mas sem redução da expressão de *cScrt2*.

Sabendo-se que durante a neurogênese ocorrem eventos de proliferação, egresso do ciclo celular, migração e diferenciação a questão que veio à tona após a superexpressão dos FTs foi: em que etapa da neurogênese esses fatores de transcrição estão interferindo para modulação diferencial desses domínios do tubo neural, na proliferação ou diferenciação? Em outras palavras, que fases celulares estão sendo afetadas para que haja a expressão de *cScrt2* modulada nos diferentes domínios no tubo neural? Para responder esta questão, realizamos imunomarcação pós-hibridação *in situ* para Fosfohistona H3 (pHH3), BrdU e *Pax7* para proliferação, e *Islet1, HuC/D, TUJ1 e NeuN* para diferenciação. Histona 3 fosforilada está presente em células em estágio M do ciclo celular, enquanto BrdU sinaliza células em fase S

106

do ciclo celular (Lopes, Schmidt e Coutinho, 2000). Já Pax7, é um marcador de progenitores neurais localizados na região dorsal do tubo neural (Jostes, Walther e Gruss, 1990). A respeito dos marcadores de diferenciação neural, Islet1 é específico para motoneurônios e neurônios d2 e d3 localizados na região dorsal do tubo neural (Ericson *et al.*, 1992). HuC/D e TUJ1 marcam células diferenciadas na zona do manto. HuC/D também é conhecido como ELAVL4, que se liga a mRNA, aumentando sua meia-vida (Perrone-Bizzozero e Bolognani, 2002). TUJ1 é um anticorpo que reconhece beta-tubulina III, um componente do citoesqueleto de células neurais (Lee *et al.*, 1990). Por fim, NeuN é uma proteína nuclear e perinuclear da face citoplasmática originada pela expressão do gene Fox-3, e é comumente utilizada como marcador específico de células neurais em início de diferenciação (revisado por Mullen, Buck e Smith, 1992; Lavezzi, Corna e Matturri, 2013; Gusel'nikova e Korzhevskiy, 2015).

Após a superexpressão de ambos os FTs juntos, nossos resultados demonstram, assim como relatado na superexpressão individual de *Ascl1* e m*Brn2*, que não houve alteração no perfil proliferativo, tanto para pHH3 (Fig. 2.6Ba-a'), BrdU (Fig. 2.6Bb-b'') ou Pax7 (Fig. 2.6Bc), sugerindo estes FTs não modulam a cascata gênica associada a mitose de progenitores neurais.

Por outro lado, vimos que ao superexpressarmos *Ascl1*+m*Brn2*, houve uma redução no domínio ventral, provavelmente de motoneurônios. A imunomarcação com Islet1, confirma que houve uma redução de aproximadamente 1/3 desse subtipo celular (Fig. 2.6Bd'') quando comparado com o lado contralateral controle (Fig. 2.6Bd').



Figura 2. 6: Coeletroporação de Ascl1 e mBrn2 aumenta a expressão de cScrt2 no domínio dorsal do tubo neural. (Aa) vista dorsal de embrião eletroporado com mAsc/1-GFP (Ac) + FLAG:mBrn2-mRFP (Ad) no lado direito do tubo neural (n=13). (Ab) Corte transversal na altura indicada pela linha tracejada em (Aa) demonstrando aumento da expressão de cScrt2 no domínio dorsal (colchete acima da linha tracejada preta) e redução da espessura do domínio ventral do tubo neural, sem alteração nos níveis de cScrt2 (seta preta). (Ba-g) Imunomarcações para GFP (mAscl1 em verde), FLAG (mBrn2 em vermelho) e marcadores de proliferação e de diversos domínios específicos do tubo neural (magenta). (Ba) imuomarcação para pHH3. (Ba') contagem de células pHH3 positivas no lado esquerdo (Ctrl, cinza escuro) e direito (Ascl1+mBrn2, cinza claro). (Bb) Imunomarcação para BrdU. As caixas tracejadas indicam os dois domínios analisados, dorsal (b') e ventral (b''). A contagem das células BrdU positivas estão nos gráficos (Bb') e (Bb''), para as regiões dorsal e ventral, respectivamente, comparando o lado controle versus experimental. (Bc) imunomarcação para Pax7. A linha tracejada indica o fim do domínio Pax7-positivo e não apresenta alteração entre os lados do tubo neural. (Bd) Imunomarcação para IsletI. As caixas (d') e (d") indicam os domínios IsletI positivos analisados na contagem celular. (d'), controle e (d'') experimental (***p<0,001). (De-g) Imunomarcação para marcadores de diferenciação no eixo centro-periférico. (De) marcação para HuC/D. (Df) marcação para TUJ1. As setas brancas e amarela indicam células eletroporadas com mAscl1 e positivas para cScrt2, mas com ausência de marcação para TUJ1. (Dg) Imunomarcação para NeuN. Todos os embriões foram eletroporados no lado direito do tubo neural. Cada ponto no gráfico indica um corte analisado. Estatística utilizada: teste paramétrico de t de Student pareado (n varia de 3 a 6).

Já nas imunomarcações para HuC/D (Fi. 11Be) e TUJ1 (Fig. 2.6Bf), observamos drástica redução do domínio TUJ1-positivo e leve redução de HuC/D-positivo, principalmente na região ventral do tubo neural. Por outro lado, interessantemente, notamos que algumas células na zona ventricular que coexpressam ambos os fatores expressaram *cScrt2* anormalmente, e não ocorreu expressão anômala de marcadores de diferenciação celular (Fig. 2.6Bf). Em outras palavras, nossos dados sugerem que a superexpressão de ambos *Ascl1* e m*Brn2* promovem a saída do ciclo celular e início de diferenciação, estacionando as células nesse estágio. Estágio esse onde *cScrt2* é expresso. Por fim, observamos aumento no domínio dorsal de células NeuN positivas (Fig. 2.6Bg).

2.3.3 Modulação da expressão gênica por Sox2

Sabe-se que a expressão de *Sox2* ocorre na zona ventricular desde HH13 a HH36 (Uwanoghoa *et al.*,1995; Graham *et al.*,2003), mantendo as células em estado proliferativo (Graham *et al.*,2003). Este campo de expressão se sobrepõe parcialmente entre a periferia da zona ventricular e a margem interna da zona intermediária, zona onde *cScrt2* é expresso. Esta sobreposição de domínios de expressão, em transição de estados celulares, sugere um possível papel na regulação de transição do estado proliferativo para a saída do ciclo celular e início de diferenciação, que pode ser modulada por *Sox2* sobre *cScrt2*. Anteriormente, mencionamos a identificação de sítios para *Sox2* após análise *in silico* para FTs em cE1 e em todos os outros cinco constructos contendo diferentes combinações de trechos de cE1 (C1 a C5). Baseado nessas informações, investigamos a possível modulação de *cScrt2* por *Sox2*.

Primeiramente, realizamos um ensaio de ChIP-qPCR (*Chromatin ImmunoPrecipitation* associado a *quantitative Polimerase Chain Reaction*) para verificar se *Sox2*, de fato, interage com cE1 como predito na análise *in silico*. Nossos dados revelaram que *Sox2* tem quatro vezes mais afinidade com cE1 que outras regiões-controle analisadas (Fig. 2.7A). Dando continuidade na nossa hipótese de regulação de *cScrt2* por *Sox2*, realizamos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Para isso, cotransfectamos um plasmídeo contendo a sequência para *Sox2* juntamente com pGL3-cE1-luciferase e pRL em células HEK293T. Nesta situação, *Sox2* reduziu a transcrição de luciferase mediada cE1, indicando que *Sox2* interage com cE1. Mais uma vez, aqui podemos ter um problema contexto-dependente. Para determinar o efeito de *Sox2*, geramos duas diferentes variações de cE1 com mutações nos sítios de *Sox2* preditos na nossa análise *in silico*:

Sox2-2mut e *Sox2*-19mut. O diferencial entre elas é que usamos dois *thresholds* para identificação dos sítios na plataforma JASPAR. Assim, "*Sox2*-2mut" (Fig. 2.7C) foi gerado pela análise com *threshold* de 80%, identificando e variando apenas 2 sítios para *Sox2* em cE1. Já para "*Sox2*-19mut" (Fig. 2.7D), baixamos o *threshold* para 70%, identificando 19 sítios para *Sox2* que foram, posteriormente, todos mutados. Em seguida, ambos os fragmentos foram inseridos no vetor pTK-mRFP para teste *in vivo* da função de cE1 com a ausência destes sítios para *Sox2*. Esperávamos que caso *Sox2* fosse necessário para modular a atividade transcricional através de cE1, com a ausência dos seus sítio-alvos, não haveria expressão de mRFP mediada por cE1. No entanto, ao contrário do esperado, não houve alteração na atividade do *enhancer*, continuando a ter função sobre mRFP mesmo após ambas as mutações (Fig. 2.7C-D). Aqui, cabe destacar que apesar de ainda em atividade, o padrão de expressão de mRFP de *Sox2*-2mut em HH23 diferiu quando comparado com cE1 (Fig. 1.1Ee*), tornandose mais semelhante a mE1 (Fig. 2.7Ee'), ou seja, com expressão mais acentuada na porção equatorial do tubo neural. Enquanto *Sox2*-19mut manteve seu padrão mais disperso pelo tubo, padrão esse semelhante a USE (Fig. 1.1Dd*).

Em nosso último ensaio, superexpressamos *Sox2* no tubo neural e verificamos o efeito na expressão de *cScrt2* por hibridação *in situ*. O que nossos resultados apresentaram, foi uma redução na expressão de cSrt2. A diminuição ocorreu tanto no domínio ventral, quanto dorsal onde o efeito foi mais marcante, resultando na ausência de expressão de *cScrt2* em uma porção de células (Fig. 2.7E). Dessa forma, demonstramos que apesar de se ligar a cE1, *Sox2* não é um modulador positivo de *cScrt2*, não sendo responsável, portanto, pela possível modulação positiva de *cScrt2* via cE1. Isso não descarta a possibilidade de que possa haver a necessidade de interação com FTs parceiros para que possa regular positivamente, uma vez que foi capaz de reconhecer e se ligar a cE1.



Figura 2. 7: **Atuação de Sox2 sobre cE1 e cScrt2.** (A) Ensaio de ChIP-qPCR com anticorpo para *Sox2* e normalização com IgG (controle). cE1 apresentou enriquecimento de ligação para *Sox2* 4 vezes maior que as regiões controle (Ctrl cromossomo 20, controles negativos Cromossomo 2 neural crest e Cromossomo 2 negativo) (***p<0,001). (B) Ensaio luciferase da ação de *Sox2* sobre cE1 em células HEK293T, com redução de aproximadamente 25% na atividade de luciferase na presença de superexpressão de *Sox2* (**p<0,01). (C-D) cortes transversais de embriões eletroporados com as sequências de cE1 mutadas para *Sox2, Sox2*-2mut (C) e *Sox2*-19mut (D), seguido de imunomarcação para mRFP e GFP. Os losangos vermelhos indicam os sítios de *Sox2* mutados. (E) Vista dorsal de embrião com superexpressão de *Sox2* (n=9) e subsequente corte transversal da região indicada pela linha horizontal tracejada, apresentando redução da expressão de *cScrt2* após hibridação *in situ*. As setas pretas indicam locais com redução de *cScrt2* comparado com o lado contralateral. Todos os embriões foram eletroporados no lado direito do tubo neural. mGFP foi utilizado como controle positivo da eletroporação. Estatística utilizada: teste não paramétrico Mann-Whitney; n varia de 3 a 4 amostras biológicas. Cada amostra biológica foi realizada em triplicatas experimentais.

4 DISCUSSÃO

2.4.1 Modulação de gene repórter por FTs in vitro

Após os testes em células HEK293T, observamos que os dados obtidos para modulação de luciferase mediada por mE1 e cE1 são similares. Em outras palavras, tanto mAscl1, mBrn2 ou ambos os FTs juntos foram capazes de reduzir a expressão de luciferase via mE1 ou cE1. No entanto, quando testamos M1 (com mutações nos *motifs Ascl1/Brn) in vitro*, observamos aumento na atividade de luciferase (Fig. 2.3), efeito oposto ao observado quando testamos M1 no tubo neural sob o controle dos FTs (Fig. 2.4). Uma hipótese sobre nossos dados é de que haja cofatores atuando diferentemente no contexto das células HEK293T comparados ao tubo neural. HEK293T é linhagem renal e possui um proteoma diferente do presente no tubo neural. Após análise dos sítios para FTs presentes em cE1, M1 e M2 na plataforma JASPAR e cruzamento com os dados de gene onthology para desenvolvimento renal e adrenal (Apêndice, Tabela 3), verificamos que cE1 apresenta dois sítios preditos para TCF21. TCF21 é um FT bHLH, assim como Ascl1. Fatores de transcrição desse tipo são capazes de dimerizar com membros da família POU (ex. Brn2/POU3F2; Castro et al., 2006) e com outros FTs bHLH, como Ascl1 (Turner et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que Ascl1 interage com outros membros da família TCF, como TCF3 e 4 (Mishra, 2006; Golla et al., 2014). Isso sugere que células HEK293T podem expressar TCF21 que agiriam em conjunto com Ascl1 e/ou Brn2. No contexto dos nossos resultados, cE1 apresenta sítio-alvo para TCF21, mas M1 não. Portanto, nesta última situação, tanto o aumento em M1 quanto a redução da expressão de luciferase em cE1 seriam artefatos gerados pela presença de TCF21 em HEK293T.

De acordo com Castro e colaboradores (2006), m*Ascl1* é capaz de ativar a transcrição de luciferase sozinho. O mesmo foi demonstrado para m*Brn2*, sugerindo que esse FT possui capacidade de se ligar e ativar fracamente a transcrição quando analisado individualmente. No nosso contexto, a ativação da expressão de luciferase por m*Ascl1* ou m*Brn2* foi observado apenas na construção contendo M1. Este efeito é consistente com a proposta de Castro, uma vez que M1 ainda possui outros sítios individuais para esses FTs. Por apresentar o mesmo efeito tanto em cE1 quanto em M1, é possível que m*Brn2* também tenha esta parceria com TCF21 ou outros FTs com parceria desconhecida. Essa hipótese não descarta a possiblidade de competição por sítios e/ou interação com outros FTs desconhecidos.

Quando deletamos todos os sítios para *Ascl1* em M2, a atividade de luciferase permaneceu igual ao controle, sugerindo fortemente que *Ascl1* reconhece as sequências mutadas.

2.4.2 Modulação de gene repórter por FTs in vivo

No tubo neural, verificamos que em nenhuma das condições testadas (cE1, M1 ou M2) houve modulação de mRFP por m*Brn2* exógeno. De acordo com esses dados, levantamos a possibilidade de que *Brn2* possa precisar de FTs parceiros adicionais para modular a atividade de mRFP, como demonstrado por Castro *et al.*,2006.

Por outro lado, *Ascl1* age sobre cE1 para ativar a expressão de mRFP no tubo neural. As células eletroporadas com m*Ascl1* se encontram na região periférica do tubo neural, e a expressão de mRFP coincide com esta subpopulação celular, sugerindo fortemente que a transcrição de mRFP é dependente da presença exógena de *Ascl1*. A remoção dos *motifs* de heterodimerização *Ascl1/Brn2* em M1 eliminou a sobreposição do sinal de mRFP com as células eletroporadas com *Ascl1*. A expressão de mRFP ficou distribuída homogeneamente em níveis basais no tubo todo. Em conjunto, estes dados indicam que a ação de *Ascl1* sobre a expressão de mRFP depende do *motif* de heterodimerização com *Brn2*.

De fato, como mencionado anteriormente, o sinergismo de *Ascl1* e *Brn2* na expressão de genes-alvo já foi demonstrado em diversos eventos de desenvolvimento neural. Além disto, *Brn2* está presente na zona ventricular e, portanto, disponível como parceiro endógeno mesmo nas condições experimentais onde não o superexpressamos (Liu *et al.*, 2000).

2.4.3 Efeito da superexpressão de Ascl1 e Brn2

Ao superexpressarmos *Ascl1*, observamos que houve redução no domínio de expressão de *cScrt2*. Uma possibilidade é de que *Ascl1* tenha interferido na progressão da neurogênese, mas sem alterar a representação da população *Scrt2*-positiva frente ao total. O deslocamento mais periférico do padrão de expressão de *cScrt2* deve-se à redução na zona do manto, referente às células diferenciadas. Em outras palavras, a superexpressão de *Ascl1* causou uma redução no número de células diferenciadas, mas sem afetar o padrão de expressão de *cScrt2*. Este resultado discorda dos nossos dados anteriores, onde a interação de *Ascl1* com o *motif* de heterodimerização *Ascl1/Brn2* presente em cE1 ativou a transcrição

gênica. Uma hipótese para esta a discrepância é que a expressão de *cScrt2* é modulada por outros elementos regulatórios. A presença ou atividade destes elementos regulatórios – ainda não identificados – dependeria do estado global de diferenciação do tubo neural. *Ascl1* é uma proteína do tipo bHLH, que tem efeitos diversos sobre o desenvolvimento do tubo neural. Resumidamente, *Ascl1* promove a saída do ciclo celular e início da diferenciação neural (Nakada *et al.*,2004; Imayoshi *et al.*,2013), além de ser necessária e suficiente para promover a neurogênese (Bertrand, Castro e Guillemot, 2002). Nos nossos resultados, a diversidade de papéis de *Ascl1* no desenvolvimento do tubo neural está refletida na alteração da morfologia do tubo neural, observada no leve achatamento dorsoventral. Ainda, o domínio IsletI-positivo sofreu deslocamento dorsal, provavelmente devido a mudanças na especificação celular modulada por *Ascl1* em neurônios V2 (Parras *et al.*,2002).

A hipótese alternativa é que os níveis endógenos de *Brn2* são insuficientes para formar os heterodímeros *Ascl1/Brn2* necessários para aumentar a expressão de *Scrt2*. Esta hipótese é adicionalmente sustentada pelos dados de co-eletroporação de *Brn2* com *Ascl1*. Nesta situação, o domínio de expressão de *Scrt2* foi expandida. Porque os níveis endógenos de *Brn2* foram suficientes para cooperar com a expressão de mRFP movida por cE1, mas insuficientes para cooperar com a expressão de *Scrt2*? Primeiramente, a regulação da expressão de *Scrt2* in vivo é mais complexa do que o sistema artificial de expressão de mRFP movida por um fragmento genômico como cE1. Além disto, no ensaio de expressão de mRFP mediada por cE1 foi realizada no estágio HH23, enquanto o ensaio de expressão de mRFP mediada por cE1 foi realizada no estágio HH23. De fato, a extensão do campo de expressão de *Brn2* relativa ao restante do tubo neural reduz com a progressão do desenvolvimento (Liu, 2000). *Brn2* é expresso desde a zona ventricular até a transição para a zona intermediária, sendo responsável pelo egresso do ciclo celular de progenitores neurais, início da diferenciação neural e da migração radial (Liu *et al.*,2000; Tanaka *et al.*,2004; Castro *et al.*,2006). À medida que o tubo neural se desenvolve, a zona ventricular reduz de tamanho.

Finalmente, as alterações na expressão de *cScrt2* também podem ser consequência das demais alterações no tubo neural geradas por *Ascl1* e *Brn2*. Nos embriões eletroporados com *Ascl1+Brn2*, houve aumento da expressão de *cScrt2* na região dorsal, enquanto não houve alteração de *cScrt2* na região ventral do tubo neural.

Possivelmente, a superexpressão de ambos os FTs em conjunto "congelaram" as células em uma fase imediatamente pós-mitótica, que é *Scrt2*-positiva. Isso deve-se à ausência de alteração no perfil proliferativo, observado tanto por pHH3 quanto para BrdU. Além disso, a população TUJ e HuC/D-positivas foram reduzidas e a de NeuN-positivas, aumentada. Como mencionado anteriormente, NeuN está relacionado à neurônios em início de diferenciação. Assim, o aumento de *cScrt2* e a redução nos domínios de células tardiamente diferenciadas sugerem que o aumento de *cScrt2* deve-se ao acúmulo de células em estágio pós-mitótico. Curiosamente, em análise *in silico* para alvos de *Ascl1+Brn2* (Castro *et al.*,2006), foi identificada a fosfatase Cdc25b, relacionada com o ciclo celular. Em *C. elegans*, o homólogo de *Scrt2*, Ces-1 atua no bloqueio da progressão do ciclo celular em progenitores motoneurais pela repressão de Cdc-25.2 (Yan *et al.*,2013). Esse efeito observado em *C.elegans*, pode sugerir que *Ascl1+Brn2* estejam atuando tanto em Cdc25b quanto em *Scrt2*, gerando o efeito observado de saída do ciclo celular e aumento da transcrição de *Scrt2* na região dorsal do tubo neural.

Horton *et al.*,1999 demonstraram que camundongos *knockout* para *Ascl1* apresentam redução na proliferação celular na região ventral do prosencéfalo, sugerindo envolvimento desse FT na proliferação e/ou transição do estado proliferativo para início de diferenciação. De fato, um estudo recente demonstra que *Ascl1* está relacionado com a ativação sequencial de reguladores do ciclo celular, como *Cdk1* e *Cdk2* (Castro *et al.*,2011) responsáveis pela entrada na fase M e transição G1-S do ciclo celular, respectivamente. Esse estudo, realizado no córtex de camundongo, revela um novo papel para *Ascl1* na progressão e manutenção do ciclo celular. Além disso, *Ascl1* também aumenta a expressão do ligante Dll1, que atua na ativação da via Notch em células laterais, mantendo-as em estado proliferativo, e induzindo a diferenciação e migração nas células *Ascl1*-positivas no córtex de camundongos (Henke *et al.*,2009; Shimojo, Ohtsuka e Kageyama, 2011).

CAPÍTULO 3 – Regulação pós-transcricional da expressão de SCRATCH2

1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Regulação pós-transcricional

Um outro mecanismo de regulação de expressão gênica é por meio de micro RNAs (miRNAs). Os miRNAs são uma família de pequenos RNAs fita simples não-codificantes, com aproximadamente de 21 a 26 nucleotídeos e que possuem função regulatória em diversos processos (apoptose e migração), durante o desenvolvimento em doenças como câncer (Sayed e Abdellatif, 2011). Diferentemente dos fatores de transcrição, os miRNAs atuam pós-transcricionalmente impedindo a tradução do mRNA-alvo através da sua hibridação com a porção 3'UTR do mRNA e direcionando este para degradação, ou simplesmente pausando a tradução temporariamente (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; MacFarlane and R. Murphy, 2010). No entanto, já foi relatada a interferência de miRNAs a nível transcricional, atuando em promotores, sequências codificantes e também na região 5'UTR (Kunej *et al.*, 2012). Um exemplo, é a indução da transcrição de E-Caderina (Cdh1) após a ligação de miR-373 em seu promotor em células PC-3 (*Prostate Câncer*) (Place *et al.*, 2008).

Assim como para regiões codificantes, os genes dos miRNAs possuem promotores próprios ou podem compartilhar promotores gênicos por estarem localizados em introns gênicos. Além disso, também são transcritos pela RNA polimerase II (Lee *et al.*,2004) e possuem modificações pós-transcricionais como 5'CAP e poliadenilação na extremidade 3' (Cai, Hagedorn e Cullen, 2004).

Inicialmente, os miRNAs são transcritos longos, variando de 60 a mais de 1000 bp em alguns casos, e são chamados de miRNA primário (pri-miRNA) (Kim, 2005). Logo são clivados por um complexo enzimático nuclear, o Drosha/DGCR8 (Zhao *et al.*,2010), reduzindo seu tamanho e liberando o pre-miRNA. Depois de seu transporte para o citoplasma através da proteína exportina 5, o pre-miRNA é processado para seu estado maduro, o miRNA, através da enzima Dicer. Ao final, para que sua função seja exercida, o miRNA é incorporado ao *RNAinduced silencing complex* (RISC), formado pelas proteínas Dicer, TRBP, e Argonauta 2, para atuar diretamente na repressão da tradução (Zhao *et al.*,2010).

O silenciamento gênico por mecanismos de splicing alternativo tem emergido à medida que novos alvos e miRNAs têm sido descobertos. Isso deve-se ao fato de esse tipo de mecanismo poder adicionar ou remover da 3'UTR, sítios-alvo para miRNAs. De fato, um estudo cruzou dados de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de diferentes tecidos humanos com dados transcriptômicos e análises da porção 3'UTR de diferentes isoformas de transcritos com as mesmas informações na linhagem celular HeLa, pois sabia-se que miR-1 e -124 atuavam como repressores de alguns alvos nesse contexto. O estudo revelou que as isoformas que continham sítios-alvo para os miRNAs -1 e -124 e que eram expressas em HeLa, tinham níveis baixos de expressão, ao contrário do que foi encontrado em outros tecidos que expressavam as mesmas isoformas e que não possuíam miR-1 e -124. Contrariamente, também foram observadas isoformas que não possuíam sítios para miR-1 e -124, que tinham altos níveis de expressão em tecidos negativos para esses miRNAs (Legendre et al., 2006). Além disso, um outro estudo demonstrou que a variabilidade de isoformas com diferenças entre as porções 3'UTR em pacientes com câncer de bexiga sugere mecanismos alterativos de regulação e adaptação para o desenvolvimento da doença por meio de splicing alternativo e deleção de sítios regulados por miRNAs, uma vez que os níveis de expressão gênica não foram alterados (Han et al., 2018). Assim, faz-se necessária a investigação de isoformas e de suas UTRs em busca de mecanismos de regulação pós-transcricionais que estejam atuando nesses casos, como um futuro meio de diagnóstico e guia para tratamento. Assim, nota-se que a regulação pós-transcricional é um mecanismo dinâmico, modulado pela presença de sítios para miRNAs e que alterações na 3'UTR pode desencadear em vias alternativas de regulação.

Por fim, foi visto que o miR-148 é capaz de reprimir a expressão do gene DNMT3b (*DNA metiltransferase 3b*) por meio de ligação à sua sequência codificante em diversas linhagens de células humanas. Além disso, o gene dessa proteína é capaz de gerar 4 isoformas, sendo que uma delas, a DNMT3b3, não possui sítios de ligação para miR-148, resultando em um mRNA resistente à regulação pós-transcricional (Duursma *et al.*,2008). Por ser um gene evolutivamente conservado, sugere-se que o mesmo mecanismo possa ocorrer em outras espécies e que possa haver vias de regulação intrincadas (epigenética e pós-transcricional).

3.1.2 Papel de miRNAs na regulação neural

Diversos estudos nos variados modelos tem sido realizados a fim de se investigar mais profundamente os mecanismos de regulação pós-transcricional por miRNAs, inclusive em galinhas (Darnell *et al.*,2006; Glazov *et al.*,2008; Rathjen *et al.*,2009; Feng *et al.*,2014; Bhattacharya *et al.*,2018).

Foi visto que miR-125b atua diretamente no mRNA de Sema4D (Semaphorin-4D), tanto em salamandras quanto camundongos, e que níveis precisos de miR-125b são essenciais na recuperação de lesão pós-traumática da espinha dorsal (Diaz Quiroz *et al.*,2014). Outro mecanismo é o envolvimento da via Wnt na expressão de Lin28a e, consequentemente, do miRNA let-7, que também é repressor de Lin28a. Esse *loop* de interregulação ocorre na região dorsal do tubo neural. Uma vez que as células iniciam o processo de delaminação e distanciam-se do tubo neural (a fonte de Wnt), os níveis de Lin28a reduzem, resultando em altos níveis de let-7 e, consequentemente, reprimindo a expressão de genes responsáveis pela identidade multipotente das células da crista neural (Bhattacharya *et al.*,2018).

Associado a outra via bastante conhecida, foi observado que há a o aumento da transição epitélio-mesenquimal (TEM) pela expressão de Snail2 induzida pela via TGF-β e, consequentemente, pela repressão de miR-203 pela ligação de Snail2 em seu promotor. miR-203 também reconhece Snail2, reprimindo sua expressão e gerando um *feedback* negativo duplo entre essas duas moléculas e controlando a TEM (Ding *et al.*,2013).

Aqui, devido à presença de sítios de reconhecimento para miRNAs na 3'UTR de *cScrt2*, buscamos entender se esse FT sofre regulação pós-transcricional mediada por miRNAs no tubo neural.

2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Análise in silico

A análise *in silico* para sítios -alvo de miRNA na porção 3'UTR de *Scrt2* foi realizada na plataforma online TargetScan Human (<u>http://www.targetscan.org</u> (versão 7.1, 2016; Agarwal *et al.*,2015) e utilizando a 3'UTR de *Scrt2* humano contida no banco de dados da plataforma, como referência de comparação. Em seguida, buscamos pelo padrão de expressão dos miRNAs identificados no banco de dados GEISHA (*Gallus* Expression *In situ* Hybridization Analysis, Darnell *et al.*,2007) para verificar se eram expressos no tubo neural e se seriam complementares a *cScrt2* em algum domínio do tubo neural.

A análise da porção 3'UTR de *cScrt2* para proteínas que reconhecem mRNA, foi realizada na plataforma Scan for *Motifs* (<u>http://bioanalysis.otago.ac.nz/sfm/sfm_main.pl;</u> Biswas e Brown, 2014), informando a referida sequência e matrizes com E-value ≤ 0.175.

3.2.2 Clonagem

Para os ensaios de luciferase, primeiramente fusionamos a porção 3'UTR de *cScrt2* com luciferase. Brevemente, clonamos por PCR a porção 3'UTR de *cScrt2* com os primers disponíveis na tabela 3.1 a partir de cDNA de embrião em HH23, e a inserimos no vetor pmiR-GLO (Promega) nos sítios de restrição para XhoI e XbaI.

Nome	Sequência
<i>cScrt2</i> -3'UTR-F	5' CTCGAGACCGGAGGCGGATCGCCGTGC
cScrt2-3'UTR-R	5' TCTAGATAGTGGCAGAAGTCCCTTTTATA

Tabela 3. 1: Primers utilizados para clonagem da região 3'UTR de cScrt2. Exxtend (Campinas, SP, Brasil).

As esponjas para miRNAs foram sintetizados (GenScript, EUA, <u>https://www.genscript.com/</u>) contendo os sítios para Xbal e Pmel. As sequências das esponjas estão demonstradas na Tabela 3.2. Posteriormente, as subclonamos no vetor pRNA-U6.1 (Addgene #35664).

Tabela 3. 2: Sequência das "esponjas" para miR-125b e -200b, sintetizada para teste in vivo.

Nome	Sequência
miR-125b-	TCACAAGTTACCACTCAGGGACGATTCACAAGTTACCACTCAGGGAA
Sponge	CCGGT <u>TCACAAGTTACCAC</u> TCAGGGATCAC <u>TCACAAGTTACCAC</u> TCAG
	GGA<u>TCACAAGTTACCAC</u>CGATTCAGGGACGATTAG
miR-200b-	TCACAAGTTACCACCAGTATTACGATTCACAAGTTACCACCAGTATTA
Sponge	ACCGGT <u>TCACAAGTTACCAC</u> CAGTATTATCAC <u>TCACAAGTTACCAC</u> CA
	GTATTA<u>TCACAAGTTACCAC</u>CGATCAGTATTACGATTAG

Os guias controle (scrambled e UTR1) e experimental (UTR2) para ensaio de CRISPR/Cas9 foram sintetizados (Tabela 3.3) e clonados no vetor pcU6.3-sgRNA como descrito no Capítulo 1 (1.3.5).

Tabela 3. 3: oligonucleotídeos utilizados como guia para deleção de alvos de miRNA na porção 3'UTR de *cScrt2* pelo método CRISPR/Cas9. Exxtend (Campinas, SP, Brasil).

Nome	Sequência
3'UTR sgRNA1-F	5' AGTCGCAGCCGCCGGGACACGGATG
3'UTR sgRNA1-R	5' AAACCATCCGTGTCCCGGCGGCTGC
3'UTR sgRNA2-F	5' AGTCGTGCAATTCAGGGATATAAAA
3'UTR sgRNA2-R	5' AAACTTTTATATCCCTGAATTGCAC
3'UTR sgRNA2 Scrambled-F	5' AGTCGGCAGGAATCAATTAGATAAT
3'UTR sgRNA2 Scrambled-R	5' AAACATTATCTAATTGATTCCTGCC

3.2.3 Eletroporação in ovo

Para os ensaios de superexpressão de miRNAs, diluímos os *mimics* (estoque 100 μ M; miRVANA hsa-miR-125b-5p, Thermo-Fisher, cat. #MC10148 e miRvana gga-miR-200b-3p, Thermo-Fisher, cat. #MC10501) em 1:5 de Tris 10mM, pH8, aquecemos a 94 °C por 1 min, deixando resfriar na bancada. Em seguida, adicionamos 2,5 μ g/ μ L de mGFP e FastGreen 1% para volume final de 10 μ L.

Nos ensaios de redução dos níveis de miRNAs no tubo neural, eletroporamos os vetores pRNA-U6.1-miR125b-Sponge ou -200b-Sponge + mGFP no lado direito do tubo neural, como descrito anteriormente. Para os ensaios com CRISPR/Cas9, utilizamos os vetores pCAG-Cas9:2A:Citrine e pcU6.3-sgRNA. Os vetores contendo os sgRNAs para a região 3'UTR de *cScrt2* (sgRNA1 e 2) ou a versão *scrambled* (controle) desses guias, foi coeletroporado com pCAG-Cas9:2A:Citrine. Os parâmetros de eletroporação estão descritos no Capítulo 1 (1.3.6).

3.2.42 RT-qPCR

Para quantificação de miRNAs e *cScrt2*, coletamos a porção truncal de três embriões nos estágios HH15, 18, 22 e 30. As amostras foram dissecadas e homogeneizadas juntas em TRIzol (Invitrogen). O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese de cDNA de miRNAs, utilizamos o kit Taqman miRNA Assay (Applied Biosystems) contendo primers específicos para a transcrição reversa dos miR-9, -125b e -200b. Utilizamos sondas Taqman (Taqman miRNA Assay; Applied Biosystems) para detecção de hsa-miR-9 (ID 000583), hsa-miR-125b (ID 000449) e gga-miR-200b (ID 006005), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata experimental para cada uma das amostras. Utilizamos o equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) acoplado ao software StepOne v2.3.

Para quantificação de *cScrt2*, sintetizamos o cDNA a partir das amostras mencionadas acima utilizando a enzima SuperScript IV (Invitrogen), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata experimental, com n de 3, utilizando Power SyBr Green no mesmo equipamento descrito anteriormente. Os primers utilizados estão listados no Capítulo 1 (Tabela 1.4). O método de análise utilizado foi 2^{-ΔΔCt}.

Na quantificação de *cScrt2* após interferência por CRISPR/Cas9, os lados do tubo neural foram coletados separadamente e as células Citrine positivas foram selecionadas por FACS no lado experimental. As células do lado controle foram separadas randomicamente para o mesmo número de células positivas do lado contralateral. O ensaio foi realizado em triplicata no equipamento ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com os mesmos primers descritos no Capítulo 1 (Tabela 1.4).

3.2.5 Hibridação in situ

Desenvolvido de acordo com a descrição no Capítulo 1.

3.2.6 Imunohistoquímica

A coleta e processamento dos embriões foi realizada de acordo com o descrito anteriormente. O anticorpo primário foi rabbit anti-GFP IgG (diluição 1:200, Molecular Probes, cat. A-6455) e secundário Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (diluição 1:500, Molecular Probes, cat. A-11008)

3.2.7 Ensaio Luciferase

Os embriões foram coeletroporados no lado direito do tubo neural com os vetores pmiR-GLO vazio (controle) ou pmiR-GLO-*cScrt2*-3'UTR + mGFP em HH11-12. Após 48 horas, os embriões em HH23 foram coletados e o lado eletroporado do tubo neural foi dissecado em Ringers. Foram coletados 3 tubos controle e 3 experimentais, pareados quanto a extensão e intensidade de eletroporação de mGFP. Posteriormente, o tubo foi lisado em tampão de lise 1x, próprio do kit de luciferase (kit descrito anteriormente). As amostras foram analisadas quanto a atividade da luciferase como descrito no Capítulo 2 (2.3.6) e cada amostra biológica em triplicata experimental.

3.2.8 Validação de edição por CRISPR/Cas9

Após eletroporação com Cas9+UTR-sgRNA2, o lado eletroporado do tubo neural foi dissecado e dissociado como descrito anteriormente. Em seguida, realizamos FACS para selecionar as células Citrine positivas. O DNA genômico foi extraído utilizando TRIzol (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante. Realizamos PCR utilizando primers flanqueando a região editada (F – 5' ACCGGAGGCGGATCGCCGTGC e R – 5' CCACCGCCGCGTGCACAAACA) e clonamos o fragmento-alvo no vetor pGEM-T (Promega). Foram sequenciados, por sequenciamento Sanger, 52 clones para verificação da região editada.

Os dados foram analisados e as sequências alinhadas no software UniPro uGene (v1.29.0) com a ferramenta Clustal W.

3.2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 7 e usado o teste t de Student não-pareado para dados paramétricos.

3 RESULTADOS

3.3.1 Análise in silico

Assim, nosso primeiro passo foi identificar possíveis sítios de ligação para miRNAs por análise *in silico* da região 3'-UTR de *cScrt2*. Nossos resultados revelaram sítios potencialmente reconhecidos por cinco miRNAs: miR-200b-3p, miR-429-3p, miR-204, miR-211 e miR-125-5p (Fig. 3.1A). Após, buscamos na literatura e bancos de dados (Bell, Yatskievych e Antin, 2004; Darnell *et al.*,2007); *GEISHA* – <u>www.geisha.arizona.edu/</u>) informações sobre o padrão destes miRNAs no tubo neural embrionário, e apenas miR-200b e miR-12b5 eram expressos neste tecido (Fig. 3.1B). Os outros três são expressos na vesícula optica. Interessantemente, o padrão de expressão demonstrado no banco de dados GEISHA para ambos os miRNAs é complementar ao de *cScrt2* (Fig. 3.1CB), ou seja, enquanto *cScrt2* é expresso na zona intermediária do tubo neural, miR-125 e -200b são expressos tanto na zona ventricular quanto do manto. Dessa forma, esses dados sugerem uma possível regulação, pois a atividade de miRNAs sobre mRNAs-alvos é a degradação, logo, não espera-se sobreposição de padrão de expressão entre determinado miRNA e seu alvo. Por fim, a sequência *seed* para miR-200b é GUCAUAAU (Fig. 3.1C) e está localizada aos 473nt após o códon de parada de *cScrt2*, enquanto o seed de miR-125b ocorre aos 494nt, com a sequência AGUCCCU (Fig. 3.1C).



Figura 3. 1: Análise in silico para miRNAs. (A) resultado obtido após inserir ao gene "Scrt2" para análise na plataforma TargetScan (<u>http://www.targetscan.org</u>), demonstrando a conservação de sítios de miRNAs na porção 3'UTR de Scrt2 em vários organismos. Embaixo, está a legenda para os sítios de miR-200b/429 (roxo), miR-124=5b/351 (azul claro) e miR-204/211 (vermelho). (B) modelo de corte transversal do tubo neural em HH23 demonstrando os subdomínios centro-periféricos do tubo neural. V, ventrículo; zv, zona ventricular; zm, zona do manto. Em marrom, entre a zv e zm está a zona intermediáreia, local de expressão de Scrt2. Em seguida, está o padrão de expressão dos miR-125, -200b (obtidos no banco de dados *GEISHA*) e cSrt2, sendo complementar ao dos miRNAs. (C) Esquema do *locus* gênico de *cScrt2* apresentando a localização dos sítios de miRNAs na porção 3'UTR.

3.3.2 Expressão gênica no tubo neural

Para complementar a informação sobre a expressão de miR-125b e -200b relatado na base de dados de expressão gênica GEISHA, dissecamos tubos neurais em diferentes estágios de desenvolvimento: HH15, HH18, HH22 e HH30 (Hambuger and Hamilton, 1951), extraímos o RNA total e realizamos RT-qPCR para miR-125b, -200b e *Scrt2* em cada um dos estágios.

O padrão de expressão temporal de miR-125b, -200b e *cScrt2* também se complementam. A expressão dos miRNAs -125 e -200b é maior nos estágios mais precoces e reduz em estágios mais tardios (Fig. 3.2A-B) do desenvolvimento. Em contrapartida, os níveis de expressão de *cScrt2* se apresentam inversos: a presença é baixa em HH15 e triplica em HH18, dobrando em HH22 e aumentando progressivamente (Fig. 3.2C). Ou seja, quando a

expressão dos miRNAs decai a de *cScrt2* aumenta. Por fim, no estágio HH30, onde temos um maior número de células pós-mitóticas, observamos uma maior taxa de expressão de *cScrt2*, enquanto as de miRNAs está bastante reduzida.



Figura 3. 2: Quantificação de expressão de miR-125b, 200b e *cScrt2*, e modulação de 3'UTR *in vivo*. (A-B) Quantificação dos níveis de expressão de (A) miR-125b e (B) miR-200b no tubo neural dissecado de embriões em HH15, HH18, HH22 e HH30. (C) As mesmas amostras foram utilizadas para quantificação de *cScrt2* no tubo neural. (D) modulação de luciferase pela porção 3'UTR de *cScrt2* (UTR) após eletroporação *in embrio* e detecção da luminescência emitida pela luciferase. Para esse ensaio utilizamos 3 tubos neurais com a porção eletroporada dissecada para cada condição e a detecção foi realizada em triplicata experimental. pmiR-GLO vazio foi usado como controle (GloV).

Para testarmos a possível funcionalidade da região 3'UTR de *cScrt2*, clonamos esta sequência no vetor pmiR-Glo. Neste sistema experimental, a 3'UTR é inserida após o término da região codificante de luciferase. Caso a 3'UTR fosse funcional, seria reconhecida por miRNAs nas sequências-alvo preditas, reduzindo os níveis de expressão de luciferase, o que é indiretamente avaliado pela sua atividade enzimática. Para manter o contexto real de expressão de *cScrt2*, eletroporamos pmiR-Glo-3'UTR (ou pmiR-GLO vazio) + mGFP no tubo neural. Em seguida, após atingir o estágio HH23, os embriões tiveram o tubo neural eletroporado dissecado e suas células lisadas para detecção da luminescência emitida pela expressão da luciferase. Nossos resultados demonstram que a presença da 3'UTR reduz a atividade de luciferase em mais de 50% (p<0,05) (Fig. 3.2D) quando comparado com o controle. Este dado sugere que a porção 3'UTR de *cScrt2* pode modular a expressão de *cScrt2* por mecanismos pós-transcricionais no tubo neural.

3.3.3 Superexpressão de miRNAs no tubo neural

Posteriormente, testamos o efeito desses miRNAs na modulação da expressão de *cScrt2* no tubo neural. Para isto, coeletroporamos miRNA *mimics* no tubo neural associado a

um vetor plasmidial controle (mGFP ou mCherry) para controle da eficácia de eletroporação. Posteriormente, verificamos as variações na expressão de *cScrt2* por hibridação *in situ*.

Considerando que *cScrt2* endógeno possui sítios previstos para miR-125b e -200b, esperávamos que um ou ambos os miRNAs causaria a redução da expressão de *cScrt2 in vivo*. Mas, ao contrário do esperado, notamos que os níveis de *cScrt2* aumentaram tanto nos embriões eletroporados com miR-125b mimics (Fig. 3.3A-a'), quanto com -200b (Fig. 3.3B-b). O aumento da expressão de *cScrt2* ocorre principalmente na região dorsal (Fig. 3.3a-b), em GRD (Fig. 3.3a-b) e também em pontos variados do eixo dorsoventral do tubo neural (Fig. 3.3a').



Figura 3. 3: Superexpressão de miRNAs altera expressão de *cScrt2 in vivo*. (A) Superexpressão de miR-125b e de (B) miR-200b no tubo neural. Todos os embriões foram eletroporados no lado direito. A linha branca tracejada indica a altura dos cortes (a), (a') e (b). O *inset* e a seta preta indicam o aumento de *cScrt2* no GRD em (A e Aa') e (Bb). A seta branca (Aa) indica aumento de *cScrt2* no domínio dorsal do tubo neural. Para miR-125 o n é de 18 de 17 para miR-200b.

3.3.4 Modulação por inibição da ação de miRNAs no tubo neural

Em contraste com a superexpressão dos miRNAs *in vivo*, outra análise funcional do papel de miRNAs -125b e -200b na regulação de *cScrt2* foi pela redução da disponibilidade destes miRNAs. Para isto, utilizamos esponjas para miRNA (Ebert, Neilson e Sharp, 2007).

Resumidamente, a estratégia é baseada em um vetor contendo uma sequência que, quando transcrita sob o controle do promotor U6, produz um RNA com 7 sequências *seed* em *tandem* para o miRNA de interesse separadas por algumas bases (Ebert, Neilson e Sharp, 2007). Este transcrito atua como uma esponja, sequestrando os miRNAs que reconhecem o *seed* inserido e, consequentemente, impedindo-os de se ligar a seus alvos endógenos. Dessa forma, testamos as esponjas para os miRNAs -125b e -200b individualmente por meio de coeletroporação com mGFP no tubo neural, do mesmo modo descrito anteriormente. Da mesma forma que o que observamos no ensaio de superexpressão, houve um aumento na expressão de *cScrt2* em ambas as condições (Fig. 3.4A-B).

Dada a complexidade de ações previstas para os miRNAs (modulação de diversos transcritos-alvo simultaneamente), seguimos com um experimento mais direto em relação ao *cScrt2*: a eliminação dos sítios-alvo de miRNAs na região 3´UTR de *cScrt2*. Para isto, utilizamos os mesmos vetores CRISPR/Cas9 descritos no capítulo 1 para realizar a edição genômica na porção 3'UTR de cScrt2. Desenhamos dois sgRNAs: um localizado mais a jusante (sgRNA1, controle 1), no nucleotídeo 32 da 3'UTR, enquanto o sgRNA2 estava localizado no nucleotídeo 489, sobrepondo-se ao seed do miR-125b (Fig. 3.4C). Baseado na nossa hipótese, a previsão seria de que a ação de Cas9 eliminaria os sítios-alvo dos miRNAs, causando um aumento nos níveis de mRNA de *cScrt2*. Contudo, devido à proximidade do sgRNAs e as possíveis variações na extensão de indel mediada por Cas9 (Williams et al., 2018), esperávamos também que pudesse haver bastante variação experimental. Após eletroporação de Cas9-2A-GFP + sgRNA1 e hibridação *in situ* para cScrt2, observamos que houve uma pequena variação nos níveis de cScrt2 (Fig. 3.4D) tanto macroscopicamente quanto em cortes transversais. Para confirmar isto de forma quantitativa, dissecamos o tubo neural de embriões eletroporados e realizamos dissociação, seleção de células eletroporadas por FACS e qPCR (descrito anteriormente) para detecção dos níveis de cScrt2, utilizando o lado contralateral como controle (Fig. 3.4E). Este procedimento foi realizado com quatro embriões diferentes, e foi possível verificar que 50% deles apresentaram aumento nos níveis de cScrt2, enquanto os outros 50% apresentaram redução quando comparados com o lado controle (Fig. 3.4E).

Em contraste, todos os embriões eletroporados com sgRNA2 apresentaram aumento de *cScrt2* no lado experimental do tubo neural, mais precisamente no domínio dorsal e não havendo modificação do domínio ventral (Fig. 3.4F) quando comparado tanto com o lado contralateral quanto com os embriões controle (Fig. 3.4H). Os embriões-controle foram eletroporados com UTR2-sgRNA-Scrambled, que é uma sequência randômica de UTR2sgRNA. Do mesmo modo, realizamos qPCR em tubos neurais dissecados pós eletroporação com sgRNA2. É possível verificar que em todas as amostras (n=7) houve aumento nos níveis de *cScrt2* como esperado (Fig. 3.4G) e, sugerindo que este ou ambos os sítios são potenciais alvos de miRNA e necessários para a regulação pós- transcricional de *cScrt2*.



Figura 3. 4: Modulação de cScrt2 por inibição da atividade de miRNAs por esponjas e CRISPR/Cas9. Embrião eletroporado com (A) esponja com seed para miR-125b (n=12) e (B) miR-200b (n=11). A linha branca tracejada indica a altura do corte transversal. As setas azuis e brancas em (A) e (B) indicam o aumento de expressão de cScrt2 nos GRDs e no tubo neural, respectivamente. (C) esquema da 3'UTR de cScrt2 indicando a localização dos guias sgRNA1 (cilindro vermelho; controlei Alinemir) e sgRNA2 (cilindro azul claro). Os nucleotídeos em vermelho indicam a seguência PAM. Os círculos verde e amarelo indicam os sítios de reconhecimento para os miR-200b e -125b, respectivamente. As setas azul-escuro indicam a posição dos primers utilizados para PCR e clonagem da 3'UTR e, posterior sequenciamento. Embrião eletroporado com (D) Cas9+sgRNA1, não apresentando alteração nos níveis de cScrt2, tanto macro quanto microscopicamente (n=16). Em (E), RTqPCR para cScrt2 em tubo neural dissecado de 4 diferentes embriões após eletroporação com sgRNA1. (F) embrião eletroporado com Cas9-sgRNA2. A seta azul indica o aumento de cScrt2 observado no domínio dorsal do tubo neural (n=15). (G) RT-qPCR para cScrt2 em tubo neural dissecado de 7 embriões diferentes após eletroporação com sgRNA2. * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001. (H) embrião eletroporado com Cas9-sgRNA2 scrambled (n=3). A imunodetecção para GFP indica as células positivas para Cas9. (I) alinhamento da região terminal da 3'UTR de cScrt2 onde era prevista a edição (433-521 nt) após eletroporação por CRISPR/Cas9+sgRNA2. WT, wild type (3'UTR de cScrt2 controle); C1 a C17 são os diferentes clones sequenciados. A caixas preta e vermelha indicam os seeds dos miR-200b e -125b, respectivamente. (J) análise para sítios de ligação para RBPs e regiões sinalizadoras referente aos nucleotídeos 433 a 521 da 3'UTR de cScrt2. Caixa verde tracejada em verde, sítio para Elav1; Caixa verde tracejada em preto, sítio para Elav2; Caixa verde escuro tracejada em azul, sítio para Pum2; Caixa verde claro tracejada em rosa, sítio para SNRPA; e Caixa amarela, região sinalizadora de poliadenilação.

Para verificar se: a) as oscilações de resultados de qPCR são causadas por variação de extensão de *indels* e b) se ocorreu edição genômica de fato, extraímos o DNA genômico do lado experimental do tubo neural de embriões eletroporados com sgRNA2, e realizamos PCR para amplificação da região editada. O fragmento foi posteriormente clonado no vetor pGEM-T e 52 colônias foram sequenciadas (Gandhi *et al.*,2017). Dessas, algumas não foram editadas para a região-alvo, outras variaram na extensão de *indels*, e ainda encontramos clones com sítios não alterados. A razão da variabilidade encontrada em nossas amostras é que a eletroporaçao em embrião de galinha causa uma edição em mosaico, e a edição por *indel* oscila na extensão da sua cobertura, ou seja, nem todas as células foram eletroporadas e nas que receberam a Cas9 a edição varia em extensão. Dessa forma, apresentamos as variações encontradas, sem representar suas frequências de ocorrência (Fig. 3.41). Algumas edições foram desde deleções de algumas bases próximas ao sítio de miR-125b, não atingindo o *seed*. Em outras, a deleção foi de aproximadamente 80 bases, excluindo tanto o sítio para miR-125b quanto para -200b (Fig. 3.41).

Por fim. analisamos na plataforma Scan For Motifs (http://bioanalysis.otago.ac.nz/sfm/sfm main.pl; Biswas and Brown, 2014), se a região 3'UTR selvagem de cScrt2 possuía sítios regulatórios para estabilidade e atividade do transcrito. Verificamos que apesar de todos os clones apresentarem deleção de parte do sinal de poliadenilação (PAS) contido no mRNA (Fig. 3.4I-J), os níveis de expressão de cScrt2 aumentaram. Ainda, alguns domínios para proteínas ligantes de RNA (RBP) também foram identificados (Fig. 3.4J) e estavam editados em alguns clones analisados (Fig. 3.4I). Usualmente, estas proteínas estão associadas ao aumento da estabilidade e meia-vida do mRNA ao qual estão ligadas. Assim, nossos dados sugerem duas hipóteses: 1) a interferência nos sítios preditos para regulação da atividade e estabilidade de mRNA não se sobrepujaram a ausência dos sítios-alvos dos miRNAs; ou 2) cScrt2 pode sofrer splicing alternativo após a perda dessa porção terminal, obtendo novo sinal de poliadenilação e sítios para outras RBP. No entanto, isoformas alternativas de Scrt2 ainda não foram observadas.

4 DISCUSSÃO

3.4.1 Efeito da modulação de miRNAs sobre cScrt2

De acordo com nossos dados, a superexpressão tanto de miR-125b guanto -200b, aumentou a expressão de cScrt2 (Fig. 3.3A-B), resultado esse contrário ao esperado. Por outro lado, após a interferência com a "esponja" para ambos os miRNAs, houve um aumento de cScrt2, o que foi de acordo com o esperado. Uma hipótese para o aumento da expressão de cScrt2 quando submetido à superexpressão de miRNAs, é o fato de que células que não expressam esses miRNAs endogenamente passaram a apresentar essa molécula. Contrariamente, a atuação de depleção da atividade de miRNAs pelas esponjas, só acontece nas células em que haja a expressão dos miRNAs em questão. Em outras palavras, a atividade de retirada de miRNAs do citoplasma por esponjas, só ocorre naquelas que possuírem o miRNA endogenamente. A presença de ambos os miRNAs em células que não os expressam endogenamente, pode ter interferido na cascata molecular do tubo neural, inibindo genesalvo em contexto espaçotemporal diferente do endógeno e, consequentemente, modificando a cascata gênica. Como dito anteriormente, os miRNAs comumente possuem diversos alvos, o que pode acarretar na alteração de vias moleculares ainda desconhecidas. Essa observação dos nossos dados, sugere que a superexpressão de miR-125b tenha acelerado a saída do ciclo celular, ou seja, mais precocemente. A razão para isso, é que é possível observar aumento de expressão de cScrt2 e também a presença de células localizadas em diferentes domínios do eixo centro-periférico do tubo neural expressando *cScrt2*, fato que ocorre apenas em células da recém-egressas do ciclo celular e em início de diferenciação. De fato, já foi visto que miR-200b regula o crescimento celular, saída do ciclo celular e diferenciação de células cardíacas por modular GATA-4 e Ciclina-D1 (Yao *et al.*,2013). Além disso, a superexpressão de miR-125b em células-tronco neurais de camundongos inibe o gene Nestina, reduzindo a proliferação e aumentando os processos de diferenciação e migração (Cui et al., 2012).

Em contraste, tanto a esponja quanto a superexpressão de ambos os miRNAs provocaram o aumento na expressão de *cScrt2* no GRD. É possível que os níveis aumentados de *cScrt2* nessa estrutura tenham sido gerados após a eletroporação do tubo neural. Na região dorsal do tubo neural estão localizadas células da crista neural, que migram em uma onda de migração lateral na região truncal (~HH15) para formar os GRD (Giovannone *et al.*,2015).

Antes da migração das células da crista neural, é possível que tenha ocorrido a repressão de um inibidor de *cScrt2*, ativando a expressão precoce e/ou exarcebada de *cScrt2* no GRDs.

De fato, miR-125b está relacionado com a promoção da saída do estado proliferativo para progenitores neurais, por inibição de SMAD4, um forte promotor da manutenção do estado proliferativo (Boissart *et al.*,2012). Além disso, miR-125b atua na inibição da apoptose, reprimindo o gene *Puma* em células da crista neural (Chen *et al.*,2015). Já miR-200b, atua na via de BMP, modulando a expressão de Zeb1 e Zeb2 durante a formação do palato (Shin *et al.*,2012). Da mesma forma, também foi visto que ZEB e miR-200b controlam-se reciprocamente em células hESCs (*human Embryonic Stem Cells*). Quando os níveis de miR-200b estão altos, há redução do processo de indução neural por aumento de BMP devido à redução de ZEB (Du *et al.*,2013). No sistema nervoso anterior, miR-200b atua na maturação de neurônios olfatórios (Choi *et al.*,2008). Em um outro estudo realizado em *Danio rerio*, foi visto que *Scrt2* evita o reingresso de células neurais pós-mitóticas no ciclo celular ao se ligar ao promotor de miR-25, reprimindo sua expressão (Rodríguez-Aznar, Barrallo-Gimeno e Nieto, 2013). A redução dos níveis de miR-25 permite a tradução de *p57*, uma proteína envolvida na inibição do ciclo celular (Rodríguez-Aznar, Barrallo-Gimeno e Nieto, 2013). Isso sugere que tanto *Scrt2* seria capaz de regular a atividade de miRNAs quanto ser regulado.

Recentemente, um estudo demonstrou que a deleção genômica de um elemento inibidor contido na 3'UTR de membros da família de citocinas CXCL em células BEAS-2B (*human bronchial epithelial cells*) pelo método CRISPR/Cas9, levou ao aumento de expressão dessas citocinas (Zhao *et al.*,2017). Um outro trabalho, ainda mais recente, utilizou-se da mesma técnica para demonstrar que a deleção da isoforma da 3'UTR longa do gene Calm1 (*Calmodulina 1*) em GRD de camundongos transgênicos desencadeia problemas no desenvolvimento dos GRDs (Gruner *et al.*,2019), sugerindo um possível papel no desenvolvimento neural.

As regiões 3'UTRs possuem diversos elementos em sua extensão, permitindo o mRNA ser controlado pela ligação de proteínas e outras moléculas em regiões como AREs (AU-rich Elements), Pumilio, ELAVLs e miRNAs, que modulam a estabilidade e tradução desses mRNAs. Após análise da 3'UTR de *cScrt2*, verificamos a presença de *motifs* de ligação para ELAVL1, ELAVL2, Pum2 e SNRPA. Já foi relatado o envolvimento de Pum2 no sistema nervoso de *C. elegans* (Kaye *et al.*,2009), *Drosophila* (Ye *et al.*,2004), zebrafish (Wang *et al.*,2012) e

134

camundongos (Siemen *et al.*,2011), controlando o comportamento, crescimento axonal, ativação da tradução e migração de células da crista neural. Já ELAVL1, atua na regulação da proliferação de progenitores neurais por se ligar a miR-9 para aumentar a expressão de TLX (Orphan Nuclear Receptor) (Shibata *et al.*,2011). Além disso, devido à interação de miR-9 com ELAVL1, miR-9 compete com ELAVL2 por alvos em mRNAs (Shibata *et al.*,2011). Foi visto também, que a superexpressão de ELAVL2 promove a diferenciação neural no sistema nervoso periférico em camundongos (Akamatsu *et al.*,1999). Assim, é possível observar que a 3'UTR é passível de ser regulada por inúmeras proteínas.

Além disso, como esperado, havia a presença do PAS (*Polyadenilation Signal*) ao final da 3'UTR. No nosso ensaio com CRISPR/Cas9, houve a edição de todos esses *motifs* em alguns clones analisados. Em outros casos, houve a perda de um sítio para ELAV1 e de PAS, e em ambos os casos houve aumento nos níveis de *cScrt2* no tubo neural. Realizamos novas análises em um fragmento genômico de 1 kb após a 3'UTR de *cScrt2* e não encontramos novos PAS ou sítios de splicing, sugerindo que *cScrt2* não deva sofrer splicing alternativo para gerar outras isoformas, assim como tem sido relatado nos bancos de dados de sequenciamento de RNA disponíveis. Com esses resultados, levantamos a hipótese de que é possível que a deleção desses sítios possa ser compensada pela existência de outros *motifs* (17 para ELAVL1, 12 para ELAVL2, 5 para Pum2 e 9 para SNRPA) na porção 3'UTR de *cScrt2*.

Uma outra estratégia que utilizamos para verificar os efeitos de miRNAs, foi a deleção de seus alvos na porção 3'UTR de *cScrt2* utilizando o método CRISPR/Cas9. Com essa estratégia, não alteramos os níveis de miRNAs endógenos, mas sim, modificamos sua atividade sobre *cScrt2*. Nossos resultados demonstram que em todas as amostras submetidas a qPCR (n=7), houve aumento nos níveis de *cScrt2* após deleção de 1 ou ambos os sítios de miRNA, sugerindo que possa haver regulação pós-transcricional de *cScrt2* por meio dos sítios de reconhecimento para os miRNAs -125b e -200b.

Nossos dados indicam fortemente, tanto pela atuação das "esponjas" quanto pelo método CRISPR/Cas9, que um ou ambos os miRNAs estão atuando sobre *cScrt2* diretamente, uma vez que tanto a inibição da atividade por remoção dos miRNAs endógenos em células expressantes ou de seus sítios-alvo na região 3'UTR de *cScrt2* causou aumento nos níveis de *cScrt2*. Consequentemente, não afetamos os níveis desses miRNAs e de outros alvos em células que não os possuam. Além disso, nossos dados demonstram a heterogeneidade dos

indels provocados pela Cas9, deletando tanto o sítio para miR-125b, quanto para ambos miR-125b e -200b. Dessa forma, não podemos afirmar pela não interferência de qual dos miRNAs o aumento nos níveis de *cScrt2* está ocorrendo.

Por fim, propomos a hipótese de que *cScrt2* seja expresso no tubo neural pela atuação de *Ascl1* e *Brn2* por meio de cE1 no domínio centro-dorsal, e que seu padrão de expressão seja refinado pela atuação de miR-125b, -200b ou pela atividade sinergística de ambos. Ainda, a edição de sítios para miRNAs em regiões 3'UTR pode ser um controle adicional na regulação da expressão gênica, revelando que o padrão de expressão de *cScrt2* seja o resultado final da integração de diversos elementos *cis, trans* e pós-transcricionais atuando em conjunto (Atkinson e Halfon, 2014).

5 MODELO HIPOTÉTICO

Em conjunto, nossos dados sugerem que o *Ascl1* atua no sítio previsto de heterodimerização *Ascl/Brn2* presente na região cE1 para regular a expressão de *cScrt2*. Desta forma, propomos que região cE1 quando está no estado de cromatina descondensada e sinalizada pela assinatura epigenética H3K27ac como ativa, estaria disponível para ligação de *Ascl1* e *Brn2*. Concomitante ou após a ligação dos FTs a cE1, há a interação de cE1 com o promotor resultando na transcrição de *cScrt2* no tubo neural. Posteriormente, o domínio de expressão do mRNA de *cScrt2* é adicionalmente restrito na zona intermediária pela atividade de miR-125b e -200b, expressos nas zonas ventricular e do manto. Estes miRNAs agem através de sítios-alvo presentes na região 3´UTR de cScrt2, promovendo a degradação do seu mRNA.



Figura 3. 5: **Modelo hipotético baseado nos dados obtidos neste trabalho.** Esquema do modelo regulatório hipotético na região dorsal do tubo neural. *Brn2* (amarelo), *Ascl1* (azul claro), cE1 (verde claro), mRNA de *cScrt2* (marrom). As setas capeadas indicam a repressão de *cScrt2* por miR-125b e -200b nas zonas ventricular e do manto.

CAPÍTULO 4 – Função de cSCRATCH2 no tubo neural posterior

1 INTRODUÇÃO

Scrt2 é um fator de transcrição da superfamília SNAIL/SLUG de fatores de transcrição, mas ao contrário dos outros membros Snail1, Snail2 e Slug que são bastante descritos e conhecidos, pouco se sabe sobre seus genes-alvo.

Scrt2 vem sendo associado a diversos processos ao longo da evolução. No nematelminto C. elegans, o homólogo de Scrt2, CES-1 (cell-death specification 1) (Metzstein and Horvitz, 1999), foi inicialmente relacionado à supressão de apoptose. O mecanismo envolvido neste processo funciona em paralelo na geração das células NSM (motoneurônios). Após a divisão celular assimétrica, o progenitor neural gera duas células-filhas. Uma delas diferencia-se em NSM, e a outra entra em apoptose. Neste processo, ocorre a repressão de cdc-25.2 e pig-1 por ces-1. ces-1 reprime a expressão de cdc-25.2, responsável pelo ciclo celular, ligando-se a uma região 4.8 kb acima de cdc-25.2. Essa repressão, por sua vez, bloqueia a progressão do ciclo celular pela perda parcial de Ciclina A (Yan et al.,2013). Ao mesmo tempo, ces-1 também inibe a expressão do gene pig-1, responsável pela polaridade celular. Uma vez reprimido, a perda de pig-1 afeta o plano de divisão, provocando divisão assimétrica das células NSM progenitoras (Wei et al., 2017). Nas NSM, ces-1 reprime o gene pró-apoptótico egl-1, ligando-se em sítios E-box. Em contrapartida, os baixos níveis de ces-1 na célula-irmã determinam sua morte por permitir a expressão de egl-1 (Thellmann, Hatzold e Conradt, 2003; Hatzold e Conradt, 2008). Esse mecanismo também pode ser entendido como um processo de determinação de destino celular mediado por ces-1, uma vez que sua presença garante a sobrevivência de uma das células-filhas e sua posterior diferenciação (Hatzold e Conradt, 2008).

Foi visto em *Drosophila*, que *Scrt* e *Esg* (Escargot), outro membro da superfamília Snail, controlam o destino celular de forma redundante por reprimir a transcrição de genes relacionados à via de sinalização Notch em precursores neurais pela ligação em sítios E-box em regiões promotoras dos genes-alvo (Ramat *et al.*,2016). Um deles é o complexo gênico E(spl)m4 (Nellesen, Lai e Posakony, 1999), que codifica fatores de transcrição da via Notch que inibem a progressão da neurogênese. No teleósteo *Danio rerio* (zebrafish), *Scrt2* está relacionado à prevenção da morte celular no sistema nervoso (Dam *et al.*,2011). Neste modelo, *Scrt2* reconhece sítios E-box no primeiro íntron do gene *Puma. Puma* é o homólogo do gene egl-1 de *C. elegans.* Os níveis de puma mantêm-se baixos pela repressão por *Scrt2*. Entretanto, ao sinal de problemas no DNA, p53 ativa a transcrição de *puma*, levando à morte celular (Rodríguez-Aznar e Nieto, 2011). Ao mesmo tempo, p53 também ativa a expressão de *Scrt2*, gerando um ciclo de feedback negativo.

Ainda em zebrafish, *Scrt2* mantém altos os níveis de p57 (cdkn1c) para prevenir a reentrada da célula no ciclo celular, uma vez que *Scrt2* é expresso em células pós-mitóticas (Rodríguez-Aznar, Barrallo-Gimeno e Nieto, 2013). Para tal, *Scrt2* inibe a expressão de miR-25, que tem como papel reprimir cdkn1c, mantendo as células em estado pós-mitótico, evitando que retornem ao estado proliferativo (Rodríguez-Aznar, Barrallo-Gimeno e Nieto, 2013). Isso porque, já foi relatado que o retorno inapropriado de células ao estado proliferativo, aumenta as chances de apoptose (revisado por Herrup and Yang, 2007).

Em mamíferos, *Scrt2* está associado ao início da migração de células do neocortex e da zona subventricular do hipocampo de camundongos (Itoh *et al.*,2013). Após a saída do ciclo celular, os progenitores intermediários estão prontos para migrar radialmente. Nesse ponto do desenvolvimento, *Scrt2* é expresso e liga-se ao promotor da proteína de adesão *E-caderina (CDH1*), reprimindo sua transcrição. Dessa forma, na ausência de E-caderina, as células não ficam aderidas à membrana apical e migram radialmente na direção pial (Itoh *et al.*,2013).

Tendo em vista a diversidade de funções exercidas por *Scrt2* no desenvolvimento neural, muito possivelmente existem diversos genes-alvo que ainda não foram descritos. Assim, propomos aqui a identificação de genes-alvo de *cScrt2* no embrião de galinha. Este objetivo preencheria dois propósitos: primeiramente, identificar pela primeira vez os genes-alvo de *Scrt2* no embrião de galinha, e também determinar se existem semelhanças evolutivas no perfil de genes-alvo de *Scrt2*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Clonagem de cScrt2

Após a amplificação por PCR, os fragmentos referentes aos domínios Eng, VP16 e *Scrt2*(Znf) foram clonados *in frame* no vetor pCIG-IRES-nGFP, no sítio de restrição para EcoRI. Esses vetores foram desenvolvidos por Glauber Ventrici em nosso laboratório.

Para superexpressão de *cScrt2*, a sequência de *cScrt2* foi amplificada por PCR e clonada no vetor pCIG nos sítios EcoRI e Smal por Tatiane Kanno em nosso laboratório. Posteriormente, digerimos o vetor com EcoRI para adição de um epítopo na porção Nterminal, *in frame* para auxiliar na imunolocalização de *Scrt2*, devido à ausência de anticorpos anti-Scratch2. Esta adição foi feita pelo método DNA Assembly (New England Biolabs). O epítopo AVI-TEV-FLAG foi amplificado a partir do vetor pCI-AVI-TAG:lhx5-H2B:RFP utilizando os primers F – 5' GGTATCGATAAGCTTGATATCGGCCACCATGGCTGGTGGCCTGAATGAC e R – 5' AGCGGGGCATGCGGGAATTTACCTTTCTTTTTTGG (IDT, EUA).

4.2.2 Eletroporação in ovo

Para os ensaios de superexpressão de VP16:*Scrt2* e Eng:*Scrt2* eletroporamos o lado direito do tubo neural com os vetores individualmente em estágio HH11-12. Os parâmetros de eletroporação estão descritos no Capítulo 1 (1.3.3). Após 2 dias, os embriões (HH23) foram dissecados e os hemitubos coletados separadamente para dissociação e FACS. Para o ensaio de C&R superexpressamos FLAG:*cScrt2*-GFP no lado direito do tubo neural de embriões em HH11-12. Coletamos dois embriões em HH23 e dissecamos o tubo neural, processando para C&R como descrito anteriormente.

Para os ensaios com DsiRNAs, resusspendemos em água ultrapura (estoque 100 μ M) e diluímos em 1:5 de Duplex Buffer (IDT), aquecemos a 94 °C por 1 min, deixando resfriar na bancada. Em seguida, adicionamos 2,5 μ g/ μ L de mGFP e FastGreen 1% para volume final de 10 μ L.

4.2.3 RNA-Seq

Durante a realização de FACS, as células GFP positivas foram coletadas em tampão de lise para extração e purificação de RNA próprio do kit RNAqueous (Life Technologies).
Passamos as amostras em vórtex e processamos as amostras de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As bibliotecas de cDNA foram preparadas com o kit Truseq RNA-Seq Library Preparation (Illumina) e sequenciadas em larga escala em instrumento HiSeq 2500 (Illumina).

Para as análises, os adaptadores foram removidos das sequências e removidas as de baixa qualidade utilizando a plataforma CutAdapt (v.1.18). Em seguida, os *reads* foram alinhados com o genoma de galinha galgal6 com a ferramenta HiSat2 (v. 2.1.0). Cada condição testada foi realizada em triplicata biológica. A análise de expressão diferencial foi realizada pelo método DESeq2 v.1.20.0 (Love, Huber e Anders, 2014). As análises estatísticas foram ajustadas para reduzir a taxa de falso-positivos. Todos os genes reportados tiveram valor de "log2 fold change" e valor de p ajustado para <0.05 (Stephens, 2016).

Por fim, realizamos análise de Venn na plataforma Gene List Venn Diagram (<u>http://genevenn.sourceforge.net</u>) para intersecção dos dados.

4.2.4 CUT and RUN (C&R)

O protocolo de C&R realizado segue como foi descrito no Capítulo 1 (1.2.8). O anticorpo utilizado foi rabbit anti-FLAG (Sigma Aldrich, cat. #F7425).

As análises após sequenciamento também foram realizadas como descrito anteriormente. A chamada de picos foi realizada após agrupamento do resultado das duas amostras para *Scrt2* e subtraídas da análise para IgG (q-value cutoff of 0.05).

3 RESULTADOS

Os genes-alvo de *Scrt2* em galinha ainda são desconhecidos. Dessa forma, aqui modulamos a atividade de *Scrt2* para identificar seus genes a jusantes. Para isto, usamos 1) DsiRNA para reduzir os níveis de *cScrt2* e 2) superxpressão de *Scrt2* fusionado a domínio ativador de transcrição (VP16:*Scrt2*) ou fusionado a domínio repressor de transcrição (Eng:*Scrt2*). Os experimentos seguintes foram realizados em colaboração com o laboratório do Professor Marcos Simoes-Costa (Cornell University, NY-EUA).

O primeiro método visa a redução da expressão de *cScrt2* por meio de interferência por DsiRNA (**D**icer-**s**ubstrate **s**mall interfering **RNA**), seja por degradação do mRNA ou por pausa temporária da tradução. Os DsiRNA vem sendo mais frequentemente usados em substituição ao siRNA (**s**mall interfering **RNA**) (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000; Kim *et al.*,2005; Bhattacharya *et al.*,2018) por serem mais estáveis e menos suscetíveis a degradação por nucleases (Yu *et al.*,2012). Além disso, difere dos siRNAs por serem maiores (27mer vs. 21mer), conferindo maior afinidade ao mRNA-alvo e substrato para processamento na enzima Dicer (Kim *et al.*,2005). Após entrar na célula, os 27mer-DsiRNAs são processados pela enzima Dicer, tornando-se 21-23mer (Kim e Rossi, 2008) e, posteriormente, são incorporados ao complexo RISC (**RNA i**nterference **s**ilencing **c**omplex) e à enzima Argonauta 2 (Ago2), onde a fita com terminação menos termoestável é favorecida para efetuar clivagem específica de mRNA-alvo (Kim e Rossi, 2008; Foster *et al.*,2012).

Já na segunda estratégia, utilizamos vetores contendo fusões de domínio ativador ou repressor ao domínio Zinc-finger de *Scrt2*. O domínio Engrailed (*Eng*), é uma porção da proteína Engrailed de *Drosophila* responsável pela sua atividade repressora (Han e Manley, 1993), recrutando FTs auxiliares. O domíno ativador VP16 foi obtido de um fator de transcrição encontrado no vírus da herpes simples tipo 1, responsável pela ativação da transcrição de genes por meio do domínio TAD (**T**rans**A**ctivation **D**omain) (Hirai, Tani e Kikyo, 2010) imediatamente após infecção no hospedeiro (Wysocka and Herr, 2003). O *Scrt2* de galinha possui cinco domínios *Zinc-finger (Znf)* localizados na porção C-terminal, responsáveis pela ligação de *Scrt2* ao DNA. Este domínio Znf, foi então fusionado a VP16 ou Eng, formando quimeras capazes de ativar ou reprimir genes-alvo de *Scrt2* (Fig. 4.1B).

Dessa forma, em embriões HH11-12, primeiramente eletroporamos o lado esquerdo do tubo neural com um plasmídeo contendo o gene repórter mCherry in frame a um domínio de localização para a membrana derivado da proteína de sinalização RAS-GTPase. Após três horas, o lado contralateral foi coeletroporado com DsiRNA + mGFP. Da mesma forma fizemos com os experimentos de ativação e repressão via domínio Znf, sendo o lado esquerdo mCherry e o direito pCIG-Eng:Scrt-GFP ou VP16:Scrt-GFP (Fig. 4.1A). Após 48 horas, os embriões foram coletados em HH23 para dissecação de ambos os lados do tubo neural (Fig. 4.1A). O lado esquerdo foi utilizado como controle, enquanto o lado direito foi o experimental em ambas as condições. Após a dissecção, os hemitubos foram dissociados individualmente e as células mCherry ou GFP positivas foram separadas por FACS, eliminando as células que não foram eletroporadas. Em seguida, extraímos o RNA total das amostras eletroporadas e as preparamos para síntese de biblioteca para seguenciamento de nova geração (NGS). Nossa proposta inicial era comparar os dados de RNA-Seg para DsiRNA, ou seja, uma condição knockdown que aumentaria os níveis de alvos de cScrt2, versus VP16, buscando alvos que apresentassem expressão aumentada. No entanto, apenas uma das amostras para DsiRNA foi sequenciada até o momento, impossibilitando a análise. Dessa forma, conduzimos nossos experimentos comparando condições de expressão opostas, com alvos de cScrt2 ativados por VP16 vs. reprimidos por Eng.



Figura 4. 1: **Delineamento experimental e análise dos dados. (A)** Esquema do desenvolvimento do experimento para identificação de alvos de *cScrt2* no tubo neural posterior. Os embriões foram eletroporados e os tubos neurais coletados e processados separadamente até a análise de dados, quando realizamos intersecção para identificação de genes em comum que modulados nas diferentes condições. **(B)** Exemplo de vista dorsal de embrião com o lado esquerdo eletroporado com o vetor controle, mCherry (laranja), e o lado direito com um dos vetores experimentais, Eng:Scrt-GFP (verde). **(C)** análise de Venn para os dados obtidos após sequenciamento NGS para Eng e VP16, com 55 genes em comum que foram modulados em ambas as condições. Abaixo, esquema demonstrando como funcionam as quimeras para ativação (VP16) ou repressão (Eng) gênica associado ao reconhecimento do domínio Znf de *cScrt2* ao *motif*-alvo, E-box (CANNTG).

Os dados provenientes do sequenciamento de Eng e VP16 foram alinhados com o genoma de galinha (galgal6) e analisados para expressão diferencial pelo método DESeq2, com valores estatísticos ajustados para p<0.05 para reduzir falsos-positivos, comparando os dados do lado positivo (verde) com os do lado contralateral negativo (vermelho). Aplicamos o filtro de "log2 fold change" para valores acima ou abaixo de 1 para identificar os genes mais ativados, quando submetido a VP16:Scrt, ou mais reprimidos quando sob Eng:Scrt. Nossos dados revelaram 1122 genes reprimidos por Eng:*Scrt2* e 168 ativados por VP16:*Scrt2* (Fig. 4.1B). Em seguida, realizamos análise de Venn (<u>http://genevenn.sourceforge.net</u>) para buscar genes em comum nas duas condições. Destes, 55 foram tanto ativados quanto reprimidos (Fig. 4.1B), sugerindo que por terem sido alterados em ambas as condições, pudessem estar sendo modulados por *cScrt2*.

Em seguida, buscamos no banco de dados GEISHA, o padrão de expressão no tubo neural dos 55 genes encontrados no banco de dados *GEISHA*, selecionando 14 como candidatos (Fig. 4.2A) devido ao seu padrão de expressão se sobrepondo parcial ou totalmente ao de *cScrt2*, ou por ter padrão complementar a *cScrt2* em algum domínio do tubo neural. Representamos o perfil de expressão desses genes em "log2 fold change", dos embriões eletroporados com Eng comparado com o lado contralateral *versus* os dados para embriões eletroporados com VP16 tambem comparado com o lado contralateral controle. Como uma porção de *Scrt2* (Znf) foi superexpressa, era esperado que aparecesse aumentado em ambas as condições. O alinhamento dos *reads* identificou uma alta frequência de *Scrt2* (Eng-Scrt >2 e VP16-Scrt >3; Fig. 4.2A). Alguns dos genes candidatos como NEO1 (Phan *et al.*,2011) e CBFA2T2 (Koyano-Nakagawa e Kintner, 2005) possuem campo de expressão similar ou próximo ao de *cScrt2*, indicando que possa haver modulação desses genes por *cScrt2*.



Figura 4. 2: *cScrt2* potencialmente modula genes associados a diversos processos. (A) Heatmap demonstrando alguns dos 55 genes modulados por *Scrt2* nas condições Eng e VP16. *cScrt2* está apresentado como controle. A primeira coluna apresenta os níveis de repressão desses genes em "Log2 fold change", enquanto a segunda coluna apresenta os genes ativados. (B) *Gene Onthology* dos 55 genes modulados por Eng e VP16:Scrt.

Submetemos os 55 genes candidatos à análise de ontologia genética na plataforma online *Panther v14.1,* para identificarmos se os genes encontrados estavam associados a algum padrão de processo biológico. Nossos dados revelaram, que a maioria dos genes (19; Fig. 4.2B) estavam relacionados a processos celulares como resposta a estímulos e transdução de sinal. Já outra parcela (16; Fig. 4.2B), estava relacionada a regulação biológica, como diferenciação e transcrição, e outra (4; Fig. 4.2B) a adesão celular, processo esse já relatado em camundongos (Itoh *et al.*,2013).

A expressão diferencial dos genes encontrados pode ter se dado não por regulação direta por *cScrt2*, mas indiretamente através de ativação ou inibição de genes montante a eles. Dessa forma, para identificar alvos diretos de *cScrt2*, utilizamos a técnica C&R, já descrita anteriormente. Para isso, por não haver anticorpos comerciais que funcionem bem para *Scrt2* em galinha, superexpressamos FLAG:*Scrt2* no tubo neural em HH11-12. Coletamos o lado eletroporado, dissociamos e iniciamos o ensaio de C&R em duplicata utilizando um anticorpo

para o epítopo FLAG e finalizando com a análise dos dados pós-sequenciamento de nova geração. Os *reads* provenientes do sequenciamento foram alinhados com o genoma de galinha (galgal5) utilizando a plataforma Bowtie2 v2.2.5 e a chamada de picos foi realizada por *script* em C-Shell disponível na plataforma *github*, desenvolvida pelo laboratório do professor Henikoff (Fred Hutchinson Câncer Research Center, Seattle, Washington, USA), sendo subtraídos dos picos para anti-IgG (controle negativo) e com cutoff de 0,05.

A chamada de picos individualmente em cada replicata, revelou a presença de 288 picos para uma das amostras, enquanto 1374 para a outra, sugerindo que a qualidade da primeira amostra foi menor. Após o agrupamento das amostras e chamada de picos em comum utilizando os picos para IgG como controle (q-value <0,05), encontramos 82 alvos de *cScrt2* (Tabela 4.1).

Comparando os resultados de sequenciamento de C&R com os 55 genes modulados por *Scrt2*:VP16 e *Scrt2*:En2, apenas 17 (DUSP6, TNFRSF11B, GALNT9, NOC4L, TMEM123B, NTN4, ZC3H12C, GRIK4, KCNQ3, WDCP, GALNT18, CDC42EP3, PLAGL1, SLC35F1, IRX3, SIPA1L2) são alvos diretos de *cScrt2*, em que Sct2 interagiu em alguma porção genômica (promotor, TSS, intron, intergênica).

Além disso, identificamos outros possíveis genes diretos de *cScrt2*. Ainda, identificamos a ligação de *cScrt2* a regiões de transcrição preditas de diversos RNAs longos não-codificantes e miRNAs, sugerindo que *cScrt2* possa ter um papel na modulação de elementos que atuam na regulação tanto transcricional quanto pós-transcricional (Dykes e Emanueli, 2017). Utilizando a plataforma SpongeScan (<u>http://spongescan.rc.ufl.edu/</u>), verificamos que nenhum dos lncRNAs identificados como alvos de *cScrt2* são candidatos a atuarem como esponjas para miRNAs. Interessantemente, observamos que *cScrt2* interage com o segundo exon de *cScrt2*, sugerindo uma autorregulação.

147



Figura 4. 3: **Visualização dos dados para C&R.** Após a análise dos dados de C&R e a chamada de picos, os arquivos foram submetidos à plataforma *Genome Browser* para visualização dos dados. **(A-B)** exemplos de picos encontrados em diferentes genes possivelmente modulados por *cScrt2*. **(A)** Irx3 e **(B)** SLC35F1. Na primeira linha são os dados para H3K27ac na segunda e terceira linhas são as amostras para FLAG:*Scrt2* em duplicata.

Gene	Descrição
ANKRD11	ankyrin repeat domain 11; miR1560/miR1785 inseridos neste gene
ANKRD33	ankyrin repeat domain 33
AUTS2	activator of transcription and developmental regulator 2
CHL1	Cell adhesion molecule 1; 2 picos
EXD3	exonuclease 3'-5' domain containing 3; 3 picos
FAM190A (CCSER1)	coiled-coil serine rich protein 1
FAM222A (C12orf34)	Chromosome 12 open reading frame 34
miR6705	Micro RNA
FOLH1	folate hydrolase 1

Tabela 4. 1: Alvos de *cScrt2* no tubo neural posterior, identificados após C&R e chamada de picos.

KSR1	kinase suppressor of ras 1
LOC100858205	Proteína desconhecida; miR1467 inserido neste gene
LOC101747569	IncRNA; Região promotora
LOC101747786	IncRNA
LOC101751443	IncRNA
LOC101752072	IncRNA
LOC101752236	IncRNA; 3 picos
LOC107051649	IncRNA
LOC107054227	IncRNA
LOC107054269	IncRNA
LOC107054965	IncRNA
LOC107055170	IncRNA
LOC418414	Proteína desconhecida
LOC421268	Categoria desconhecida
miR6654	Micro RNA
MSI2	musashi RNA binding protein 2
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1
NEURL1B	neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1B
PBX3	PBX homeobox 3
PLXNA2	Plexin A2
PTPN4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4
RAD51B	3 picos próximo a TMEM229B
RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2
RNF216	ring finger protein 216
Scrt2	scratch family transcriptional repressor 2
SLC25A26	SLC25A26 solute carrier family 25 member 26
SLC35F1	solute carrier family 35 member F1
SLC39A11	solute carrier family 39 member 11
SNX19	sorting nexin 19
SPAG17	sperm associated antigen 17
SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
ST6GALNAC3	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3
TACC1	transforming acidic coiled-coil containing protein 1
TMEM132C	transmembrane protein 132C
TNRC6C	trinucleotide repeat containing 6C
UHRF1BP1	UHRF1 binding protein 1
ZFHX4	zinc finger homeobox 4
ZMAT4	zinc finger matrin-type 4
20 regiões	1 delas próxima a cSox4, que possui mesmo padrão de expressão
intergênicas	de <i>cScrt2</i> (Bergsland <i>et al.,</i> 2006); CDK8; Proteínas não-descritas;
	IncRNAs;

4 DISCUSSÃO

Dentre os genes que foram modulados em ambas as condições, situação de repressão com Eng:*Scrt2* e situação de ativação com VP16:*Scrt2*, analisamos em mais detalhes o *NEO1* e *CBFA2T2* porque apresentam padrão de expressão semelhante a *cScrt2* no tubo neural de galinha, e tem potencial de ser regulados por *cScrt2*. Para contrastar, também investigamos o gene Irx3 por ter um padrão de expressão complementar a *cScrt2* e que supostamente poderia ser reprimido por *cScrt2*.

NEO1 codifica a proteína de membrana neogenina e pertence à família com domínio de imunoglobulina. Tem como função descrita, a sobrevivência, adesão, migração e diferenciação celular (Cole, Bradford e Cooper, 2007; Wilson e Key, 2007). Além disso, outros trabalhos ainda demonstram a atividade de neogenina no direcionamento axonal (Rajagopalan *et al.*,2004; Phan *et al.*,2011). Já *CBFA2T2*, também conhecido como *MTGR1*, pertence à família de proteínas MTG e atua como correpressor, dimerizando com diversas proteínas como NCor (*Nuclear receptor co-repressor 1*) e membros da família NHR (Lutterbach *et al.*,1998) em células neurais pós-mitóticas. Desta forma, modula genes proneurais e determina a população de células diferenciadas (Koyano-Nakagawa e Kintner, 2005). Irx3 é um fator de transcrição cujo campo de expressão está mais interno a *cScrt2* no tubo neural, localizando-se na zona ventricular, e tem como papel contribuir na padronização de subpopulações neurais por meio da via *Shh (Sonic Hedgehog)* (Robertshaw *et al.*,2013). Já na região ventral, atua em conjunto com Nkx2-2 e Nkx6-1 na restrição e determinação do domínio de motoneurônios (Sander *et al.*,2000; Dichmann e Harland, 2011).

Para confirmar se *Scrt2* interage com sítios-alvo próximos aos *loci* destes genes, analisamos os dados de C&R para *cScrt2*. Após o cruzamento dos dados de C&R com os obtidos no RNA-Seq, verificamos que a região genômica de NEO1 apresentou diversos picos de ligação de *cScrt2* nas regiões promotora, exons e introns, sugerindo uma possível regulação direta. Em contraste, não encontramos sítios-alvos para *cScrt2* próximos ao *locus* de CBFA2T2. Por outro lado, isso não descarta que *cScrt2* possa estar atuando em algum elemento regulatório distante ainda não identificado. Irx3 apresentou pico de ligação a *Scrt2* próximo à região promotora, que se sobrepôs com pico de padrão semelhante para H3K27ac, sugerindo que esta região possa ser um elemento regulatório e possivelmente modulado por *cScrt2* (Fig. 4.3A).

Também nos chamou atenção três outros genes que estavam simultanamente presentes no RNA-Seq de Eng:*Scrt2* e VP16:*Scrt2* e no C&R para *Scrt2*, mas cujo padrão de expressão não estava claramente relacionado ao padrão de *Scrt2*: SLC35F1 (*Solute Carrier Family 35, member F1*), SIPA1L2 (*Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2*) e NTN4 (*Netrin 4*). Em galinha, foram documentadas 3 isoformas distintas de SLC35F1, geradas por TSS alterativos. Em nossos dados de C&R, apenas SLC35F1.2 apresentou um pico acentuado de ligação de *cScrt2* no primeiro exon (Fig. 4.3B). Esta região também se sobrepõe à marcação para H3K27ac. De acordo com os nossos dados, nem o TSS nem o primeiro exon das isoformas SLC35F1.1 ou SLC35F1.3 parecem ser reconhecidas por *cScrt2*. Em conjunto, estes dados sugerem que *cScrt2* regula seletivamente a isoforma SLC35F1.2.

SIPA1L2 codifica uma proteína com atividade ativadora de GTPase e também está associado à proliferação celular, além de ser crucial para formação das sinapses (Rothe *et al.*,2016). SIPA1L2 é expresso em diversos tecidos neurais em *Xenopus*, dentre eles, a região dorsal do sistema nervoso anterior, placódio olfatório e na retina (Rothe *et al.*,2016). Todos os membros da família SIPA (signal-induced proliferation-associated) são expressos no sistema nervoso (Spilker *et al.*,2008). Em camundongos, estudo de sequenciamento *single cell* demonstrou a expressão de SIPA1L2 na placa do assoalho, no tubo neural em E9,5 (Delile *et al.*,2019). Já NTN4 (*Netrin 4*), é uma proteína secretada relacionada às lamininas (Kennedy *et al.*,2006). Curiosamente, foi demonstrado que NTN4 inibe o processo de angiogênese por ligar-se a NEO1 (Larrivee *et al.*,2007). Esse mesmo efeito foi observado em câncer de próstata, onde houve redução da massa tumoral após redução da angiogênese reprimida por NTN4 (Lejmi *et al.*,2008).

A nossa análise de C&R também identificou genes que não estavam presentes no RNA-Seq após expressão exógena de VP16:*Scrt2* ou En2:*Scrt2*. Dentre estes, nos chamou a atenção NCAM1. NCAM1 (*Neural Cell Adhesion Molecule*) é uma proteína de membrana, que media a adesão célula-célula. Devido a esta função, NCAM1 tem sido associada à diversos eventos morfogenéticos, como proliferação e diferenciação (Aoki, 1991; Doherty *et al.*,1991). Durante

152

o desenvolvimento de camundongos, NCAM1 está presente nas zonas ventricular e do manto em todo o tubo neural (E8-12,5; Goridis e Brunet, 1992; Bally-Cuif, Goridis e Santoni, 1993). A identificação de NTN4 e NCAM1 no nosso ensaio de C&R é condizente com a proposta de que *Scrt2* modula a expressão de proteínas relacionadas a adesão celular. Até o presente momento, esta proposta era centrada apenas na repressão direta da transcrição de E-caderina (CDH1) por *Scrt2* em camundongos (Itoh *et al.*,2013). Desta forma, nossos dados reforçam a conservação evolutiva da função de *cScrt2* em modular esse processo já descrito.

Além disso, outro dado que nos chamou a atenção foram os diversos picos para a ligação de *cScrt2* em regiões intergênicas e *loci* identificados como referentes a lncRNAs. LncRNAs são RNAs longos não codificantes, com tamanho acima de 200 nucleotídeos (Zampetaki, Albrecht e Steinhofel, 2018). Muitos dos lncRNAs são elementos transposíveis, e estes podem atuar como elementos regulatórios no recrutamento de modificadores epigenéticos e RBPs (Hutchins and Pei, 2015). Uma vez que *cScrt2* é expresso em uma população de células espaçotemporalmente delimitada, e que os lncRNAs também são (Ulitsky *et al.,2011*), podemos especular que *cScrt2* possa estar atuando na regulação da expressão dessa classe de RNAs importantes em diversos processos, sobretudo epigenéticos (Perry e Ulitsky, 2016). Além disso, lncRNAs são intensamente expressos no sistema nervoso (Sun e Kraus, 2015), provavelmente devido à complexidade morfológica e fisiológica desse tecido e da presença de diversos tipos de células, conferindo a necessidade de um nível a mais de regulação.

De modo geral, nossos dados sugerem que *cScrt2* possivelmente modula a expressão de genes-alvo envolvidos em diversos processos celulares. A identificação de genes-alvo com mesmo papel de alvos já identificados anteriormente em outros modelos biológicos estudados, e dos novos aqui descritos, aumenta a confiança em nossos dados.

CONCLUSÃO GERAL

Especificamente, concluímos:

1) Tanto mE1 quanto cE1 (USE), possuem atividade *enhancer* no tubo neural posterior embrionário.

2) O ensaio 3C revelou que cE1 está interagindo com o promotor de *cScrt2*, além de revelar um novo elemento-*cis* (Ep2) possivelmente envolvido na regulação de *cScrt2*.

3) A deleção de cE1 causa alteração na morfologia dorsoventral do tubo neural e redução da expressão de *cScrt2*.

4) Ascl1 reconhece cE1 através do motif de heterodimerização "Ascl1/Brn2".

5) A superexpressão conjunta de *Ascl1* e *Brn2* aumenta a expressão de *cScrt2* na região dorsal do tubo neural e reduz o domínio de células diferenciadas.

6) Os miRNAs -125b e -200b são expressos no tubo neural em complementariedade temporal a *cScrt2*.

7) miR-125b e -200b regulam *cScrt2* pós-transcricionalmente por meio de sítios localizados em sua 3'UTR.

8) *cScrt2* atua na modulação de genes associados a diversos processos celulares, reconhecendo regiões codificantes e não codificantes no genoma de galinha.

REFERÊNCIAS

Agarwal, V. *et al.* (2015) 'Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs', *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.05005.

Akamatsu, W. *et al.* (1999) 'Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), pp. 9885–9890. doi: 10.1073/pnas.96.17.9885.

Ali, F. *et al.* (2011) 'Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis', *Development*, 138(19), pp. 4267–4277. doi: 10.1242/dev.067900.

Allfrey, V. G., Faulkner, R. and Mirsky, A. E. (1964) 'ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5), pp. 786–794. doi: 10.1073/pnas.51.5.786.

Anderson, E. *et al.* (2014) 'Mapping the Shh long-range regulatory domain', *Development*, 141(20), pp. 3934–3943. doi: 10.1242/dev.108480.

Aoki, J. (1991) 'Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M', *The Journal of Cell Biology*, 115(6), pp. 1751–1761. doi: 10.1083/jcb.115.6.1751.

Arnaudo, A. M. and Garcia, B. A. (2013) 'Proteomic characterization of novel histone posttranslational modifications', *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), p. 24. doi: 10.1186/1756-8935-6-24.

Ashwell, K. W. (2009) 'Development of the Spinal Cord', in *The Spinal Cord*. Elsevier, pp. 8–16. doi: 10.1016/B978-0-12-374247-6.50006-7.

Atkinson, T. J. and Halfon, M. S. (2014) 'REGULATION OF GENE EXPRESSION IN THE GENOMIC CONTEXT', *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 9(13), p. e201401001. doi: 10.5936/csbj.201401001.

Avilés, E. C., Wilson, N. H. and Stoeckli, E. T. (2013) 'Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(June), pp. 1–17. doi: 10.3389/fncel.2013.00086.

Bally-Cuif, L., Goridis, C. and Santoni, M. J. (1993) 'The mouse NCAM gene displays a biphasic expression pattern during neural tube development.', *Development (Cambridge, England)*, 117(2), pp. 543–52. doi: 8330525.

Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. (2005) 'The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer', *Development*, 132(14), pp. 3151–3161. doi: 10.1242/dev.01907.

Bell, G. W., Yatskievych, T. A. and Antin, P. B. (2004) 'GEISHA, a whole-mount in situ hybridization gene expression screen in chicken embryos', *Developmental Dynamics*, 229(3), pp. 677–687. doi: 10.1002/dvdy.10503.

Del Bene, F. *et al.* (2008) 'Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient', *Cell*, 134(6), pp. 1055–1065. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.017.

Bergsland, M. *et al.* (2006) 'The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11', *Genes & Development*, 20(24), pp. 3475–3486. doi: 10.1101/gad.403406.

Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F. (2002) 'Proneural genes and the specification of neural cell types', *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), pp. 517–530. doi: 10.1038/nrn874.

Bhattacharya, D. *et al.* (2018) 'Control of neural crest multipotency by wnt signaling and the Lin28/let-7 axis', *eLife*, 7, pp. 1–24. doi: 10.7554/eLife.40556.

Billin, A. N., Cockerill, K. A. and Poole, S. J. (1991) 'Isolation of a family of Drosophila POU domain genes expressed in early development', *Mechanisms of Development*, 34(2–3), pp. 75–84. doi: 10.1016/0925-4773(91)90045-8.

Biswas, A. and Brown, C. M. (2014) 'Scan for Motifs: a webserver for the analysis of post-transcriptional regulatory elements in the 3' untranslated regions (3' UTRs) of mRNAs', *BMC Bioinformatics*, 15(1), p. 174. doi: 10.1186/1471-2105-15-174.

Black, J. C., Van Rechem, C. and Whetstine, J. R. (2012) 'Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact', *Molecular Cell*, 48(4), pp. 491–507. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.006.

Boissart, C. *et al.* (2012) 'miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells', *Development*, 139(7), pp. 1247–1257. doi: 10.1242/dev.073627.

Boros, J. *et al.* (2014) 'Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1α at chromatin.', *Molecular and cellular biology*, 34(19), pp. 3662–74. doi: 10.1128/MCB.00205-14.

Briscoe, J. and Small, S. (2015) 'Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning.', *Development (Cambridge, England)*, 142(23), pp. 3996–4009. doi: 10.1242/dev.129452.

Bronner-Fraser, M. (1986) 'Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian

embryos using monoclonal antibody HNK-1', *Developmental Biology*, 115(1), pp. 44–55. doi: 10.1016/0012-1606(86)90226-5.

Bylund, M. *et al.* (2003) 'Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity', *Nature Neuroscience*, 6(11), pp. 1162–1168. doi: 10.1038/nn1131.

Cai, X., Hagedorn, C. and Cullen, B. (2004) 'Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs', *RNA*, 10(12), pp. 1957–1966. doi: 10.1261/rna.7135204.

Cai, Y. *et al.* (2019) 'H3K27me3-rich genomic regions can function as silencers to repress gene expression via chromatin interactions', *bioRxiv*, 9664(65), p. 684712. doi: 10.1101/684712.

Calo, E. and Wysocka, J. (2013) 'Modification of Enhancer Chromatin: What, How, and Why?', *Molecular Cell*, 49(5), pp. 825–837. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.038.

Casarosa, S., Fode, C. and Guillemot, F. (1999) 'Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon.', *Development (Cambridge, England)*, 126(3), pp. 525–34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9876181.

Castro, D. S. *et al.* (2006) 'Proneural bHLH and Brn Proteins Coregulate a Neurogenic Program through Cooperative Binding to a Conserved DNA Motif', *Developmental Cell*, 11(6), pp. 831–844. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.006.

Castro, D. S. *et al.* (2011) 'A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets', *Genes and Development*, 25(9), pp. 930–945. doi: 10.1101/gad.627811.

Caviness, V. S., Takahashi, T. and Nowakowski, R. S. (1995) 'Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model', *Trends in Neurosciences*, 18(9), pp. 379–383. doi: 10.1016/0166-2236(95)93933-O.

Cedar, H. and Bergman, Y. (2009) 'Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms', *Nature Reviews Genetics*, 10(5), pp. 295–304. doi: 10.1038/nrg2540.

Chen, K. and Rajewsky, N. (2007) 'The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs', *Nature Reviews Genetics*, 8(2), pp. 93–103. doi: 10.1038/nrg1990.

Chen, X. *et al.* (2015) 'MiR-125b protects against ethanol-induced apoptosis in neural crest cells and mouse embryos by targeting Bak 1 and PUMA', *Experimental Neurology*, 271, pp. 104–111. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.026.

Chiang, C. and Ayyanathan, K. (2012) 'Characterization of the E-box binding affinity to SNAGzinc finger proteins', *Molecular Biology*, 46(6), pp. 809–816. doi: 10.1134/S0026893312060027. Choi, P. S. *et al.* (2008) 'Members of the miRNA-200 Family Regulate Olfactory Neurogenesis', *Neuron*, 57(1), pp. 41–55. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.018.

Cirillo, L. A. *et al.* (2002) 'Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4.', *Moleular cell*, 9(2), pp. 279–89. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864602.

Cole, S. J., Bradford, D. and Cooper, H. M. (2007) 'Neogenin: A multi-functional receptor regulating diverse developmental processes', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(9), pp. 1569–1575. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.009.

Corral, R. D. del and Storey, K. G. (2001) 'Markers in vertebrate neurogenesis', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(11), pp. 835–839. doi: 10.1038/35097587.

Creyghton, M. P. *et al.* (2010) 'Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), pp. 21931–21936. doi: 10.1073/pnas.1016071107.

Cui, Y. *et al.* (2012) 'MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin', *BMC Neuroscience*. BMC Neuroscience, 13(1), p. 1. doi: 10.1186/1471-2202-13-116.

Dallman, J. *et al.* (2004) 'A Conserved Role But Different Partners for the Transcriptional Corepressor CoREST in Fly and Mammalian Nervous System Formation', *Journal of Neuroscience*, 24(32), pp. 7186–7193. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0238-04.2004.

Dam, T. M. T. *et al.* (2011) 'Neuron-specific expression of scratch genes during early zebrafish development', *Molecules and Cells*, 31(5), pp. 471–475. doi: 10.1007/s10059-011-0052-4.

Darnell, D. K. *et al.* (2006) 'MicroRNA expression during chick embryo development', *Developmental Dynamics*, 235(11), pp. 3156–3165. doi: 10.1002/dvdy.20956.

Darnell, D. K. *et al.* (2007) 'GEISHA: an in situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo', *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1–4), pp. 30–35. doi: 10.1159/000103162.

Delile, J. *et al.* (2019) 'Single cell transcriptomics reveals spatial and temporal dynamics of gene expression in the developing mouse spinal cord', *Development*, 146(12), p. dev173807. doi: 10.1242/dev.173807.

Diaz Quiroz, J. F. *et al.* (2014) 'Precise control of miR-125b levels is required to create a regeneration-permissive environment after spinal cord injury: a cross-species comparison between salamander and rat', *Disease Models & Mechanisms*, 7(6), pp. 601–611. doi: 10.1242/dmm.014837.

Dichmann, D. S. and Harland, R. M. (2011) 'Nkx6 genes pattern the frog neural plate and Nkx6.1 is necessary for motoneuron axon projection', *Developmental Biology*, 349(2), pp. 378–386. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.10.030.

Ding, X. *et al.* (2013) 'Signaling between Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Transcription Factor SNAI2 Represses Expression of MicroRNA miR-203 to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Metastasis', *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp. 10241–10253. doi: 10.1074/jbc.M112.443655.

Dixit, R. *et al.* (2014) 'Neurog1 and Neurog2 Control Two Waves of Neuronal Differentiation in the Piriform Cortex', *Journal of Neuroscience*, 34(2), pp. 539–553. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0614-13.2014.

Doherty, P. *et al.* (1991) 'Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca2+ channels', *Cell*, 67(1), pp. 21–33. doi: 10.1016/0092-8674(91)90569-K.

Dominguez, M. H., Ayoub, A. E. and Rakic, P. (2013) 'POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upperlayer cells of the cerebral cortex', *Cerebral Cortex*, 23(11), pp. 2632–2643. doi: 10.1093/cercor/bhs252.

Le Dreau, G. *et al.* (2012) 'Canonical BMP7 activity is required for the generation of discrete neuronal populations in the dorsal spinal cord', *Development*, 139(2), pp. 259–268. doi: 10.1242/dev.074948.

Le Dréau, G. and Martí, E. (2012) 'Dorsal-ventral patterning of the neural tube: A tale of three signals', *Developmental Neurobiology*, 72(12), pp. 1471–1481. doi: 10.1002/dneu.22015.

Du, Z.-W. *et al.* (2013) 'miR-200 and miR-96 families repress neural induction from human embryonic stem cells', *Development*, 140(12), pp. 2611–2618. doi: 10.1242/dev.092809.

Duursma, A. M. *et al.* (2008) 'miR-148 targets human DNMT3b protein coding region', *RNA*, 14(5), pp. 872–877. doi: 10.1261/rna.972008.

Dykes, I. M. and Emanueli, C. (2017) 'Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA', *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 15(3), pp. 177–186. doi: 10.1016/j.gpb.2016.12.005.

Ebert, M. S., Neilson, J. R. and Sharp, P. A. (2007) 'MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells', *Nature Methods*, 4(9), pp. 721–726. doi: 10.1038/nmeth1079.

El-Sherif, E. and Levine, M. (2016) 'Shadow Enhancers Mediate Dynamic Shifts of Gap Gene Expression in the Drosophila Embryo.', *Current biology : CB*, 26(9), pp. 1164–9. doi:

10.1016/j.cub.2016.02.054.

Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. (1991) 'Two C. elegans genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx.', *Development (Cambridge, England)*, 112(2), pp. 591–603. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1794327.

Ericson, J. *et al.* (1992) 'Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1', *Science*, 256(5063), pp. 1555–1560. doi: 10.1126/science.1350865. Fan, J., Baeza, J. and Denu, J. M. (2016) 'Investigating Histone Acetylation Stoichiometry and Turnover Rate', in, pp. 125–148. doi: 10.1016/bs.mie.2016.01.007.

Fei, Q. *et al.* (2015) 'SETDB1 modulates PRC2 activity at developmental genes independently of H3K9 trimethylation in mouse ES cells.', *Genome research*, 25(9), pp. 1325–35. doi: 10.1101/gr.177576.114.

Feng, Y. P. *et al.* (2014) 'Expression analysis of differentially expressed miRNAs in male and female chicken embryos', *Genetics and Molecular Research*, 13(2), pp. 3060–3068. doi: 10.4238/2014.April.17.2.

Fode, C. *et al.* (2000) 'A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons', *Genes and Development*, 14(1), pp. 67–80. doi: 10.1101/gad.14.1.67.

Foster, D. J. *et al.* (2012) 'Comprehensive evaluation of canonical versus Dicer-substrate siRNA in vitro and in vivo', *Rna*, 18(3), pp. 557–568. doi: 10.1261/rna.031120.111.

Gandhi, S. *et al.* (2017) 'Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 432(1), pp. 86–97. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.036.

Gaudet, J. (2002) 'Regulation of Organogenesis by the Caenorhabditis elegans FoxA Protein PHA-4', *Science*, 295(5556), pp. 821–825. doi: 10.1126/science.1065175.

Ge, W. *et al.* (2006) 'Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), pp. 1319–1324. doi: 10.1073/pnas.0510419103.

Giovannone, D. *et al.* (2015) 'Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1', *Acta Histochemica*. Elsevier GmbH., 117(3), pp. 255–266. doi: 10.1016/j.acthis.2015.03.002.

Glazov, E. A. *et al.* (2008) 'A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach', *Genome Research*, 18(6), pp. 957–964. doi: 10.1101/gr.074740.107.

Golla, J. P. et al. (2014) 'Carboxylation of cytosine (5caC) in the CG dinucleotide in the E-box

motif (CGCAG|GTG) increases binding of the Tcf3|Ascl1 helix-loop-helix heterodimer 10-fold', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(2), pp. 248–255. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.018.

Goridis, C. and Brunet, J.-F. (1992) 'NCAM: Structural diversity, function and regulation of expression', *Seminars in Cell Biology*, 3(3), pp. 189–197. doi: 10.1016/S1043-4682(10)80015-7.

Grimes, H. L. *et al.* (1996) 'The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal.', *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), pp. 6263–6272. doi: 10.1128/mcb.16.11.6263.

Groner, A. C. *et al.* (2010) 'KRAB–Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading', *PLoS Genetics*. Edited by H. D. Madhani, 6(3), p. e1000869. doi: 10.1371/journal.pgen.1000869.

Gross, D. S. and Garrard, W. T. (1988) 'Nuclease Hypersensitive Sites in Chromatin', Annual Review of Biochemistry, 57(1), pp. 159–197. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.001111.

Gruner, H. *et al.* (2019) 'Precise removal of Calm1 long 3' UTR isoform by CRISPR-Cas9 genome editing impairs dorsal root ganglion development in mice', *bioRxiv*. doi: https://doi.org/10.1101/553990.

Grunstein, M. (1997) 'Histone acetylation in chromatin structure and transcription', *Nature*, 389(6649), pp. 349–352. doi: 10.1038/38664.

Gualdi, R. *et al.* (1996) 'Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control.', *Genes & Development*, 10(13), pp. 1670–1682. doi: 10.1101/gad.10.13.1670.

Guillemot, F. and Joyner, a L. (1993) 'Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system.', *Mechanisms of development*, 42(3), pp. 171–85.

Guo, Y. *et al.* (2012) 'CTCF / cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice', 109(51). doi: 10.1073/pnas.1219280110.

Gusel'nikova, V. V. and Korzhevskiy, D. E. (2015) 'NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker', *Acta Naturae*, 7(2), pp. 42–47.

Hagege, H. *et al.* (2007) 'Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3c-qpcr)', *Nature Protocols*, 2(7), pp. 1722–1733. doi: 10.1038/nprot.2007.243.

Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1992) 'A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo', *Developmental Dynamics*, 195, pp. 231–272.

Han, K. and Manley, J. L. (1993) 'Functional domains of the Drosophila Engrailed protein.', *The EMBO Journal*, 12(7), pp. 2723–2733. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05934.x.

Han, S. *et al.* (2018) 'The effects of alternative splicing on miRNA binding sites in bladder cancer', *PLOS ONE*. Edited by Y. Zheng, 13(1), p. e0190708. doi: 10.1371/journal.pone.0190708.

Hardwick, L. J. A. and Philpott, A. (2014) 'Nervous decision-making: to divide or differentiate', *Trends in Genetics*, 30(6), pp. 254–261. doi: 10.1016/j.tig.2014.04.001.

Hatzold, J. and Conradt, B. (2008) 'Control of Apoptosis by Asymmetric Cell Division', *PLoS Biology*. Edited by J. Ahringer, 6(4), p. e84. doi: 10.1371/journal.pbio.0060084.

He, X. *et al.* (1989) 'Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development', *Nature*, 340(6228), pp. 35–42. doi: 10.1038/340035a0.

Heintzman, N. D. *et al.* (2007) 'Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome', *Nature Genetics*, 39(3), pp. 311–318. doi: 10.1038/ng1966.

Henke, R. M. *et al.* (2009) 'Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube', *Developmental Biology*. Elsevier Inc., 328(2), pp. 529–540. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.007.

Herrup, K. and Yang, Y. (2007) 'Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5), pp. 368–378. doi: 10.1038/nrn2124.

Hirai, H., Tani, T. and Kikyo, N. (2010) 'Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA', *The International Journal of Developmental Biology*, 54(11–12), pp. 1589–1596. doi: 10.1387/ijdb.103194hh.

Horton, S. *et al.* (1999) 'Correct Coordination of Neuronal Differentiation Events in Ventral Forebrain Requires the bHLH Factor MASH1', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 14(4–5), pp. 355–369. doi: 10.1006/mcne.1999.0791.

Hutchins, A. P. and Pei, D. (2015) 'Transposable elements at the center of the crossroads between embryogenesis, embryonic stem cells, reprogramming, and long non-coding RNAs', *Science Bulletin*, 60(20), pp. 1722–1733. doi: 10.1007/s11434-015-0905-x.

Hyun, K. *et al.* (2017) 'Writing, erasing and reading histone lysine methylations', *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), pp. e324–e324. doi: 10.1038/emm.2017.11.

Imayoshi, I. *et al.* (2013) 'Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors', *Science*, 342(6163), pp. 1203–1208. doi: 10.1126/science.1242366.

Itoh, Y. *et al.* (2013) 'Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelialmesenchymal transition-like mechanism', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 16(4), pp. 416–425. doi: 10.1038/nn.3336.

Jeong, Y. (2006) 'A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers', *Development*, 133(4), pp. 761–772. doi: 10.1242/dev.02239.

Jin, Q. *et al.* (2011) 'Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation', *The EMBO Journal*, 30(2), pp. 249–262. doi: 10.1038/emboj.2010.318.

Jostes, B., Walther, C. and Gruss, P. (1990) 'The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system.', *Mechanisms of development*, 33(1), pp. 27–37. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1982921.

Kaldis, P. and Richardson, H. E. (2012) 'When cell cycle meets development', *Development*, 139(2), pp. 225–230. doi: 10.1242/dev.073288.

Karlic, R. *et al.* (2010) 'Histone modification levels are predictive for gene expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), pp. 2926–2931. doi: 10.1073/pnas.0909344107.

Karmodiya, K. *et al.* (2012) 'H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells.', *BMC genomics*, 13, p. 424. doi: 10.1186/1471-2164-13-424.

Kaye, J. A. *et al.* (2009) 'A 3'UTR Pumilio-Binding Element Directs Translational Activation in Olfactory Sensory Neurons', *Neuron*, 61(1), pp. 57–70. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.012.

Kearns, N. A. *et al.* (2015) 'Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion', *Nature Methods*, 12(5), pp. 401-403. doi: 10.1038/nmeth.3325.

Kebede, A. F., Schneider, R. and Daujat, S. (2015) 'Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest', *FEBS Journal*, 282(9), pp. 1658–1674. doi: 10.1111/febs.13047.

Kennedy, T. E. *et al.* (1994) 'Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord', *Cell*, 78(3), pp. 425–435. doi: 10.1016/0092-8674(94)90421-9.

Kim, D. H. *et al.* (2005) 'Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy', *Nature Biotechnology*, 23(2), pp. 222–226. doi: 10.1038/nbt1051.

Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2008) 'RNAi mechanisms and applications', *BioTechniques*, 44(5), pp. 613–616. doi: 10.2144/000112792.

Kim, V. N. (2005) 'MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), pp. 376–385. doi: 10.1038/nrm1644.

Kimura, H. (2013) 'Histone modifications for human epigenome analysis', *Journal of Human Genetics*, 58(7), pp. 439–445. doi: 10.1038/jhg.2013.66.

Kong, X. *et al.* (2011) 'Catalytic Mechanism Investigation of Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1): A Computational Study', *PLoS ONE*. Edited by A. Pastore, 6(9), p. e25444. doi: 10.1371/journal.pone.0025444.

Kouzarides, T. (2007) 'Chromatin Modifications and Their Function', *Cell*, 128(4), pp. 693–705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

Koyano-Nakagawa, N. and Kintner, C. (2005) 'The expression and function of MTG/ETO family proteins during neurogenesis', *Developmental Biology*, 278(1), pp. 22–34. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.10.010.

Kroll, Kristen, L. (2007) 'Geminin in embryonic development: coordinating transcription and the cell cycle during differentiation', *Frontiers in Bioscience*, 12(1), p. 1395. doi: 10.2741/2156.

Kunej, T. *et al.* (2012) 'Cross Talk Between MicroRNA and Coding Cancer Genes', *The Cancer Journal*, 18(3), pp. 223–231. doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b771.

Lacomme, M. *et al.* (2012) 'NEUROG2 Drives Cell Cycle Exit of Neuronal Precursors by Specifically Repressing a Subset of Cyclins Acting at the G1 and S Phases of the Cell Cycle', *Molecular and Cellular Biology*, 32(13), pp. 2596–2607. doi: 10.1128/mcb.06745-11.

Lai, H. C., Meredith, D. M. and Johnson, J. E. (2013) 'bHLH Factors in Neurogenesis and Neuronal Subtype Specification', in *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. Elsevier, pp. 333–354. doi: 10.1016/B978-0-12-397265-1.00065-4.

Langeland, J. A. *et al.* (1998) 'An amphioxus snail gene: expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo.', *Development genes and evolution*, 208(10), pp. 569–77. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811975.

Larrivee, B. *et al.* (2007) 'Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis', *Genes & amp; Development*, 21(19), pp. 2433–2447. doi: 10.1101/gad.437807.

Lawrence, M., Daujat, S. and Schneider, R. (2016) 'Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression', *Trends in Genetics*, 32(1), pp. 42–56. doi: 10.1016/j.tig.2015.10.007.

Lee, M. G. *et al.* (2005) 'An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation', *Nature*, 437(7057), pp. 432–435. doi: 10.1038/nature04021.

Lee, M. K. *et al.* (1990) 'The expression and posttranslational modification of a neuronspecific ?-tubulin isotype during chick embryogenesis', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 17(2), pp. 118–132. doi: 10.1002/cm.970170207.

Lee, Y. et al. (2004) 'MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II', *The EMBO Journal*, 23(20), pp. 4051–4060. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.

Legendre, M. *et al.* (2006) 'Differential Repression of Alternative Transcripts: A Screen for miRNA Targets', *PLoS Computational Biology*, 2(5), p. e43. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020043.

Lejmi, E. *et al.* (2008) 'Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), pp. 12491–12496. doi: 10.1073/pnas.0804008105.

Levine, M. (2010) 'Transcriptional Enhancers in Animal Development and Evolution', *Current Biology*, 20(17), pp. R754–R763. doi: 10.1016/j.cub.2010.06.070.

Levine, M., Cattoglio, C. and Tjian, R. (2014) 'Looping back to leap forward: Transcription enters a new era', *Cell*. Elsevier Inc., 157(1), pp. 13–25. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.009.

Lewis, K. E. and Eisen, J. S. (2003) 'From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord.', *Progress in neurobiology*, 69(6), pp. 419–49. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880634.

Lin, Y.-C. *et al.* (2014) 'Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations', *Nature Communications*, 5(1), p. 4767. doi: 10.1038/ncomms5767.

Liu, H. *et al.* (2013) 'Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway.', *International journal of molecular medicine*, 32(1), pp. 59–66. doi: 10.3892/ijmm.2013.1354.

Liu, Q. and Hengartnet, M. (1999) 'The Molecular Mechanism of Programmed Cell Death in C. elegans', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 887(1), pp. 92–104. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07925.x.

Liu, Y. *et al.* (2000) 'qBrain-2, a POU domain gene expressed in quail embryos', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1491(1–3), pp. 27–36. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00011-7.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lopes, M. L., Schmidt, G. S. and Coutinho, L. L. (2000) 'Identification of proliferating cells in

chicken embryos using 5-bromo- 2'-deoxyuridine immunohistochemical detection', *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), pp. 149–153. doi: 10.1590/S1415-47572000000100028.

Louvi, A. and Artavanis-Tsakonas, S. (2006) 'Notch signalling in vertebrate neural development', *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), pp. 93–102. doi: 10.1038/nrn1847.

Love, M. I., Huber, W. and Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Luo, J. *et al.* (2018) 'SOX2 inhibits cell proliferation and metastasis, promotes apoptotic by downregulating CCND1 and PARP in gastric cancer.', *American journal of translational research*, 10(2), pp. 639–647. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29511458.

Lutterbach, B. *et al.* (1998) 'ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors', *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), pp. 7176–7184. doi: 10.1128/MCB.18.12.7176.

MacFarlane, L.-A. and R. Murphy, P. (2010) 'MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer', *Current Genomics*, 11(7), pp. 537–561. doi: 10.2174/138920210793175895.

Madarsz, E. (2013) 'Diversity of Neural Stem/Progenitor Populations: Varieties by Age, Regional Origin and Environment', *Neural Stem Cells - New Perspectives*. doi: 10.5772/55678.

Mandell, J. G. and Barbas, C. F. (2006) 'Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases', *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server), pp. W516–W523. doi: 10.1093/nar/gkl209.

Manzanares, M., Locascio, A. and Nieto, M. (2001) 'The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution', *Trends in Genetics*, 17(4), pp. 178–181. doi: 10.1016/S0168-9525(01)02232-6.

Margolin, J. F. *et al.* (1994) 'Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), pp. 4509–4513. doi: 10.1073/pnas.91.10.4509.

Marín, F. and Nieto, M. A. (2006) 'The expression of Scratch genes in the developing and adult brain', *Developmental Dynamics*, 235(9), pp. 2586–2591. doi: 10.1002/dvdy.20869.

Marmorstein, R. and Zhou, M.-M. (2014) 'Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(7), pp. a018762–a018762. doi: 10.1101/cshperspect.a018762.

Matsuda, T. and Cepko, C. L. (2004) 'Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), pp. 16–22.

Mattar, P. *et al.* (2004) 'A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex', *Developmental Biology*, 273(2), pp. 373–389. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.06.013.

Mendenhall, E. M. *et al.* (2013) 'Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers', *Nature Biotechnology*, 31(12), pp. 1133–1136. doi: 10.1038/nbt.2701.

Metzstein, M. M. and Horvitz, H. R. (1999) 'The C. elegans cell death specification gene ces-1 encodes a snail family zinc finger protein.', *Molecular cell*, 4(3), pp. 309–19. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518212.

Mishra, G. R. (2006) 'Human protein reference database--2006 update', *Nucleic Acids Research*, 34(90001), pp. D411–D414. doi: 10.1093/nar/gkj141.

Misteli, T. *et al.* (2000) 'Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells', *Nature*, 408(6814), pp. 877–881. doi: 10.1038/35048610.

Molina, A. and Pituello, F. (2017) 'Playing with the cell cycle to build the spinal cord', *Developmental Biology*, 432(1), pp. 14–23. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.12.022.

Mullen, R. J., Buck, C. R. and Smith, A. M. (1992) 'NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.', *Development (Cambridge, England)*, 116(1), pp. 201–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1483388.

Murciano, A. *et al.* (2002) 'Interkinetic Nuclear Movement May Provide Spatial Clues to the Regulation of Neurogenesis', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(2), pp. 285–300. doi: 10.1006/mcne.2002.1174.

Nakada Y, Hunsaker TL, H. R. and J. J. (2004) 'Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification', *Development*, 131(6), pp. 1319–1330. doi: 10.1242/dev.01008.

Nakada, Y. et al. (2004) 'Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification', *Development*, 131(6), pp. 1319–1330. doi: 10.1242/dev.01008.

Nakakura, E. K. *et al.* (2001) 'Mammalian Scratch: A neural-specific Snail family transcriptional repressor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), pp. 4010–4015. doi: 10.1073/pnas.051014098.

Nakakura, Eric K. *et al.* (2001) 'Mammalian Scratch participates in neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma cells', *Molecular Brain Research*, 95(1–2), pp. 162–166. doi: 10.1016/S0169-328X(01)00246-7.

Naumova, N. *et al.* (2012) 'Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture', *Methods*, 58(3), pp. 192–203. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.07.022.

Nellesen, D. T., Lai, E. C. and Posakony, J. W. (1999) 'Discrete Enhancer Elements Mediate Selective Responsiveness of Enhancer of split Complex Genes to Common Transcriptional Activators', *Developmental Biology*, 213(1), pp. 33–53. doi: 10.1006/dbio.1999.9324.

Neuwald, A. F. and Landsman, D. (1997) 'GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein.', *Trends in biochemical sciences*, 22(5), pp. 154–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175471.

Nieto, M. A. (2002) 'The snail superfamily of zinc-finger transcription factors', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), pp. 155–166. doi: 10.1038/nrm757.

Oleksiewicz, U. *et al.* (2017) 'TRIM28 and Interacting KRAB-ZNFs Control Self-Renewal of Human Pluripotent Stem Cells through Epigenetic Repression of Pro-differentiation Genes', *Stem Cell Reports*, 9(6), pp. 2065–2080. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.031.

Ong, C.-T. and Corces, V. G. (2011) 'Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression', *Nature Reviews Genetics*, 12(4), pp. 283–293. doi: 10.1038/nrg2957.

Parras, C. M. *et al.* (2002) 'Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity', *Genes and Development*, 16(3), pp. 324–338. doi: 10.1101/gad.940902.

Patel, A. *et al.* (2009) 'On the Mechanism of Multiple Lysine Methylation by the Human Mixed Lineage Leukemia Protein-1 (MLL1) Core Complex', *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), pp. 24242–24256. doi: 10.1074/jbc.M109.014498.

Paul, V. *et al.* (2012) 'Scratch2 modulates neurogenesis and cell migration through antagonism of bHLH proteins in the developing neocortex', *Cerebral Cortex*, 24(3), pp. 754–772. doi: 10.1093/cercor/bhs356.

Perez, S. E., Rebelo, S. and Anderson, D. J. (1999) 'Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo.', *Development (Cambridge, England)*, 126(8), pp. 1715–28. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079233.

Perrone-Bizzozero, N. and Bolognani, F. (2002) 'Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity', *Journal of Neuroscience Research*, 68(2), pp. 121–126. doi: 10.1002/jnr.10175.

Perry, M. W., Boettiger, A. N. and Levine, M. (2011) 'Multiple enhancers ensure precision of gap gene-expression patterns in the Drosophila embryo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), pp. 13570–13575. doi: 10.1073/pnas.1109873108.

Perry, R. B.-T. and Ulitsky, I. (2016) 'The functions of long noncoding RNAs in development and

stem cells', Development, 143(21), pp. 3882–3894. doi: 10.1242/dev.140962.

Phan, K. D. *et al.* (2011) 'Neogenin May Functionally Substitute for Dcc in Chicken', *PLoS ONE*. Edited by I. Sugihara, 6(7), p. e22072. doi: 10.1371/journal.pone.0022072.

Place, R. F. *et al.* (2008) 'MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), pp. 1608–1613. doi: 10.1073/pnas.0707594105.

Rada-Iglesias, A. *et al.* (2011) 'A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans.', *Nature*, 470(7333), pp. 279–83. doi: 10.1038/nature09692.

Raisner, R. *et al.* (2018) 'Enhancer Activity Requires CBP/P300 Bromodomain-Dependent Histone H3K27 Acetylation', *Cell Reports*, 24(7), pp. 1722–1729. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.041.

Rajagopalan, S. *et al.* (2004) 'Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule', *Nature Cell Biology*, 6(8), pp. 756–762. doi: 10.1038/ncb1156.

Ramat, A. *et al.* (2016) 'Escargot and Scratch regulate neural commitment by antagonizing Notch activity in Drosophila sensory organs', *Development*, 143(16), pp. 3024–3034. doi: 10.1242/dev.134387.

Rand, M. D., Lake, R. J. and Artavanis-Tsakonas, S. (1999) 'Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development', *Science*, 284(5415), pp. 770–776. doi: 10.1126/science.284.5415.770.

Raposo, A. A. S. F. *et al.* (2015) 'Ascl1 coordinately regulates gene expression and the chromatin landscape during neurogenesis', *Cell Reports*, 10(9), pp. 1544–1556. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.025.

Rathjen, T. *et al.* (2009) 'High throughput sequencing of microRNAs in chicken somites', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 583(9), pp. 1422–1426. doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.048.

Richman, R. *et al.* (1988) 'Micronuclei and the cytoplasm of growing Tetrahymena contain a histone acetylase activity which is highly specific for free histone H4', *The Journal of Cell Biology*, 106(4), pp. 1017–1026. doi: 10.1083/jcb.106.4.1017.

Roark, M. *et al.* (1995) 'Scratch, a Pan-Neural Gene Encoding a Zinc Finger Protein Related To Snail, Promotes Neuronal Development', *Genes and Development*, 9(19), pp. 2384–2398. doi: 10.1101/gad.9.19.2384.

Robertshaw, E. *et al.* (2013) 'Irx3 and Pax6 establish differential competence for Shh-mediated induction of GABAergic and glutamatergic neurons of the thalamus', *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 110(41), pp. E3919–E3926. doi: 10.1073/pnas.1304311110.

Rodríguez-Aznar, E., Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M. A. (2013) 'Scratch2 prevents cell cycle re-entry by repressing miR-25 in postmitotic primary neurons', *Annals of Internal Medicine*, 158(6), pp. 5095–5105. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4459-12.2013.

Rodríguez-Aznar, E. and Nieto, M. A. (2011) 'Repression of Puma by Scratch2 is required for neuronal survival during embryonic development', *Cell Death and Differentiation*, 18(7), pp. 1196–1207. doi: 10.1038/cdd.2010.190.

Roeder, R. G. (1996) '[14] Nuclear RNA polymerases: Role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription', in, pp. 165–171. doi: 10.1016/S0076-6879(96)73016-1.

Rogers, C. D. *et al.* (2009) 'Xenopus Sox3 activates sox2 and geminin and indirectly represses Xvent2 expression to induce neural progenitor formation at the expense of non-neural ectodermal derivatives', *Mechanisms of Development*, 126(1–2), pp. 42–55. doi: 10.1016/j.mod.2008.10.005.

Rothbart, S. B. and Strahl, B. D. (2014) 'Interpreting the language of histone and DNA modifications', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), pp. 627–643. doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.03.001.

Rothe, M. *et al.* (2016) 'Comparative expression study of sipa family members during early Xenopus laevis development', *Development Genes and Evolution*, 226(5), pp. 369–382. doi: 10.1007/s00427-016-0556-1.

Sakurai, K. and Osumi, N. (2008) 'The Neurogenesis-Controlling Factor, Pax6, Inhibits Proliferation and Promotes Maturation in Murine Astrocytes', *Journal of Neuroscience*, 28(18), pp. 4604–4612. doi: 10.1523/jneurosci.5074-07.2008.

Sander, M. *et al.* (2000) 'Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates.', *Genes & development*, 14(17), pp. 2134–9. doi: 10.1101/gad.820400.

Sandmann, T. *et al.* (2006) 'A Temporal Map of Transcription Factor Activity: Mef2 Directly Regulates Target Genes at All Stages of Muscle Development', *Developmental Cell*, 10(6), pp. 797–807. doi: 10.1016/j.devcel.2006.04.009.

Sasai, Y. *et al.* (1994) 'Xenopus chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes', *Cell*, 79(5), pp. 779–790. doi: 10.1016/0092-8674(94)90068-X.

Sayed, D. and Abdellatif, M. (2011) 'MicroRNAs in Development and Disease', *Physiological Reviews*, 91(3), pp. 827–887. doi: 10.1152/physrev.00006.2010.

Scardigli, R. et al. (2001) 'Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying

neuronal identity in the spinal cord', *Neuron*, 31(2), pp. 203–217. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00358-0.

Schultz, D. *et al.* (2002) 'SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins', *Genes & Development*, 16(8), pp. 919–932. doi: 10.1101/gad.973302.

Shi, Yujiang *et al.* (2004) 'Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1', *Cell*, 119(7), pp. 941–953. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012.

Shibata, M. *et al.* (2011) 'MicroRNA-9 Regulates Neurogenesis in Mouse Telencephalon by Targeting Multiple Transcription Factors', *Journal of Neuroscience*, 31(9), pp. 3407–3422. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5085-10.2011.

Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2011) 'Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/ progenitor cells', *Frontiers in Neuroscience*, 5(JUN), pp. 1–7. doi: 10.3389/fnins.2011.00078.

Shin, H. Y. *et al.* (2017) 'CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(May), pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms15464.

Shin, J.-O. *et al.* (2012) 'miR-200b regulates cell migration via Zeb family during mouse palate development', *Histochemistry and Cell Biology*, 137(4), pp. 459–470. doi: 10.1007/s00418-012-0915-6.

Shlyueva, D., Stampfel, G. and Stark, A. (2014) 'Transcriptional enhancers: From properties to genome-wide predictions', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 15(4), pp. 272–286. doi: 10.1038/nrg3682.

Siemen, H. *et al.* (2011) 'Pumilio-2 Function in the Mouse Nervous System', *PLoS ONE*. Edited by X. Zhuang, 6(10), p. e25932. doi: 10.1371/journal.pone.0025932.

Simmons, A. D. *et al.* (2001) 'Neurogenin2 expression in ventral and dorsal spinal neural tube progenitor cells is regulated by distinct enhancers', *Developmental Biology*, 229(2), pp. 327–339. doi: 10.1006/dbio.2000.9984.

Skene, P. J., Henikoff, J. G. and Henikoff, S. (2018) 'Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 13(5), pp. 1006–1019. doi: 10.1038/nprot.2018.015.

Small, S., Blair, A. and Levine, M. (1992) 'Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo.', *The EMBO journal*, 11(11), pp. 4047–57. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327756.

Smith, J. and Schoenwolf, G. (1997) 'Neurulation: coming to closure', *Trends in Neurosciences*, 20(11), pp. 510–517. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01121-1.

Soufi, A., Donahue, G. and Zaret, K. S. (2012) 'Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome.', *Cell*, 151(5), pp. 994–1004. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.045.

Spilker, C. *et al.* (2008) 'SPAR2, a novel SPAR-related protein with GAP activity for Rap1 and Rap2', *Journal of Neurochemistry*, pp. 071027034046003-??? doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04991.x.

Spitz, F. and Furlong, E. E. M. (2012) 'Transcription factors: From enhancer binding to developmental control', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 613–626. doi: 10.1038/nrg3207.

Splinter, E., Grosveld, F. and Laat, W. de (2003) '3C Technology: Analyzing the Spatial Organization of Genomic Loci In Vivo', in, pp. 493–507. doi: 10.1016/S0076-6879(03)75030-7.

Sripathy, S. P., Stevens, J. and Schultz, D. C. (2006) 'The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression', *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), pp. 8623–8638. doi: 10.1128/MCB.00487-06.

Stanojevic, D., Small, S. and Levine, M. (1991) 'Regulation of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the Drosophila embryo', *Science*, 254(5036), pp. 1385–1387. doi: 10.1126/science.1683715.

Stephens, M. (2016) 'False discovery rates: a new deal', *Biostatistics*, p. kxw041. doi: 10.1093/biostatistics/kxw041.

Stormo, G. D. and Zhao, Y. (2010) 'Determining the specificity of protein-DNA interactions', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 751–760. doi: 10.1038/nrg2845.

Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000) 'The language of covalent histone modifications', *Nature*, 403(6765), pp. 41–45. doi: 10.1038/47412.

Sugitani, Y. (2002) 'Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons', *Genes & Development*, 16(14), pp. 1760–1765. doi: 10.1101/gad.978002.

Sun, M. and Kraus, W. L. (2015) 'From Discovery to Function: The Expanding Roles of Long NonCoding RNAs in Physiology and Disease', *Endocrine Reviews*, 36(1), pp. 25–64. doi: 10.1210/er.2014-1034.

Sunabori, T. *et al.* (2008) 'Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors', *Journal of Cell Science*, 121(8), pp. 1204–1212. doi: 10.1242/jcs.025064.

Swartz, M. E. *et al.* (2001) 'EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb.', *Development (Cambridge, England)*, 128(23), pp. 4669–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731448.

Szyf, M. (2015) 'Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics', *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd, 21(2), pp. 134–144. doi: 10.1016/j.molmed.2014.12.004.

Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*, 126(4), pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tanaka, S. *et al.* (2004) 'Interplay of SOX and POU Factors in Regulation of the', *Microbiology*, 24(20), pp. 8834–8846. doi: 10.1128/MCB.24.20.8834.

Thellmann, M., Hatzold, J. and Conradt, B. (2003) 'The Snail-like CES-1 protein of C. elegans can block the expression of theBH3-only cell-death activator gene egl-1 by antagonizing the function of bHLH proteins', *Development*, 130(17), pp. 4057–4071. doi: 10.1242/dev.00597.

Thibodeau, A. *et al.* (2017) 'Chromatin interaction networks revealed unique connectivity patterns of broad H3K4me3 domains and super enhancers in 3D chromatin', *Scientific Reports*, 7(1), p. 14466. doi: 10.1038/s41598-017-14389-7.

Torchia, J., Glass, C. and Rosenfeld, M. G. (1998) 'Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses.', *Current opinion in cell biology*, 10(3), pp. 373–83. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9640539.

Trizzino, M., Kapusta, A. and Brown, C. D. (2018) 'Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion', *BMC Genomics*, 19(1), p. 468. doi: 10.1186/s12864-018-4850-3.

Turner, E. C. *et al.* (2004) 'Controlling the DNA Binding Specificity of bHLH Proteins through Intramolecular Interactions', *Chemistry & Biology*, 11(1), pp. 69–77. doi: 10.1016/j.chembiol.2003.12.015.

Uchikawa, M. *et al.* (2003) 'Functional Analysis of Chicken Sox2 Enhancers Highlights an Array of Diverse Regulatory Elements that Are Conserved in Mammals activated Sox2 (Figure 1A, st. 5-8). At neurulation stages when the sheet of Sox2-expressing cells converges (Fig-ure 1A, st. 8)', *Developmental Cell*, 4, pp. 509–519.

Ulitsky, I. *et al.* (2011) 'Conserved Function of lincRNAs in Vertebrate Embryonic Development despite Rapid Sequence Evolution', *Cell*, 147(7), pp. 1537–1550. doi:

10.1016/j.cell.2011.11.055.

Urrutia, R. (2003) 'Protein family review KRAB-containing zinc-finger repressor proteins', *Genome Biology*, 4, p. 231. Available at: http://genomebiology.com/2003/4/10/231.

Valencia-Sanchez, M. A. *et al.* (2006) 'Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs', *Genes and Development*, 20(5), pp. 515–524. doi: 10.1101/gad.1399806.

Vieceli, F. M. *et al.* (2013) 'The transcription factor chicken Scratch2 is expressed in a subset of early postmitotic neural progenitors', *Gene Expression Patterns*. Elsevier B.V., 13(5–6), pp. 189–196. doi: 10.1016/j.gep.2013.03.004.

Waddington, C. H. (1942) 'The Epigenotype', *Endeavour*, pp. 18–20. doi: 10.1093/ije/dyr184.

Wallace, K., Liu, T. H. and Vaessin, H. (2000) 'The pan-neural bHLH proteins DEADPAN and ASENSE regulate mitotic activity and cdk inhibitor dacapo expression in the Drosophila larval optic lobes.', *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 26(1), pp. 77–85.

Wang, H. N. *et al.* (2012) 'Identification and characterization of the pumilio-2 expressed in zebrafish embryos and adult tissues', *Molecular Biology Reports*, 39(3), pp. 2811–2819. doi: 10.1007/s11033-011-1040-7.

Wapinski, O. L. *et al.* (2013) 'Hierarchical Mechanisms for Direct Reprogramming of Fibroblasts to Neurons', *Cell*, 155(3), pp. 621–635. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.028.

Wei, H. *et al.* (2017) 'Caenorhabditis elegans CES-1 Snail Represses pig-1 MELK Expression To Control Asymmetric Cell Division', *Genetics*, 206(4), pp. 2069–2084. doi: 10.1534/genetics.117.202754.

Whyte, W. A. *et al.* (2012) 'Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation', *Nature*, 482(7384), pp. 221–225. doi: 10.1038/nature10805.

Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000) 'Specific interference with gene function by doublestranded RNA in early mouse development', *Nature Cell Biology*, 2(2), pp. 70–75. doi: 10.1038/35000016.

Williams, R. M. *et al.* (2018) 'Genome and epigenome engineering CRISPR toolkit for in vivo modulation of cis -regulatory interactions and gene expression in the chicken embryo', *Development*, 145(4), p. dev160333. doi: 10.1242/dev.160333.

Wilson, B. *et al.* (2006) 'Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis', *Science*, 313(5787), pp. 640–644. doi: 10.1126/science.1124704.

Wilson, N. H. and Key, B. (2007) 'Neogenin: One receptor, many functions', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(5), pp. 874–878. doi: 10.1016/j.biocel.2006.10.023.

Wolf, G., Greenberg, D. and Macfarlan, T. S. (2015) 'Spotting the enemy within: Targeted silencing of foreign DNA in mammalian genomes by the Krüppel-associated box zinc finger protein family', *Mobile DNA*, 6(1), p. 17. doi: 10.1186/s13100-015-0050-8.

Wysocka, J. and Herr, W. (2003) 'The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch', *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), pp. 294–304. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00088-4.

Yan, B. *et al.* (2013) 'Coordination of cell proliferation and cell fate determination by CES-1 snail.', *PLoS genetics*, 9(10), p. e1003884. doi: 10.1371/journal.pgen.1003884.

Yao, C.-X. *et al.* (2013) 'miR-200b targets GATA-4 during cell growth and differentiation', *RNA Biology*, 10(4), pp. 465–480. doi: 10.4161/rna.24370.

Ye, B. *et al.* (2004) 'nanos and pumilio Are Essential for Dendrite Morphogenesis in Drosophila Peripheral Neurons', *Current Biology*, 14(4), pp. 314–321. doi: 10.1016/j.cub.2004.01.052.

Yu, D. *et al.* (2012) 'Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression', *Cell*, 150(5), pp. 895–908. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.002.

Zampetaki, A., Albrecht, A. and Steinhofel, K. (2018) 'Long Non-coding RNA Structure and Function: Is There a Link?', *Frontiers in Physiology*, 9. doi: 10.3389/fphys.2018.01201.

Zaret, K. S. and Carroll, J. S. (2011) 'Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression', *Genes & Development*, 25(21), pp. 2227–2241. doi: 10.1101/gad.176826.111.

Zentner, G. E., Tesar, P. J. and Scacheri, P. C. (2011) 'Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions', *Genome Research*, 21(8), pp. 1273–1283. doi: 10.1101/gr.122382.111.

Zhao, W. et al. (2017) 'CRISPR–Cas9-mediated functional dissection of 3'-UTRs', Nucleic Acids Research, 45(18), pp. 10800–10810. doi: 10.1093/nar/gkx675.

Zhao, X. *et al.* (2010) 'MicroRNA-Mediated Control of Oligodendrocyte Differentiation', *Neuron*. Elsevier Ltd, 65(5), pp. 612–626. doi: 10.1016/j.neuron.2010.02.018.
APÊNDICE

cE1				
ALX1	EVX1	ID4	NRL	SHOX2
ARNTL	FEV	INSM1	OLIG1	SIX1
ARX	FOS	ISL2	OLIG2	SMAD4
ASCL1	FOXA1	JUN	OLIG3	SOX10
ASCL2	FOXA2	KLF4	ONECUT2	SOX15
ATF1	FOXB1	LBX1	OTX1	SOX17
ATF4	FOXC1	LHX2	OTX2	SOX2
ATOH1	FOXD1	LHX3	PAX3	SOX5
BARHL1	FOXG1	LHX4	PAX5	SOX6
BARHL2	FOXO3	LHX6	PAX6	SOX9
BCL6	FOXO6	LHX8	PAX7	SRF
BHLHE22	FOXP1	LHX9	PBX1	SRY
BHLHE23	FOXP2	LMX1A	PBX3	STAT3
BHLHE40	GATA2	MAFB	PDX1	Т
BHLHE41	GATA3	MAFK	PHOX2A	TBR1
BSX	GBX1	MEF2A	PHOX2B	TBX20
СЕВРВ	GBX2	MEF2C	PITX1	TCF12
CREB1	GCM1	MEF2D	PITX3	TCF3
CREB3L2	GFI1	MEIS1	PLAG1	TCF4
CRX	GLI2	MNX1	POU1F1	TCF7
CUX2	GLIS2	MSX1	POU3F1	TCF7L2
DLX1	GRHL2	MYB	POU3F2	TEAD2
DLX2	GSC	MYC	POU3F3	TFAP2B
DMBX1	GSX1	MYCN	POU3F4	TFAP2C
DMRT3	GSX2	NEUROD1	POU4F1	TGIF1
E2F1	HES1	NEUROD2	PRDM1	TGIF2
EGR2	HES2	NEUROG1	PROP1	TWIST1
EGR3	HES5	NEUROG2	PROX1	UNCX
EMX1	HESX1	NFE2L2	PRRX1	VAX1
EMX2	HEY2	NFIA	RAX	VAX2
EN1	HIF1A	NFIX	RBPJ	VSX1
EN2	HNF1B	NKX2-5	RELA	VSX2
EOMES	HOXA2	NKX6-1	RFX4	ZBTB18
ESR2	HOXB2	NKX6-2	RORA	ZEB1
ETS1	HOXB3	NR2C2	RORB	ZIC1
ETV1	HOXC10	NR2E1	RUNX2	ZIC3
ETV4	HOXD3	NR2F1	RUNX3	ZIC4
ETV5	HOXD9	NR2F2	RXRA	
ETV6	ID2	NR4A2	RXRG	

Tabela 1: Genes neurais com sítios identificados em cE1 após intersecção dos dados de Gene Onthology e JASPAR.

mE1				
ALX1	FOXA1	JUN	OLIG1	SCRT2
ARNTL	FOXA2	KLF4	OLIG2	SHOX2
ARX	FOXB1	LBX1	OLIG3	SIX1
ASCL1	FOXC1	LEF1	OTX1	SIX3
ASCL2	FOXD1	LHX2	OTX2	SMAD4
ATF1	FOXG1	LHX3	PAX3	SOX1
ATF4	FOXO3	LHX4	PAX5	SOX10
ATOH1	FOXO6	LHX6	PAX6	SOX15
BARHL1	FOXP1	LHX8	PAX7	SOX17
BARHL2	FOXP2	LHX9	PBX1	SOX2
BCL6	GATA2	LMX1A	PBX3	SOX5
BHLHE22	GATA3	MAFB	PDX1	SOX6
BHLHE23	GBX1	MAFK	PHOX2A	SOX9
BHLHE40	GBX2	MECOM	PHOX2B	SRF
BHLHE41	GCM1	MEF2A	PITX1	SRY
BSX	GFI1	MEF2C	PITX3	STAT3
CEBPB	GLI2	MEF2D	PLAG1	Т
CREB1	GLIS2	MEIS1	POU1F1	TBR1
CREB3L2	GRHL2	MNX1	POU3F1	TBX19
CRX	GSC	MSX1	POU3F2	TBX20
CUX2	GSX1	MTF1	POU3F3	TCF12
DLX1	GSX2	MYB	POU3F4	TCF3
DLX2	HES1	MYC	POU4F2	TCF4
DMBX1	HES2	MYCN	PRDM1	TCF7
DMRT3	HES5	NEUROD1	PROP1	TCF7L2
E2F1	HES7	NEUROD2	PROX1	TEAD2
EGR2	HESX1	NEUROG1	PRRX1	TFAP2B
EGR3	HEY2	NEUROG2	RARA	TFAP2C
EMX1	HIF1A	NFE2L2	RARB	TGIF1
EMX2	HMX2	NFIA	RARG	TGIF2
EN1	HMX3	NFIX	RAX	TWIST1
EN2	HNF1B	NKX2-5	RBPJ	UNCX
EOMES	HOXA2	NKX6-1	RELA	VAX1
ESR2	HOXB2	NKX6-2	REST	VAX2
ETS1	НОХВЗ	NR2C2	RFX4	VSX1
ETV1	HOXC10	NR2E1	RORA	VSX2
ETV4	HOXD3	NR2E3	RORB	ZBTB18
ETV5	HOXD9	NR2F1	RUNX2	ZEB1
ETV6	ID2	NR2F2	RUNX3	ZIC1
EVX1	ID4	NR2F6	RXRA	ZIC3
FEV	INSM1	NR4A2	RXRG	ZIC4
FOS	ISL2	NRL	SCRT1	

Tabela 2: Genes neurais com sítios identificados em mE1 após intersecção dos dados de Gene Onthology e JASPAR.

cE1	M1	M2
ASCL1	ASCL1	EGR1
EGR1	EGR1	FOXC1
FOXC1	FOXC1	FOXC2
FOXC2	FOXC2	FOXD1
FOXD1	FOXD1	GATA3
GATA3	GATA3	GLI2
GLI2	GLI2	GLIS2
GLIS2	GLIS2	HES1
HES1	HES1	HNF1B
HES5	HES5	HOXA11
HNF1B	HNF1B	HOXC11
HOXA11	HOXA11	HOXD11
HOXC11	HOXC11	ID2
HOXD11	HOXD11	INSM1
ID2	ID2	MEF2C
INSM1	INSM1	MYC
MEF2C	MEF2C	NKX3-1
MYC	MYC	PAX2
NKX3-1	NKX3-1	PBX1
PAX2	PAX2	POU3F3
PBX1	PBX1	PROX1
POU3F3	POU3F3	RARB
PROX1	PROX1	SIX1
SIX1	SIX1	SMAD4
SMAD4	SMAD4	SOX9
SOX9	SOX9	STAT1
STAT1	STAT1	TFAP2A
TCF21	TFAP2A	TFAP2B
TFAP2A	TFAP2B	TP73
TFAP2B	TP73	
TP73		

Tabela 3: Genes presentes no desenvolvimento renal e adrenal com sítios identificados em cE1, M1 e M2 após intersecção dos dados de Gene Onthology e JASPAR.

ANEXO I - LISTA DE VETORES

Ensaio	Nome	Referência
	pTK-mRFP	Uchikawa et al.,2003
	pTK-mE1-mRFP	
	pTK-cE1-mRFP	
	pTK-USE1-mRFP	
	pTK-USE3-mRFP	
	pTK-USE-mRFP	
	pTK-cE1-c1-mRFP	
	pTK-cE1-c2-mRFP	
Validação de	pTK-cE1-c3-mRFP	
Enhancers	pTK-cE1-c4-mRFP	
	pTK-cE1-c5-mRFP	
	pTK-Ep2-mRFP	
	pTK-cE1- <i>Sox2</i> -2mut-mRFP	
	pTK-cE1-Sox2-19mut-mRFP	
	pTK-M1-mRFP	
	pTK-M2-mRFP	
	pCU6.3-sgRNA	Williams et al.,2018
	pCAG-Cas9-2A-Citrine	Williams et al.,2018
	pX330-dCas9-LSD1	Williams et al.,2018
	pCAG-dCas9-KRAB-2A-EGFP	Williams et al.,2018
	pCU6.3-cE1-sg1	
	pCU6.3-cE1-sg2	
	pCU6.3-cE1-sg3	
	pCU6.3-USE1-sg1	
	pCU6.3-USE1-sg2	
	pCU6.3-USE1-sg3	
CRISPR/Cas9	pCU6.3-USE3-sg1	
	pCU6.3-cE1-sg1-Scrambled	
	pCU6.3-cE1-sg2-Scrambled	
	pCU6.3-cE1-sg3-Scrambled	
	pCU6.3-USE1-sg1-Scrambled	
	pCU6.3-USE1-sg2-Scrambled	
	pCU6.3-USE1-sg3-Scrambled	
	pCU6.3-USE3-sg1-Scrambled	
	pCU6.3-UTR-sg1	
	pCU6.3-UTR-sg2	
	pCU6.3-UTR-sg2-Scrambled	
Controle de	pCDNA3.1-mGFP	Criado in lab; de Magalhães, CG
eletroporação	mCherry-RAS	Simoes-Costa Lab.

	pGL3-basic	Promega cat #E1751
	pRL-TK	Promega cat #E2241
	pmir-GLO	Promega cat #1330
Luciferase	pGL3-cE1	
	pGL3-mE1	
	Pmir-GLO- <i>cScrt2</i> -3'UTR	
	pCAGGS-mAscl1-IRES-GFP	Castro <i>et al.,</i> 2006
	pCAG-m <i>Brn2</i>	Addgene #19711
	pCI-IRES-H2B:RFP	Marianne Bronner Lab
	pMes	Swartz <i>et al.,</i> 2001
Expressão	pCIG	Matsuda e Cepko, 2004
	pCI-AVITAG-mBrn2-IRES-H2B:RFP	Criado in lab; Goes, CP
	pMes-m <i>Brn2</i> -IRES-GFP	Criado <i>in lab</i> ; Goes, CP
	pCI-FLAG:Sox2-IRES-H2B:RFP	Criado <i>in lab</i> ; Goes, CP
Redução da	pRNA-U6.1-let7-Sponge	Phillip Zamore (Addgene #35664)
atividade de	pRNA-U6.1-125b-Sponge	
miRNAs	pRNA-U6.1-200b-Sponge	
Função de	pCIG-VP16:Scrt2-GFP	Criado <i>in lab</i> ; Ventrici, G
cScrt2	pCIG-Eng:Scrt2-GFP	Criado <i>in lab</i> ; Ventrici, G
	pCIG-AVI-TAG:Scrt2-eGFP	Modificado in lab; Goes, CP
Síntese de Sonda	pGEM-T- <i>cScrt2</i>	Criado <i>in lab</i> ; Goes, CP