

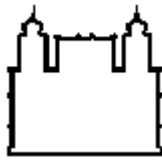


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
Da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**EDIÇÃO GENÔMICA COMO ESTUDO DA REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA SÍNDROME DE
PRADER-WILLI**

Régis Afonso Costa

Rio de Janeiro
Janeiro de 2020



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
Da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**EDIÇÃO GENÔMICA COMO ESTUDO DA REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA SÍNDROME DE
PRADER-WILLI**

Régis Afonso Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientação: Dra. Leticia da Cunha Guida

Coorientação: Dr. Juan Llerena Clinton Junior

Rio de Janeiro
Janeiro de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Costa, Régis Afonso.

EDIÇÃO GENÔMICA COMO ESTUDO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA SÍNDROME DE PRADER-WILLI / Régis Afonso Costa. - Rio de Janeiro, 2020.
108 f.

Tese (Doutorado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2020.

Orientadora: Leticia da Cunha Guida.
Co-orientador: Juan Llerena Clinton Junior.

Bibliografia: f. 75-97

1. Hormônio de crescimento. 2. Síndrome de Prader-Willi. 3. CRISPR Cas9. 4. Células GH3. 5. Expressão gênica. I. Título.

Agradecimentos

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo suporte para concluir esta tese, pela presença constante e, principalmente, por todo amor e pela formação que me deram.

Aos companheiros do Laboratório de Alta Complexidade do IFF, por criarem um ambiente de trabalho divertido e por aturarem minha rotina maluca de trabalho.

Ao Dr. Leonardo Gomes por toda ajuda, parceria, risadas e contribuição durante meu doutorado.

À Dra. Leticia Guida, por abrir as portas para mim, pela orientação durante esta tese e pela confiança no meu trabalho. Muito obrigado por tudo.

Special thanks to the NichollsLab folks for the great welcome and companionship. I've learned so much there.

To Erik, thank you for all the knowledge shared. You are a remarkable young researcher and I look up to you as a model. I was really happy to be there when you had your baby girl.

To Marie, thank you for all the good moments and for all I've learned from you. I can divide my molecular biology skills as in B.M. and A.M. You made my stay there much happier.

To Dr. Robert Nicholls, my gratefulness could not be truly expressed in words here. You've opened your lab and your home to me. You're the most brilliant person I've ever met. I am happy to say that I end this thesis with an advisor, a mentor, and a friend.

A todos que, em algum momento, riram ou choraram comigo, muito obrigado.

Por último, agradeço a Deus, por me guiar até aqui e por me dar forças para superar todos os obstáculos impostos neste caminho.

“Nada é permanente, exceto a mudança.”

Heráclito de Éfeso.

Resumo

A síndrome de Prader-Willi (SPW) é associada a distúrbios neurológicos, comportamentais e diversas deficiências hormonais, incluindo o hormônio do crescimento (GH). Embora o tratamento de reposição do GH melhore a composição corporal, o crescimento e o quadro clínico geral, esta não é uma cura e suas bases clínicas ainda são desconhecidas na síndrome. A SPW ocorre por três mecanismos moleculares: deleção paterna da região 15q11-q13; dissomia uniparental materna 15; ou defeitos de *imprinting*. A linhagem celular GH3 de pituitária de rato foi utilizada por ser um modelo bem estudado de células secretoras de GH e prolactina. Utilizando o sistema CRISPR-Cas9, realizamos a deleção completa da região ortóloga da SPW de 3,2 Mb na linhagem GH3, produzindo o genótipo da síndrome *in vitro*, para investigar quais segmentos gênicos da SPW estão envolvidos na regulação do GH. A investigação de *off-targets* por sequenciamento Sanger revelou desde reparos sem alteração nucleotídica até grandes rearranjos nos flancos dos sítios-alvo dos gRNAs, inclusive com inserções não previstas de DNA exógeno. Nossos dados ressaltam a necessidade de projetar cuidadosamente as condições experimentais e caracterizar minuciosamente os materiais genéticos obtidos pelo sistema CRISPR-Cas9. A análise do DNA no flanco proximal da região da SPW em ratos demonstrou sequências que podem representar o marco inicial do silenciamento gênico por *imprinting* na região, assim como ocorre próximo a *UBE3A* em humanos na porção distal da região ortóloga. Os quatro modelos de sublinhagens SPW-*Knockout* gerados neste trabalho com deleções de 3,2 Mb envolvendo toda a região da SPW permitirão compreender melhor a relação entre os genes da síndrome e as vias moleculares envolvidas na regulação do GH, além da sua utilização como modelos em novos estudos sobre a SPW. O gene *SNORD107* surgiu como o principal candidato a regular o GH dentro da região da SPW, podendo formar um complexo ribonucleoprotéico que exerceria função regulatória pós-transcricional na cadeia de produção do GH.

Palavras-chave: Hormônio de crescimento. Síndrome de Prader-Willi. CRISPR-Cas9. Células GH3. Expressão gênica.

Abstract

Prader-Willi syndrome (PWS) is associated with neurodevelopmental and behavioral abnormalities and numerous hormonal deficiencies, including growth hormone (GH). Although GH replacement treatment improves body composition, growth, and the overall clinical presentation, it is not a cure and its clinical basis is still unknown in the syndrome. PWS occurs by three molecular mechanisms: paternal deletion of the 15q11-q13 region; maternal uniparental disomy 15; or imprinting defects. The rat pituitary GH3 cell line is a well-studied model of GH and prolactin-secreting cells. Using the CRISPR-Cas9 system, we performed the complete deletion of the 3.2 Mb PWS orthologous region in GH3 cells, generating the syndrome genotype *in vitro* to investigate which PWS genes are involved in GH regulation. Off-target analysis by Sanger sequencing revealed perfect breakpoint repairs, but also large rearrangements on the flanking sites of the gRNA targets, including unexpected insertions of exogenous DNA. These data highlight the need to carefully design the experimental conditions and fully characterize the genetic materials obtained by CRISPR-Cas9. DNA analysis on the proximal flank of the PWS region in rats has shown sequences that can mark the initial borders of genomic imprinting, as it occurs close to *UBE3A* in humans in the distal portion of the orthologous region. The four PWS-Knockout models generated in this work with 3.2 Mb deletions involving the entire PWS region will allow a better understanding of the relationship between PWS genes and the molecular pathways involved in GH regulation and can be used as models in new PWS studies. The *SNORD107* gene has emerged as the main candidate to regulate GH within the PWS region and may form a ribonucleoprotein complex with a post-transcriptional regulatory function in the GH production pathway.

Keywords: Growth hormone. Prader-Willi Syndrome. CRISPR-Cas9. GH3 cells. Gene expression.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. O hormônio do crescimento	1
1.2. A síndrome de Prader-Willi	3
1.2.1. Efeitos terapêuticos do hormônio do crescimento na SPW	6
1.2.2. Genética e diagnóstico molecular da SPW	8
1.3. Edição genética	13
1.3.1. Nucleases de Dedo de Zinco (ZFN)	14
1.3.2. Nucleases Efetoras Pseudo-Ativadoras de Transcrição (TALEN)	16
1.3.3. O sistema CRISPR Cas9	17
1.4. Justificativa	21
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Materiais e metodologia	24
3.1 Cultura de células GH3	24
3.2. Análise da ploidia da região 1q22 da linhagem GH3	24
3.2.1. Bandeamento G e cariotipagem da linhagem GH3	24
3.2.2. Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência (FISH)	25
3.2.3. Dissociação em Alta Resolução Sensível à Metilação (MS-HRM)	26
3.3. Edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9	27
3.3.1. Construção dos plasmídeos com gRNAs	28
3.3.2. Transfecção do sistema CRISPR-Cas9 em células GH3	29
3.3.3. Confirmação e caracterização das edições genômicas	30
3.3.4. Triagem e avaliação de <i>off-targets</i>	32
3.4. Extração do RNA total e síntese de cDNA	35
3.4.1. Análise da expressão da expressão gênica por RT-PCR	35
3.4.2. Análise da expressão da expressão gênica por RT-PCR digital	37
4. Resultados	38
5. Discussão	61
6. Conclusões	74
Referências bibliográficas	75
Anexo 1. Mapa gênico dos <i>primers</i> utilizados para as PCRs de caracterização das edições genômicas.	98

Lista de figuras

Figura 1. Características físicas da SPW _____	5
Figura 2. Efeitos da terapia de reposição do GH _____	7
Figura 3. Classes moleculares da SPW _____	9
Figura 4. Mapa gênico da região cromossômica 15q11-q13 _____	10
Figura 5. Editores de genoma associados a proteínas _____	15
Figura 6. Os estágios da resposta imune por CRISPR-Cas _____	18
Figura 7. A endonuclease Cas9 programada para edição genética _____	20
Figura 8. Mapas gênicos das regiões ortólogas da síndrome de Prader-Willi _____	22
Figura 9. Mapa do plasmídeo com sítios de clonagem para oligos de gRNAs _____	28
Figura 10. Cariótipo por bandeamento G de células GH3 _____	38
Figura 11. Análise citogenética de GH3 por FISH da região da SPW _____	39
Figura 12. Análise da curva de dissociação por MS-HRM do DNA parental de GH3 _____	40
Figura 13. Células GH3 sob microscópio de fluorescência dois dias após transfecção _____	41
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção por CRISPR-Cas9 _____	42
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção nas linhagens GH3 fundadoras _____	43
Figura 16. Comparação dos eletroferogramas dos sítios-alvo dos gRNAs 1 e 3 e da sequência de DNA editada de GH3 F90 _____	44
Figura 17. Curvas de dissociação por MS-HRM do DNA das linhagens GH3 fundadoras _____	45
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção nas sublinhagens GH3 _____	46
Figura 19. Alinhamento das sequências de DNA nos pontos de quebra da deleção nas sublinhagens GH3 _____	48
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose das PCRs de confirmação da inversão nas sublinhagens GH3 _____	50
Figura 21. Alinhamento das sequências de DNA nos pontos de quebra de inversão nas sublinhagens GH3 _____	51

Figura 22. Análise do número de cópias da região da SPW nas sublinhagens GH3 por PCR digital _____	53
Figura 23. Curvas de dissociação por MS-HRM do DNA das sublinhagens GH3 F90 _____	54
Figura 24. Alinhamento das sequências de DNA para análise da atividade <i>on-target</i> e <i>off-target</i> pelo sistema CRISPR-Cas9 _____	56
Figura 25. Painel de expressão gênica da linhagem GH3 parental por RT-PCR _____	57
Figura 26. Quantificação dos níveis de expressão gênica da linhagem GH3 parental por PCR digital _____	58
Figura 27. Painel de expressão gênica das sublinhagens GH3 por RT-PCR _____	59
Figura 28. Quantificação dos níveis de expressão gênica das sublinhagens GH3 por PCR digital _____	60
Figura 29. Mapa gênico da síndrome de Prader-Willi em ratos e os alvos CRISPR _____	62
Figura 30. Alinhamento das sequências de possíveis sítios-alvo do fator de ligação CTCF na porção proximal da SPW _____	66
Figura 31. Comparação de painéis de expressão da linhagem GH3 parental por RT-PCR _____	68

Lista de tabelas

Tabela 1. Características clínicas das fases nutricionais na SPW _____	4
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para PCR do DNA de GH3 após conversão bissulfito _____	27
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para MS-HRM _____	27
Tabela 4. gRNAs para deleções da região da SPW _____	28
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados para PCR de caracterização das edições genômicas _____	31
Tabela 6. Triagem de <i>off-targets</i> _____	33
Tabela 7. <i>Primers</i> utilizados para PCR de avaliação e caracterização de <i>off-targets</i> _____	34
Tabela 8. <i>Primers</i> utilizados para análise de expressão por RT-PCR _____	36
Tabela 9. Resumo da triagem de sublinhagens GH3 F90 com deleção _____	49
Tabela 10. Resumo da triagem de sublinhagens GH3 F90 com inversão _____	52
Tabela 11. Visão geral da atividade <i>on-target</i> e <i>off-target</i> pelo sistema CRISPR-Cas9 _____	55

1. Introdução

1.1. O hormônio do crescimento

A primeira sugestão de uma função do hormônio do crescimento (GH, do inglês *Growth Hormone*) foi feita pelo neurologista francês Pierre Marie, em 1886, associando a acromegalia e tumores da pituitária (ou hipófise) (Tattersall 1996). Nas décadas seguintes, firmou-se a ideia de que a principal ação do GH (também chamado de somatotropina) era controlar e promover o crescimento esquelético (Olarescu et al. 2019). Ainda mais tarde, haveria o entendimento de que as ações deste hormônio são, de fato, muito mais numerosas e complexas.

O GH é um peptídeo produzido na região anterior da pituitária pelas células somatotrópicas. O fator de transcrição Pit-1 é responsável pela diferenciação das células somatotrópicas na pituitária, assim como pelo estímulo da sua secreção hormonal (Cheung et al. 2018). Nos seres humanos, o GH é liberado no sangue de forma pulsátil e em ritmo circadiano, com picos de produção máxima à noite (Ranke & Wit 2018). Este hormônio tem papel fundamental não somente no controle do crescimento esquelético, mas também no metabolismo e composição corporal, além de regular crescimento e diferenciação celulares, apoptose e reorganização do citoesqueleto. Devido a esta abrangência de ações, tem influência sobre diversos sistemas, incluindo cardíaco, imunológico e nervoso, e processos fisiológicos, como envelhecimento e longevidade (Bartke et al. 2016, Lu et al. 2019).

Apesar do GH apresentar ações diretas, a maioria dos seus efeitos é mediada periféricamente de forma indireta, através do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), produzido principalmente no fígado. Estes hormônios formam juntos o eixo GH-IGF (ou eixo somatotrófico) que é o principal determinante do crescimento linear pós-natal (Yakar et al. 2005, Savage et al. 2011). Proteínas transportadoras e receptores associados a GH e IGF-1 também desempenham papel fundamental no controle da regulação do metabolismo e de processos fisiológicos. Este complexo eixo hormonal sofre regulação genética, celular e neuroendócrina, e ainda possui diversos componentes e mecanismos desconhecidos (Kovacs et al. 2008, Ranke & Wit 2018).

Durante a homeostasia, a secreção do GH pela pituitária é modulada por dois hormônios hipotalâmicos, o hormônio liberador do GH (GHRH), que estimula a sua liberação, e a somatostatina, que tem ação inibitória (Dattani & Malhotra 2019). IGF-1 exerce *feedback* negativo sobre a produção de GHRH e GH e *feedback* positivo sobre a liberação de somatostatina. A grelina (conhecida como o hormônio da fome), secretada principalmente pelo estômago, é mais uma potente estimuladora do GH, por amplificar a liberação hipotalâmica de GHRH. No eixo somatotrófico, outros hormônios como insulina, leptina, glicocorticóides e hormônios tireoidianos e sexuais modulam a síntese e a biodisponibilidade de GH e/ou IGF-1, (Renaville et al. 2002, Hull & Harvey 2014, Renes et al. 2019).

O GHRH atua nas células somatotróficas através da ativação da proteína G estimulatória acoplada a seu receptor de membrana, regulando positivamente a expressão do gene *GH1* (17q24.2, em humanos) e estimulando a liberação do GH (Formosa et al. 2013). Já o receptor do hormônio do crescimento (GHR) é encontrado em diversos tecidos, incluindo adiposo, muscular, cardíaco, nervoso e, claro, hepático (Dehkhoda et al. 2018). A ligação do GH ao GHR ativa a via de sinalização JAK-STAT, composta por proteínas transdutoras de sinal Janus quinases (JAKs) e fatores de transcrição (STATs). No núcleo, os STATs estimulam a expressão de genes-alvo, como citocinas supressoras da sinalização (exercem *feedback* negativo no GHR) e IGF-1 (Woelfle et al. 2003, Wormald & Hilton 2004).

A síntese de IGF-1 ocorre majoritariamente no fígado, aproximadamente 75% (Ohlsson et al. 2009). Este hormônio é encontrado na circulação fortemente ligado a proteínas transportadoras, que são importantes para a sua biodisponibilidade. O IGF-1 é conhecido como um fator de crescimento global com atividades autócrina, parácrina ou endócrina, através da ligação ao seu receptor (IGF-1R), expresso por quase todos os tipos celulares. Além de determinante no crescimento e diferenciação celular pós-natal, o IGF-1 desempenha papel fundamental no metabolismo da glicose, estímulo da síntese protéica, hipertrofia das fibras musculares (sob estímulo apropriado), inibição da apoptose celular e redução dos níveis de gordura corporal (Rajpathak et al. 2009, Kim & Lee 2015).

A complexidade na regulação da produção do GH e seus efeitos se reflete no grande número de doenças relacionadas ao crescimento com diferentes características patofisiológicas. A deficiência do GH (DGH) é definida por distúrbios congênitos ou adquiridos na pituitária (Davis et al. 2013). Pacientes com DGH possuem clínica altamente variável, porém retardo do crescimento, baixa estatura, diminuição da massa muscular, excesso de gordura corporal e perda da qualidade de vida são sintomas clássicos. Nestes casos, o diagnóstico preciso e precoce é fundamental, pois o quadro é facilmente tratável com a reposição hormonal do GH (Grimberg & Allen 2017). A DGH está presente em várias doenças com etiologias distintas, como síndrome de Turner, hipotireoidismo, acondroplasia e síndrome de Prader-Willi (Molitch et al. 2011, Aycan & Nijat Baş 2014, Dattani & Malhotra 2019).

1.2. A síndrome de Prader-Willi

A síndrome de Prader-Willi (SPW) foi descrita em 1956 pelos pesquisadores Andrea Prader, Alexis Labhart e Heinrich Willi baseados em um trabalho com nove crianças com uma tétrade clínica em comum: pequena estatura, retardo mental, obesidade e mãos e pés pequenos (Prader et al. 1956, Butler et al. 1986). Em 1961, Prader e Willi expandiram a análise do fenótipo, considerando, também, a presença de hipotonia e o desenvolvimento de diabetes *mellitus* na infância (Dunn 1968).

Considerada uma doença genética rara, a SPW tem incidência estimada em cerca de 1 para cada 10.000-30.000 nascidos vivos, em diferentes países (Butler 2011, Wang et al. 2016, Smith & Hung 2017). Os dados estatísticos são, provavelmente, subestimados em diversas regiões do mundo porque muitos indivíduos afetados não são diagnosticados precocemente. A síndrome acomete igualmente homens e mulheres e ocorre em todos os grupos étnicos (Wattendorf & Muenke 2005). A SPW foi a primeira doença reconhecidamente relacionada a erros de *imprinting* genômico em humanos, e também a primeira demonstrada como consequência de dissomia uniparental (Nicholls et al. 1989a, Butler 2009).

As manifestações clínicas variam com a idade, afetando diferentes sistemas (Tabela 1). O tamanho do feto geralmente está dentro da faixa de

normalidade. Peso ao nascer e índice de massa corporal são 15% menores em média, quando comparados a irmãos não afetados. A hipotonia pré-natal pode causar diminuição do movimento fetal, posição fetal anormal no parto e aumento da incidência de parto assistido ou cesariana (Butler et al. 2009, Miller et al. 2011a).

Tabela 1. Características clínicas das fases nutricionais na SPW.

Intervalo de idade	Características clínicas
Pré-natal - nascimento	Diminuição dos movimentos fetais Menores peso e massa corporal ao nascer
0-9 meses	Hipotonia grave Problemas de alimentação e má evolução ponderal
9-25 meses	Melhora na alimentação e apetite Crescimento normal Atraso nos marcos de desenvolvimento
2,1-4,5 anos	Aumento de peso sem aumento do apetite ou excesso de calorias
4,5-8 anos	Aumento de peso com aumento do apetite Atraso global no desenvolvimento
8 anos - fase adulta	Hiperfagia, raramente sente saciedade Deficiência intelectual e problemas de comportamento Hipogonadismo
Fase adulta	Sensação de saciedade para alguns indivíduos Baixa estatura e mãos e pés pequenos

(Gunay-Aygun et al. 2001, Miller et al. 2011a, Driscoll et al. 2017)

Durante a fase perinatal, a hipotonia severa é um marco clínico tão característico da SPW que todo recém-nascido com este sintoma persistente deve ser testado geneticamente para a síndrome (Cassidy et al. 2012). Este quadro hipotônico (Figura 1A), leva a dificuldades de alimentação e ganho de peso devido, principalmente, à letargia e má sucção (Angulo et al. 2015). Outros achados neonatais comuns são diminuição do movimento e excitação espontânea, choro fraco, saliva espessa, reflexos fracos e hipogenitalismo (Gunay-Aygun et al. 2001). Por volta dos 9 meses de vida, o comportamento alimentar começa a normalizar e o estado hipotônico tende a melhorar, mas a hipotonia leve a moderada persiste ao longo da vida, com redução da massa e do tônus muscular (Richer et al. 2001, Angulo et al. 2015).

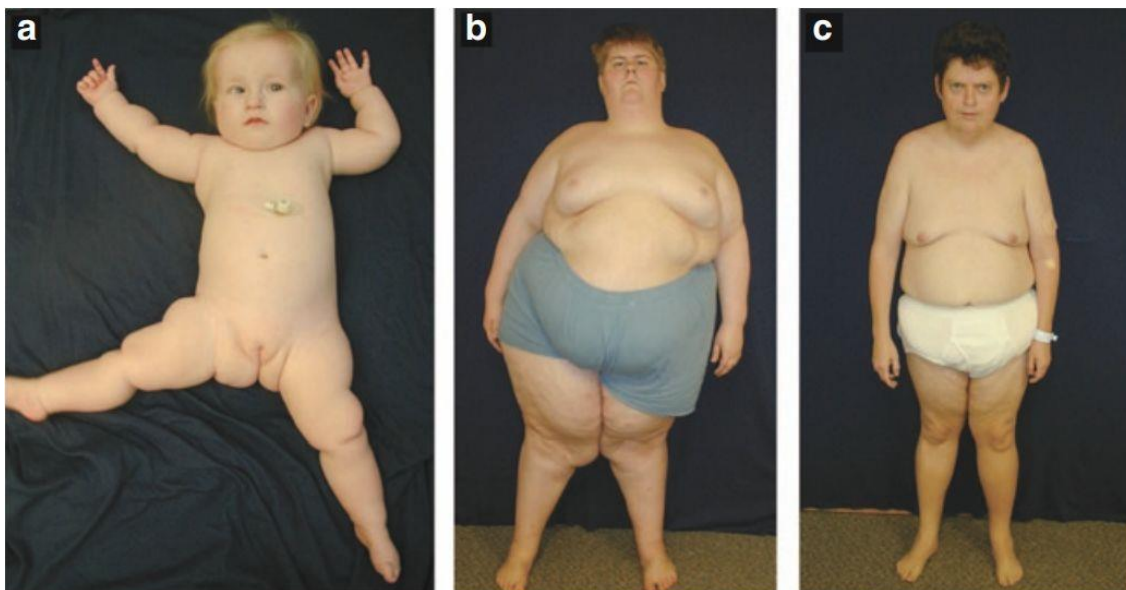


Figura 1. Características físicas da SPW. A, uma menina de 8 meses com hipotonia, hipogonadismo e necessidade de alimentação assistida. B, um homem de 19 anos com dieta descontrolada (mostrando obesidade central, típica da síndrome). C, um homem de 34 anos com dieta relativamente controlada (mostrando pele suspensa devido ao histórico de obesidade mórbida). Modificado de Cassidy et al. 2012.

Outros sintomas são observados com o avanço da idade e, até mesmo, exacerbados na ausência de tratamento. Há déficit no desenvolvimento motor em 90-100% das crianças com SPW, com marcos iniciais da primeira infância alcançados no dobro da idade normal (sentar aos 12 meses e andar aos 24 meses) (Whittington et al. 2004). Durante esta fase, a maioria dos indivíduos já apresenta problemas comportamentais característicos, como teimosia, manipulação, compulsividade, automutilação e dificuldade com mudança de rotina (Jauregi et al. 2007, Copet et al. 2010, Driscoll et al. 2017). Outro sintoma comum é deficiência intelectual de leve a moderada, com dificuldades de aprendizado e baixo desempenho acadêmico (Cassidy & Driscoll 2009, Cassidy et al. 2012). Na ausência da reposição do hormônio do crescimento (GH), quase sempre se observa baixa estatura durante a segunda década de vida, resultando em altura média de 155 cm para homens e 148 cm para mulheres, além de mãos e pés pequenos. Distúrbios do sono também são comuns na síndrome, sendo relacionados à apneia do sono, que prejudica a qualidade e a eficiência do sono, frequentemente associada à sonolência diurna excessiva e ao comportamento sedentário com maior predisposição à obesidade (Gunay-Aygun et al. 2001, Gillett & Perez 2016).

A partir da segunda infância, indivíduos com SPW podem atingir a obesidade severa, a menos que a ingestão de alimentos seja estritamente controlada pela família e pelos responsáveis (Figura 1B, C). A falta de saciedade (de origem hipotalâmica) resulta em hiperfagia, com busca obsessiva de alimentos. Nos casos de ingestão alimentar descontrolada, surgem as complicações da obesidade, que são as principais causas de morbidade e mortalidade: insuficiência respiratória, problemas cardiovasculares, apneia do sono, tromboflebite e edema crônico das pernas (Brambilla et al. 2011, Crinò et al. 2018). As taxas de mortalidade variam entre 1,25-3% ao ano, de acordo com o controle terapêutico (Butler et al. 2002, Whittington et al. 2015, Driscoll et al. 2017). A hiperfagia na SPW ainda não é totalmente compreendida e o controle do apetite continua sendo um desafio.

O sistema endócrino pode ser o mais afetado na SPW. A DGH está presente em até 84% dos casos e está associada à baixa estatura, mãos e pés pequenos, perda de força motora, aumento da massa gorda, diminuição de movimento e gasto energético e tolerância ao exercício reduzidos (Tauber & Cutfield 2007, Diene et al. 2010, Aycan & Nijat Baş 2014, Grugni et al. 2016, Khan et al. 2016). O hipogonadismo afeta ambos os sexos e se manifesta como hipogenitalismo, desenvolvimento incompleto na puberdade e infertilidade na maioria dos indivíduos (Crinò et al. 2003). Acredita-se que o hipogonadismo tenha origem hipotalâmica com consequente insuficiência de gonadotrofinas e hormônios sexuais (testosterona ou estrogênio) (Cassidy & Driscoll 2009, Heksch et al. 2017, Muscogiuri et al. 2019). Outras anormalidades endócrinas incluem hipotireoidismo (20-30%), insuficiência adrenal central (cerca de 5%) e diabetes *mellitus* tipo 2 (até 25%) devido a complicações da obesidade (Tauber et al. 2000; Butler et al. 2002; Corrias et al. 2012; Beauloye et al. 2015; Grugni et al. 2013).

1.2.1. Efeitos terapêuticos do hormônio do crescimento na SPW

A terapia de reposição do GH mostra efeitos positivos não apenas no crescimento e na composição corporal (Figura 2), mas também no desenvolvimento e no comportamento de pacientes com SPW. Outros quadros com melhoras são desenvolvimento cognitivo, flexibilidade, massa muscular,

função respiratória e, com a evolução do tratamento, na qualidade de vida de modo geral. Ainda que não se saibam os exatos mecanismos que levam a esta deficiência, os benefícios terapêuticos do GH em bebês, crianças e adultos vem sendo demonstrados em diversos estudos (Lindgren 2006, Höybye 2007, Mogul et al. 2008, Siemensma et al. 2012, Deal et al. 2013, Dykens et al. 2017).

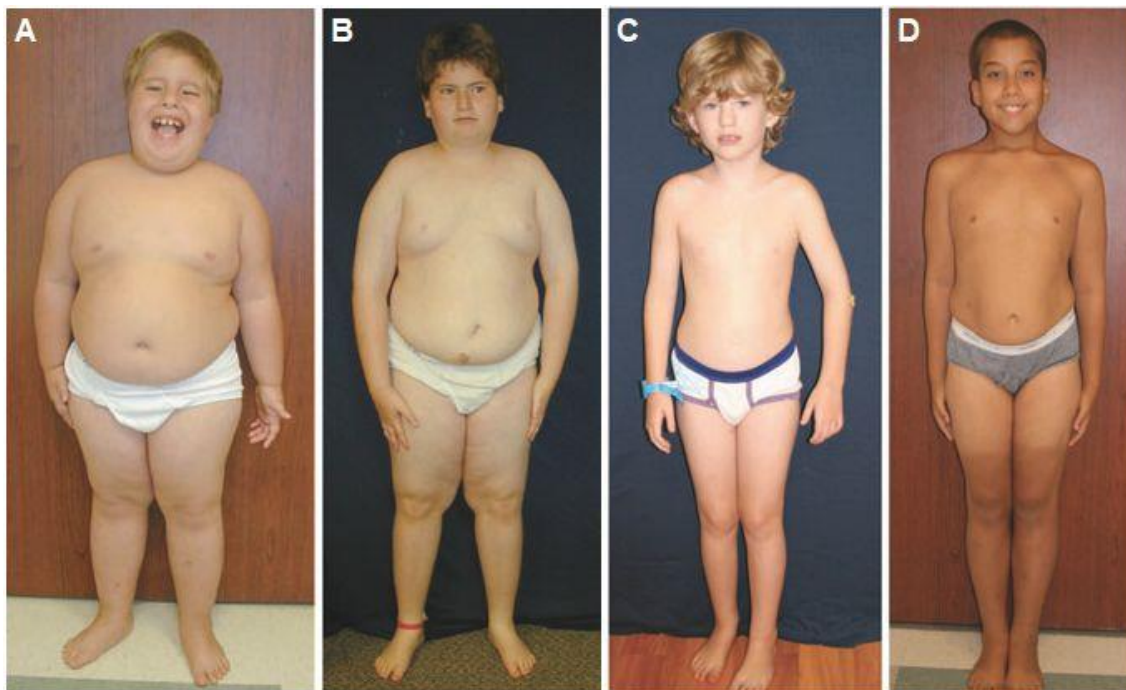


Figura 2. Efeitos da terapia de reposição do GH. A e B, crianças com sete e 13 anos, respectivamente, sem tratamento com GH. C e D, crianças de sete e 13 anos, respectivamente, em tratamento com GH e controle alimentar. Modificado de Cassidy et al. 2012.

O início do tratamento é indicado para recém-nascidos com DGH entre 4 e 6 meses, já que os maiores efeitos decorrentes da terapia são observados nos primeiros anos de vida (Siemensma et al. 2012). Especialmente na infância, quando iniciada precocemente e mantida a longo prazo, a reposição do GH regula a composição corporal, normalizando a altura final do adulto, a massa magra e a circunferência da cabeça (Figura 2), sempre aliada ao controle dos hábitos alimentares (Grugni et al. 2016). A dose recomendada para crianças é semelhante ao que se pratica com indivíduos com DGH de modo geral, isto é $1 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$. Na fase adulta, recomenda-se o uso de apenas 20% a 25% da dose infantil, já que os níveis do GH diminuem normalmente em

adultos, porém ainda contribuem para a manutenção da composição corporal e do desempenho cognitivo (Vogt & Emerick 2015, Driscoll et al. 2017).

O principal efeito colateral descrito em pacientes sob terapia de reposição do GH foi a morte súbita, inicialmente (Eiholzer 2005, Sacco & Di Giorgio 2005). Porém, indivíduos com SPW apresentam risco aumentado de morte súbita infantil, independentemente da terapia de reposição do GH (Whittington 2001, Nagai et al. 2005). Os distúrbios respiratórios são a causa mais comum de morte entre os pacientes tratados, mas também entre os controles não tratados com GH, deste modo, recomenda-se que o tratamento seja iniciado com doses baixas do hormônio e que o quadro respiratório seja cuidadosamente acompanhado (Miller et al. 2006, Einfeld et al. 2006, Berini et al. 2013, Angulo et al. 2015). Atualmente, a reposição hormonal do GH é considerada segura e eficaz e, mesmo com alguns poucos efeitos colaterais descritos a longo prazo, os benefícios da terapia excedem, em muito, os riscos (Carrel et al. 2010, DiVall & Radovick 2013).

1.2.2. Genética e diagnóstico molecular da SPW

A disfunção hipotalâmica observada na SPW pode ser a causa de vários sintomas (como hipotonia, atraso no desenvolvimento ou obesidade) que se sobrepõem a características de outras doenças com quadros clínicos similares, como obesidade normal e deficiência intelectual (Smith & Hung 2017). Portanto, a clínica necessita do suporte de testes moleculares para fechar o diagnóstico preciso.

A SPW é um distúrbio genômico da região cromossômica 15q11-q13, de expressão monoalélica, com atividade exclusiva dos genes paternos. A síndrome ocorre quando estes genes estão deletados ou inativados epigeneticamente, por defeitos de *imprinting* genômico (Whittington et al. 2007). Existem três mecanismos genéticos principais de ocorrência (Figura 3): deleção paterna da região 15q11-q13; dissomia uniparental materna 15; ou defeitos de *imprinting* (Nicholls & Knepper 2001, Cheon 2016). Por outro lado e na mesma região cromossômica, a perda da expressão do gene *UBE3A* (de atividade preferencial materna no cérebro) leva à síndrome de Angelman, com características clínicas completamente diferentes e que não será abordada

neste trabalho. Pela região afetada e mecanismos moleculares comuns, ambas são consideradas síndromes irmãs (Buiting 2010, Chamberlain & Lalande 2010).

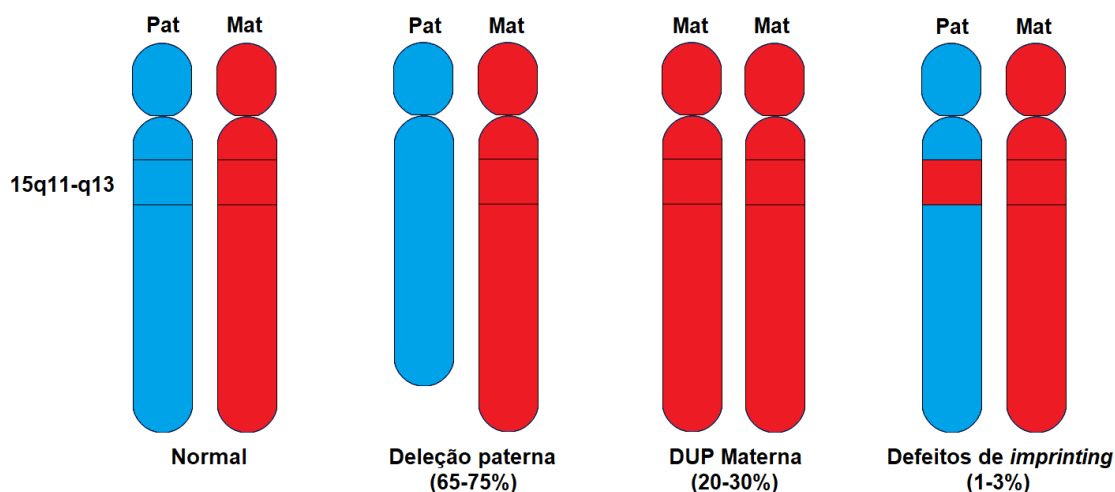


Figura 3. Classes moleculares da SPW. Cromossomo azul é paterno, vermelho é materno. Retângulo representa a região crítica para SPW. DUP, Dissomia Uniparental.

A região crítica da SPW abrange, aproximadamente, 6 Mb do braço longo do cromossomo 15 (Figura 4). Dentro desta região, pelo menos 2,5 Mb compreende genes com expressão diferencial dependendo da origem parental. Este *locus* possui genes codificadores de proteínas e diversos RNAs não codificantes, os quais tem atividade proposta de participação na metilação do DNA, no *splicing* alternativo e na regulação pós-transcricional, principalmente no cérebro (Cavaillé et al. 2000, Cassidy et al. 2012, Cheon 2016).

O gene bicistrônico *SNURF-SNRPN* é central na região da SPW e crucial para a compreensão do padrão de metilação nesta doença. A ilha CpG na extremidade 5' de *SNURF-SNRPN* (abrangendo sua região promotora, éxon 1 e íntron 1) sofre *imprinting* diferencial de acordo com a origem parental: o alelo paterno não metilado é expresso, enquanto que o alelo materno metilado é silenciado (Glenn et al. 1996). O centro de *imprinting* da SPW (CI, Figura 4) engloba a ilha CpG e o éxon 1 em uma região mínima de 4,3 Kb de sobreposição (Ohta et al. 1999). Além disso, a expressão do gene *SNURF-SNRPN* produz um longo e único transcrito, incluindo também CI, sete genes SNORDs, *IPW* e o antissenso de *UBE3A* (Figura 4), cuja hipótese é reprimir a expressão paterna do gene *UBE3A* (Yazdi et al. 2013, Galiveti et al. 2014, Butler et al. 2015, Koufaris et al. 2016).

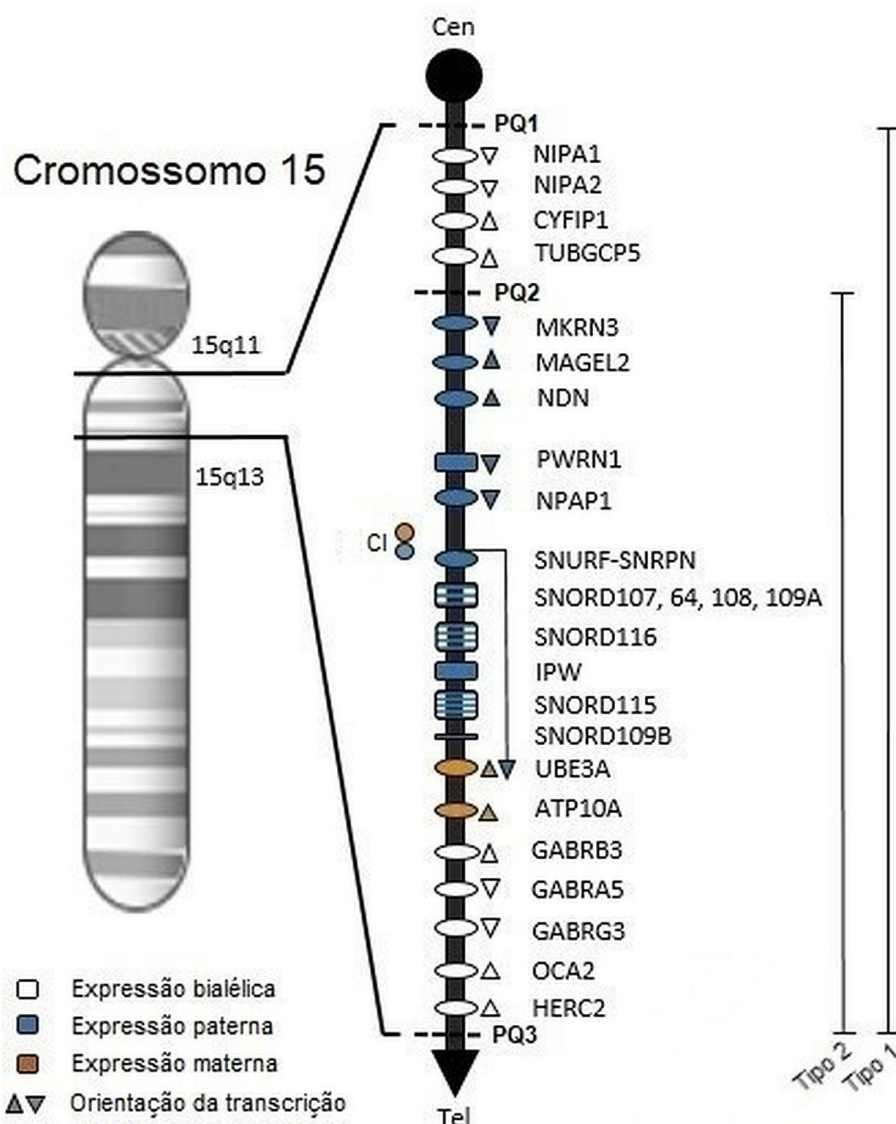


Figura 4. Mapa gênico da região cromossômica 15q11-q13. Símbolos ovais, genes codificadores de proteínas; Retângulos, genes de RNA não codificantes; PQ, ponto de quebra; CI: centro de *imprinting* da SPW; Cen: Centrômero; Tel: Telômero. (Costa et al. 2019)

A maioria dos pacientes com SPW (65-75%) apresenta a deleção da região 15q11-q13 de origem paterna (Figura 3), com tamanho de 5-6 Mb, aproximadamente (Nicholls & Knepper 2001, Bittel & Butler 2005). As deleções apresentam dois pontos de quebra proximais (PQ1 e PQ2) e um ponto comum de quebra distal (PQ3, Figura 4), isto porque estas regiões são flanqueadas por sequências de repetição de baixo número de cópias que predispõem ao pareamento cromossômico anormal e *crossing-over* desigual, resultando em erros durante a meiose (Christian et al. 1995, Cassidy & Driscoll 2009, Hartin et al. 2019). De acordo com os pontos de quebra, as deleções podem ser divididas em duas classes: tipo 1 (40% dos casos) com ~5,69 Mb de tamanho

entre PQ1-PQ3 e tipo 2 (60% dos casos) com ~4,82 Mb entre PQ2-PQ3. Indivíduos com a deleção do tipo 1 apresentam um fenótipo mais grave, com maior propensão ao comportamento obsessivo-compulsivo, autolesão e baixo desempenho acadêmico em comparação ao tipo 2. Ambos os tipos são quase sempre eventos *de novo* (Butler et al. 2004, Hartley et al. 2005, Angulo et al. 2015).

Em indivíduos com Dissomia Uniparental (DUP) materna, o cariótipo é normal (inclusive o bandeamento), porém, ambos os cromossomos 15 são herdados da mãe (Figura 3). A DUP materna foi descrita pela primeira vez na SPW em 1989 e representa de 20-30% dos casos da síndrome (Nicholls et al. 1989b, Cassidy et al. 2012). Na DUP materna, ocorre um mecanismo conhecido como resgate trissômico, onde há dois eventos anormais: o primeiro na meiose, resultando em um zigoto com trissomia 15 e o segundo é um evento somático, onde, após a fertilização, ocorre a perda do cromossomo 15 paterno. A trissomia 15 é uma causa relativamente comum de abortos precoces, e tem risco aumentado de acordo com a idade materna avançada. Indivíduos com SPW com DUP materna, quando comparados a portadores de deleção 15q11-q13 paterna, têm diagnóstico tardio com melhor comportamento social e desempenho acadêmico, porém, são mais propensos a surtos psicóticos e comportamento autista (Cassidy et al. 1997, Yamazawa et al. 2010).

Defeitos de *imprinting* (DI) ocorrem em cerca de 1-3% dos casos da SPW (Butler 2009). Indivíduos desta classe molecular apresentam herança biparental para os dois alelos da região de Prader-Willi, porém, apenas o padrão materno de metilação do DNA (Figura 3), epigeneticamente silenciado (Glenn et al. 1997, Buiting 2010). A maioria dos casos de DI são classificadas como “epimutações”, onde não há alteração na sequência de DNA. Estas epimutações são consideradas erros aleatórios no processo de *imprinting* ou no início da embriogênese, em casos raros de mosaïcismo somático. No entanto, 15% dos indivíduos com DI apresentam uma microdeleção (7,5-100 kb) na região do centro de *imprinting* da SPW (Figura 4), perto da região promotora do gene *SNURF-SNRPN*. Destes casos, metade são deleções *de novo* no centro de *imprinting* do cromossomo 15 de origem

paterna que ocorrem durante a espermatogênese ou após a fecundação. A outra metade é devido a herança de um pai saudável com uma deleção no centro de *imprinting* do cromossomo 15 materno, estes casos raros são de grande importância para o aconselhamento genético, já que o risco de recorrência é de 50% (Nicholls & Knepper 2001, Cheon 2016).

Devido a heterogeneidade clínica e molecular observada na SPW, o diagnóstico genético torna-se de grande importância na definição terapêutica e no aconselhamento genético. Apenas a análise da metilação do DNA é capaz de diagnosticar a SPW em todas as três classes moleculares (Figura 3) de uma só vez, além de diferenciá-la da síndrome de Angelman (clinicamente distinta). Se a análise da metilação for consistente com a SPW, isto já é suficiente para confirmar o diagnóstico clínico (Glenn et al. 1997, Angulo et al. 2015). O teste padrão-ouro e mais utilizado tem como alvo uma ilha CpG na extremidade 5' do gene *SNURF-SNRPN*, sendo capaz de diagnosticar corretamente mais de 99% dos casos, porém, sem distinguir as classes moleculares. Atualmente, existem três técnicas moleculares com esta capacidade de detecção: PCR metilação-específica (MS-PCR, padrão-ouro), amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação específica para metilação (MS-MLPA) e dissociação em alta resolução sensível à metilação (MS-HRM) (Kosaki et al. 1997, White et al. 2007, Bittel et al. 2007, Henkhaus et al. 2011, Botezatu et al. 2016, Ferreira et al. 2019).

Após a confirmação do status de metilação, a definição do mecanismo molecular exato por trás da origem da síndrome é importante para o aconselhamento genético. Os casos de deleção esporádica têm menos de 1% de risco de recorrência, enquanto raras anormalidades estruturais envolvendo o cromossomo 15 (como translocações, cromossomo em anel, isocromossomo ou inversões) podem chegar a 25-50%. Para todos estes casos, a avaliação da deleção da região 15q11-q13 é realizada pela técnica de Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) usando-se, normalmente, uma sonda para o gene *SNURF-SNRPN* (Hawkey & Smithies 1976, Smith et al. 1991, Robinson et al. 1998, Kuslich et al. 1999, Flori et al. 2004, Kim et al. 2012, Yip 2014). A DUP materna 15 é tipicamente *de novo* (recorrência <1%), probando e pais devem ser investigados por microarranjo de polimorfismos de nucleotídeo único

(SNPs) para um aconselhamento preciso (Santoro et al. 2017, Beygo et al. 2019). (Santoro et al. 2017; Beygo et al. 2019). A maioria dos casos de DI é classificada como epimutação sem alteração na sequência do DNA e tem menos de 1% de risco de recorrência. No entanto, 15% dos indivíduos com defeitos de impressão apresentam uma microdeleção herdada paternamente (7,5-100 kb) no centro de *imprinting*, casos em que o risco de recorrência é de 50%. A análise de CI por MS-MLPA ou sequenciamento de DNA define a origem exata deste fenômeno (Ohta et al. 1999, Gunay-Aygun et al. 2001, Driscoll et al. 2017). Uma vez que o mecanismo genético causador da síndrome foi decoberto, existem testes pré-natais disponíveis para gestações onde há risco aumentado de recorrência.

1.3. Edição genética

Nos últimos anos, a edição genômica deixou de ser uma possibilidade revolucionária para se tornar um procedimento de rotina em muitos laboratórios de pesquisa. A comunidade científica tem testemunhado o surgimento de diversas técnicas de manipulação de genomas. Os chamados editores de genoma são constituídos pela combinação de DNA nucleases com um grupamento de ligação ao DNA, que podem ser programados para se ligar, basicamente, a qualquer região genômica (Fernández et al. 2017, Manghwar et al. 2019).

Dentre os principais editores de genoma estão as Nucleases de Dedo de Zinco (ZFN, do inglês *Zinc-Finger Nucleases*), as Nucleases Efetoras Pseudo-Ativadoras de Transcrição (TALEN, do inglês *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) e o sistema de Pequenas Repetições Palindrômicas Agrupadas e Regularmente Inter-espaçadas (ou sistema CRISPR-Cas, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Todos estes métodos operam sob o mesmo princípio: introduzir uma quebra na dupla fita do DNA em uma sequência definida do genoma e, posteriormente, corrigi-la pelos mecanismos de reparo do DNA da própria célula (Cornu et al. 2017, Petersen 2017).

As quebras na dupla fita do DNA podem ser reparadas por dois métodos: o reparo terminal não homólogo (NHEJ, do inglês *Non-Homologous*

End-Joining) ou o reparo direcionado por homologia (HDR, *Homology-Directed Repair*). Embora possa ser preciso, o reparo NHEJ geralmente insere ou deleta algumas bases no sítio de quebra, resultando nas chamadas mutações InDel. Por este motivo, o reparo não homólogo é utilizado, principalmente, para inativação de genes. De modo alternativo, o HDR necessita da presença de DNA molde (homólogo ao ponto de quebra) junto do maquinário de edição genética para ser introduzido no *locus* desejado. Assim, a edição por homologia pode ser usada para reparar mutações causadoras de doenças ou para introduzir sequências específicas para alterar padrões de expressão (Li et al. 2011, Yin et al. 2014).

Uma edição genética bem-sucedida depende diretamente do modo que o editor de genoma é introduzido no tipo celular de interesse. Levando-se em consideração o contexto clínico, não só a eficiência da transfecção é importante, mas também a possível toxicidade gerada pelo procedimento no paciente. E, além da atividade na região de interesse (sequência-alvo), os editores de genoma também podem atuar sobre regiões não específicas (os chamados *off-targets*), isto é, *loci* do genoma que compartilhem alta similaridade com a sequência-alvo. Portanto, eficácia na transfecção e especificidade são pontos-chave na edição genômica (Mussolino et al. 2017, Yin et al. 2017).

1.3.1. Nucleases de Dedo de Zinco (ZFN)

Uma nuclease de dedo de zinco é uma proteína sintética com atividade endonuclease inespecífica da enzima de restrição *FokI* ligada a domínios protéicos de dedo de zinco com capacidade de ligação ao DNA em região sítio-específica do genoma. São necessárias, ao menos, duas moléculas de ZFNs para edição genética, já que a endonuclease *FokI* precisa formar dímeros para cortar o DNA (Petersen 2017). Esta demanda aumenta a especificidade do método, porque são necessários dois alvos (um em cada fita do DNA) na região de interesse para haver edição (Smith et al. 2000). As duas ZFNs se ligam ao DNA em sentidos apostos separados por 5-7 pares de bases e a quebra na dupla fita ocorre nesta região espaçadora (Figura 5A).

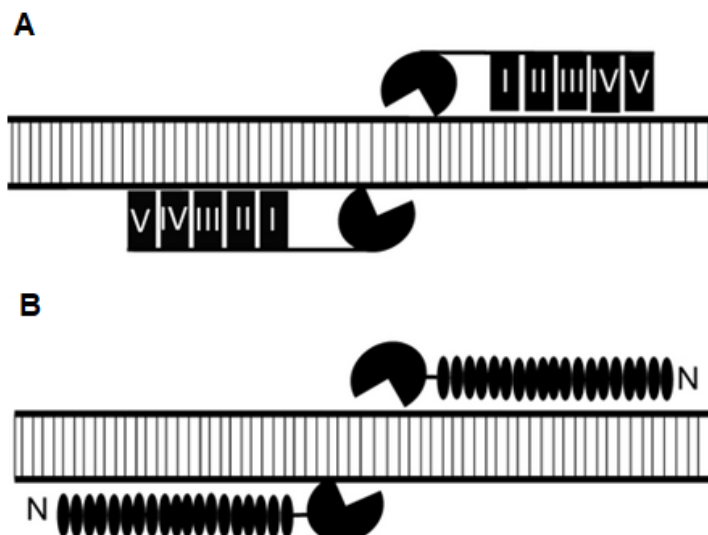


Figura 5. Editores de genoma associados a proteínas. A, ZFNs, compostas por múltiplos domínios ligados à endonuclease *FokI*; e B, TALENs, compostas pelo arranjo de aminoácidos com resíduos dipeptídicos variáveis, também ligados à endonuclease *FokI*. Modificado de Petersen, 2017.

Múltiplos domínios de dedo de zinco podem ser associados para aumentar o reconhecimento do DNA alvo, o que gera ganho em especificidade e eficiência (Figura 5A). Esta abordagem é utilizada para evitar a atividade indesejada em *off-targets*, uma limitação de grande preocupação nos editores de genoma (Radecke et al. 2010, Mushtaq et al. 2019).

As ZFNs ganharam força como uma eficiente ferramenta de edição de genes para a geração de mamíferos transgênicos em vários laboratórios de pesquisa básica, principalmente com camundongos, ratos, bovinos e suínos (Geurts et al. 2010, Meyer et al. 2010, Qian et al. 2015, Wei et al. 2015). Outra aplicação de destaque é na terapia gênica em culturas de tecidos. Há, inclusive, estudos pré-clínicos utilizando ZFNs em células humanas que já evoluíram para ensaios clínicos em andamento, aprovados pelas autoridades reguladoras dos EUA, como, por exemplo, trabalhos para inativação do co-receptor CCR5 do HIV (Maier et al. 2013, Tebas et al. 2014).

A metodologia das ZFNs tem limitações como dificuldade de desenho e alto custo, não sendo acessível a qualquer laboratório de biologia molecular, o que afeta o sucesso e o impacto desta tecnologia (Fernández et al. 2017). Além, claro, do surgimento e crescimento de outras técnicas de edição concorrentes e até mais atrativas, como TALEN e CRISPR-Cas9.

1.3.2. Nucleases Efetoras Pseudo-Ativadoras de Transcrição (TALEN)

As TALENs se assemelham as ZFNs por também utilizarem a endonuclease *FokI* para clivar o DNA e proteínas de reconhecimento de regiões sítio-específicas do genoma. Tais domínios protéicos são chamadas de Efetoras Pseudo-Ativadoras de Transcrição (TALEs) que, *in vivo*, se ligam ao DNA e atuam como fatores de transcrição, ativando a expressão de genes em regiões específicas. As TALEs são proteínas formadas por repetições, cada uma constituída por 33-35 aminoácidos com dois polimorfismos nas posições 12 e 13 (resíduo dipeptídico). Através de bioinformática e análises moleculares, chegou-se à conclusão de que este resíduo dipeptídico é hipervariável e que cada combinação de dois aminoácidos se liga especificamente a um nucleotídeo, estabelecendo uma relação 1:1 (Boch et al. 2009, Moscou & Bogdanove 2009).

Esta propriedade é usada pela engenharia genética para criar TALEs capazes de reconhecer sequências específicas do genoma (arranjos específicos para cada nucleotídeo) ligadas à atividade da endonuclease *FokI*, gerando cortes sítio-específicos no DNA (Figura 5B) e, posteriormente, estimulando o maquinário de reparo celular (Miller et al. 2011b). Assim como nas ZFNs, a atividade nucleolítica de *FokI* depende de dimerização, isto é, são necessárias duas TALENs (uma em cada fita) para haver quebra do DNA.

As TALENs diferem em alguns aspectos das ZFNs. As repetições TALEs são de três a quatro vezes maiores que as ZFNs, o que pode ser um limitante no processo de transfecção. O tamanho do espaço catalítico entre as TALENs é variável e pode levar à atividade fora do sítio-específico (*off-target*). Dependendo do desenho das ZFNs, pode haver ligação cruzada entre os “dedos” levando a um reconhecimento impreciso do DNA, o que não foi reportado nas TALENs (Cathomen & Keith Joung 2008, DeFrancesco 2012).

Uma limitação de importância das TALENs é que, apesar de poderem reconhecer potencialmente qualquer sequência do genoma, seus sítios de ligação têm que começar com uma timidina, o que deve ser levado em consideração na escolha dos possíveis alvos (Boch & Bonas 2010). Entretanto, no contexto geral, as TALENs mostram-se mais vantajosas que as ZFNs em

relação à simplicidade, custo e desenho. Além disso, as TALENs apresentam maior taxa de eficiência de edição, podendo chegar até 88% (Kim et al. 2013).

1.3.3. O sistema CRISPR Cas9

Os elementos CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) e suas proteínas associadas Cas (do inglês *CRISPR-associated*) são parte de um sistema imune adaptativo descoberto e investigado em procariotos há décadas (Ishino et al. 1987). No entanto, apenas em 2012, após trabalho liderado pelas pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, que a comunidade científica começou a enxergar o sistema CRISPR-Cas como uma ferramenta de edição genômica (Jinek et al. 2012).

De fato, os grandes avanços sobre o tema ocorreram a partir dos anos 2000. Os CRISPRs foram observados em um grande número de bactérias e arqueobactérias, com hipóteses sobre sua participação no reparo do DNA e na regulação gênica (Mojica et al. 2000, Makarova et al. 2002). Mais tarde, observou-se que as “sequências espaçadoras” que dão nome aos CRISPRs eram de origem viral e plasmidial. Estes fatos, ligados às descobertas de que os *loci* CRISPRs eram transcritos e que as proteínas Cas tinham ação enzimática de nuclease e helicase, levaram à proposta de que o CRISPR-Cas seria um sistema imune adaptativo em procariotos, não só capaz de guardar memória de invasões anteriores, mas também de passá-la para futuras gerações (Tang et al. 2002, Bolotin et al. 2005, Makarova et al. 2006, Barrangou et al. 2007).

A resposta imune mediada por CRISPR-Cas pode ser dividida em três estágios diferentes (Figura 6). O primeiro estágio é a adaptação, onde ocorre a incorporação de uma pequena sequência do DNA invasor como uma nova sequência espaçadora no *locus* CRISPR. Esta sequência espaçadora servirá como registro genético de infecções anteriores. A seleção desta sequência depende de um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM, do inglês *Protospacer Adjacent Motif*) que é uma pequena sequência do DNA invasor (a mais comum utilizada é 5'-NGG-3', onde N pode ser qualquer nucleotídeo). Os *loci* CRISPR bacterianos não possuem sequências 5'-NGG-3', o que previne que este maquinário de defesa clive o próprio DNA bacteriano (Marraffini &

Sontheimer 2010). O segundo estágio é a expressão, ou biogênese do RNA CRISPR (crRNA), onde o *locus* CRISPR é transcrito em um longo precursor (pré-crRNA), e processado por proteínas Cas e fatores acessórios em um crRNA maduro, que contém uma única sequência espaçadora do DNA invasor (Figura 6). O último estágio é a interferência, onde o crRNA maduro se complexa à enzima Cas, sendo guiado por uma sequência PAM adjacente, e degrada o DNA invasor por pareamento com o crRNA (Jiang & Doudna 2015, Rath et al. 2015).

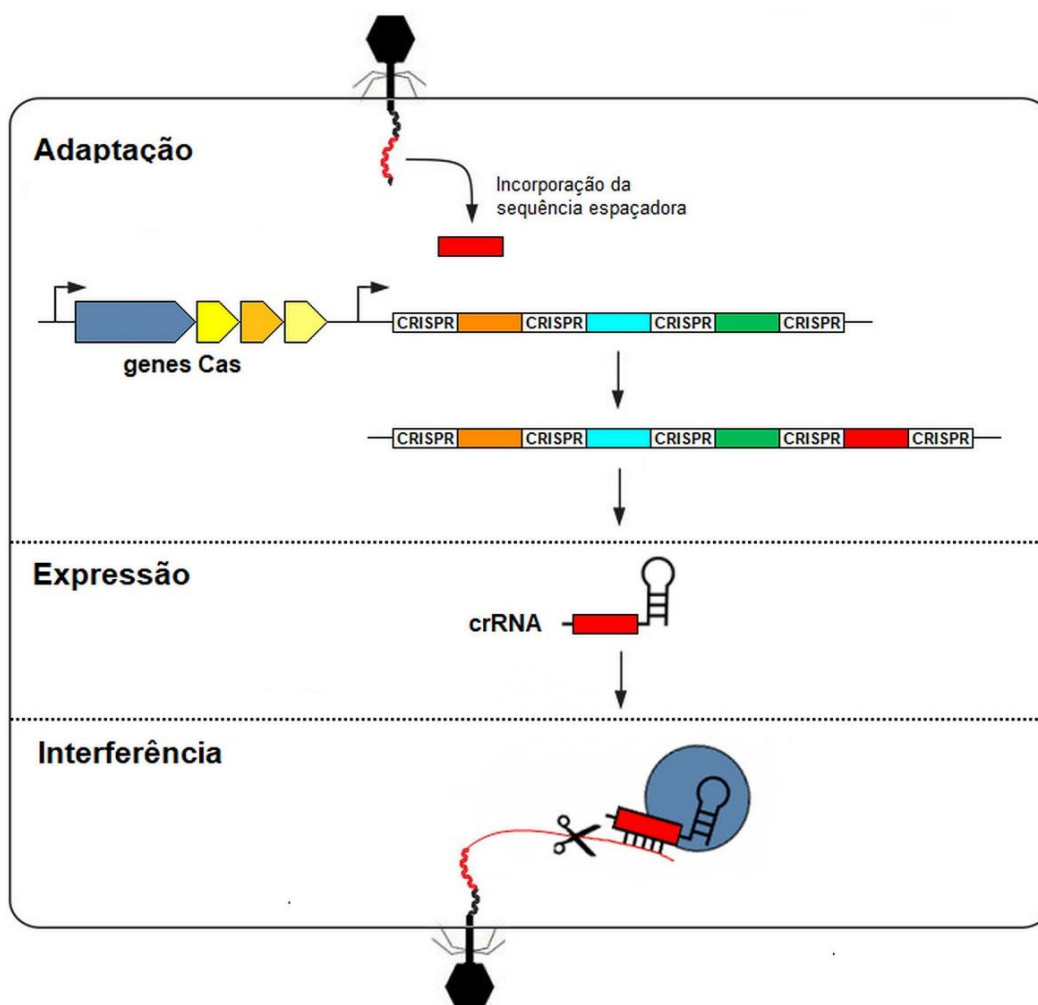


Figura 6. Os estágios da resposta imune por CRISPR-Cas. Na adaptação, ocorre a inserção de novas sequências espaçadoras originadas do DNA invasor no *locus* CRISPR. Durante a expressão, ocorre a transcrição do *locus* CRISPR e o processamento do crRNA. Por fim, na interferência, ocorre o reconhecimento e a clivagem do DNA invasor pelo sistema CRISPR-Cas.

Baseado na organização do *locus* CRISPR, nos diversos genes e proteínas efetoras envolvidas, o sistema CRISPR-Cas pode ser dividido em duas classes e seis tipos diferentes (I-VI) (Makarova et al. 2015, Koonin et al.

2017). O sistema CRISPR de classe 1 é caracterizado por um grande complexo de proteínas Cas para sua atividade (várias subunidades com funções distintas) e inclui os tipos I, III e IV. Já a segunda classe utiliza apenas uma proteína efetora, como a Cas9, para o reconhecimento e a clivagem do DNA-alvo guiado por RNA, o que a torna uma melhor escolha para aplicação em edição genética. A classe 2 engloba os sistemas de tipos II, V e VI (Doudna & Charpentier 2014, Shmakov et al. 2017, Moon et al. 2019). Os sistemas diferem entre si em termos de desenho do gRNA e requisitos de sequência PAM necessários para gerar quebra na dupla fita do DNA. Com toda a atenção voltada para a área nos últimos e nos próximos anos, é de se esperar uma melhor compreensão dos sistemas já conhecidos e, até mesmo, o surgimento de novos sistemas.

Atualmente, a ferramenta mais utilizada em CRISPR ainda é o sistema de classe 2 tipo II, que é derivado do *Streptococcus pyogenes*, onde a endonuclease é denominada Cas9 (Pickar-Oliver & Gersbach 2019). Por isto, este sistema é amplamente conhecido como CRISPR-Cas9. Como mencionado anteriormente, uma clara vantagem da endonuclease Cas9 é acumular as funções de reconhecimento e clivagem do sítio-alvo. *In vivo*, após o estágio de adaptação e conseqüente incorporação da sequência do DNA invasor (Figura 6), ocorre a transcrição do *locus* CRISPR, que gera as proteínas Cas, o pré-crRNA (contendo a sequência do DNA invasor) e o chamado crRNA trans-ativador (tracrRNA), essencial para a maturação do crRNA e para sua ligação à Cas9. A enzima Cas9 é, então, guiada por um duplex natural de RNA formado por crRNA:tracrRNA para clivar a sequência de DNA complementar, numa eventual segunda infecção (Doudna & Charpentier 2014, Jiang & Doudna 2017).

Este duplex crRNA:tracrRNA pode ser sintetizado *in vitro* como uma molécula de RNA guia (gRNA) que direciona, eficientemente, a Cas9 para clivar a sequência-alvo de 20 nucleotídeos complementar ao gRNA sintético (Figura 7) (Jinek et al. 2012). O uso deste pequeno gRNA é o que torna o método de fácil manuseio, eficiente e custo-efetivo. Além disso, o RNA é o parceiro natural do DNA no pareamento nucleotídico, sendo bioquimicamente

mais estável que as interações eletrostáticas entre DNA e proteínas, usadas por ZFN e TALEN (Fernández et al. 2017).

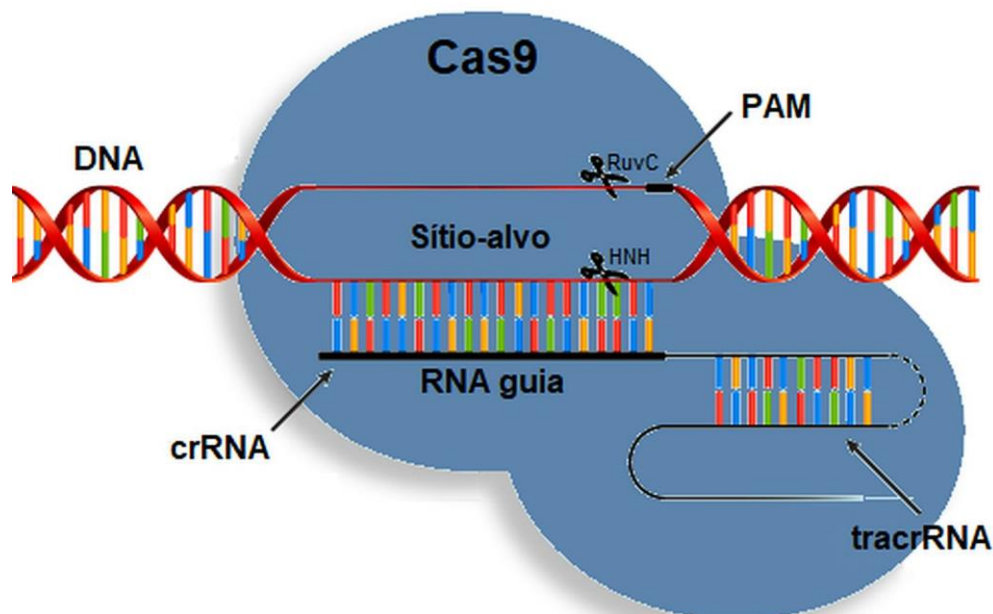


Figura 7. A endonuclease Cas9 programada para edição genética. A enzima Cas9 gera quebras no DNA dupla-fita usando seus dois sítios catalíticos (HNH e RuvC) para clivar o DNA alvo ao lado de uma sequência PAM e pareado à sequência de 20 nucleotídeos do RNA guia sintético.

A clivagem do DNA pela endonuclease Cas9 ocorre 3pb à montante da sequência PAM (Figura 7), através dos seus dois domínios catalíticos: uma nuclease HNH, que cliva a cadeia de DNA complementar ao gRNA, e uma nuclease RuvC, que cliva a fita de DNA oposta (mesmo lado da sequência PAM). É importante ressaltar que o reconhecimento do sítio-alvo requer tanto o pareamento gRNA-DNA quanto a presença da sequência PAM, do contrário, a Cas9 não apresenta atividade nucleolítica (Jinek et al. 2012, Sternberg et al. 2014, Jiang & Doudna 2017).

A atividade *off-target* refere-se a alterações no DNA em regiões não propositalis e inespecíficas, podendo acontecer por erros de desenho do gRNA, SNPs na população, mutações desconhecidas ou mesmo por anotações genômicas imprecisas (Martin et al. 2016, Jin et al. 2019). Esta vem sendo a maior preocupação na melhoria do maquinário dos editores de genoma, principalmente para fins terapêuticos em humanos. A solução para diminuir a atividade *off-target* passa por desenvolver sistemas CRISPR com

alta-fidelidade para edição genômica e refinar os métodos de detecção dos possíveis *off-targets* (Stella & Montoya 2016, Barman et al. 2019).

A principal estratégia para triagem de alvos não específicos baseia-se na previsão *in silico* de possíveis sítios de ligação do gRNA. Atualmente, existem várias ferramentas de bioinformática capazes de prever potenciais *off-targets* com sequências semelhantes ao gRNA desejado e com compatibilidade de PAM, como *Cas-OFFinder*, *CCTop* e *CRISPOR* (Bae et al. 2014, Stemmer et al. 2015, Haeussler et al. 2016). A análise de *off-targets* pode, então, ser realizada por métodos como PCR convencional do sítio não específico seguido por sequenciamento Sanger, análise de formação de heteroduplex ou, mesmo, sequenciamento de nova geração mediante construção de biblioteca específica (Moon et al. 2019).

O sistema CRISPR-Cas vem demonstrando uma capacidade extraordinária de aplicações científicas, e se tornou a ferramenta mais popular e a metodologia de escolha para edição genômica. Este sucesso se deve à simplicidade da técnica e sua eficácia na clivagem do DNA para promoção do reparo celular (NHEJ ou HDR), além de ser um método econômico e de fácil desenho *in silico* para editar, modificar, regular e marcar regiões genômicas de uma ampla variedade de células e organismos (Petersen 2017, Manghwar et al. 2019).

1.4. Justificativa

Nas últimas duas décadas, houve um aumento no número de trabalhos sobre a terapia de reposição do GH na SPW e, principalmente, na observação e registro dos seus efeitos a longo prazo (Höybye 2007, Mogul et al. 2008, Siemensma et al. 2012, Dykens et al. 2017). No entanto, ainda não se sabe a origem molecular da DGH em portadores da síndrome, visto que a região da SPW encontra-se em 15q11-13 em humanos, enquanto o gene *GH1* (produtor do hormônio) é localizado na região 17q24.2 (Ranke & Wit 2018).

Modelos de camundongo *knockout* para genes individuais da região crítica da SPW apresentaram apenas fenótipos moderados e nenhum quadro de hiperfagia ou obesidade (Tsai et al. 1999, Nicholls & Knepper 2001, Ding et al. 2005, 2008). Enquanto modelos de camundongo *knockout* para toda a

região da SPW apresentaram má evolução seguida de morte prematura (de cinco a sete dias após o nascimento) devido à grave hipoglicemia progressiva pós-natal. Nestes trabalhos, os camundongos demonstraram retardo de crescimento, hipoglicemia, baixos níveis plasmáticos de insulina e glucagon e déficits na secreção de insulina (Stefan et al. 2005, 2011). Nossa hipótese é que os genes da SPW são essenciais para a função secretora endócrina, incluindo GH, insulina, glucagon, hormônios tireoidianos, gonadotrofinas e outros hormônios que se encontram deficientes na síndrome.

Como os modelos animais apresentam morte prematura, foi utilizado neste trabalho uma linhagem celular tumoral de glândula pituitária de rato (*Rattus norvegicus*), chamada GH3, cuja região genômica 1q22 é ortóloga à 15q11-q13 humana associada à SPW (Figura 8). Para avaliar a regulação da expressão gênica do GH por genes associados à SPW, foi utilizado o sistema CRISPR-Cas9 para deletar 3,2 Mb do genoma da linhagem GH3, produzindo o genótipo da SPW *in vitro*. Sabe-se que esta linhagem é produtora de GH, além de expressar vários genes associados à síndrome. Após a edição genômica, foi avaliada a expressão gênica do GH e dos genes da região crítica da SPW para investigar seus possíveis mecanismos de regulação.

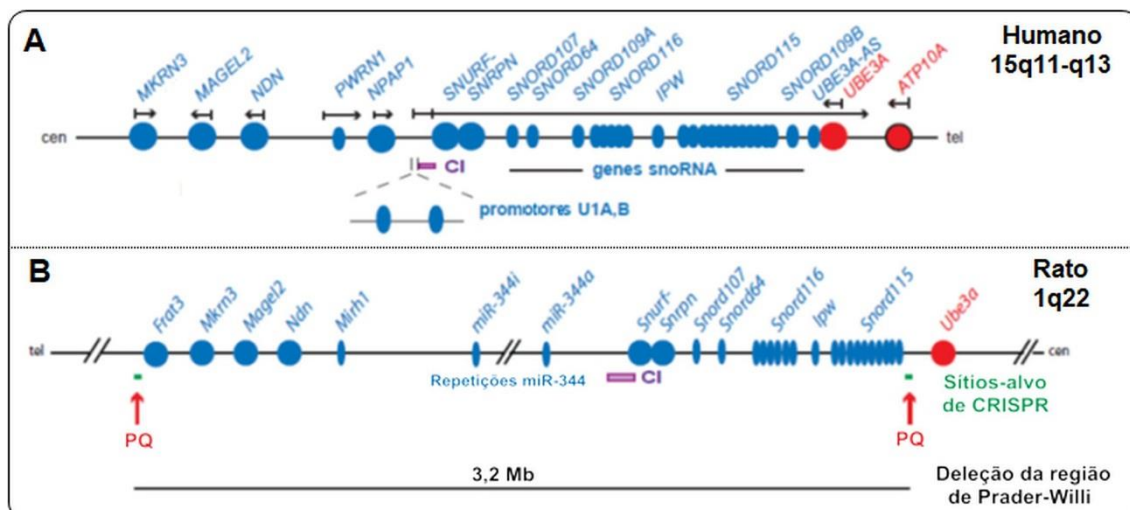


Figura 8. Mapas gênicos das regiões ortólogas da síndrome de Prader-Willi. A, humano. B, rato. A figura mostra a região de 3,2 Mb deletada pelos alvos do sistema CRISPR-Cas9. PQ, ponto de quebra; CI, centro de *imprinting* da SPW. Em azul, genes com expressão monoalélica paterna. Em vermelho, genes com expressão preferencial materna.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Produzir linhagens celulares com genótipo da SPW através da metodologia CRISPR-Cas9.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ploidia da região 1q22 de células GH3 por cariotipagem, FISH e MS-HRM;
- Desenhar gRNAs para edição gênica por CRISPR-Cas9 voltada para a região ortóloga da SPW em ratos;
- Selecionar células GH3 com deleções genômicas de 3,2 Mb por citometria de fluxo analítica e separação em célula única;
- Confirmar e caracterizar as edições genômicas por PCR da região específica, seguida por sequenciamento Sanger;
- Determinar, por MS-HRM, a origem parental do alelo restante nas linhagens celulares editadas;
- Avaliar edições inespecíficas (*off-targets*) por sequenciamento Sanger;
- Avaliar a expressão do GH e dos genes da região da SPW nas linhagens parental e editadas por RT-PCR convencional e digital;

3. Materiais e metodologia

3.1 Cultura de células GH3

As células GH3 foram cultivadas em meio Ham F-12K (Gibco) suplementado com 15,0% de soro de cavalo e 2,5% de soro fetal bovino contendo penicilina e estreptomicina (100 mg/mL cada), e piperacilina e ciprofloxacina (50 mg/mL cada), sob temperatura de 37° e uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ e 95 % de O₂. Subcultivo ou passagem foi realizada sempre que a cultura celular atingiu confluência próxima a 80%. O descolamento da monocamada de células GH3 foi realizado com solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM (Gibco) e, após lavagem com tampão PBS 1X (KH₂PO₄ 1,05 mM, NaCl 155,17 mM, Na₂HPO₄ 2,96 mM, pH 7,4 Gibco), as células foram ressuspensas em meio F-12K suplementado. Sempre que houve necessidade de criopreservação, após lavagem, as células foram ressuspensas em meio F-12K suplementado contendo 10% DMSO (Sigma) e armazenadas em nitrogênio líquido (-195 °C).

3.2. Análise da ploidia da região 1q22 da linhagem GH3

A linhagem celular GH3 foi estabelecida em Julho de 1965 a partir de um tumor pituitário de fêmea de rato da linhagem Wistar-Furth, adulta com 7 meses de idade (Tashjian et al. 1968). Trata-se de uma linhagem celular pseudo-triplóide, que possui a região genômica 1q22 ortóloga à região da SPW humana, também apresentando expressão monoalélica paterna (Sonnenschein et al. 1970). Por isto, fez-se necessário analisar sua ploidia para saber com exatidão o número de alvos da edição genômica proposta e a origem de cada alelo (paterna ou materna).

3.2.1. Bandeamento G e cariotipagem da linhagem GH3

O estudo cariotípico da linhagem GH3 foi realizado em laboratório terceirado no Departamento de Cultura Celular e Citogenética da Universidade de Pittsburgh, pelos pesquisadores Dale Lewis e Dra. Susanne M. Gollin.

As células GH3 foram enviadas para o laboratório de citogenética, para bandeamento G, em meio F-12K em garrafa de cultura celular de 75 cm², com contagem mínima de 1 x 10⁷ células. As células foram tratadas com brometo de etídio (0,1 µg/mL) durante uma hora, seguido de bloqueio mitótico usando

tratamento com colchicina (0,5 µg/mL) por duas horas. Após o bloqueio mitótico, as células foram ressuspensas em solução hipotônica de KCl (0,075M) e incubadas por uma hora a 37°C. Após centrifugação e desprezo do sobrenadante, foi adicionada solução fixadora (metanol:ácido acético, em proporção 3:1), seguido do preparo de lâminas que foram incubadas por 24 horas a 60°C. As lâminas foram coradas pela metodologia de Tripsina-Giemsa. As imagens das metáfases foram capturadas e os cromossomos cariotipados.

3.2.2. Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH)

A análise de FISH da linhagem GH3 também foi realizada em laboratório terceirado no Departamento de Cultura Celular e Citogenética da Universidade de Pittsburgh, pelos pesquisadores Dale Lewis e Dra. Susanne M. Gollin.

Usando banco de dados de DNA *GenBank* para pesquisar regiões conservadas no domínio da SPW no genoma de rato, foram geradas duas sondas BAC (do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome*) para FISH, marcadas com fluorescência. A sonda BAC CH230-114P11 (Enzo Life Sciences) foi marcada com o fluorocromo tetrametil-rodamina (de emissão vermelha), tendo como alvo a região gênica de *U1A-Snurf-Snrpn-Snord107-Snord64* (1q22, dentro da região da SPW). A sonda BAC CH230-2B12 (Enzo Life Sciences) foi marcada com o fluorocromo fluoresceína (de emissão verde), tendo como alvo a região gênica de *Cyfp1-Nipa2-Nipa1-Herc2* (1q22, a 3 Mb de distância fora da região da SPW), para ser usada com controle na técnica de FISH.

As lâminas de GH3 foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70%, 85% e 100%) e desnaturadas com formamida. No preparo das sondas BAC, o DNA marcado foi precipitado em etanol, ressuspensado em tampão de hibridização (70% formamida/2X Citrato de Sódio Salina) e desnaturado por cinco minutos a 75°C. As sondas foram aplicadas à lâmina de GH3, cobertas com lamínula e hibridizadas por 16 horas a 37°C em câmara úmida. No dia seguinte, as sondas não ligadas foram removidas com tampão de lavagem (50% formamida/2X Citrato de Sódio Salina) e a lâmina foi corada com DAPI (corante de DNA de emissão azul). A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX61 (Olympus Microscopes) e as imagens digitalizadas pelo programa Genus no sistema

Cytovision (Leica Microsystems). Foram contados 380 (trezentos e oitenta) núcleos.

3.2.3. Dissociação em Alta Resolução Sensível à Metilação (MS-HRM)

A técnica de MS-HRM (do inglês *Methylation-Sensitive High Resolution Melting*) foi utilizada para analisar a região genômica 1q22 de rato quanto à origem dos alelos (paterna ou materna) e sua proporção. A extração de DNA genômico de células GH3 foi realizada com o conjunto de reagentes do kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante.

O DNA de células de GH3 foi submetido à modificação bissulfítica, para avaliar o padrão de metilação da região promotora do gene *Snurf-Snrpn*. Para o tratamento com bissulfito, foi utilizado o kit de Metilação do DNA EZ (Zymo Research), de acordo com o protocolo do fabricante. Visando melhorar a especificidade e a eficiência da curva de dissociação final, o experimento foi desenhado para uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) aninhada ou *nested*. Isto é, uma primeira reação com um par de *primers* mais externos, seguida de uma segunda com outro par de *primers* mais internos para a região de interesse. Após a conversão, a amostra de DNA foi submetida à primeira rodada de PCR.

A PCR foi realizada com volume final de 25 μ L, contendo 20,25 μ L de água livre de nucleases, 2,5 μ L de tampão de PCR Taq10x (com MgCl₂ 1,5mM), 0,5 μ L de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 40 mM, 0,25 μ L de cada iniciador ou *primer* (Tabela 2) a 20 mM, 0,25 μ L de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 μ L de DNA de GH3 após o tratamento com bissulfito em concentração de 50ng/ μ L. Os parâmetros do termociclador utilizados para a PCR foram os seguintes: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos; 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; resfriamento a 4°C. O produto da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6). Os produtos de PCR foram purificados através do conjunto de reagentes *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

Tabela 2. Primers utilizados para PCR do DNA de GH3 após conversão bissulfito.

Primer	Sequência do primer 5' - 3'	Produto da PCR (pb)	Ta
RN5037	GTAGGAATTTTGAAGATTAGATAGTTG	262	64°C
RN5038	AAACCAAATACCCAACCTTCC		

Primers para região promotora do gene SNURF-SNRPN. Ta, temperatura de anelamento.

A segunda rodada de PCR da região promotora do gene *Snurf-Snrpn* foi realizada pela técnica de MS-HRM, utilizado-se o kit comercial de HRM *MeltDoctor* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram utilizados como substrato, combinados a um par de *primers* mais internos que o da reação antecedente (Tabela 3). A reação de MS-HRM foi realizada no equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros: desnaturação a 95°C por 10 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 segundos e com anelamento e extensão a 64°C por um minuto; a curva de dissociação foi programada com desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por um minuto e aquisição de sinal de fluorescência a cada 0,5°C entre 60°C e 95°C. Os resultados foram analisados pelo programa *High Resolution Melting* V3.0.1 (Applied Biosystems).

Tabela 3. Primers utilizados para MS-HRM.

Primer	Sequência do primer 5' - 3'	Produto da PCR (pb)	Ta
RN5039	TAGTTAGAGAGTGATATGGATTTTTG	178	62°C
RN5040	TACAAAATCTCTCCTCAAAACCAAC		

Primers "internos" para região promotora do gene SNURF-SNRPN. Ta, temperatura de anelamento.

3.3. Edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9

O desenho dos oligos de gRNAs específicos para a clivagem e deleção genética das regiões da SPW em rato por CRISPR-Cas9 (Tabela 4), foi realizado através da ferramenta disponível em crispr.mit.edu, tendo como alvos para deleção regiões a montante do gene *Frat3* e regiões entre os genes *Snord115* e *Ube3a*. As deleções foram projetadas com tamanho de 3,2 Mb, cada.

Tabela 4. gRNAs para deleções da região da SPW.

gRNA	Sequência do gRNA 5' - 3' + PAM	Região-alvo
gRNA1	GTCAGTGTGTTATTGCTCTG AGG	<i>Frat3</i> 5'-UTR
gRNA3	TACTTATGACAATTAACCTC AGG	<i>Snord115/Ube3a</i>
gRNA70-3	GCTTGTATGAATCCCTCTGG TGG	<i>Frat3</i> 5'-UTR
gRNA79-1	GCCAGGTACAGGTAGTTCAC AGG	<i>Snord115/Ube3a</i>

3.3.1. Construção dos plasmídeos com gRNAs

Neste trabalho, foram utilizados os plasmídeos PX330 e PX458 (ambos da *Addgene*) com expressão da endonuclease Cas9 proveniente de *Streptococcus pyogenes*, com sítios de clonagem para oligos de gRNA (Figura 9) e com todo o maquinário necessário para edição genética por CRISPR-Cas9 (Cong et al. 2013, Ran et al. 2013).

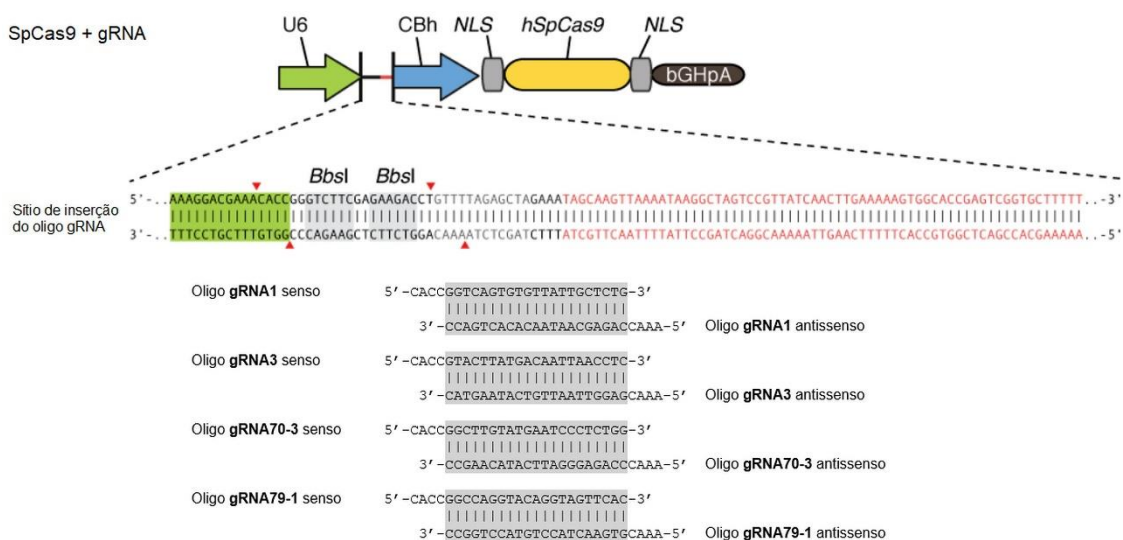


Figura 9. Mapa do plasmídeo com sítios de clonagem para oligos de gRNAs. U6 e CBh são promotores. NLS são extremidades de nucleoplasmina fusionadas à endonuclease Cas9. bGHpA é um sinal de poliadenilação. Setas vermelhas representam os sítios de corte da enzima de restrição BbsI.

Os oligos senso e antissenso foram anelados por ação da enzima T4 ligase (NEB), seguindo protocolo do fabricante. Em seguida, o plasmídeo foi digerido por ação da enzima de restrição *BbsI* (NEB), também seguindo as instruções do fabricante. A reação de ligação entre o plasmídeo digerido e cada um dos oligos anelados foi realizada pela enzima Quick ligase (NEB), seguindo protocolo do produtor.

Para a reação de transformação, foram utilizadas células DH5 α competentes para clonagem (NEB). A um tubo de microcentrífuga de 1,5mL

(microtubo), foram adicionados 50 μ L de células DH5 α e 2 μ L de plasmídeo com gRNA. Este microtubo foi incubado em gelo por 20 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 30 segundos. Novamente, o microtubo foi incubado em gelo por dois minutos. Após este período, foram adicionados 250 μ L de meio enriquecido SOC (2% peptona, 0,5% extrato de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 20 mM, NEB) e o microtubo foi incubado a 37°C por uma hora sob agitação. Foram plaqueados 150 μ L das células DH5 α em placa de Petri contendo meio ágar LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 20 g de ágar, H₂O q.s.p. 1L) com ampicilina e incubados durante a noite em estufa a 37°C. No dia seguinte, após confirmação do crescimento em placa, uma das colônias foi inoculada em 3 mL de meio de enriquecimento LB líquido com ampicilina em tubo de fundo redondo, que foi incubado durante a noite a 37°C sob agitação orbital contínua (250 rpm). Os plasmídeos foram isolados com kit de purificação plasmidial em média escala ZymoPURE (Zymo Research), seguindo o protocolo do fabricante, e quantificados por espectrofotometria (NanoDrop 2000, comprimento de onda de 260nm).

3.3.2. Transfecção do sistema CRISPR-Cas9 em células GH3

Para a transfecção da construção CRISPR-Cas9 em células GH3, foi utilizado o reagente Lipofectamina 3000 (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados dois plasmídeos para cada edição genômica das extremidades da região da SPW (proximal e distal), mais um plasmídeo de expressão transiente de proteína verde fluorescente (pT3-Neo-EF1a-GFP, *Addgene* #69134) como método de detecção, apenas para a transfecção com os plasmídeos PX330 (Chicaybam et al. 2017). Foi realizado um gradiente crescente de quantidade de gRNAs (500 ng, 750 ng e 1000 ng por reação) para avaliar a eficiência da edição genômica. Para cada situação de transfecção, foram plaqueadas 2×10^6 células GH3 por poço em placa para cultura de 6 poços. As células foram mantidas em estufa de cultura a 37°C após o processo.

Os primeiros três dias após a transfecção foram de acompanhamento da cultura celular e observação da expressão de GFP (fluorescência verde) sob

microscópio de fluorescência. No quarto dia, as células GH3 transfectadas foram submetidas à citometria de fluxo analítica em ambiente estéril para separação em célula única em placas de 96 poços (*single cell sorting*), para geração de sublinhagens de GH3, e foram recondicionadas em meio de cultura suplementado a 37°C.

3.3.3. Confirmação e caracterização das edições genômicas

Após a separação por citometria de fluxo, foi observado o crescimento das células GH3 em cultura. Após cinco dias de crescimento, metade das células GH3 foi mantida em cultura e a outra metade teve seu DNA extraído com o conjunto de reagentes do kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante.

A técnica de PCR convencional foi utilizada para confirmação e caracterização das possíveis edições genômicas neste trabalho: deleção e/ou inversão. Foram utilizados pares de *primers* distantes em milhares ou milhões de pares de base (Tabela 5 e anexo 1), isto é, a reação só geraria produto de PCR se houvesse edição genômica seguido do reparo do DNA que aproximasse o par de *primers*. Para as reações de inversão, ainda, foram utilizados pares de *primers* na mesma fita do DNA (ambos sentidos ou antissensos), ou seja, a reação só ocorreria mediante prévia inversão de um dos flancos da PCR, após edição genômica. As PCRs foram realizadas seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente (tópico 3.2.3). O produto de cada amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de 2% agarose, as bandas de interesse foram sacadas e purificadas utilizando o conjunto de reagentes *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

Tabela 5. Primers utilizados para PCR de caracterização das edições genômicas.

Primer	Sequência do primer 5' - 3'	Alteração	Intervalo de sítios	Produto da PCR* (pb)
RN4805	AAGTTACAGCAAATCTTTATTCTG	Deleção	gRNA1/gRNA3	360
RN4806	AACACGAAAATATGTAACCACAG			
RN6021	AATCCATATTGTGGGAACTACAG	Deleção	ALT-gRNA1/gRNA3	334
RN4806	AACACGAAAATATGTAACCACAG			
RN6021	AATCCATATTGTGGGAACTACAG	Deleção	ALT-gRNA1/gRNA1	1247
RN5353	ATTAGAGTCCTAACTTCAATCAATC			
RN4805	AAGTTACAGCAAATCTTTATTCTG	Inversão proximal	gRNA1/gRNA3	249
RN4989	TACTACAGATGTAAGGGCCAAG			
RN5353	ATTAGAGTCCTAACTTCAATCAATC	Inversão distal	gRNA1/gRNA3	1755
RN4645	AAAACCAAGTGTGCTTCTGTCCAC			
RN6021	AATCCATATTGTGGGAACTACAG	Inversão proximal	ALT-gRNA1/gRNA3	240
RN4989	TACTACAGATGTAAGGGCCAAG			
RN6022	TAATTCAGGTTTGTGGATAGTATC	Inversão distal	ALT-gRNA1/gRNA3	1001
RN4645	AAAACCAAGTGTGCTTCTGTCCAC			
RN6021	AATCCATATTGTGGGAACTACAG	Inversão proximal	ALT-gRNA1/gRNA1	297
RN4805	AAGTTACAGCAAATCTTTATTCTG			
RN6022	TAATTCAGGTTTGTGGATAGTATC	Inversão distal	ALT-gRNA1/gRNA1	1450
RN5353	ATTAGAGTCCTAACTTCAATCAATC			
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC	Deleção	gRNA70-3/gRNA79-1	554
RN4999	TGAAGTTGGCACCTTTGTTTTGC			
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC	Deleção	ALT-gRNA70-3/gRNA79-1	554
RN4999	TGAAGTTGGCACCTTTGTTTTGC			
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC	Deleção	ALT-gRNA70-3/gRNA70-3	480
RN5002	ATACAGAATGTCCTGGCTTATAC			
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC	Inversão proximal	gRNA70-3/gRNA79-1	424
RN5003	GTACAATGTGATGATTATGTCCTG			
RN5002	ATACAGAATGTCCTGGCTTATAC	Inversão distal	gRNA70-3/gRNA79-1	304
RN4999	TGAAGTTGGCACCTTTGTTTTGC			
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC	Inversão proximal	ALT-gRNA70-3/gRNA79-1	424
RN5003	GTACAATGTGATGATTATGTCCTG			
RC19	TTCGGTACAGTCCTTCTCTAC	Inversão distal	ALT-gRNA70-3/gRNA79-1	395
RN4999	TGAAGTTGGCACCTTTGTTTTGC			
RC20	ACCGAGTATCGTTTGCCCTC	Inversão proximal	ALT-gRNA70-3/gRNA70-3	459
RN4998	GAGCTTGAAGTCAGATTACACC			
RC19	TTCGGTACAGTCCTTCTCTAC	Inversão distal	ALT-gRNA70-3/gRNA70-3	321
RN5002	ATACAGAATGTCCTGGCTTATAC			
RN4467	GTTACCTACATCTCATACTTGCT	Controle externo	<i>Ube3a</i> (éxon 13)	238
RN4468	TGTGGTTCACTATCTTACAGCC			

A temperatura de anelamento de todos os pares de primers foi de 60°C. *, só haverá amplificação de produto da PCR se ocorrer edição genômica.

A reação de sequenciamento Sanger foi realizada com o conjunto de reagentes *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems). Cada reação foi composta por 4,5 μL de água livre de nucleases, 1,5 μL de tampão de sequenciamento 5X, 1 μL de *BigDye mix*, 1 μL de *primer* senso ou antissenso (3,2 pmol/ μL) e 2 μL de produto de PCR purificado. Os parâmetros do termociclador para a reação de sequenciamento foram os seguintes: desnaturação inicial a 95°C por um minuto; 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos, hibridização a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por quatro minutos; resfriamento a 4°C.

Foi utilizado o protocolo de etanol/isopropanol para a precipitação da reação de sequenciamento. Inicialmente, a placa foi centrifugada a 600 rpm por um minuto. Foram adicionados 30 μL de isopropanol 75% (Merck). As amostras foram ressuspendidas para homogeneização. A placa foi, então, incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, sob abrigo da luz. Em seguida, centrifugada a 4°C por 45 minutos a 4.000 rpm. Foi descartado o sobrenadante, vertendo a placa sobre papel-toalha, através de movimentos circulares. A placa foi centrifugada, invertida sobre papel-toalha, a 600 rpm por um minuto. Foram adicionados 50 μL de Etanol 75% (Merck). A placa foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado sobre o papel-toalha, como descrito anteriormente. A placa foi centrifugada, novamente, invertida sobre papel-toalha, a 600 rpm por um minuto. Por fim, a placa foi colocada em um bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz.

O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI-3130XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas no programa ChromasPro v2.18 (Technelysium), alinhadas e analisadas no programa MEGA X (Kumar et al. 2018), e comparadas à sequência referência do genoma de rato depositada no *GenBank* sob o número de acesso Rnor_6.0.

3.3.4. Triagem e avaliação de *off-targets*

Para a previsão dos possíveis *off-targets* (ou alvos não específicos) decorrentes das edições CRISPR-Cas9, foi utilizado o banco de dados online CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) (Haeussler et al. 2016), baseado nos gRNAs

propostos para as deleções da região da SPW (Tabela 4). Esta ferramenta lista os locais de todos os possíveis *off-targets* com até quatro erros de pareamento (*mismatches*), anotados com informações adicionais como posição genômica e se o alvo se encontra em um éxon, íntron ou entre genes. Para escolha dos alvos, foram utilizados os dois algoritmos com melhor distinção entre *off-targets* validados e falsos positivos (Lin & Wong 2018). Para o algoritmo Determinação da Frequência de Corte (CFD, do inglês *Cutting Frequency Determination*) foram considerados valores $\geq 0,027$. Para o algoritmo MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) foram considerados valores $\geq 0,011$ (Hsu et al. 2013, Lin & Wong 2018). Foram escolhidos de três a cinco *off-targets* por gRNA que ultrapassaram os limiares mínimos para os algoritmos CFD e MIT, juntos (Tabela 6).

Tabela 6. Triagem de *off-targets*.

Alvo	Sequência do gRNA 5' - 3' + PAM	CFD	MIT	Alvos gênicos
gRNA1	<u>GTCAGTGTGTTATTGCTCTG</u> AGG	0,700	32	Intergênico: <i>Chrna7-Frat3</i>
O-T 1	<u>GTCAGTGTGTTATTGCTCTG</u> AGG	0,700	32	Intergênico: <i>Otud7a-Chrna7</i>
O-T 2	<u>GTCAGTGTGTTTATTGCTCTG</u> AAG	0,138	12,22	Intergênico: <i>Gnb4-Actl6a</i>
O-T 3	<u>GTCTGTGTGTTATTGCTCCG</u> AGG	0,176	4,275	Intergênico: <i>Flrt2-Elmsan1</i>
O-T 4	<u>GCTAGTGTGATATTGCTCTG</u> GGG	0,505	2,427	Intergênico: <i>Htra1-Mgmt</i>
O-T 5	<u>TCCAGTGTGTGATTGATCTG</u> GGG	0,343	0,151	Intrônico: <i>Col24a1</i>
gRNA3	<u>TACTTATGACAATTAACCTC</u> AGG	0,920	80	Intergênico: <i>Snord115-Ube3a</i>
O-T 6	<u>TGTTTATGACAATTAAGCTC</u> AGG	0,032	1,196	Intergênico: <i>Cbln1-Zfp423</i>
O-T 7	<u>TGCTAATGACAATTAACCTC</u> TGA	0,028	1,145	Intrônico: <i>Sos2</i>
O-T 8	<u>TGCTTGTGACAATTAACCTT</u> GGG	0,171	0,903	Intrônico: <i>Tmem232</i>
gRNA70-3	<u>GCTTGTATGAATCCCTCTGG</u> TGG	0,900	76	Intergênico: <i>Chrna7-Peg12</i>
O-T 9	<u>GTATGTATGAATCCCTCTGG</u> TGG	0,649	5,147	Intergênico: <i>Otud7a-Chrna7</i>
O-T 10	<u>GCTACTATGCATCCCTCTGG</u> TGG	0,125	2,343	Intergênico: <i>Gm21893-Hs3st4</i>
O-T 11	<u>GCTTGTGTTGAAGCCCTCTGG</u> TGG	0,219	2,128	Intrônico: <i>Tcf12</i>
O-T 12	<u>CTATGTATGAGTCCCTCTGG</u> TGG	0,301	0,783	Intergênico: <i>Frat3-Otud7a</i>
O-T 13	<u>CAATGTATGATTCCCTCTGG</u> TGG	0,114	0,783	Intergênico: <i>Otud7a-Chrna7</i>
gRNA79-1	<u>GCCAGGTACAGGTAGTTCAC</u> AGG	0,820	81	Intergênico: <i>Snord115-Ube3a</i>
O-T 14	<u>GCCAGGTACAGGCAGTACAC</u> AGG	0,421	0,896	Intergênico: <i>Tyw5-Satb2</i>
O-T 15	<u>GGTAGATTTCAGGTAGTTCAC</u> AGG	0,205	0,814	Intergênico: <i>Flrt3-Macrod2</i>
O-T 16	<u>TCCTAGTACAGGAAGTTCAC</u> TGG	0,382	0,582	Intergênico: <i>Parp8-Isl1</i>

O-T, *Off-Target*. Nucleotídeos não sublinhados indicam erros de pareamento (*mismatches*) com os gRNAs originais ("*On-Target*").

Novamente, a técnica de PCR convencional foi utilizada para a avaliação de *off-targets*. Os pares de *primers* utilizados encontram-se na tabela 7. Os parâmetros das reações foram os mesmos descritos anteriormente (tópico 3.2.3). As bandas de interesse foram sacadas do gel de agarose, purificadas e submetidas ao sequenciamento Sanger, como descrito no tópico anterior.

Tabela 7. *Primers* utilizados para PCR de avaliação e caracterização de *off-targets*.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> 5' - 3'	Alvo investigado	Produto esperado da PCR (pb)
RN6021	AATCCATATTGTGGGAACTACAG	O-T 1	492
RN6022	TAATTCAGGTTTGTGGATAGTATC		
RC05	TGAGAATGGCCCCCATAGGA	O-T 2	452
RC06	TTGCTGCCTTCAACCCAAGAT		
RC07	TCTGCCTCCAACCTCCACAC	O-T 3	318
RC08	TAACTGCAGCTTGTGAGTGGGA		
RC09	AACTGCACGGTAGGGAATGG	O-T 4	390
RC10	ATGCAAGCATGGGCCTAGAG		
RC11	GCCTTCTGGTTGGCTCAGCAG	O-T 5	690
RC12	AGAAACCTGAAGATCGGCCTTG		
RC13	TCAATTTGAAGCCCAAAGGTCAC	O-T 6	350
RC14	TGCTCTGGACAACCAAATGTACT		
RC15	TTGAGGGGATACTCTGGGGT	O-T 7	298
RC16	TGTAGAGCTGCTGGGAACAC		
RC17	TTTCTGGTTTCGCTAATGACAC	O-T 8	347
RC18	GTGCTCAGGGGAGCTAATC		
RC19	TTCGGTACAGTCCTTCTCTAC	O-T 9	300
RC20	ACCGAGTATCGTTTGCCCTC		
RC21	GCAGTGCCATGCTTCAGAAC	O-T 10	290
RC22	TTGTACAGGTGACCCTCTGC		
RC23	AAGGGCTGCTCGTAAATCCC	O-T 11	231
RC24	GGCCAGAGGGAGGGAAGATA		
RC25	CCGGAAACTGGGCTTCTCAT	O-T 12	182
RC26	TCTGGTGGCCAAGCACTAAG		
RC27	AAGCTGCCACTTTTAGATCCTC	O-T 13	242
RC28	CTAAACCGGTATCGTTTGCCC		
RC29	ACCAATAGAGCCCAGTTTCGC	O-T 14	166
RC30	AGTGGTAAGGCAACAGCCAAG		
RC31	CCACACTACTTCTCAGGGTTG	O-T 15	250
RC32	GGTGAAGTGTGGAATCCTGTAC		
RC33	GCTGTGCTCCATTTTCCTAGC	O-T 16	155
RC34	CACGTGCTACCATAGCAACAG		

A temperatura de anelamento de todos os pares de *primers* foi de 60°C.

3.4. Extração do RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA total de células GH3 foi realizada com o kit miRNeasy Mini (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados RNAs comerciais (Zyagen) de glândula pituitária e córtex cerebral de rato como controles da análise de expressão gênica. A pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria (A260/A280, com valores entre 1,9-2,1). Para descartar contaminação residual com DNA, as amostras foram testadas por PCR convencional.

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o conjunto de reagentes SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA gerado foi alíquotado em tubos com volume de 20 µL, que foram armazenados a -20°C e retirados, apenas, no momento de uso.

3.4.1. Análise da expressão da expressão gênica por RT-PCR

Para a técnica de PCR após a reação da transcriptase reversa (RT-PCR) foram utilizados os mesmos parâmetros descritos anteriormente no tópico 3.2.3. Os genes *Gapdh* e *Gpi* foram utilizados como controles por se tratarem de genes domésticos de expressão constitutiva. Os pares de *primers* utilizados encontram-se na tabela 8. O produto de cada amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de 2% agarose.

Tabela 8. Primers utilizados para análise de expressão por RT-PCR.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> 5' - 3'	Região-alvo	Produto da PCR (pb)	Ta
RN4833	TGCACCACCAACTGCTTAGC	<i>Gapdh</i>	110	60°C
RN4834	GGCATGGACTGTGGTCATGA			
RN5883	CACCAAGGCACCAAGATGATAC	<i>Gpi</i>	92	62°C
RN5884	AGGAGGATCTTGTGATGCAGAC			
RN3507	CTGGCTGCTGACACCTACAA	<i>Gh1</i>	166	60°C
RN3508	AGAAGCGAAGCAATTCCATGTC			
RN4761	AATTAGCCAGGCCTATCCTGAAGC	<i>Prl</i>	186	60°C
RN4762	TGGACAATTTGGCACCTCAGGA			
RN3505	CTTTCGGGAAACCTCATCAAG	<i>Frat3</i>	104	60°C
RN3506	GCTGACAGAGGCTCCAAGAAC			
RN3617	CTCCTCTGGCTTTGTATTCTTA	<i>Mkrn3</i>	149	62°C
RN3498	AGAATTCTCCAAATGGGCAGTG			
RN3497	CCAACACTAAGCTGGAGTGCAC	<i>Magel2</i>	78	66°C
RN3616	TGACGATGATGTAAGTGTGGGTTT			
RN3495	GAAGAAGCACTCCACCTTCG	<i>Ndn</i>	165	60°C
RN3496	TCCATGATCTGCATCTTGGTG			
RN3493	GATGAAATCCTGATCATCTGTG	<i>Mirh1</i>	122	60°C
RN3494	CTCTCGTCGAGTCTCATCTG			
RN3488	GAATGGTCAGCAAGGCAATGC	<i>U1A</i>	Múltiplas bandas	60°C
RN3489	ACCTGGACCTCAATCTCTGG			
RN3490	GACGGTTGGTTCTGAGGAGA	<i>Snurf-Snrpn</i> <i>ex 1-2</i>	108	60°C
RN3489	ACCTGGACCTCAATCTCTGG			
RN3490	GACGGTTGGTTCTGAGGAGA	<i>Snurf-Snrpn</i> <i>ex 1-3</i>	215	60°C
RN4242	GTCTCAGCTCTGCCTGGAAATC			
RN3490	GACGGTTGGTTCTGAGGAGA	<i>Snurf-Snrpn</i> <i>ex 1-4</i>	431	60°C
RN5294	GATTGCTGTTCCACAATAGCAG			
RN3490	GACGGTTGGTTCTGAGGAGA	<i>Snurf-Snrpn</i> <i>ex 1-5</i>	541	60°C
RN5295	ATGCTTGTCAAAAGCCTTAAAGG			
RN5191	ACCTCCAGGCATTATGGCTC	<i>Snurf-Snrpn</i> <i>ex 8-10</i>	183	60°C
RN5192	TCAACTGTATCTTAGGGTCTTG			
RN3499	ATGATGACATGGGACCTTGTC	<i>Snord107</i>	104	56°C
RN3279	GTGAGGCACATTGACTAGAT			
RN3500	AATGATGAGCTGTGTTTACTG	<i>Snord64</i>	59	56°C
RN3501	CTTCAGAGTAATTATTTTGAGC			
RN3502	GGATCGATGATGATTTCCAATAAA	<i>Snord116</i>	89	62°C
RN3503	CTCAGTCACGATGATAGTGGC			
RN3491	CATAGATGGTGCCACTTCTTCA	<i>lpw</i>	101	60°C
RN3492	TCTGAAGGTGGTGTCTGCTG			
RN3504	GTCAATGATGACAACATTAAG	<i>Snord115</i>	75	54°C
RN3285	GGCCTCAGCGTAATCCTATT			
RN4192	AGCAAGTATGAGATGTAGGTAAC	<i>Ube3a-ATS</i>	103	62°C
RN4435	AATAGGAGCATTAACTGAGC			
RN4430	CTGCAGTTTACAACAGGCACAG	<i>Ube3a ex 12</i>	112	62°C
RN4192	AGCAAGTATGAGATGTAGGTAAC			

Em negrito, genes de expressão monoalélica paterna da região da SPW.

3.4.2. Análise da expressão da expressão gênica por RT-PCR digital

A técnica de *Droplet Digital* RT-PCR (RT-PCR digital) foi realizada seguindo os parâmetros do fabricante (*Bio-Rad Laboratories*). As reações foram realizadas em placa de PCR de 96 poços, cada poço contendo 10 μ L *QX200 EvaGreen ddPCR Supermix*, 1 μ L de *primer* senso (20 μ M), 1 μ L de *primer* antissenso (20 μ M), 6 μ L de água livre de nucleases e 2 μ L de cDNA. O gerador de gotículas automatizado QX200 (*Bio-Rad Laboratories*) foi utilizado para particionar cada reação em gotículas aquosas em solução oleosa. As gotículas foram transferidas para uma nova placa de PCR de 96 poços e termicamente seladas com papel alumínio. A PCR foi realizada no termociclador C1000 *Touch* (*Bio-Rad Laboratories*) com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento e extensão a 58°C por 1 min; estabilização do sinal e resfriamento a 4°C. Foram utilizados os mesmos *primers* da tabela 8. Após a PCR, a intensidade da fluorescência das gotículas foi medida pelo QX200 *Droplet Reader* (*Bio-Rad Laboratories*). Um controle negativo (sem cDNA) foi incluído em todas as reações. A análise dos dados foi realizada com o *software* *QuantaSoft* (*Bio-Rad Laboratories*). As populações de gotículas positivas e negativas foram detectadas automaticamente pelo *software* de análise. A quantidade absoluta de mRNA foi calculada automaticamente pelo programa de análises usando a distribuição de Poisson, corrigido com base nos dados do controle negativo. Os níveis de expressão foram determinados em números absolutos de cópias/ μ g de RNA.

A dosagem do conteúdo genômico da região crítica da SPW também foi realizada por PCR digital para selecionar os clones editados que seriam utilizados na continuidade do trabalho. Neste caso, foram mantidos os parâmetros acima, sendo a única diferença o uso de DNA genômico (ao invés de cDNA). Para esta análise de número de cópias, foram utilizados *primers* para o gene *Ube3a* como referência externa à deleção da região da SPW (Tabela 5) e *primers* para *Snord107* como referência interna (Tabela 8). O número de cópias foi calculado automaticamente pelo *software* de análises usando a distribuição de Poisson, corrigido com base no número de gotículas positivas para o gene *Ube3a* (trissômico em células GH3).

4. Resultados

A análise cariotípica da linhagem celular GH3 confirmou o relato feito pelo grupo de trabalho que estabeleceu esta linhagem na década de 60 (Tashjian et al. 1968). Trata-se de uma linhagem celular pseudo-triplóide com número modal = 54 observado em 90,6% dos cariótipos analisados (Figura 10). O restante dos cariótipos apresentou variações entre 54 e 83 cromossomos, condizentes com artefatos da técnica e, mesmo, com a natureza tumoral da linhagem celular. O número de cromossomos ($2n$) da espécie *Rattus norvegicus* é 42 (Duncan & Van Peenen 1971). Os resultados revelaram a aneuploidia desta linhagem celular, com alguns cromossomos apresentando três cópias. O cromossomo 1, que contém a região crítica da SPW (1q22), apresenta-se em trissomia, sendo duas cópias com ganho cromossômico visível no braço curto.

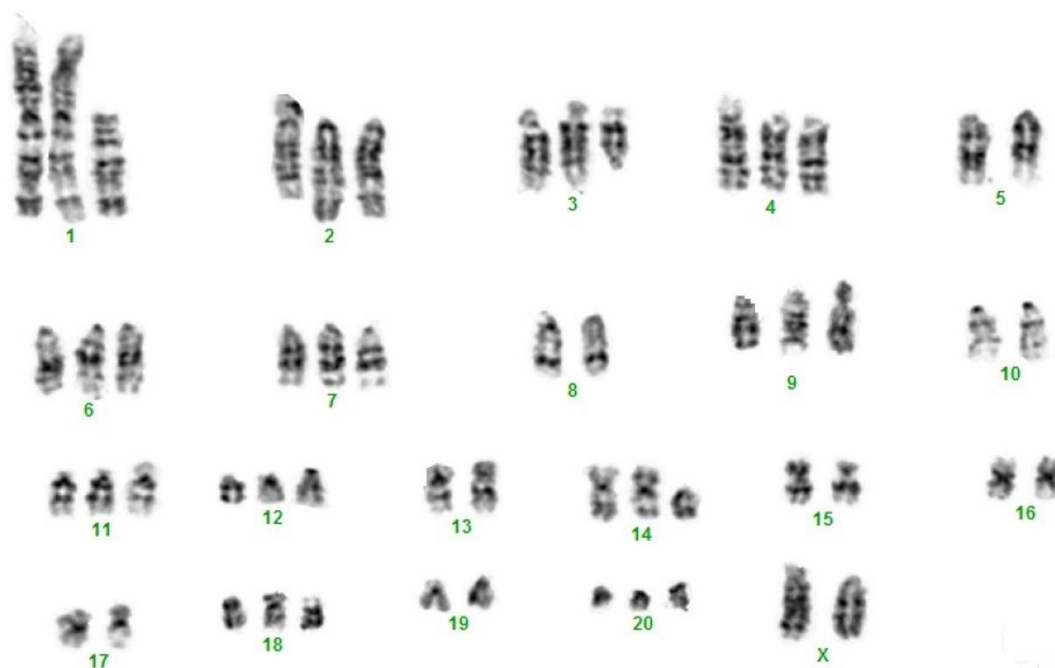


Figura 10. Cariótipo por bandeamento G de células GH3. Foram observadas diversas anormalidades numéricas. O cromossomo 1, de interesse para a SPW, encontra-se em trissomia, sendo que duas cópias apresentaram ganho cromossômico no braço curto (1p+).

A avaliação por FISH de núcleos interfásicos com sondas de duas cores permitiu visualizar o número de cópias de região cromossômica 1q22 na linhagem celular GH3. Foram examinadas 380 células para os sinais das sondas BAC CH230-114P11 (de cor vermelha, marcando a região da SPW) e BAC CH230-2B12 (de cor verde, como controle). Do total, 351 células (92,3%)

apresentaram três sinais vermelhos e três sinais verdes (Figura 11), consistente com o estado trissômico da região crítica da SPW. O restante das células analisadas apresentou variações entre duas e seis cópias para esta região, interpretável como baixo percentual e possível artefato de hibridização da técnica.

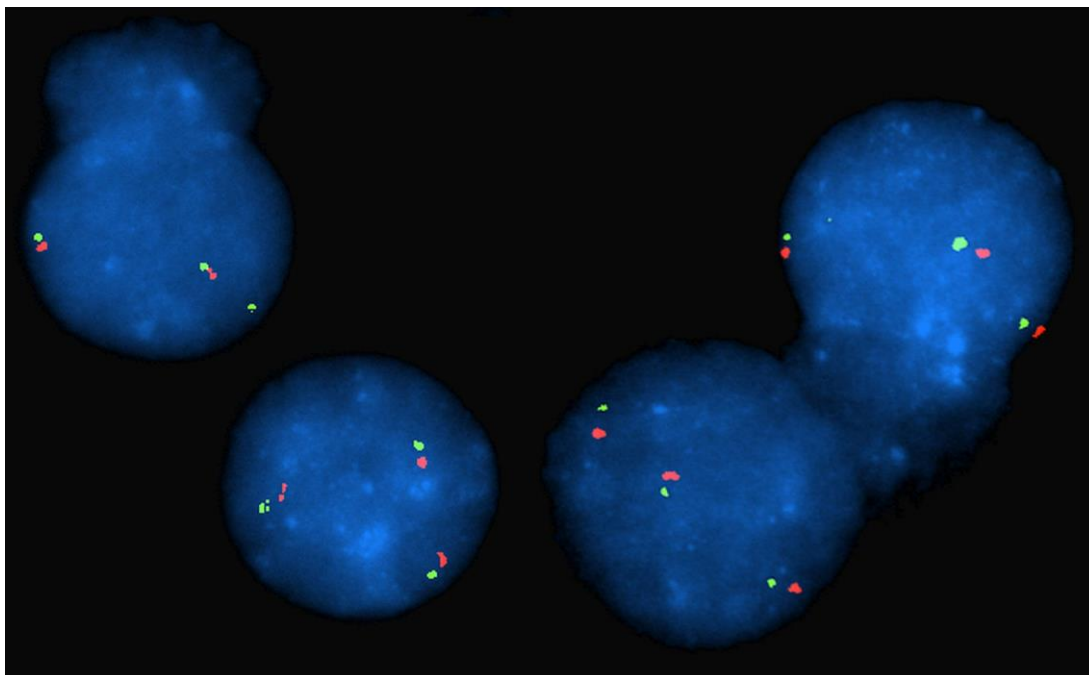


Figura 11. Análise citogenética de GH3 por FISH da região da SPW. Núcleos interfásicos corados em azul (DAPI), sondas BAC CH230-114P11 (região gênica de *U1A-Snurf-Snrpn-Snord107-Snord64*) coradas em vermelho e sondas BAC CH230-2B12 (região gênica de *Cyfp1-Nipa2-Nipa1-Herc2*) em verde.

A análise da curva de dissociação em alta resolução sensível à metilação (MS-HRM) da região promotora do gene *Snurf-Snrpn* permitiu a separação de fragmentos com sequências distintas devido a diferenças nos conteúdos CpG e, conseqüentemente, nas temperaturas de fusão. Isto possibilitou a discriminação da origem parental, bem como a proporção dos alelos paterno e materno da região genômica 1q22 da linhagem GH3, de acordo com seu padrão de metilação. O DNA da linhagem GH3 parental foi analisado após modificação bissulfítica e apresentou padrão duplo de picos, devido à presença dos alelos não metilado e metilado da região da SPW (Figura 12). O pico de menor temperatura de dissociação (não metilado, de origem paterna) apresentou, aproximadamente, o dobro da intensidade de fluorescência do pico de maior temperatura (metilado, de origem materna). Este resultado indicou a presença de dois alelos paternos (não metilados) e um

alelo materno (metilado) na linhagem GH3 na região crítica da SPW, corroborando os resultados prévios de cariotipagem e FISH, que indicaram trissomia para a região. Além disso, indicou a necessidade de deleção de ambos os alelos paternos para que houvesse o silenciamento gênico desejado na região da SPW na linhagem GH3, isto é, dois eventos de edição genômica.

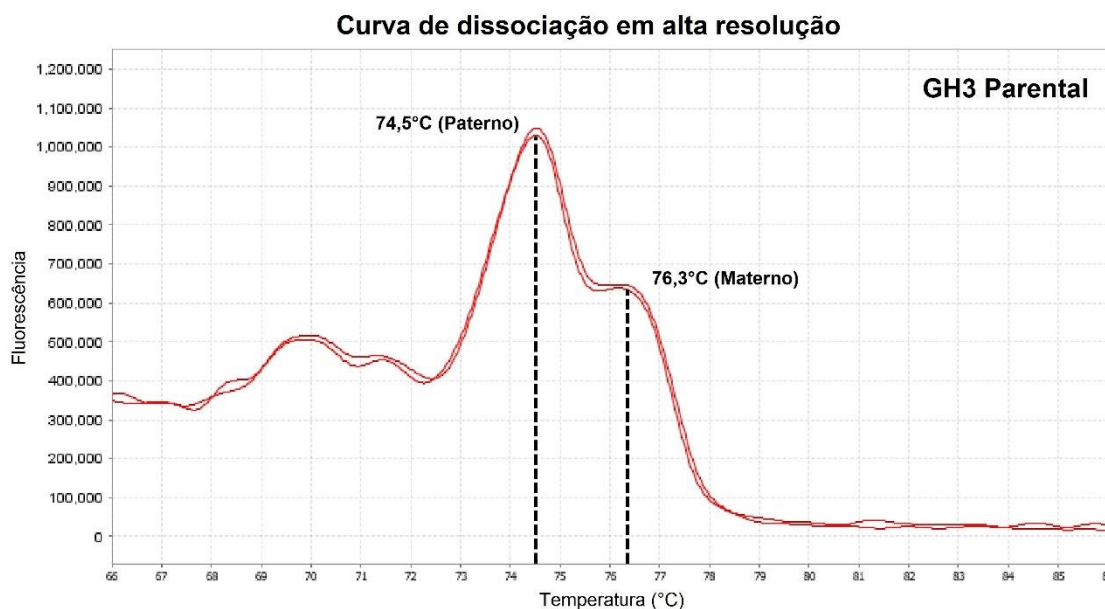


Figura 12. Análise da curva de dissociação por MS-HRM do DNA parental de GH3. Os fragmentos analisados (não metilado e metilado) contêm oito CpGs e apresentam temperaturas de fusão diferentes após modificação bissulfítica.

As células GH3 foram transfectadas em quatro condições diferentes: apenas com o plasmídeo GFP (como controle) e um gradiente crescente de três concentrações contendo os plasmídeos gRNA1 e gRNA3 (500 ng, 750 ng e 1000 ng de cada, Tabela 4). Este experimento foi realizado em duplicata para assegurar e garantir o processo de edição genômica. As culturas foram acompanhadas nos dias seguintes à transfecção, sendo possível observar o aumento da expressão de GFP sob microscópio de fluorescência (Figura 13), que serviu de marcador para separação e purificação das células GH3 transfectadas por citometria de fluxo. As taxas de células GH3 expressando GFP no momento do *sorting* (D4) ficaram em torno de 6,7%.

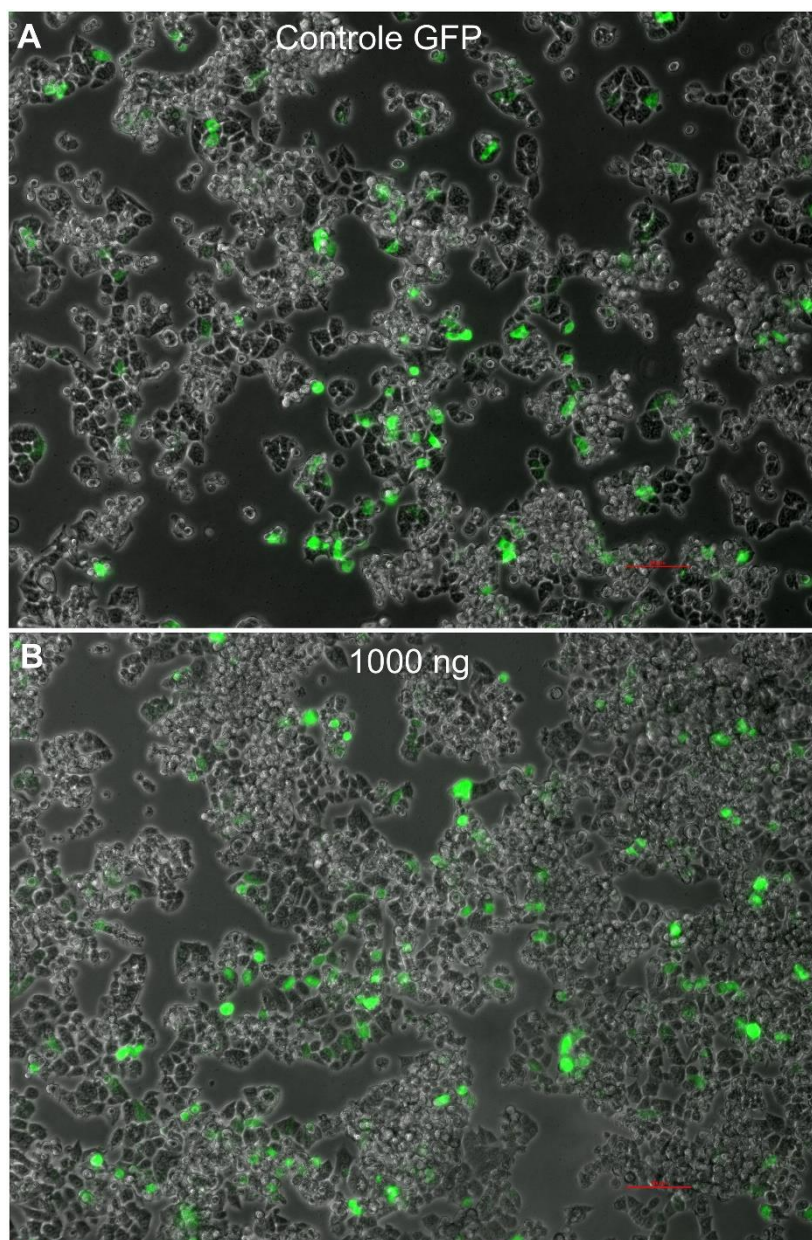


Figura 13. Células GH3 sob microscópio de fluorescência dois dias após transfecção. A, exemplo de condição controle (apenas GFP). B, exemplo de condição teste (GFP + gRNAs). Ampliação original X10.

Após a separação das células GFP positivas, através do *sorting* celular, foi realizada a extração do DNA das células GH3 transfectadas. A análise por PCR convencional (*primers* RN4805 + RN4806, Tabela 5 e anexo 1) permitiu confirmar a ocorrência da deleção, comprovando o sucesso da edição genômica (Figura 14). Foi possível observar a banda de 360 bp indicativa da deleção genética da região de 3,2 Mb da SPW em todas as condições contendo gradiente dos plasmídeos gRNA1 e gRNA3 e em suas duplicatas. As células GH3 transfectadas com 1000 ng apresentaram maior frequência de edição, de acordo com a figura 14, e foram escolhidas para seleção clonal. As

amostras controles apenas com o plasmídeo GFP não apresentaram banda de PCR, como esperado, assim como a amostra de controle negativo da PCR (H₂O) também não produziu banda, confirmando não haver contaminação na reação.

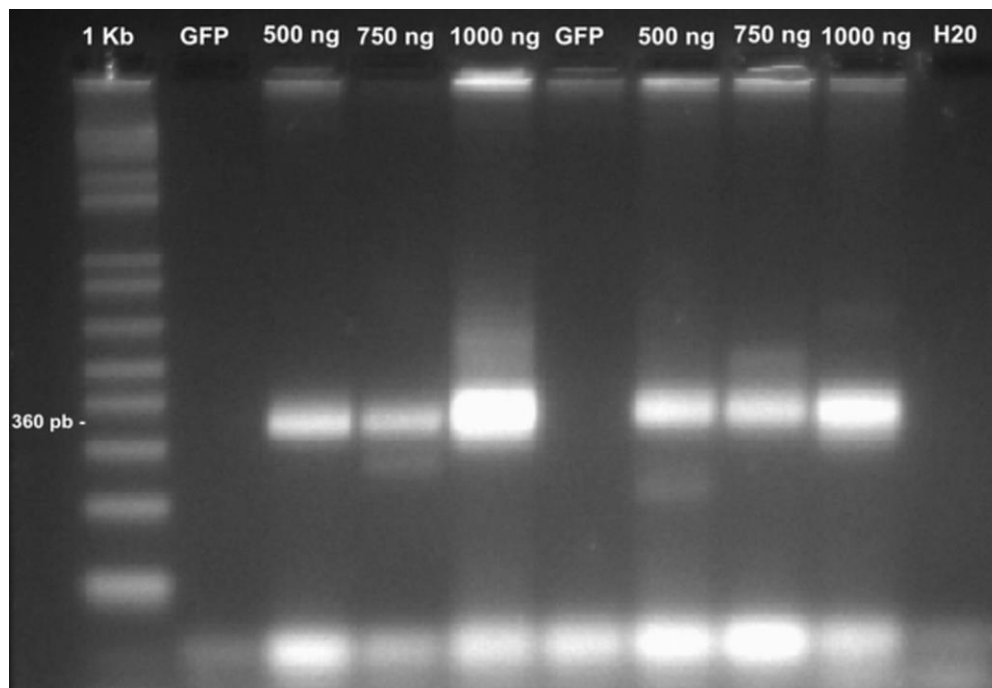


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção por CRISPR-Cas9. 1 Kb, peso molecular. GFP e H₂O, controles da PCR. Demais poços representam os três gradientes crescentes de plasmídeos e suas duplicatas.

Após a confirmação da edição genômica, as sublinhagens de GH3 originadas de único clone celular foram crescidas por quatro semanas. Ao todo, foram plaqueadas 384 células únicas em quatro placas de 96 poços. Após acompanhamento sob microscópio, constatou-se que 144 colônias foram originadas a partir de único clone celular, no restante dos 240 poços não havia células ou foram observadas colônias originadas de mais de um clone celular. Todas as 144 colônias tiveram o DNA extraído e submetido a nova PCR para confirmação da deleção (*primers* RN4805 + RN4806, Tabela 5). Além desta reação, foi realizada PCR para o gene *Ube3a* (*primers* RN4467 + RN4468, Tabela 5) para confirmação da integridade do DNA extraído e também por se tratar de um gene fora da região deletada pelo sistema CRISPR-Cas9. Das 144 colônias analisadas, apenas três (2,08%) apresentaram a deleção de 3,2 Mb na região da SPW (Figura 15). Estas linhagens clonais de GH3 serão denominadas de agora em diante como fundadoras e referidas pela letra “F”.

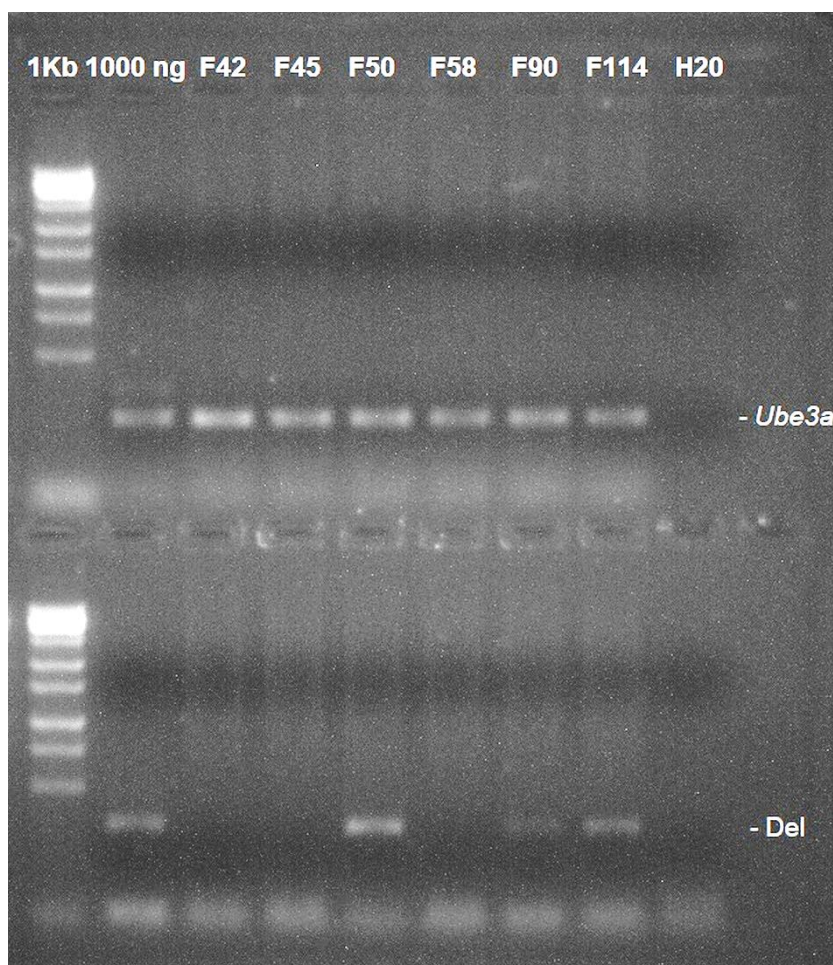


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção nas linhagens GH3 fundadoras. 1 Kb, peso molecular. 1000 ng e H₂O, controles da PCR. F42, F45 e F58 não apresentaram deleção. Todas as amostras apresentaram a banda de *Ube3a* confirmando a integridade do DNA extraído. F50, F90 e F114 apresentaram a banda esperada de 360 bp, confirmando a edição genômica.

Para a confirmação e caracterização da edição genômica, as bandas observadas por eletroforese em gel de agarose da PCR da deleção (Figura 15) das linhagens GH3 F50, F90 e F114 foram retiradas, purificadas e sequenciadas. A figura 16 exemplifica o eletroferograma resultante do sequenciamento da linhagem GH3 F90, comparado aos eletroferogramas dos sítios-alvo dos gRNAs 1 e 3 (extremidades proximal e distal da edição genética proposta). O alinhamento permitiu identificar precisamente os sítios de corte e reparo do genoma, caracterizando um reparo preciso na região da deleção obtida sem ganhos ou perdas de nucleotídeos nos pontos de quebra da dupla fita do DNA das linhagens GH3 F90 e F114. Não foi possível analisar os dados do sequenciamento da linhagem GH3 F50 por estar presente um padrão duplo de picos, caracterizando mosaicismo nesta amostra. Por este motivo, a linhagem GH3 F50 foi descontinuada nas etapas seguintes desta tese.

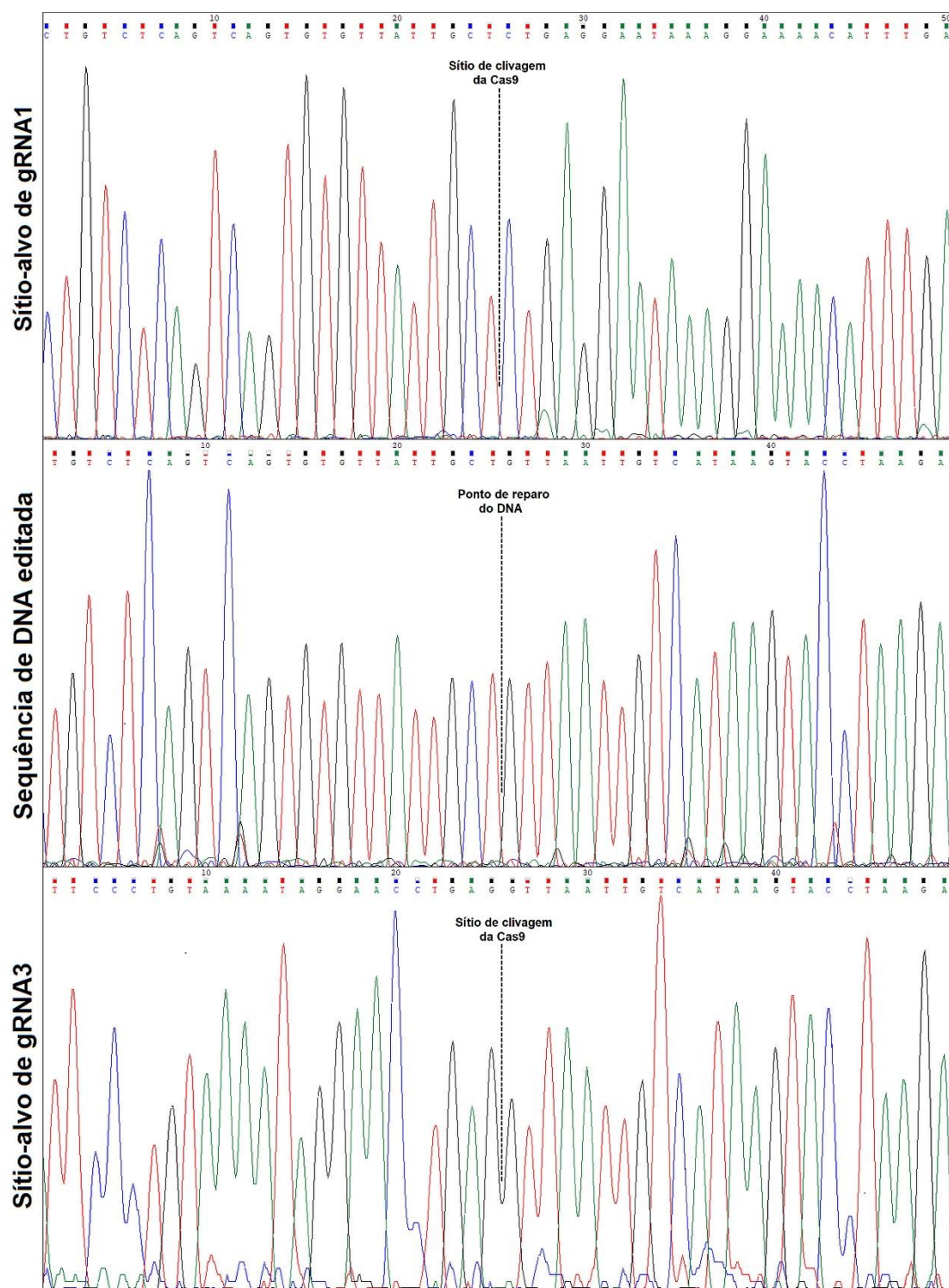


Figura 16. Comparação dos eletroferogramas dos sítios-alvo dos gRNAs 1 e 3 e da sequência de DNA editada de GH3 F90. A linha tracejada indica os respectivos pontos de quebra da dupla fita e de reparo do DNA.

Após a definição da presença da deleção genética proposta nas linhagens GH3 fundadoras, foi necessário caracterizar qual alelo havia sido deletado. Para isto, utilizou-se novamente a técnica de MS-HRM. As duas novas linhagens fundadoras tiveram um dos alelos paternos deletados (Figura

17), apresentando, então, dissomia para a região crítica da SPW (1q22). Apesar do sucesso alcançado pela metodologia CRISPR-Cas9, ainda se faria necessário mais um evento de edição genética para deletar o alelo paterno restante e anular, de fato, a expressão dos genes da SPW.

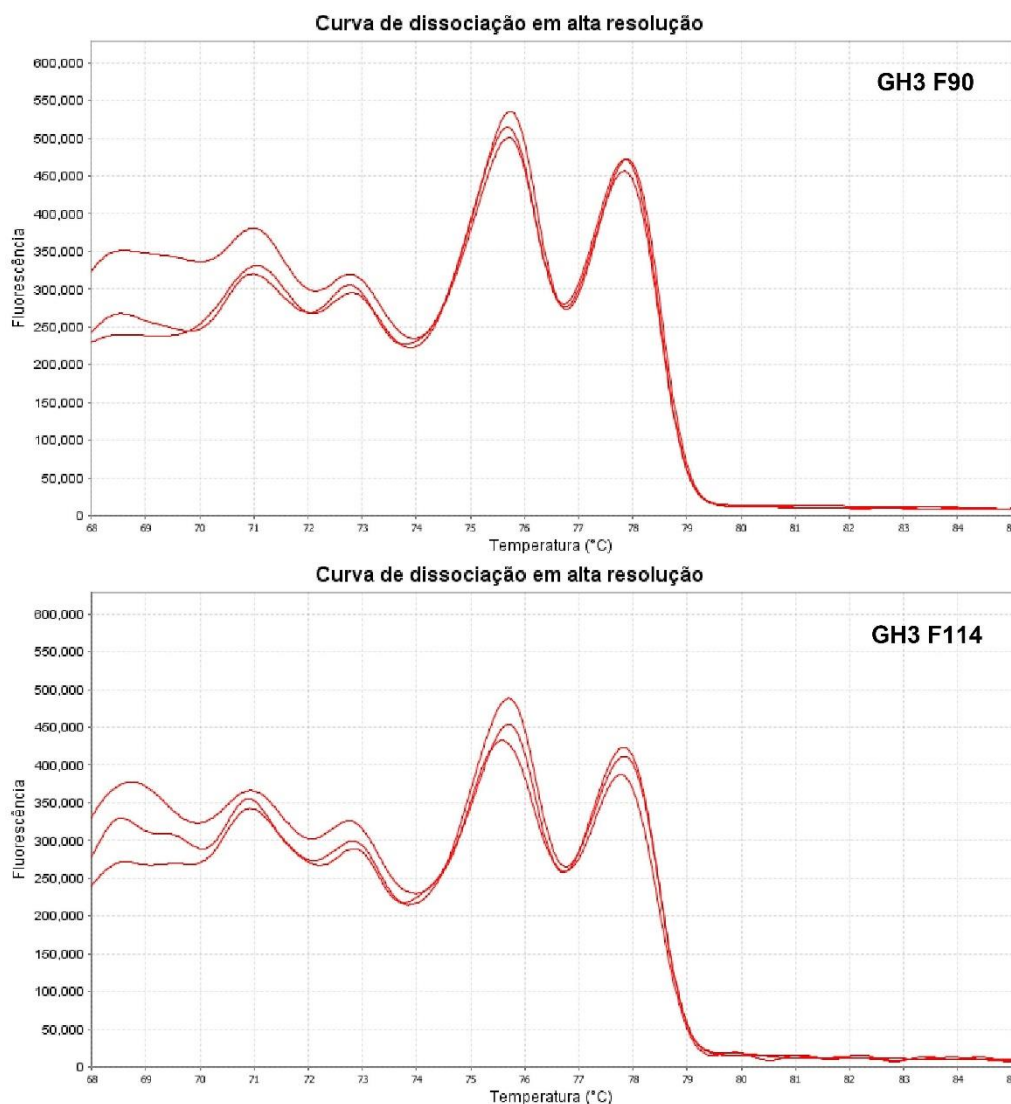


Figura 17. Curvas de dissociação por MS-HRM do DNA das linhagens GH3 fundadoras. O alelo paterno encontra-se na altura de 75,7°C e o alelo materno na altura de 77,9°C.

Para o segundo "hit" da deleção pelo sistema CRISPR-Cas9, foram utilizados os plasmídeos gRNA70-3 e gRNA79-1 (Tabela 4), com sítios-alvo mais internos que os plasmídeos anteriores, para que não houvesse nenhum risco de "reeditar" o alelo já deletado das linhagens GH3 fundadoras, referida daqui em diante como deleção "menor". As células GH3 F90 foram escolhidas para dar continuidade à segunda edição genômica. As células foram transfectadas com 1000 ng de cada plasmídeo, que foi a melhor condição

observada no primeiro experimento, e submetidas à separação e purificação celular por citometria de fluxo, baseada na expressão de GFP, atingindo índices de 6,1% de fluorescência no momento do *sorting* (D4). Foi realizada extração do DNA do *pool* de células GH3 F90 transfectadas, seguida por PCR convencional (*primers* RN4998 + RN4999, Tabela 5 e anexo 1) que comprovou a ocorrência da deleção por meio da banda esperada de 554 bp.

Novamente, foi realizada separação clonal e crescimento das culturas celulares por quatro semanas. 288 células únicas foram distribuídas em placas de 96 poços. Após acompanhamento sob microscópio, foram observadas 134 colônias originadas a partir de único clone celular, no restante dos 154 poços não havia células ou as colônias foram originadas a partir de mais de um clone celular. Todas as 134 colônias tiveram o DNA extraído e submetido à nova PCR para confirmação da deleção (*primers* RN4998 + RN4999, Tabela 5). A PCR para o gene *Ube3a* foi realizada novamente como controle. Ao todo, 19 (14,17%) das 134 colônias analisadas exibiram a deleção de 3,2 Mb na região da SPW, como exemplifica a figura 18. Os clones de GH3 F90 foram chamados de sublinhagens e, de agora em diante, serão referidos pela letra “s”.

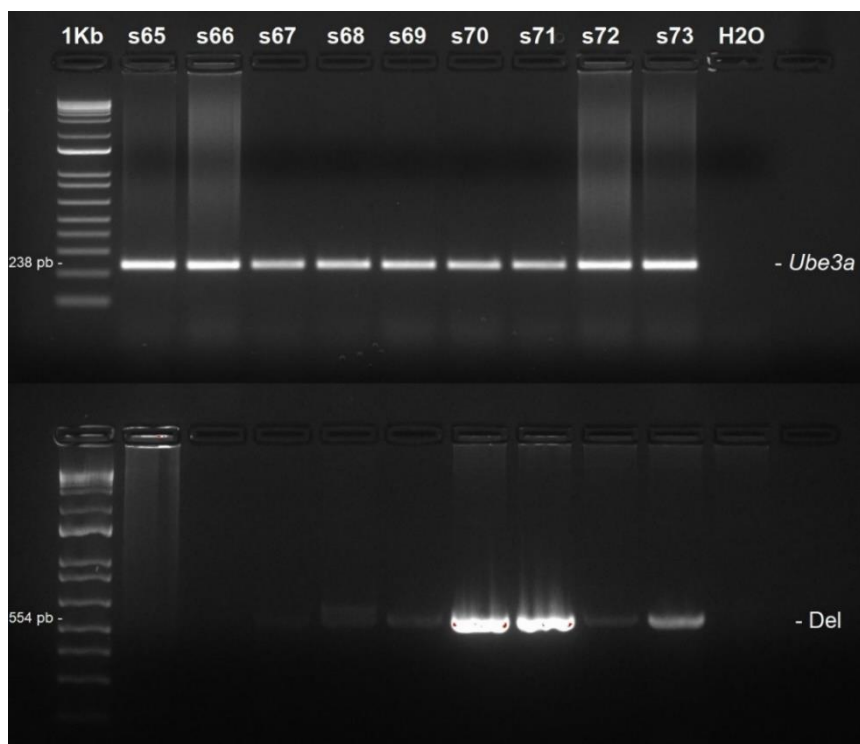


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose da PCR de confirmação da deleção nas sublinhagens GH3. 1 Kb, peso molecular. H₂O, controle negativo. Todas as amostras apresentaram a banda de *Ube3a* confirmando a integridade do DNA extraído. s70 e s71 apresentaram bandas fortes na altura esperada de 554 bp, confirmando a edição genômica.

Todas as 19 bandas de PCR das sublinhagens GH3 F90 foram submetidas ao sequenciamento para confirmação e caracterização da deleção menor. Durante a análise e alinhamento das sequências, foi observado que algumas linhagens não apresentaram a sequência de DNA esperada para o ponto de quebra proximal gerado pelo gRNA70-3. Após checagem pela ferramenta BLAST, foi constatado que o gRNA70-3 tem, na verdade, dois possíveis alvos na extremidade proximal da região da SPW em ratos, distantes por pouco mais de 104 Kb. O primeiro alvo é o projetado originalmente com total homologia ao gRNA desenhado, já o segundo alvo genômico apresenta dois erros de pareamento (CT>TA) com o gRNA70-3. Estes *mismatches* não afetaram a capacidade de edição pelo sistema CRISPR-Cas9 e o sítio-alvo não planejado foi chamado de gRNA70-3 “alternativo” (ALT-gRNA70-3). Como o ponto de quebra gerado pelo ALT-gRNA70-3 continuou englobando toda a região da SPW, as sublinhagens que apresentaram este sítio alternativo de edição foram mantidas para o seguimento deste trabalho. O alinhamento das sequências (Figura 19A, B) permitiu identificar os sítios de corte e reparo no genoma das 19 sublinhagens. Enquanto a maioria apresentou reparo preciso do DNA, seis sublinhagens exibiram inserções e/ou deleções (InDels) de nucleotídeos nos pontos de quebra da dupla fita (Tabela 9).

De modo geral, estas InDels foram de, no máximo, 8 nucleotídeos nas adjacências dos pontos de clivagem da Cas9. No entanto, a sublinhagem GH3 F90 s79 apresentou uma grande inserção de 358 pb. O que chamou a atenção foram as origens do DNA inserido na abertura gerada pela edição genômica (Figura 19C). A sequência hexanucleotídica clássica dos telômeros em mamíferos é 5'-TTAGGG-3', ocorrendo em repetições em tandem (Saretzki 2018). Nesta grande inserção, 188 pb corresponderam a 31 unidades de repetição telomérica (5'-CCCTAA-3'). O restante dos 170 pb da inserção foi classificado inicialmente como sequência de origem desconhecida. Após análise pela ferramenta BLAST, foi demonstrado que esta sequência derivou do plasmídeo PX458 utilizado na transfecção do complexo Cas9-gRNA. Este fenômeno constata a complexidade e dificuldade em controlar o reparo celular que ocorre após a edição genômica.

sublinhagem apresentou deleções nos dois pontos de quebra possíveis, gRNA70-3 e ALT-gRNA70-3 (Figura 19A, B e Tabela 9). Entretanto, por ainda apresentar conteúdo genômico da região proposta para deleção, não se tratava de um *knockout* completo da SPW.

Tabela 9. Resumo da triagem de sublinhagens GH3 F90 com deleção.

Sublinhagens com deleção	Banda da PCR da deleção (em pb)	Ponto de quebra proximal	Ponto de quebra distal
GH3 F90 s4	554	ALT-gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s25	551 [deleção de 3 pb]	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s38	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s42	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s45	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s57	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s70	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s71	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s79	912 [inserção de 358 pb]	ALT-gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s81	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s86	554	ALT-gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s89	545 [deleções de 1+8 pb]	ALT-gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s97	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s97	551 [deleções de 1+3 pb + inserção de 1 pb]	ALT-gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s101	549 [deleções de 6+3 pb + inserção de 4 pb]	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s104	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s106	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s111	548 [deleções de 1+7 pb + inserção de 2 pb]	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s116	554	gRNA70-3	gRNA79-1
GH3 F90 s128	554	gRNA70-3	gRNA79-1

Pb, pares de base.

Além da deleção completa da região crítica da SPW, outra alteração avaliada nesta segunda edição genômica realizada nas células GH3 F90 foi a possibilidade de inversão completa de toda a região gênica após ação do sistema CRISPR-Cas9. Inicialmente as linhagens fundadoras (GH3 F90 e GH3 F114) foram investigadas e não apresentaram nenhuma das inversões possíveis com os gRNAs utilizados (Tabela 5 e anexo 1).

Num segundo momento, todas as 123 sublinhagens de GH3 F90 que restaram após o *screening* para deleções foram submetidas à investigação para inversões (11 sublinhagens não conseguiram prosperar após a extração do DNA e foram descontinuadas). Para as reações de inversão, foram utilizados pares de *primers* na mesma fita do DNA (ambos sentidos ou ambos antissensos) para os flancos proximal e distal da edição planejada. Ao todo, 22 das 123 colônias (17,88%) analisadas exibiram inversão completa da região da SPW de 3,2 Mb, como exemplifica a figura 20.

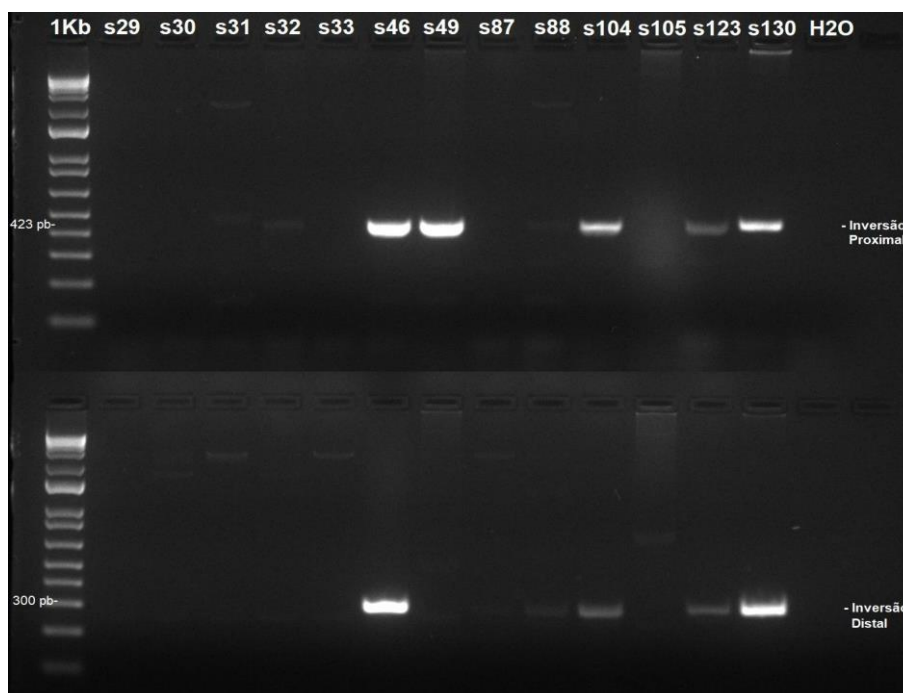


Figura 20 Eletroforese em gel de agarose das PCRs de confirmação da inversão nas sublinhagens GH3. 1 Kb, peso molecular. H₂O, controle negativo. s46, s49, s104, s123 e s130 apresentaram bandas para inversão proximal e/ou distal, confirmando a edição genômica.

Ao todo, 39 bandas de PCR de inversão proximal e/ou distal das sublinhagens GH3 F90 foram submetidas ao sequenciamento para confirmação e caracterização. O alinhamento das sequências permitiu identificar os sítios de corte e reparo no genoma das 22 sublinhagens (Figura 21). A maioria apresentou reparo preciso do DNA, enquanto nove sublinhagens exibiram inserções e/ou deleções de nucleotídeos nos pontos de quebra da dupla fita (Tabela 10). Em investigação posterior, foi constatado que a sublinhagem s106 também exibiu uma “pequena” inversão de 104 Kb à montante da região SPW entre o sítio-alvo original (gRNA70-3) e o alternativo (ALT-gRNA70-3), gerada pelo segundo evento de edição genômica.

Nesta análise de inversões, as InDels foram de baixo número de nucleotídeos nas adjacências dos pontos de quebra, em regra. Porém, algumas sublinhagens apresentaram alterações “maiores” e intrigantes (Tabela 10). GH3 F90 s41 demonstrou uma inserção de 86 pb derivada do plasmídeo PX458 utilizado na transfecção. A sublinhagem s79 exibiu uma inserção composta por uma pequena duplicação de 22 pb originada de uma sequência intergênica à jusante do gene *Ube3a* (1q22) e outra sequência de 22 pb que apresentou 100% de homologia com o DNA de *Megasphaera elsdenii* (uma bactéria fermentadora presente no trato intestinal de gado de criação) (Weimer

et al. 2015). A sublinhagem s99 apresentou deleção de 37 pb na junção com o flanco distal da edição genômica e uma inserção composta por 169 pb de uma sequência intergênica derivada do braço longo do cromossomo 11 de rato e 36 pb originados do plasmídeo PX458. GH3 F90 s133 exibiu uma inserção de 129 pb originada do gene *Esr1* (receptor de estrogênio), localizado em 1q11 no genoma de rato. Em relação às deleções, a análise de inversões apresentou resultados ainda mais inesperados quanto às origens do DNA utilizado pelo maquinário da célula para o reparo celular após a edição genômica.

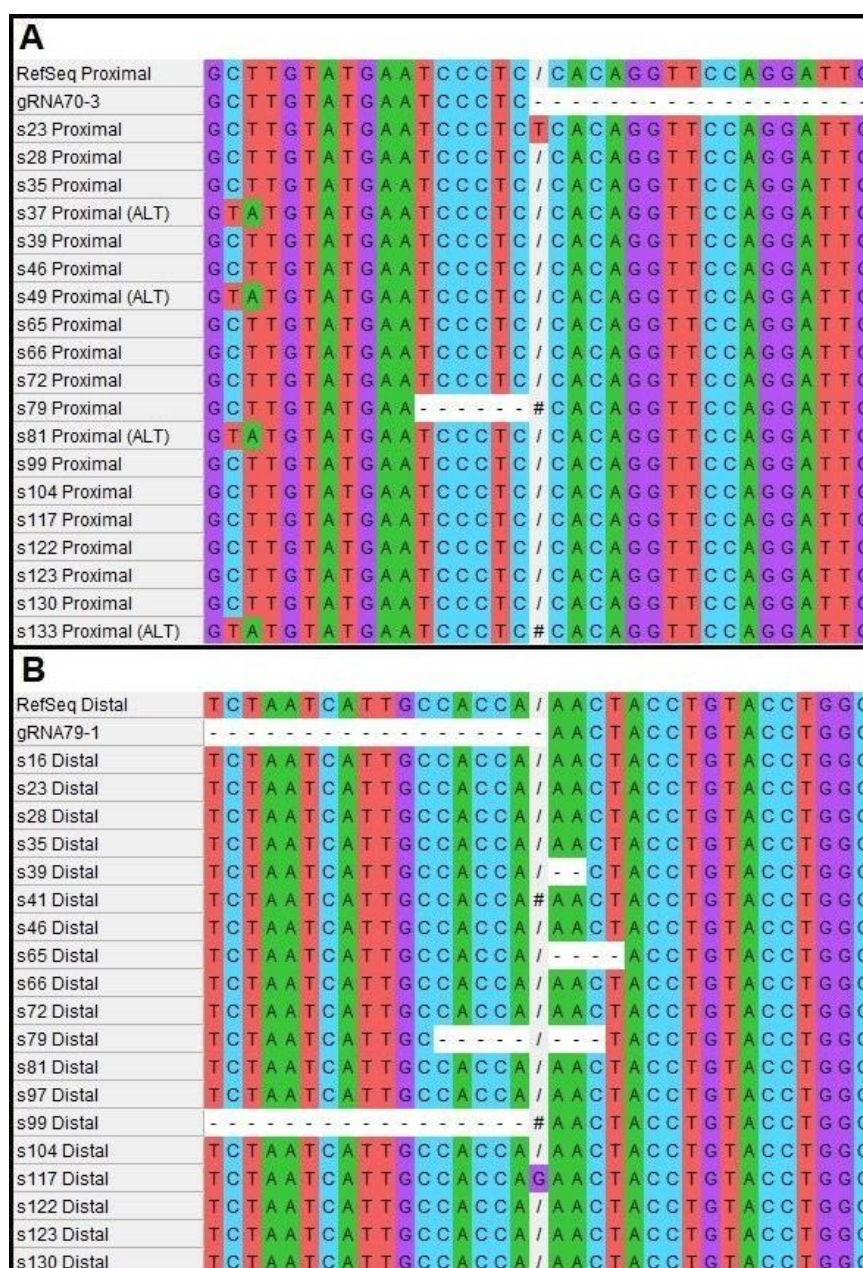


Figura 21. Alinhamento das sequências de DNA nos pontos de quebra de inversão nas sublinhagens GH3. A, ponto de quebra proximal gerado pelo gRNA70-3. B, ponto de quebra distal gerado pelo gRNA79-1. /, sítio de corte da Cas9. #, inserção de nucleotídeo(s).

Tabela 10. Resumo da triagem de sublinhagens GH3 F90 com inversão.

Sublinhagens com inversão	PCR de inversão proximal (em pb)	Quebra proximal	PCR de inversão distal (em pb)	Quebra distal
GH3 F90 s16	Sem banda	-	300	gRNA79-1
GH3 F90 s23	424 [Ins de 1 pb]	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s28	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s35	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s37	423	ALT-gRNA70-3	Sem banda	gRNA79-1
GH3 F90 s39	423	gRNA70-3	298 [Del de 2 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s41	Sem banda	-	386 [Ins de 86 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s46	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s49	423	ALT-gRNA70-3	Sem banda	gRNA79-1
GH3 F90 s65	423	gRNA70-3	296 [Del de 4 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s66	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s72	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s79	461 [Del de 6 pb + Ins de 44 pb]	gRNA70-3	292 [Dels de 5+3 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s81	423	ALT-gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s97	Sem banda	-	300	gRNA79-1
GH3 F90 s99	423	gRNA70-3	432 [Del de 37 pb + Ins de 169 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s104	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s106	Sem banda	ALT-gRNA70-3	321	gRNA70-3
GH3 F90 s117	423	gRNA70-3	301 [Ins de 1 pb]	gRNA79-1
GH3 F90 s122	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s123	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s130	423	gRNA70-3	300	gRNA79-1
GH3 F90 s133	552 [Ins de 129 pb]	ALT-gRNA70-3	Sem banda	gRNA79-1

Del, deleção. Ins, inserção. Pb, pares de bases.

A técnica de PCR digital foi utilizada para avaliar o número de cópias da região da SPW nas 19 sublinhagens deletadas e diferenciá-las entre clones puros e possíveis mosaicos (Figura 22). A análise confirmou a trissomia esperada para a linhagem GH3 parental e dissomia para as duas linhagens fundadoras (GH3 F90 e GH3 F114). Ao todo, dez sublinhagens exibiram número de cópias da região da SPW em torno de dois (próximo da dissomia), sendo interpretadas como mosaicos, e foram desconsideradas para as análises subsequentes deste trabalho. Por outro lado, nove sublinhagens apresentaram número de cópias próximo a um, indicando possível monossomia para a região da SPW. Estas sublinhagens foram utilizadas nos experimentos seguintes. Nenhuma sublinhagem apresentou *knockout* completo da região crítica da SPW.

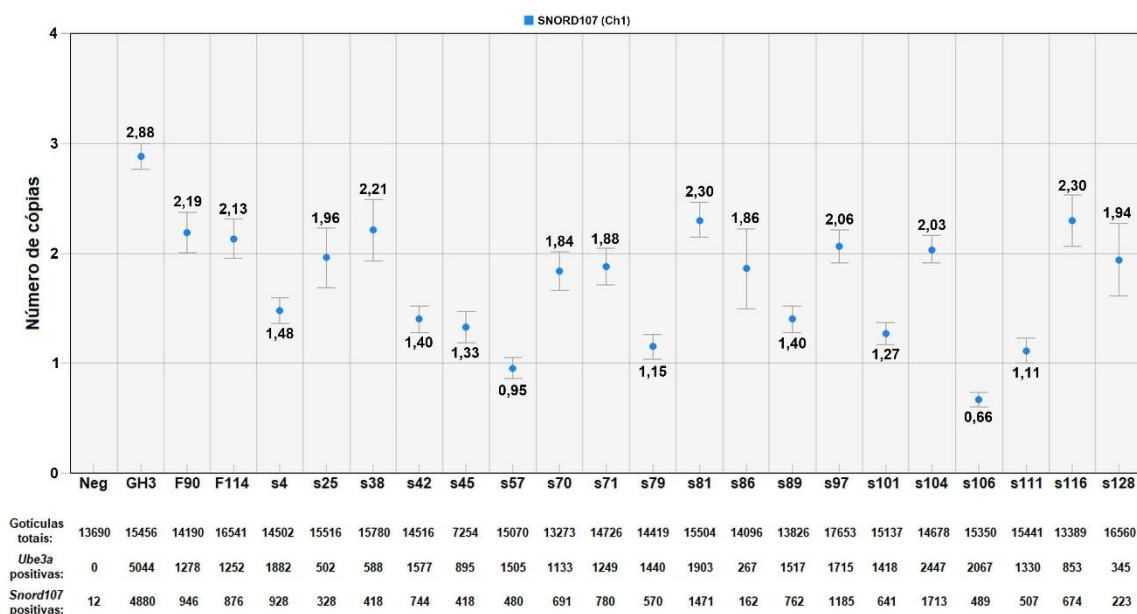


Figura 22. Análise do número de cópias da região da SPW nas sublinhagens GH3 por PCR digital. O gene *Ube3a* é a referência com três cópias. O número de cópias do gene *Snord107* variou de acordo com os eventos de edição genômica em cada sublinhagem e a presença de mosaicismos. Neg, controle negativo.

Após a definição das nove sublinhagens com monossomia para a região da SPW, resultante dos dois *rounds* de edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9, foi necessário definir qual alelo restou em cada sublinhagem, paterno ou materno. Para esta definição, a técnica de MS-HRM foi novamente utilizada (Figura 23). A linhagem fundadora GH3 F90 foi analisada para servir como base de comparação às sublinhagens que dela derivaram e, também, para definir os parâmetros das temperaturas esperadas para os picos paterno e materno. As sublinhagens s4, s42, s79, s101 e s111 apresentaram deleção do alelo materno (MAT-KO). Apesar de não ser a edição esperada, já que os genes da região da SPW continuariam ativos no alelo restante, estas sublinhagens foram mantidas no trabalho como controles. Já as sublinhagens s45, s57, s89 e s106 exibiram deleção do alelo paterno (genótipo objetivado neste projeto) e serão tratadas, de agora em diante, como *knockout* da SPW (SPW-KO). As sublinhagens SPW-KO teriam, em teoria, expressão nula dos genes da região da SPW.

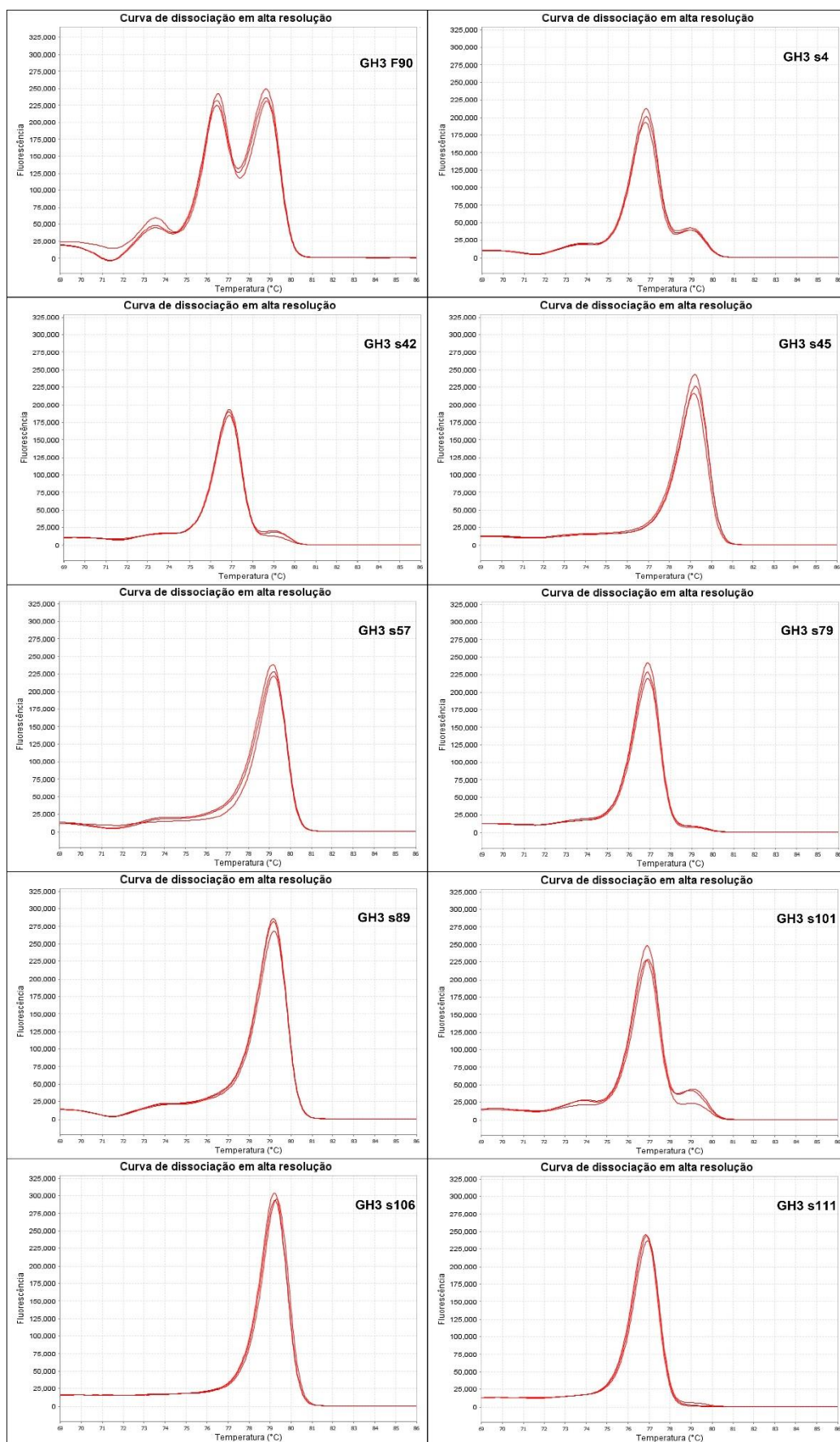


Figura 23. Curvas de dissociação por MS-HRM do DNA das sublinhagens GH3 F90. O alelo paterno encontra-se na altura de 76,8°C e o alelo materno na altura de 79,0°C.

A atividade *off-target* na edição genômica mediada por CRISPR é uma preocupação ao se analisar fenótipos. É importante garantir que qualquer resultado experimental não seja decorrente de modificações genéticas inespecíficas ou não intencionais. Neste trabalho, além da investigação de *off-targets*, também foi realizada uma análise por sequenciamento da atividade nos sítios *on-target* pelo sistema CRISPR-Cas9. Isto é, após confirmada a deleção de 3,2Mb em um alelo específico, o que ocorreu nos sítios *on-target* no(s) alelo(s) remascente(s)? Nestes alvos originais dos gRNAs espera-se encontrar sequências inalteradas ou mesmo “cicatrizes” (mutações de base única ou Indels). Ao todo, foram analisados quatro sítios *on-target* e 16 sítios *off-target* nas linhagens GH3 fundadoras e suas sublinhagens derivadas (Tabela 11). A figura 24 exemplifica alguns destes alvos e seus respectivos alinhamentos de sequências. O gRNA70-3 exibiu a maior atividade *off-target*, principalmente no sítio alternativo decorrente de duplicação segmentar (Figura 24D). De modo geral, houve pouca ou nenhuma atividade *off-target*.

Tabela 11. Visão geral da atividade *on-target* e *off-target* pelo sistema CRISPR-Cas9.

Alvo investigado	Sem edição genética	Mutação de base única	InDels
gRNA1	4	0	0
<i>Off-target 1</i>	6	0	0
<i>Off-target 2</i>	6	0	0
<i>Off-target 3</i>	6	0	0
<i>Off-target 4</i>	6	0	0
<i>Off-target 5</i>	6	0	0
gRNA3	4	0	0
<i>Off-target 6</i>	6	0	0
<i>Off-target 7</i>	6	0	0
<i>Off-target 8</i>	6	0	0
gRNA70-3	9	0	9
<i>Off-target 9</i>	12	0	12
<i>Off-target 10</i>	24	0	3
<i>Off-target 11</i>	27	0	0
<i>Off-target 12</i>	27	0	0
<i>Off-target 13</i>	26	0	1
gRNA79-1	14	1	3
<i>Off-target 14</i>	27	0	0
<i>Off-target 15</i>	27	0	0
<i>Off-target 16</i>	27	0	0

A análise dos alvos de gRNA1 e gRNA3 corresponde às duas linhagens fundadoras. A análise dos alvos de gRNA70-3 e gRNA79-1 corresponde às nove sublinhagens.

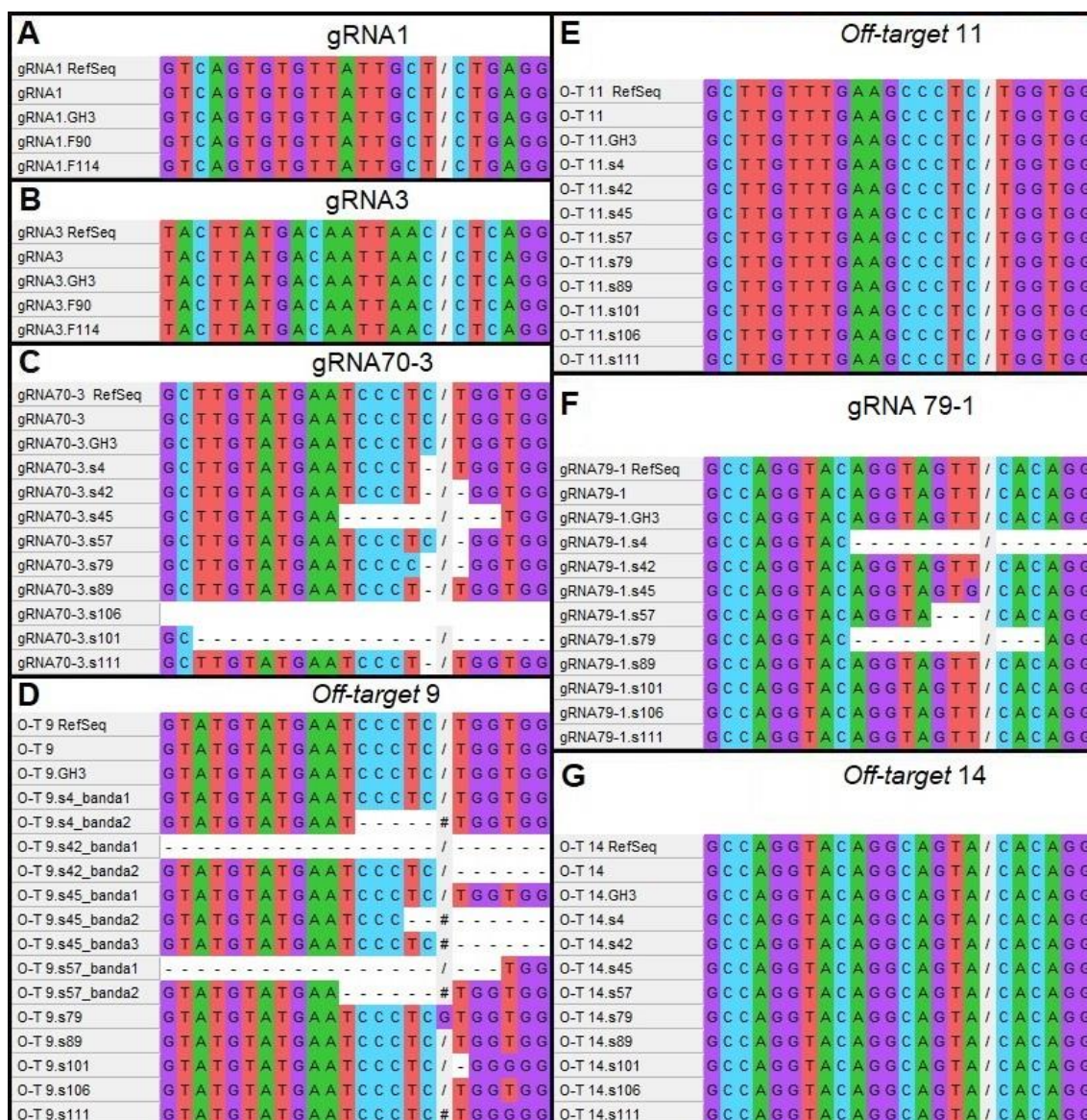


Figura 24. Alinhamento das sequências de DNA para análise da atividade *on-target* e *off-target* pelo sistema CRISPR-Cas9. A, gRNA1. B, gRNA3. C, gRNA70-3. D, Off-target 9. E, Off-target 11. F, gRNA79-1. G, Off-target 14.

Após toda a caracterização das sublinhagens quanto ao conteúdo genético da região da SPW, deleções e/ou inversões, origem parental do(s) alelo(s) restante(s) e avaliação da atividade *on-target* e *off-target* pelo sistema CRISPR-Cas9, foi realizada a análise da expressão gênica da região crítica da SPW, objeto final desta tese.

Inicialmente, a linhagem parental GH3 teve um painel de genes analisados por RT-PCR (Tabela 8), antes de qualquer edição genética (Figura 25). Este painel de expressão apresentou a relação da expressão do GH frente à expressão dos genes imprintados da região da SPW em condição selvagem (células GH3 não editadas) e em pituitária e córtex cerebral de ratos (como

controles positivo e negativo da expressão do GH, respectivamente). Os resultados qualitativos por RT-PCR indicaram maior expressão gênica de *Snurf*, *Snord107* e *Snord116* concomitantemente à alta expressão de *Gh1*, em células GH3.

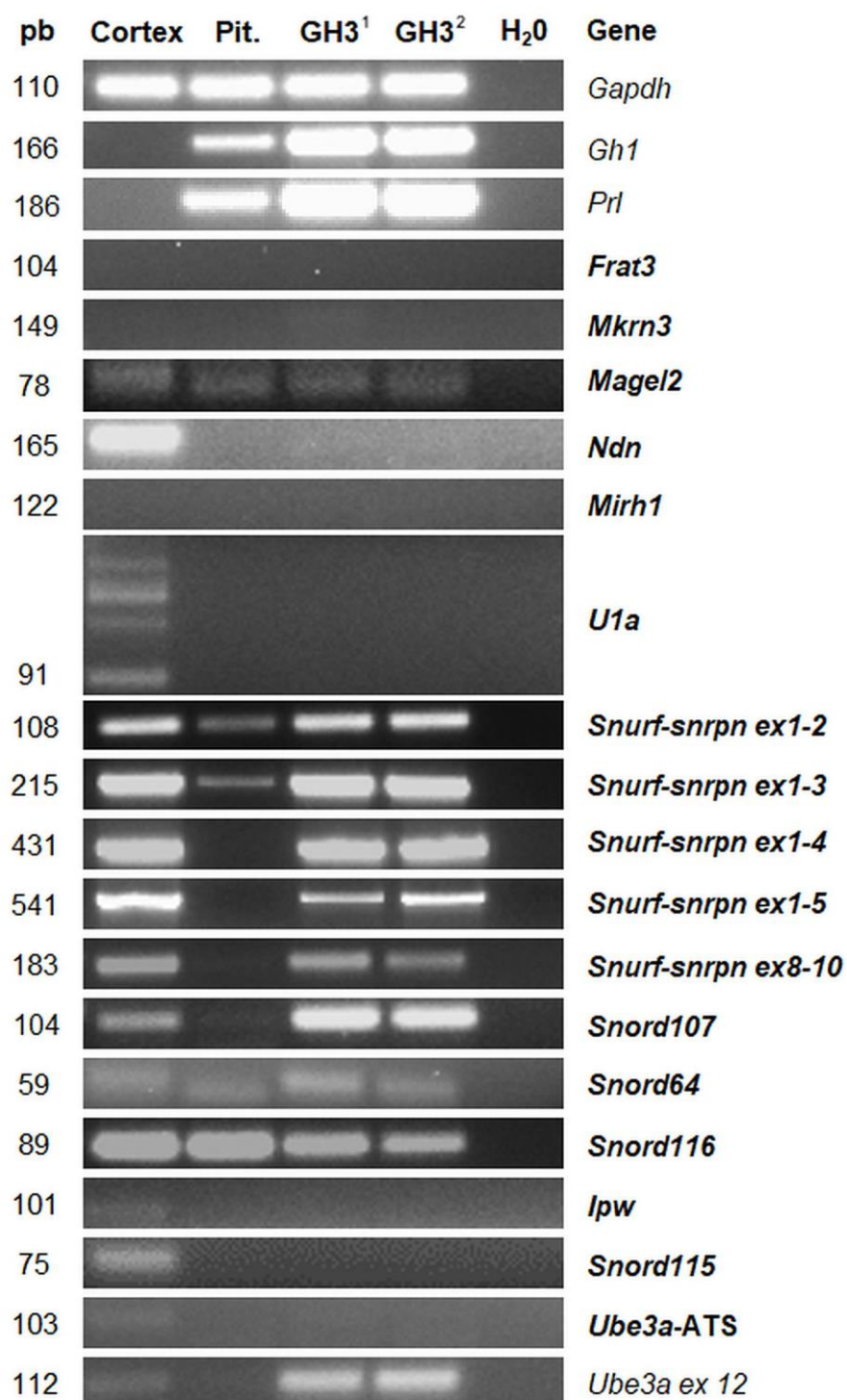


Figura 25. Painel de expressão gênica da linhagem GH3 parental por RT-PCR. A expressão de GH3 foi avaliada em duplicata, proveniente de RNA total extraído de células em dois meios de cultura diferentes. Em negrito, genes de expressão monoalélica paterna da região da SPW. Pb, pares de base. Pit, pituitária.

A análise quantitativa por PCR digital dos genes *Snurf*, *Snord107* e *Snord116* confirmou seus níveis enriquecidos de expressão na linhagem GH3 (Figura 26), identificando estes três genes como os principais candidatos a desempenhar função na regulação do GH nestas células.

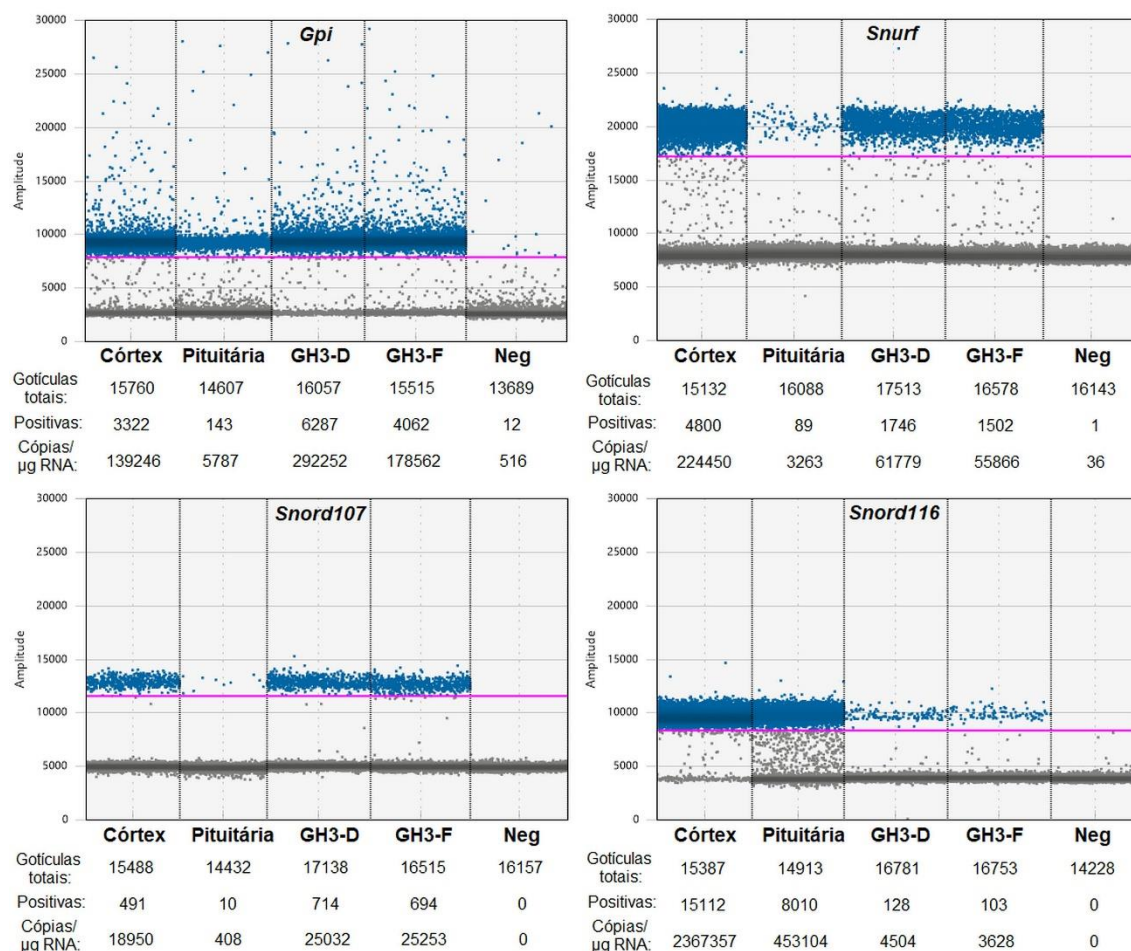


Figura 26. Quantificação dos níveis de expressão gênica da linhagem GH3 parental por PCR digital. Análise em células GH3, córtex e pituitária de rato para gene controle (*Gpi*) e genes que sofrem *imprinting* na SPW. Gráficos mostram as gotículas positivas (pontos azuis) e gotículas negativas (pontos pretos). Limiar manual representado pela linha rosa. Neg, negativo.

A avaliação da expressão gênica da região crítica da SPW das sublinhagens GH3 F90 por RT-PCR e PCR digital (Figuras 27 e 28, respectivamente) confirmou os dados de deleção genômica e análise de metilação exibidos até aqui. Como esperado, os genes que sofrem *imprinting* na região da SPW não apresentaram expressão nas sublinhagens SPW-KO. Já as sublinhagens MAT-KO mantiveram os níveis observados tanto na linhagem parental quanto nas fundadoras, sugerindo que a presença de apenas um alelo paterno ativo é suficiente para manutenção da expressão gênica na região da SPW. Não houve diferenças significativas na expressão de prolactina nas

condições analisadas. A sublinhagem s57 (SPW-KO) apresentou uma redução de 99,25% na expressão do GH em relação à GH3 parental, entretanto a sublinhagem s106 (também SPW-KO) apresentou os maiores níveis de expressão do GH entre as células editadas, abaixo apenas da linhagem parental GH3, apenas. Nas condições analisadas, não é possível afirmar que a expressão do GH não foi afetada pela ausência de atividade gênica na região crítica da SPW, já que tanto a expressão quanto a secreção do GH ocorrem de forma pulsátil e em ritmo circadiano, com picos de produção em diferentes períodos do dia.

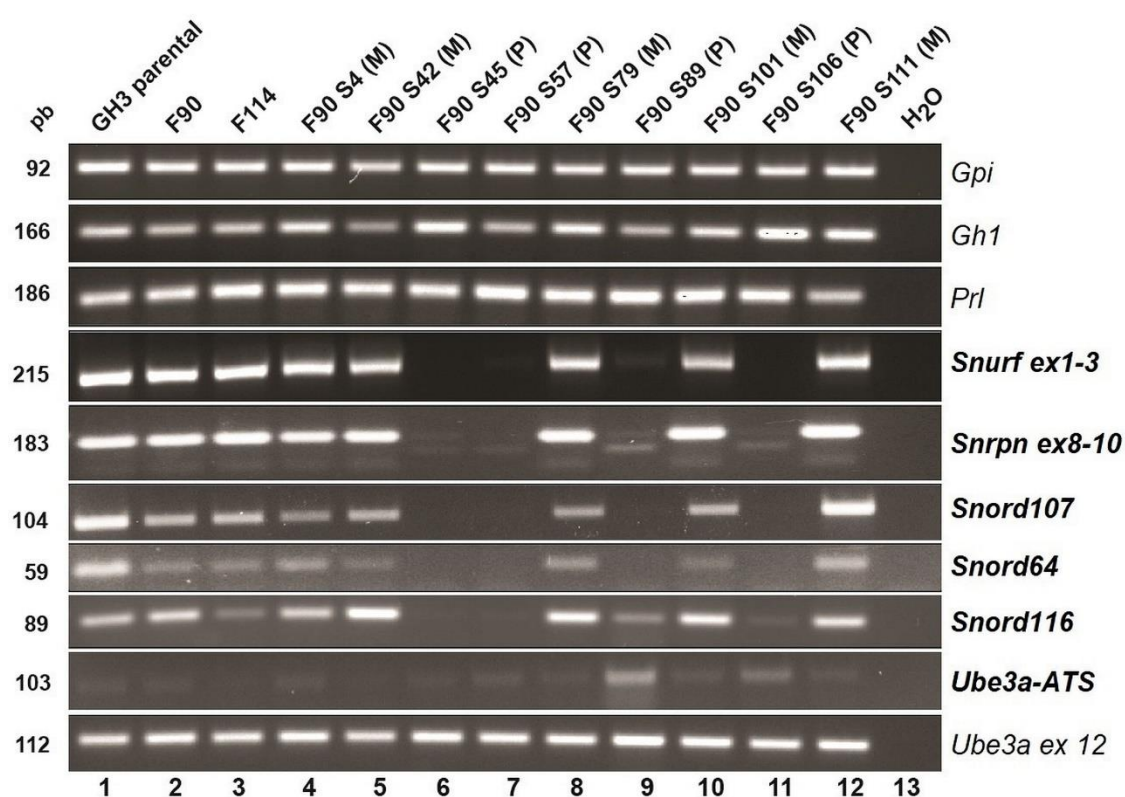


Figura 27. Painele de expressão gênica das sublinhagens GH3 por RT-PCR. Em negrito, genes de expressão monoalélica paterna da região da SPW. Pb, pares de base. Pit, pituitária. M, indica sublinhagens MAT-KO. P, indica sublinhagens SPW-KO.

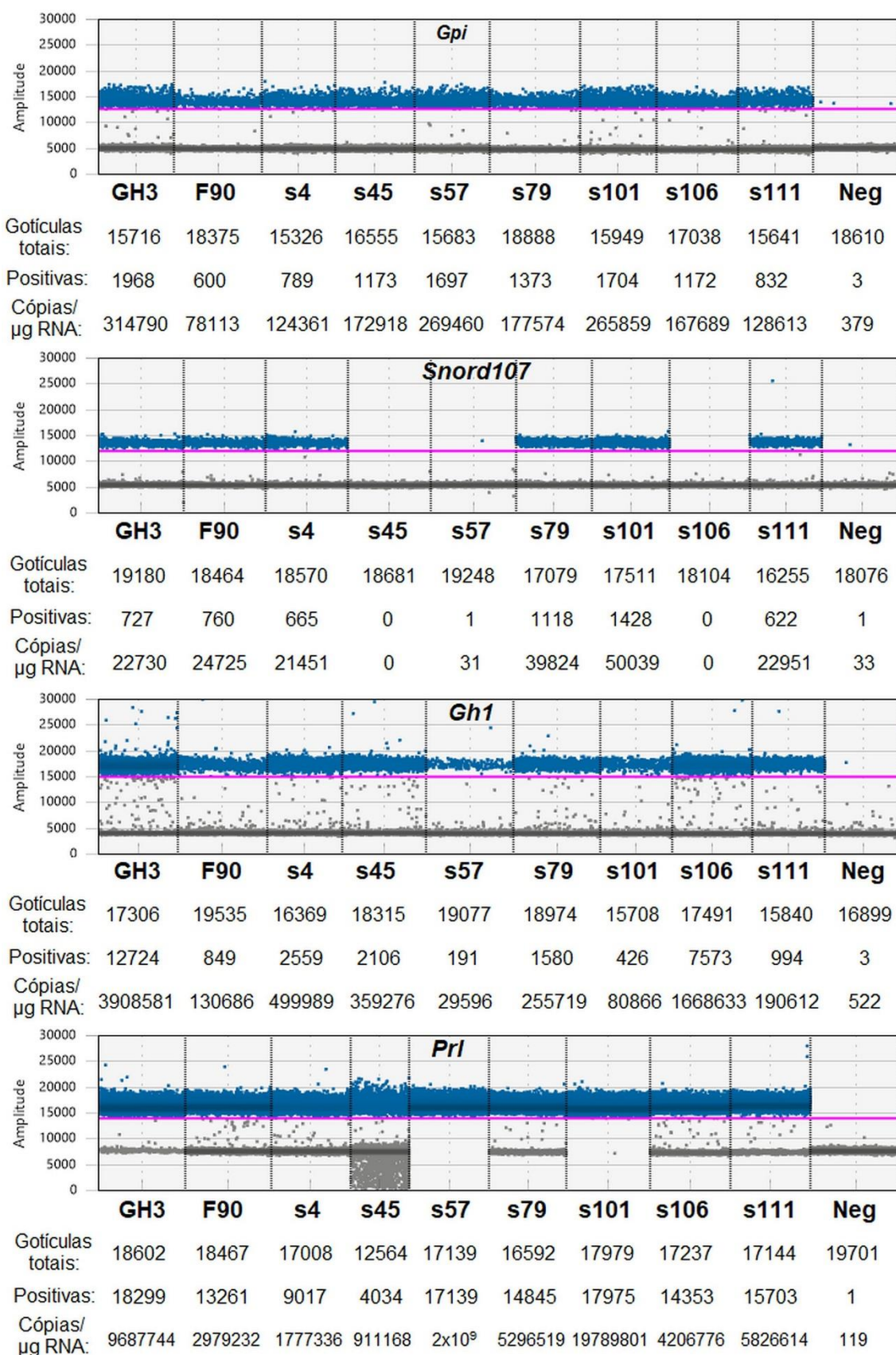


Figura 28. Quantificação dos níveis de expressão gênica das sublinhagens GH3 por PCR digital. Gráficos mostram as gotículas positivas (pontos azuis) e gotículas negativas (pontos pretos). Limiar manual representado pela linha rosa. Neg, negativo.

5. Discussão

A análise citogenética e molecular da linhagem celular GH3 demonstrou trissomia para a região crítica da SPW (1q22), composta por dois alelos paternos e um materno. Estes resultados aumentaram a dificuldade do processo de edição genômica nestas células, já que nestes moldes com três alelos, fez-se necessário dois eventos de deleção pelo sistema CRISPR-Cas9 para obter o genótipo desejado da SPW *in vitro*. Para tanto, uma vez que linhagens fundadoras foram obtidas (dissômicas para região 1q22), GH3 F90 serviu de molde para a deleção menor dentro da região da SPW, gerando quatro sublinhagens SPW-KO e cinco MAT-KO.

O processo de transfecção para incorporação dos plasmídeos CRISPR-Cas9 apresentou baixa eficiência na linhagem GH3, visto que em experimento realizado sem o *sorting* celular (dados não mostrados), não foi possível confirmar a deleção por PCR. Experimentalmente, por citometria de fluxo, os níveis de expressão de GFP chegaram próximos a 25%, quatro dias após a transfecção. Entretanto, para ocorrer a deleção projetada, seria indispensável a incorporação pelas células dos dois plasmídeos contendo gRNAs com alvos proximal e distal. Por isto, projetamos que um baixo percentual de células, de fato, incorporou ambos os plasmídeos necessários. O que explica a necessidade do *sorting* celular por GFP para enriquecer as células GH3 transfectadas com sucesso.

Uma vez que as células GH3 foram sortadas, a grande deleção genômica de 3,2 Mb na região 1q22 mostrou-se factível e seu método de confirmação foi eficiente (Figura 14). O primeiro evento de edição genômica foi realizado com plasmídeos PX330 (contendo gRNA1 e gRNA3, cada), mais o plasmídeo pT3-GFP, e apresentou baixa eficiência de seleção clonal: apenas três (2,08%) entre 144 clones analisados exibiram a deleção na região da SPW (Figura 15). Já no segundo evento de edição, apenas dois plasmídeos PX458 (contendo gRNA70-3 e gRNA79-1), com expressão intrínseca de GFP, foram utilizados na transfecção das células GH3 F90. Esta mudança aumentou, sensivelmente, a eficiência da segunda deleção: 19 (14,17%) das 134 colônias analisadas exibiram a deleção de 3,2 Mb desejada (Figura 18). Considerando a baixa eficiência de transfecção das células GH3 observada apenas com

plasmídeo GFP (entre 20-25% nos testes iniciais) e sua baixa viabilidade após transfeções, minimizar a quantidade de plasmídeos usados na segunda deleção genômica aumentou a eficiência da transfeção e diminuiu a toxicidade.

As maiores deleções geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 reportadas na literatura em modelos celulares e animais atingiram 30 Mb, até o momento (Essletzbichler et al. 2014, Birling et al. 2017, Korablev et al. 2017). A deleção genômica de 3,2 Mb realizada neste trabalho foi relativamente “pequena” diante deste número, porém supera outros trabalhos que produziram deleções por CRISPR no Brasil, que chegaram a 82 Kb, no máximo (Stankiewicz et al. 2017, Letelier et al. 2018, Deocesano-Pereira et al. 2019).

Devido à anotação genômica imprecisa nos bancos de dados para o genoma de rato durante o desenho do gRNAs (anos 2014 e 2015), a extremidade proximal da região crítica da SPW apresentou dois possíveis alvos para o gRNA1 e para o gRNA70-3 (Figura 29), decorrentes de duplicação segmentar não anotada que foram chamados de alternativos. Note-se que este pequeno viés não alterou o objetivo final do trabalho: deleção completa da região da SPW, visto que qualquer combinação de gRNAs proximal e distal geraria a deleção de 3,2 Mb planejada. Esta duplicação segmentar tornou a análise mais complexa e desafiadora, porém mais interessante tanto do ponto de vista analítico quanto para futuras publicações. Além disso, devido aos elementos repetitivos entre os genes *Frat3* e *Chrna7*, não haveria uma sequência de DNA proximal essencialmente única para os alvos CRISPR.

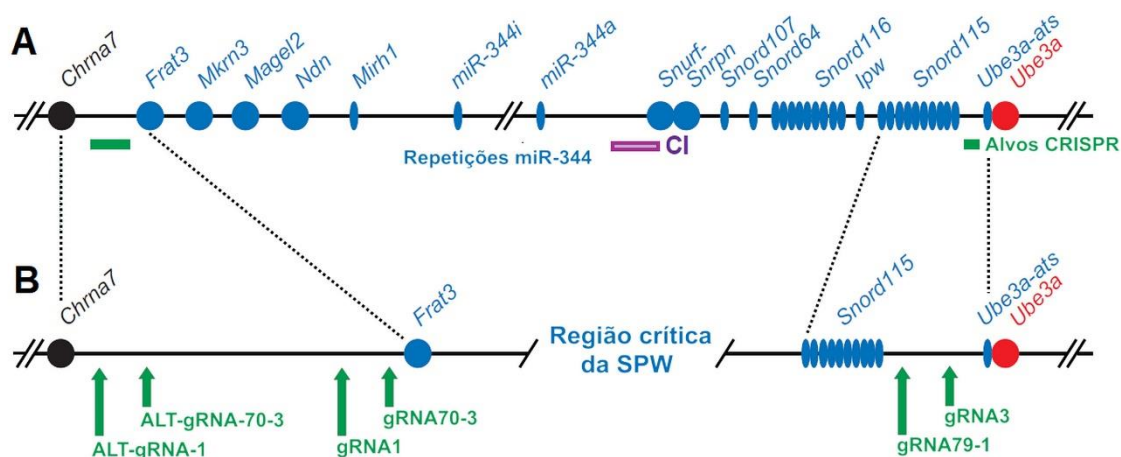


Figura 29. Mapa gênico da síndrome de Prader-Willi em ratos e os alvos CRISPR. A, mapa genético completo. **B,** Mapa expandido dos sítios-alvo proximais e distais de CRISPR. CI, centro de imprinting da SPW. Em azul, genes com expressão monoalélica paterna. Em vermelho, genes com expressão preferencial materna.

As linhagens fundadoras GH3 F90 e F114 apresentaram a deleção de 3,2 Mb esperada. Os resultados de sequenciamento revelaram uma restauração perfeita entre os sítios-alvo de edição do DNA nestas células, sem inserções ou deleções de nucleotídeos nos pontos de quebra da dupla fita do DNA. Porém, como o intuito da edição genômica proposta neste trabalho foi, justamente, a inativação desta grande região gênica, não haveria necessidade de um reparo celular perfeito. O eletroferograma da linhagem GH3 F50 para a sequência no sítio-alvo de reparo da edição gênica exibiu padrão duplo de picos caracterizando mosaicismos. Como necessitávamos de clones puros nas etapas seguintes do trabalho, GH3 F50 foi descontinuada.

Durante o processo de deleção do primeiro alelo (gRNAs 1 + 3) não foi realizada investigação para eventos de inversão genômica. Esta análise foi realizada *a posteriori* apenas nas linhagens fundadoras GH3 F90 e F114, que não exibiram nenhum tipo de inversão.

Entretanto, no decorrer da deleção menor (gRNAs 70-3 + 79-1) foram investigados os eventos de deleção e inversão. Como exposto anteriormente, o uso do plasmídeo PX458 aumentou a eficiência da segunda deleção, com seleção de 14,17% de clones deletados. Não obstante, eventos de inversão completa da região da SPW de 3,2 Mb foram observados em 17,88% dos clones analisados. Estes resultados corroboram relatos da literatura que eventos de deleções e inversões ocorrem com frequência similar ao se utilizar dois gRNAs por CRISPR, com fragmentos de DNA variando entre algumas dezenas de pares de base, centenas de kilobases e, até mesmo, na escala de megabases, como demonstrado nesta tese (Zhang et al. 2015, Li et al. 2015, Korablev et al. 2017).

Este aumento na eficiência, devido ao uso do plasmídeo PX458, veio acompanhado também por eventos mais inusitados de reparo celular e recombinação do DNA. Por exemplo, sete sublinhagens com inversão da região da SPW apresentaram apenas uma das duas bandas esperadas por PCR (proximal ou distal). Isto sugere que possa ter havido grandes deleções nos flancos destes sítios, impossibilitando a ligação dos *primers* de inversão e, conseqüentemente, impedindo que a PCR ocorresse (Adikusuma et al. 2018).

No entanto, apenas a presença de umas das bandas esperadas para inversão já seria suficiente para comprovar a ocorrência deste evento na região inteira.

Os casos de sublinhagens com inserções atípicas nos espaços gerados pela quebra da dupla fita do DNA também chamaram a atenção neste trabalho. A deleção de s79 e as inversões de s41 e s99 apresentaram recombinação com a sequência de DNA do próprio plasmídeo PX458 utilizado na transfecção do complexo Cas9-gRNA. Não houve similaridade nas sequências inseridas, o que revela a aleatoriedade no sistema de reparo. Este tipo de descontrole no reparo do DNA pode induzir rearranjos cromossômicos complexos e indesejados, afetando a confiabilidade da edição genômica, especialmente na pesquisa de modelos de doenças e terapias gênicas mediadas pelo sistema CRISPR-Cas9, quando se requer alta precisão (Culot et al. 2019).

Outros casos de inserção inesperada incluíram DNA de fora da região da SPW como trechos do gene *Ube3a* (1q22, inversão de s79), do gene *Esr1* (1q11, inversão de s133), 31 cópias da sequência hexanucleotídica 5'-TTAGGG-3' de telômero (deleção de s79) e 169 pb de uma sequência intergênica derivada do braço longo do cromossomo 11 de rato (inversão de s99). Estes dados também reforçam o caráter imprevisível do sistema de reparo de DNA, incorporando sequências de diversas regiões genômicas do organismo alvo de edição pelo sistema CRISPR-Cas9, inesperadamente.

Sem dúvida, a origem do DNA mais inesperada dentre as inserções foi o trecho de 22 pb (5'-CGAACATTTATGAATAAGATTT-3') da inversão da sublinhagem s79. Esta inserção apresentou 100% de homologia com o DNA de *Megasphaera elsdenii*, após análise pela ferramenta BLAST. Esta é uma bactéria fermentadora encontrada no trato intestinal de gado de criação (Weimer et al. 2015). A única explicação lógica para a origem deste DNA bacteriano é a partir do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura F-12K. Este resultado revela um perigo adicional (além das mutações *off-target*) no uso de meios de cultura padrão no preparo de células de pacientes em qualquer abordagem de terapia gênica, por exemplo. Para maior segurança, no futuro podem ser necessários meios de cultura de origem não celular (sem soro fetal bovino ou equino, por exemplo) que usem ingredientes sintéticos ou purificados para proteger contra inserções de fragmentos exógenos de DNA.

A inserção de 358 pb observada na deleção de GH3 s79 foi a única que mostrou um “padrão” de recombinação. Esta inserção foi composta por 188 pb de repetição telomérica e 170 pb derivados do plasmídeo PX458. Cada uma das três junções de recombinação do DNA genômico de rato, do vetor plasmidial e do DNA telomérico, apresentou uma sequência 5'-CCCT-3' (Figura 19C, sublinhado) próximo à quebra do DNA, sugerindo um potencial papel desta sequência na resolução destas recombinações. Na realidade, uma proteína com dedos de zinco de ligação ao DNA chamada CTCF (*CCCTC-Binding factor*) é recrutada quando há quebras na dupla fita do DNA e tem papel na regulação do reparo por homologia (Hilmi et al. 2017). Isto explicaria este padrão de recombinação observado na deleção de GH3 s79 (Figura 19C, sublinhado).

Uma análise mais profunda da duplicação segmentar observada no flanco proximal da região crítica da SPW revelou, ao menos, 10 cópias da sequência 5'-CCCTC-3', alvo de ligação da proteína CTCF, a montante do gene *Frat3* (Figura 30). A CTCF está envolvida em processos celulares como regulação transcricional, recombinação, organização da arquitetura da cromatina e *imprinting* genômico (Hnisz et al. 2016, Song & Kim 2017). Os sítios de ligação de CTCF são considerados fronteiras de sinalização do início da metilação diferencial dependente da origem parental em alguns genes, incluindo *UBE3A* na porção distal da região da SPW (Murrell et al. 2004, Kurukuti et al. 2006, Hsiao et al. 2019, Liu et al. 2019). O que gera este *imprinting* genômico diferencial é a baixa densidade de RNA polimerases II nos *clusters* dos sítios de ligação de CTCF, seja por impedimento estérico direto ou pela pausa no alongamento da transcrição (Shukla et al. 2011). De acordo com o que foi investigado neste trabalho e baseado nos dados da literatura, estes prováveis sítios de ligação de CTCF entre os genes *Frat3* e *Chrna7* podem demarcar o início do silenciamento gênico por *imprinting* na porção proximal do domínio da SPW em ratos. Se esta hipótese estiver correta, sítios homólogos devem ser encontrados a montante de *MKRN3* no genoma humano. Os próximos passos serão investigar estas possíveis fronteiras de marcação epigenética, bem como as sequências de DNA que flanqueiam genes impressos e não impressos.

gRNA70-3	A	T	T	T	C	A	G	C	T	T	G	T	A	T	G	A	A	T	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	A	A	T	G	A	T	T	A	G	A	A	C
ALT-gRNA70-3	C	A	G	A	A	T	G	T	A	T	G	T	A	T	G	A	A	T	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	A	A	A	G	A	G	T	A	G	A	A	C
CCCTC 3	T	A	A	A	C	C	G	A	G	T	A	T	C	G	T	T	T	G	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	C	A	A	T	A	T	G	T	T	G	A	A
CCCTC 4	T	A	A	A	C	C	G	A	G	T	A	T	C	G	T	T	T	G	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	C	A	C	T	A	T	T	T	G	A	A	
CCCTC 5	T	T	A	A	C	G	G	A	G	C	A	T	C	G	G	C	T	G	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	C	A	A	G	C	A	C	T	A	A	G	T
CCCTC 6	C	A	T	G	T	A	C	T	A	T	G	T	A	T	G	A	G	T	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	A	A	T	G	A	T	C	A	G	A	A	C
CCCTC 7	C	T	A	A	A	C	C	G	G	T	A	T	C	G	T	T	T	G	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	C	A	T	T	A	C	A	T	C	A	A	A
CCCTC 8	C	A	T	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	T	G	A	T	T	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	A	T	A	A	G	A	A	C	T	T	A	A
CCCTC 9	T	G	A	A	C	A	A	A	G	A	C	T	C	T	T	C	T	G	C	C	C	T	C	T	A	G	T	G	G	C	T	G	T	T	A	A	A	T	T	A	A	A
CCCTC 10	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	G	A	C	G	A	G	T	C	C	C	T	C	T	G	G	T	G	G	C	C	A	T	G	G	T	T	A	G	A	A	C	

Figura 30. Alinhamento das sequências de possíveis sítios-alvo do fator de ligação CTCF na porção proximal da SPW. *, destaque para a sequência-alvo 5'-CCCTC-3'.

A análise da dosagem do conteúdo genômico da região da SPW por PCR digital (Figura 22) mostrou-se eficaz na definição das nove sublinhagens derivadas de clones puros, com monossomia para a região. Estes dados foram corroborados posteriormente pela técnica de MS-HRM (Figura 23). Esta etapa foi de grande importância para definir a origem parental do alelo restante em cada sublinhagem, visto que o genótipo de SPW-KO era o objetivo deste trabalho, porém o genótipo de MAT-KO serviria como um excelente controle nos ensaios de expressão genômica. Além disso, a análise do estado de metilação das nove sublinhagens pela técnica de MS-PCR (dados não mostrados) foi capaz de definir apenas as sublinhagens SPW-KO, enquanto os resultados de MS-HRM conseguiram distinguir claramente os alelos paterno e materno de cada sublinhagem. Mais uma vez, o método de MS-HRM exibiu vantagens significativas sobre a análise de metilação convencional por MS-PCR, como já foi relatado pelo nosso grupo (Ferreira et al. 2019).

A atividade *off-target* é uma grande preocupação na utilização do sistema CRISPR-Cas9 e sua análise é essencial para validação dos trabalhos com edição genômica, atualmente. Neste estudo, foram avaliados 16 alvos não específicos por sequenciamento Sanger. gRNA1, gRNA3 e gRNA79-1 não apresentaram atividade *off-target*. O gRNA70-3 apresentou atividade *off-target* relativamente alta de 11,85%, se considerado isoladamente. Isto se deve principalmente ao seu sítio alternativo decorrente de duplicação segmentar (Figura 29), que faz com que o gRNA70-3 tenha, praticamente, dois “*on-targets*” no genoma de ratos. Ao se comparar as sequências de DNA do sítio-alvo original do gRNA70-3 e o *off-target* 9 (ALT-gRNA70-3), observa-se apenas dois erros de pareamento (CT>TA) na porção 5' do gRNA (Figura 24C,

D). Os primeiros 8-12 nucleotídeos do gRNA próximos à sequência PAM são críticos na determinação da especificidade e direcionamento da clivagem específica pelo sistema CRISPR-Cas9 (Cong et al. 2013). Em outras palavras, pequenos erros de pareamento distantes da PAM, como observado entre o gRNA70-3 e o *off-target* 9, não afetam tanto a atividade catalítica da enzima Cas9. Isto pode ser confirmado pela análise dos números semelhantes de InDels decorrentes da ação *on-target* de gRNA70-3 e *off-target* 9 (Tabela 11).

De modo geral, a atividade *off-target* foi de apenas 6,06% em todos os quatro gRNAs utilizados neste trabalho, um valor baixo, considerando que alguns trabalhos chegam a 50% de mutações em alvos inespecíficos (Hruscha et al. 2013, Yan et al. 2014, Dong et al. 2019). Um ponto positivo da nossa análise foi que os locais de maior probabilidade de atividade *off-target* para os nossos gRNAs (segundo o banco de dados online CRISPOR) foram alvos intergênicos, na maioria, e três alvos intrônicos, apenas. Ou seja, a probabilidade de mutações deletérias com os gRNAs utilizados foi mínima.

Nosso grupo colaborador, chefiado pelo Dr. Robert Nicholls, da Universidade de Pittsburgh (Pittsburgh, PA, EUA), demonstrou que os genes que sofrem *imprinting* genômico diferencial na região crítica da SPW são necessários para o desenvolvimento, sobrevivência, regulação e secreção hormonal em modelos animais (Stefan et al. 2005, 2011). Além disso, camundongos recém-nascidos apresentam características clínicas consistentes com as observadas em bebês com SPW, o que reforça a hipótese de que os genes dessa região coordenam a regulação hormonal. A maioria dos genes de expressão monoalélica paterna na região da SPW tem função desconhecida e podem exercer papel direto ou indireto na expressão, no *splicing* alternativo e/ou na estabilidade de genes que codificam os hormônios deficientes na síndrome. Esta via de regulação hormonal pode ser essencial para a compreensão da fisiopatologia de vários sintomas na SPW.

O painel de expressão gênica da linhagem parental GH3 revelou o estado de *Gh1* frente aos genes da região da SPW. Inicialmente, nós comparamos o painel produzido neste trabalho ao realizado por nosso grupo colaborador no ano de 2001 (dados não publicados), também com células GH3 por RT-PCR (Figura 31). O diferencial deste painel prévio em relação ao atual é

que foram utilizados RNAs de tecidos de ratos recém-nascidos, enquanto o nosso painel utilizou-se de RNA total comercial de tecidos de ratos adultos.

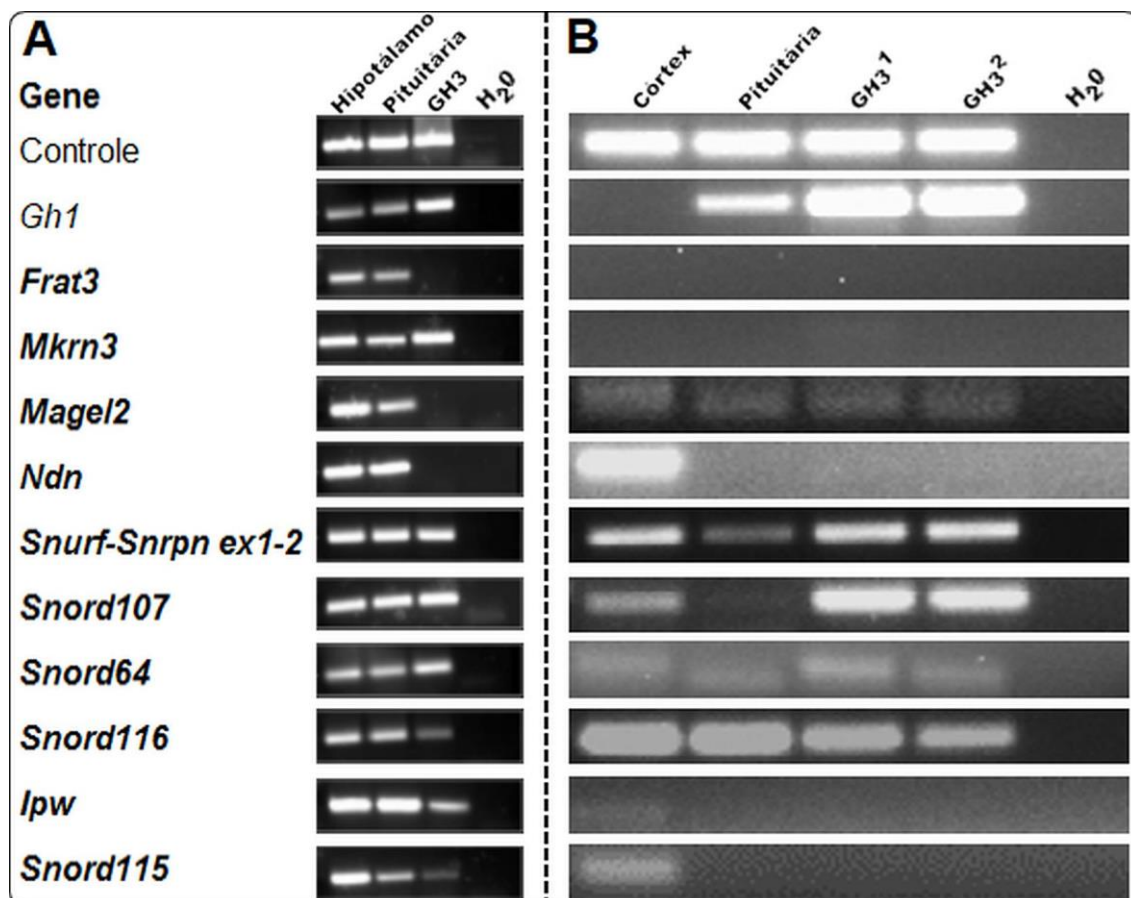


Figura 31. Comparação de painéis de expressão da linhagem GH3 parental por RT-PCR. A, painel de 2001 a partir de RNAs de ratos neonatos (controle = gene *5.8S RNA*). B, painel atual a partir de RNAs de ratos adultos (controle = gene *Gapdh*). Em negrito, genes de expressão monoalélica paterna da região da SPW.

Ao comparar células de neonatos e adultos de uma mesma espécie, é de se esperar uma expressão gênica diferencial. Isto é consistente com a transição do crescimento para a homeostase, em qualquer organismo. O padrão de expressão de genes da região crítica da SPW mostrou diferenças entre as células de ratos neonatos e adultos. No entanto, a comparação realizada aqui (Figura 31) é informativa ao apontar quais genes mantiveram alta expressão junto ao *Gh1* na vida adulta, e quais genes apresentam redução ou nenhuma expressão.

Primeiramente, é importante ressaltar que o gene *Gh1* manteve-se altamente expresso em células GH3, como postulado anteriormente, confirmando a identidade da linhagem celular (Tashjian et al. 1968, Sonnenschein et al. 1970). Os genes *Frat3*, *Mkrn3*, *Ndn*, *lpw* e *Snord115* não

demonstraram ter participação na regulação do GH, visto que nenhum desses apresentou atividade gênica, enquanto a expressão de *Gh1* manteve-se alta na pituitária de adultos e em GH3. Os genes *Magel2* e *Snord64* exibiram baixa expressão em relação ao *Gh1* de pituitária de adultos e GH3, mas mantiveram os mesmos níveis basais de expressão em comparação ao córtex, isto sugere que *Magel2* e *Snord64* também não tenham participação na regulação do GH.

As diferenças dos resultados da linhagem GH3 em 2001 e os atuais também revelaram informações preditivas. Foram utilizados a mesma linhagem, os mesmos métodos de cultivo celular e os mesmos genes para análise por RT-PCR. Além da comparação entre o RNA de células de neonatos e adultos, a discordância de resultados também pode ser explicada por fatores externos, como laboratório e equipamentos diferentes e, claro, pelos profissionais distintos que realizaram todas as técnicas (variação interpessoal). Entretanto, mais uma vez, estes resultados discrepantes foram significativos. Os genes *Mkrn3*, *Ipw* e *Snord115* apresentaram expressão na linhagem GH3 em 2001 e nenhuma atividade gênica atual, enquanto a expressão de *Gh1* manteve-se alta nas duas situações, confirmando que estes três genes não devem ter participação na regulação positiva da expressão do GH.

Por outro lado, os principais genes candidatos à regulação do GH dentro da região crítica da SPW, de acordo com a análise comparativa de expressão gênica, foram *Snurf*, *Snord107* e *Snord116*, que se mantiveram altamente expressos em células GH3 nos dois painéis gerados (Figura 31A e B). Isto orientou nossa seleção de quais *loci* avaliar por análise quantitativa por PCR digital (Figura 26). Estes resultados confirmaram os níveis enriquecidos de expressão qualitativa dos genes *Snurf*, *Snord107* e *Snord116* por RT-PCR na linhagem GH3, identificando estes três genes como os principais candidatos a desempenhar um papel na regulação do GH.

SNURF-SNRPN é um gene bicistrônico complexo que codifica duas proteínas diferentes. O gene *SNRPN* (do inglês, *Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*) está localizado na região central associada à SPW e tem papel importante na regulação dos genes que sofrem *imprinting* nesta região (Özçelik et al. 1992, Ohta et al. 1999), enquanto o gene *SNURF* (do inglês, *SNRPN Upstream Reading Frame*) é codificado por éxons na sua

extremidade 5' (Rodriguez-Jato et al. 2005). O gene *SNURF*, codificado pelos éxons 1-3, produz uma pequena proteína de função desconhecida, de localização restrita ao núcleo (Ohta et al. 1999), já os éxons 4-10 correspondem à porção *SNRPN* do gene e codificam a proteína SmN, envolvida no *splicing* alternativo de mRNAs (Glenn et al. 1996). A proteína SmN demonstra altos níveis de expressão no cérebro e no coração em humanos (Geuns 2003, Rodriguez-Jato et al. 2005, Cao et al. 2017). Além disso, a expressão do gene *SNURF-SNRPN* produz um longo e único transcrito, incluindo também o centro de *imprinting*, sete genes SNORDs, *IPW* e o antissenso de *UBE3A* (Yazdi et al. 2013, Galiveti et al. 2014, Butler et al. 2015, Koufaris et al. 2016). Apesar de sua posição central na região da SPW, a função e a regulação dos vários transcritos alternativos do gene *SNURF-SNRPN* ainda são pouco compreendidas (Koufaris et al. 2016).

Dentro do longo transcrito de *SNURF-SNRPN*, há uma série de pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs, também chamados de SNORDs), que apresentam características estruturais para participação na metilação do DNA, no *splicing* alternativo e, principalmente, na regulação pós-transcricional (Cavaillé et al. 2000, Cheon 2016, Liang et al. 2019). A região da SPW abrange cinco genes SNORDs de cópia única (*SNORD64*, *SNORD107*, *SNORD108*, *SNORD109A* e *SNORD109B*) e dois *clusters* de genes SNORDs (*SNORD115* e *SNORD116*). A expressão dos genes SNORDs varia em diferentes tecidos humanos e animais, sugerindo especificidade na atividade pós-transcricional (Vitali et al. 2010, Castle et al. 2010, Chamberlain et al. 2010, Martins-Taylor et al. 2014, Galiveti et al. 2015). Embora a maioria dos SNORDs seja expressa uniformemente nos tecidos humanos, os *SNORD115* e *SNORD109B* parecem estar restritos ao cérebro. O conhecimento sobre os SNORDs de cópia única na SPW permanece extremamente limitado, porém algum progresso foi feito em relação aos *clusters*: o *SNORD116* possui 29 repetições consecutivas e o *SNORD115* é composto por 48 cópias genéticas em humanos (Cavaillé et al. 2000). Considerando que as sequências SNORDs são altamente conservadas em mamíferos placentários (especialmente em primatas e roedores), isto sugere um papel funcional evolutivo destes pequenos RNAs nucleolares (Zhang et al. 2014, Cavaillé 2017).

O *cluster* de cópias do *SNORD116* é postulado como crucial para a maior parte dos fenótipos da SPW, com base em evidências clínicas em pacientes raros com pequenas deleções ou translocações (Sahoo et al. 2008, de Smith et al. 2009, Buiting 2010, Duker et al. 2010, Bieth et al. 2015). Em estudos experimentais, camundongos *Snord116*-KO exibiram características da SPW como baixo peso ao nascer, retardo de crescimento pós-natal, aumento do ganho de peso corporal no início da idade adulta e hiperfagia (Skryabin et al. 2007, Ding et al. 2008, Rozhdestvensky et al. 2016, Qi et al. 2016). Curiosamente, foi demonstrado que um modelo de camundongo com deleção do *Snord116* exibiu perda ou mudança na dinâmica de metilação em 97% das ilhas CpG no córtex cerebral dependente do ciclo circadiano. E este ritmo epigenético desregulado teve influência considerável sobre genes relacionados ao horário de refeições, biologia circadiana e obesidade em humanos e camundongos (Coulson et al. 2018). Nos últimos anos, o *SNORD116* vem surgindo como candidato crítico ou, até mesmo, determinante na SPW, não apenas por sua sequência altamente conservada, mas também porque deleções paternas que afetam outros genes da região não englobam todo o espectro fenotípico da SPW (Bürger et al. 2002, Runte et al. 2005, Kanber et al. 2009, Cheon 2016, Cavailé 2017).

O último dos três principais genes avaliados como candidatos à regulação do GH dentro da região crítica da SPW neste trabalho foi o *SNORD107*. Assim como o *SNORD116*, este gene faz parte de um grupo chamado de “SNORDs órfãos”, que são snoRNAs com sequência conhecida, porém sem nenhum alvo ou função definidos. O *SNORD107* é um gene de cópia única que transcreve uma pequena molécula de RNA de 74 pb em humanos e 71 pb em ratos (Ding et al. 2005). A alta conservação das sequências de DNA entre mamíferos placentários sugere uma função evolutiva destes pequenos RNAs na metilação do DNA, *splicing* alternativo e/ou regulação pós-transcricional (Cavailé et al. 2000, Kishore & Stamm 2006, Zhang et al. 2014, Cheon 2016, Cavailé 2017).

De fato, o *Snord107* emerge como nosso principal candidato a participar da regulação do GH na linhagem GH3. Isto se baseia nos dados encontrados e confirmados nesta tese, somados aos dados do nosso grupo colaborador, em

Pittsburgh, que tem extenso trabalho na avaliação do GH e outros hormônios deficientes na SPW com diversas linhagens celulares. Além disso, dados recentes de transcriptoma de células somatotrópicas de pituitária corroboraram esta alta expressão do *Snord107* (DeVore et al. 2018, Peel et al. 2018). Outros projetos do nosso grupo colaborador no exterior vêm avaliando a expressão de hormônios como insulina, glucagon, hormônio liberador de gonadotrofina, e obtiveram dados de expressão similares aos desta tese para os genes *Snurf* e *Snord116*, porém em nenhuma destas linhagens houve enriquecimento da expressão do gene *Snord107* (dados não publicados). O que fez deste gene, por eliminação, nosso primeiro candidato lógico à regulação do GH. O *SNORD107* apresenta características estruturais para se associar a outras proteínas e formar complexos funcionais de ribonucleoproteínas, além de exibir sequência antissenso (evolutivamente conservada) capaz de parear com precursores de RNA ribossômico, podendo regular a atividade dos ribossomos por metilação direta ou facilitando o *splicing* de RNAs (Watkins & Bohnsack 2012, Cavallé 2017). Nossa hipótese, baseada no exposto, é que o *SNORD107* forma um complexo ribonucleoprotéico com alvo na cadeia de produção do GH e função regulatória pós-transcricional.

Nós estabelecemos quatro novos modelos de células secretoras de GH pelo sistema de edição genômica CRISPR-Cas9 com genótipo da SPW, através de duas deleções de 3,2 Mb na região genômica 1q22 de ratos, para avaliar os mecanismos genéticos, moleculares e bioquímicos de regulação do GH e o papel dos genes que sofrem *imprinting* na SPW, enquanto tais estudos não seriam possíveis de serem realizados clinicamente ou em modelos animais. Além disso, estas sublinhagens podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas terapias hormonais ou metabólicas para a SPW. Os modelos SPW-KO apresentaram completo silenciamento da expressão gênica dentro da região que sofre *imprinting* na SPW, por RT-PCR e PCR digital. A banda fraca de 162 pb observada na análise de expressão por RT-PCR (Figura 27) nas linhagens SPW-KO para o gene *Snrpn* (éxons 8-10) não corresponde à expressão gênica destas linhagens dentro da região da SPW. Na verdade, esta banda menor corresponde ao íntron 2 do gene *Mon2* (localizado no

cromossomo 7 em ratos) que é um pseudogene de *Snurf-Snrpn* no genoma de ratos, confirmado por sequenciamento.

Não é possível afirmar que a expressão do GH foi afetada pela ausência de atividade gênica na região da SPW, visto que duas sublinhagens SPW-KO apresentam a menor e a segunda maior expressão de *Gh1* (s57 e s106, respectivamente) dentre todas as condições analisadas por PCR digital (Figura 28). É possível que, de fato, os genes da região crítica da SPW não tenham influência na expressão do GH, porém ainda resta avaliar o estado da tradução e da secreção do GH nas sublinhagens SPW-KO, que serão estudados na sequência deste trabalho. Outra hipótese que pode explicar os resultados conflitantes de expressão de *Gh1*, como explicado anteriormente, é que a expressão e a secreção do GH ocorrem de forma pulsátil e em ritmo circadiano, com picos de produção. Vale ressaltar que os RNAs foram extraídos logo que as colônias apresentaram confluência e número de células suficientes, em momentos diferentes para cada sublinhagem. Para testar esta última hipótese, nós iremos sincronizar as sublinhagens SPW-KO através de inanição nutricional pela redução dos níveis de soro do meio de cultura para induzir expressão circadiana e pulsátil. Além disso, iremos testá-las em condição basal e sob efeito de indutores do GH (como benzeno, CXCL12/SDF1 e/ou dibutiril-AMPc) (Barbieri et al. 2007, Lee et al. 2008, Zhou et al. 2015, Fortunati et al. 2017, Zunino et al. 2019).

Os dados desta tese irão gerar outros desdobramentos, além dos testes citados acima para confirmar o real estado de expressão de *Gh1* frente à ausência de expressão gênica na região crítica da SPW nas sublinhagens SPW-KO. Dentre outras perspectivas futuras de comparação das sublinhagens SPW-KO *versus* MAT-KO estão a análise do transcriptoma (RNA-Seq), a avaliação a nível proteico de GH e prolactina (*Western blot* e proteômica), os estudos de secreção hormonal para GH e prolactina, e uma análise de bioinformática para investigar os possíveis alvos de *SNORD107*, baseado no pareamento de bases conservado evolutivamente. Em caso de confirmação desta última hipótese, iremos realizar mais estudos funcionais nos possíveis alvos de *SNORD107* relacionados à produção do GH.

6. Conclusões

- A linhagem celular GH3 apresentou trissomia para a região genômica 1q22, associada à SPW por ortologia em humanos, sendo necessários dois eventos de deleção de 3,2 Mb para obter o genótipo da SPW *in vitro*
- Nove sublinhagens apresentaram a deleção de 3,2 Mb esperada. A triagem por edições genômicas demonstrou que os eventos de deleções e inversões ocorreram com frequências similares (14,17% e 17,88%, respectivamente).
- Foram gerados quatro sublinhagens SPW-KO, com deleções envolvendo toda a região da SPW. Estes modelos ajudarão na compreensão da relação entre os genes da SPW e a regulação do GH, além de novas pesquisas *in vitro* sobre esta síndrome.
- A análise do estado de metilação do alelo da SPW por MS-HRM foi capaz de distinguir claramente sua origem parental nas nove sublinhagens.
- A atividade *off-target* foi de apenas 5,73% nos 16 alvos avaliados por sequenciamento Sanger.
- O sistema de reparo de DNA após ação do sistema CRISPR-Cas9 mostrou imprevisibilidade, incorporando sequências de diversas regiões genômicas do organismo alvo de edição e, até mesmo, sequências de DNA exógeno.
- A análise do DNA na região proximal da SPW exibiu sequências que podem ser o marco inicial do *imprinting* genômico nesta região, assim como ocorre próximo a *UBE3A* em humanos na porção distal da região ortóloga.
- Postulamos o gene *SNORD107* como o principal candidato dentro da região da SPW a regular o GH, formando um complexo ribonucleoprotéico com função regulatória pós-transcricional deste hormônio.
- Os modelos SPW-KO exibiram completo silenciamento gênico dentro da região crítica da SPW, porém não foi possível afirmar que a expressão do GH foi afetada, sendo ainda necessários testes suplementares.

Referências bibliográficas

- Adikusuma F, Piltz S, Corbett MA, Turvey M, McColl SR, Helbig KJ, Beard MR, Hughes J, Pomerantz RT, Thomas PQ 2018. Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature* 560: E8–E9.
- Angulo MA, Butler MG, Cataletto ME 2015. Prader-Willi syndrome: A review of clinical, genetic, and endocrine findings. *J. Endocrinol. Invest.* 38: 1249–1263.
- Aycan Z, Nijat Baş V 2014. Prader-Willi Syndrome and Growth Hormone Deficiency. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 6: 62–67.
- Bae S, Park J, Kim J-S 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30: 1473–1475.
- Barbieri F, Bajetto A, Porcille C, Pattarozzi A, Schettini G, Florio T 2007. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. *J. Mol. Endocrinol.* 38: 383–389.
- Barman A, Deb B, Chakraborty S 2019. A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Curr. Genet.*
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P 2007. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-.)*. 315: 1709–1712.
- Bartke A, List EO, Kopchick JJ 2016. The somatotrophic axis and aging: Benefits of endocrine defects. *Growth Horm. IGF Res.* 27: 41–45.
- Berini J, Spica Russotto V, Castelnuovo P, Candia S Di, Gargantini L, Grugni G, Iughetti L, Nespoli L, Nosetti L, Padoan G, Pilotta A, Trifirò G, Chiumello G, Salvatoni A 2013. Growth Hormone Therapy and Respiratory Disorders: Long-Term Follow-up in PWS Children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: E1516–E1523.
- Beygo J, Buiting K, Ramsden SC, Ellis R, Clayton-Smith J, Kanber D 2019. Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* 15.
- Bieth E, Eddiry S, Gaston V, Lorenzini F, Buffet A, Conte Auriol F, Molinas C, Cailley D, Rooryck C, Arveiler B, Cavallé J, Salles JP, Tauber M 2015.

- Highly restricted deletion of the SNORD116 region is implicated in Prader–Willi Syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 23: 252–255.
- Birling M-C, Schaeffer L, André P, Lindner L, Maréchal D, Ayadi A, Sorg T, Pavlovic G, Héroult Y 2017. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci. Rep.* 7: 43331.
- Bittel DC, Butler MG 2005. Prader-Willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev. Mol. Med.* 7: 1–20.
- Bittel DC, Kibiryeveva N, Butler MG 2007. Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Analysis of Subjects with Chromosome 15 Abnormalities. *Genet. Test.* 11: 467–476.
- Boch J, Bonas U 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 419–436.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science (80-.)*. 326: 1509–1512.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151: 2551–2561.
- Botezatu A, Puiu M, Cucu N, Diaconu CC, Badiu C, Arsene C, Iancu I V., Plesa A, Anton G 2016. Comparative molecular approaches in Prader-Willi syndrome diagnosis. *Gene* 575: 353–358.
- Brambilla P, Crinò A, Bedogni G, Bosio L, Cappa M, Corrias A, Delvecchio M, Candia S Di, Gargantini L, Grechi E, Iughetti L, Mussa A, Ragusa L, Sacco M, Salvatoni A, Chiumello G, Grugni G 2011. Metabolic syndrome in children with Prader-Willi syndrome: The effect of obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 21: 269–276.
- Buiting K 2010. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 154: 365–376.
- Bürger J, Horn D, Tönnies H, Neitzel H, Reis A 2002. Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 111: 233–237.
- Butler MG 2009. Genomic imprinting disorders in humans: A mini-review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26: 477–486.

- Butler MG 2011. Prader-Willi Syndrome: Obesity due to Genomic Imprinting. *Curr. Genomics* 12: 204–215.
- Butler MG, Bittel DC, Kibiryeve N, Talebizadeh Z, Thompson T 2004. Behavioral Differences Among Subjects With Prader-Willi Syndrome and Type I or Type II Deletion and Maternal Disomy. *Pediatrics* 113: 565–573.
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG, Opitz JM, Reynolds JF 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 23: 793–809.
- Butler MG, Sturich J, Myers SE, Gold JA, Kimonis V, Driscoll DJ 2009. Is gestation in Prader-Willi syndrome affected by the genetic subtype? *J. Assist. Reprod. Genet.* 26: 461–466.
- Butler MG, Wang K, Marshall JD, Naggert JK, Rethmeyer JA, Gunewardena SS, Manzardo AM 2015. Coding and noncoding expression patterns associated with rare obesity-related disorders: Prader-Willi and Alstrom syndromes. *Adv. Genomics Genet.* 2015: 53–75.
- Butler J V, Whittington JE, Holland AJ, Boer H, Clarke D, Webb T 2002. Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: A population-based study. *Dev. Med. Child Neurol.* 44: 248–255.
- Cao Y, AlHumaidi SS, Faqeih EA, Pitel BA, Lundquist P, Aypar U 2017. A novel deletion of SNURF/SNRPN exon 1 in a patient with Prader-Willi-like phenotype. *Eur. J. Med. Genet.* 60: 416–420.
- Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Eickhoff J, Allen DB 2010. Long-Term Growth Hormone Therapy Changes the Natural History of Body Composition and Motor Function in Children with Prader-Willi Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 1131–1136.
- Cassidy SB, Driscoll DJ 2009. Prader-Willi syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 3–13.
- Cassidy SB, Forsythe M, Heeger S, Nicholls RD, Schork N, Benn P, Schwartz S 1997. Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am. J. Med. Genet.* 68: 433–440.
- Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ 2012. Prader-Willi syndrome.

- Genet. Med.* 14: 10–26.
- Castle JC, Armour CD, Löwer M, Haynor D, Biery M, Bouzek H, Chen R, Jackson S, Johnson JM, Rohl CA, Raymond CK 2010. Digital Genome-Wide ncRNA Expression, Including SnoRNAs, across 11 Human Tissues Using PolyA-Neutral Amplification (C Creighton, Ed.). *PLoS One* 5: e11779.
- Cathomen T, Keith Joung J 2008. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Mol. Ther.* 16: 1200–1207.
- Cavaillé J 2017. Box C/D small nucleolar RNA genes and the Prader-Willi syndrome: a complex interplay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 8.
- Cavaillé J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Hüttenhofer A 2000. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 14311–14316.
- Chamberlain SJ, Chen P-F, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M 2010. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader–Willi syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 17668–17673.
- Chamberlain SJ, Lalande M 2010. Neurobiology of Disease Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11 – q13. *Neurobiol. Dis.* 39: 13–20.
- Cheon CK 2016. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 21: 126–135.
- Cheung LYM, George AS, McGee SR, Daly AZ, Brinkmeier ML, Ellsworth BS, Camper SA 2018. Single-cell RNA sequencing reveals novel markers of male pituitary stem cells and hormone-producing cell-types. *Endocrinology.*
- Chicaybam L, Barcelos C, Peixoto B, Carneiro M, Limia CG, Redondo P, Lira C, Paraguassú-Braga F, Vasconcelos ZFM De, Barros L, Bonamino MH 2017. An Efficient Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4.
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH 1995. Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman

- syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 40–48.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80-.). 339: 819–823.
- Copet P, Jauregi J, Laurier V, Ehlinger V, Arnaud C, Cobo AM, Molinas C, Tauber M, Thuilleaux D 2010. Cognitive profile in a large french cohort of adults with Prader-Willi syndrome: Differences between genotypes. *J. Intellect. Disabil. Res.* 54: 204–215.
- Cornu TI, Mussolino C, Cathomen T 2017. Refining strategies to translate genome editing to the clinic. *Nat. Med.* 23: 415–423.
- Costa RA, Ferreira IR, Cintra HA, Gomes LHF, Guida L da C 2019. Genotype-Phenotype Relationships and Endocrine Findings in Prader-Willi Syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10.
- Coulson RL, Yasui DH, Dunaway KW, Laufer BI, Vogel Ciernia A, Zhu Y, Mordaunt CE, Totah TS, LaSalle JM 2018. Snord116-dependent diurnal rhythm of DNA methylation in mouse cortex. *Nat. Commun.* 9: 1616.
- Crinò A, Fintini D, Bocchini S, Grugni G 2018. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy Dovepress Obesity management in Prader-willi syndrome: current perspectives. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 11: 579–593.
- Cullot G, Boutin J, Toutain J, Prat F, Pennamen P, Rooryck C, Teichmann M, Rousseau E, Lamrissi-Garcia I, Guyonnet-Duperat V, Bibeyran A, Lalanne M, Prouzet-Mauléon V, Turcq B, Ged C, Blouin J-M, Richard E, Dabernat S, Moreau-Gaudry F, Bedel A 2019. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat. Commun.* 10: 1136.
- Dattani MT, Malhotra N 2019. A review of growth hormone deficiency. *Paediatr. Child Heal. (United Kingdom)* 29: 285–292.
- Davis SW, Ellsworth BS, Pérez Millan MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Camper SA 2013. *Pituitary Gland Development and Disease: From Stem Cell to Hormone Production*.
- Deal CL, Tony M, Höybye C, Allen DB, Tauber M, Christiansen JS, Ambler GR, Battista R, Beauloye V, Berall G, Biller BMK, Butler MG, Cassidy SB,

- Chihara K, Cohen P, Craig M, Farholt S, Goetghebeur M, Goldstone AP, Gregg T, Grugni G, Hokken-Koelega AC, Johannsson G, Johnson K, Kemper A, Kopchick JJ, Malozowski S, Miller J, Mogul HR, Muscatelli F, Nergårdh R, Nicholls RD, Radovick S, Rosenthal MS, Sipilä I, Tarride J-E, Vogels A, Waters MJ 2013. Growth Hormone Research Society Workshop Summary: Consensus Guidelines for Recombinant Human Growth Hormone Therapy in Prader-Willi Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98: E1072–E1087.
- DeFrancesco L 2012. Move over ZFNs. *Nat. Biotechnol.* 30: 112–112.
- Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ 2018. The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9.
- Deocesano-Pereira C, Machado R, Jesus-Ferreira H de, Marchini T, Pereira T, Carreira A, Sogayar M 2019. Functional impact of the long non-coding RNA MEG3 deletion by CRISPR/Cas9 in the human triple negative metastatic Hs578T cancer cell line. *Oncol. Lett.*
- DeVore SB, Young CH, Li G, Sundararajan A, Ramaraj T, Mudge J, Schilkey F, Muth A, Thompson PR, Cherrington BD 2018. Histone Citrullination Represses MicroRNA Expression, Resulting in Increased Oncogene mRNAs in Somatolactotrope Cells. *Mol. Cell. Biol.* 38.
- Diene G, Mimoun E, Feigerlova E, Caula S, Molinas C, Grandjean H, Tauber M 2010. Endocrine Disorders in Children with Prader-Willi Syndrome – Data from 142 Children of the French Database. *Horm. Res. Paediatr.* 74: 121–128.
- Ding F, Li HH, Zhang S, Solomon NM, Camper SA, Cohen P, Francke U 2008. SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* 3.
- Ding F, Prints Y, Dhar MS, Johnson DK, Garnacho-Montero C, Nicholls RD, Francke U 2005. Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mamm. Genome* 16: 424–431.
- DiVall SA, Radovick S 2013. Growth Hormone and Treatment Controversy; Long-Term Safety of rGH. *Curr. Pediatr. Rep.* 1: 128–132.

- Dong Y, Li H, Zhao L, Koopman P, Zhang F, Huang JX 2019. Genome-Wide Off-Target Analysis in CRISPR-Cas9 Modified Mice and Their Offspring. *Genes/Genomes/Genetics* 9: 3645–3651.
- Doudna JA, Charpentier E 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.)*. 346: 1258096–1258096.
- Driscoll DJ, Miller JL, Schwartz S, Cassidy SB 2017. Prader-Willi Syndrome. In: MP A, HH A, RA P, SE W, LJH B, HC M, K S, A A, N L (Eds.), *GeneReviews*, University of Washington, pp. 1–38.
- Duker AL, Ballif BC, Bawle E V, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T 2010. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader–Willi syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 18: 1196–1201.
- Duncan JF, Peenen PFD Van 1971. Karyotypes of Ten Rats (Rodentia: Muridae) from Southeast Asia. *Caryologia* 24: 331–346.
- Dunn HG 1968. The Prader-Labhart-Willi syndrome: review of the literature and report of nine cases. *Acta Paediatr. Scand.* 186: Suppl 186:1+.
- Dykens EM, Roof E, Hunt-Hawkins H 2017. Cognitive and adaptive advantages of growth hormone treatment in children with Prader-Willi syndrome. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 58: 64–74.
- Eiholzer U 2005. Deaths in Children with Prader-Willi Syndrome. *Horm. Res. Paediatr.* 63: 33–39.
- Einfeld SL, Kavanagh SJ, Smith A, Evans EJ, Tonge BJ, Taffe J 2006. Mortality in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 111: 193–198.
- Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp B V, Kralovics R, Brummelkamp TR, Nijman SMB, Bürckstümmer T 2014. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* 24: 2059–2065.
- Fernández A, Josa S, Montoliu L 2017. A history of genome editing in mammals. *Mamm. Genome* 28: 237–246.
- Ferreira IR, Cunha WD dos S, Gomes LHF, Cintra HA, Fonseca LLCG, Bastos E, Llerena JC, Vasconcelos ZFM de, Guida L da C 2019. A rapid and accurate methylation-sensitive high-resolution melting analysis assay for

- the diagnosis of Prader Willi and Angelman patients. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7: 1–10.
- Flori E, Biancalana V, Girard-Lemaire F, Favre R, Flori J, Doray B, Mandel JL 2004. Difficulties of genetic counselling and prenatal diagnosis in a consanguineous couple segregating for the same translocation (14;15) (q11;q13) and at risk for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 181–186.
- Formosa R, Xuereb-Anastasi A, Vassallo J 2013. Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr. Relat. Cancer* 20: 495–505.
- Fortunati N, Guaraldi F, Zunino V, Penner F, D'Angelo V, Zenga F, Pecori Giraldi F, Catalano MG, Arvat E 2017. Effects of environmental pollutants on signaling pathways in rat pituitary GH3 adenoma cells. *Environ. Res.* 158: 660–668.
- Galiveti CR, Raabe C a, Konthur Z, Rozhdestvensky TS 2014. Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader-Willi Syndrome locus. *Sci. Rep.* 4: 6445.
- Galiveti CR, Raabe CA, Konthur Z, Rozhdestvensky TS 2015. Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader-Willi Syndrome locus. *Sci. Rep.* 4: 6445.
- Geuns E 2003. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2873–2879.
- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Jeffrey C, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R 2010. Knockout Rats Produced Using Designed Zinc Finger Nucleases. *Science (80-.)*. 325: 2009–2011.
- Gillett E, Perez I 2016. Disorders of Sleep and Ventilatory Control in Prader-Willi Syndrome. *Diseases* 4: 23.
- Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, Nicholls RD 1997. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 321–332.

- Glenn CC, Saitoh S, Jong MTC, Filbrandt MM, Surti U, Driscoll DJ, Nicholls RD 1996. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 335–346.
- Grimberg A, Allen DB 2017. Growth hormone treatment for growth hormone deficiency and idiopathic short stature: New guidelines shaped by the presence and absence of evidence. *Curr. Opin. Pediatr.* 29: 466–471.
- Grugni G, Sartorio A, Crinò A 2016. Growth hormone therapy for Prader–Willi syndrome: Challenges and solutions. *Ther. Clin. Risk Manag.* 12: 873–881.
- Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O’Riordan MA, Cassidy SB 2001. The Changing Purpose of Prader-Willi Syndrome Clinical Diagnostic Criteria and Proposed Revised Criteria. *Pediatrics* 108: e92–e92.
- Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud JB, Schneider-Maunoury S, Shkumatava A, Teboul L, Kent J, Joly JS, Concordet JP 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17: 1–12.
- Hartin SN, Hossain WA, Francis D, Godler DE, Barkataki S, Butler MG 2019. Analysis of the Prader–Willi syndrome imprinting center using droplet digital PCR and next-generation whole-exome sequencing. *Mol. Genet. Genomic Med.* 7: 1–10.
- Hartley SL, MacLean WE, Butler MG, Zarccone J, Thompson T 2005. Maladaptive behaviors and risk factors among the genetic subtypes of Prader-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* 136A: 140–145.
- Hawkey CJ, Smithies A 1976. The Prader-Willi syndrome with a 15/15 translocation. Case report and review of the literature. *J. Med. Genet.* 13: 152–157.
- Heksch R, Kamboj M, Anglin K, Obrynba K 2017. Review of Prader-Willi syndrome: the endocrine approach. *Transl. Pediatr.* 6: 274–285.
- Henkhaus RS, Kim S-J, Kimonis VE, Gold J-A, Dykens EM, Driscoll DJ, Butler MG 2011. Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Identification of Deletion Genetic Subtypes in Prader-Willi Syndrome. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 16: 178–186.
- Hilmi K, Jangal M, Marques M, Zhao T, Saad A, Zhang C, Luo VM, Syme A,

- Rejon C, Yu Z, Krum A, Fabian MR, Richard S, Alaoui-Jamali M, Orthwein A, McCaffrey L, Witcher M 2017. CTCF facilitates DNA double-strand break repair by enhancing homologous recombination repair. *Sci. Adv.* 3: e1601898.
- Hnisz D, Day DS, Young RA 2016. Insulated Neighborhoods: Structural and Functional Units of Mammalian Gene Control. *Cell* 167: 1188–1200.
- Høybye C 2007. Five-years growth hormone (GH) treatment in adults with Prader-Willi syndrome. *Acta Paediatr.* 96: 410–413.
- Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B 2013. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 140: 4982–4987.
- Hsiao JS, Germain ND, Wilderman A, Stoddard C, Wojenski LA, Villafano GJ, Core L, Cotney J, Chamberlain SJ 2019. A bipartite boundary element restricts UBE3A imprinting to mature neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116: 2181–2186.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31: 827–832.
- Hull KL, Harvey S 2014. Growth Hormone and Reproduction: A Review of Endocrine and Autocrine/Paracrine Interactions. *Int. J. Endocrinol.* 2014.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169: 5429–5433.
- Jauregi J, Arias C, Vegas O, Alén F, Martínez S, Copet P, Thuilleaux D 2007. A neuropsychological assessment of frontal cognitive functions in Prader-Willi syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 51: 350–365.
- Jiang F, Doudna JA 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 30: 100–111.
- Jiang F, Doudna JA 2017. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu.Rev.Biophys* 46: 505–529.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu J-L, Zhang

- F, Gao C 2019. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* (80-.): eaaw7166.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-.). 337: 816–821.
- Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K 2009. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader–Willi syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 582–590.
- Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG 2016. Mechanisms of obesity in Prader-Willi syndrome. *Pediatr. Obes.*: 1–11.
- Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, Kim S, Lee C, Jeong E, Chung E, Kim D, Lee MS, Go EM, Song HJ, Kim H, Cho N, Bang D, Kim S, Kim J-S 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* 31: 251–258.
- Kim MS, Lee D-Y 2015. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins axis in diabetes mellitus. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 20: 69.
- Kim S-J, Miller JL, Kuipers PJ, German JR, Beaudet AL, Sahoo T, Driscoll DJ 2012. Unique and atypical deletions in Prader–Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* 20: 283–290.
- Kishore S, Stamm S 2006. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 311: 230–232.
- Koonin E V, Makarova KS, Zhang F 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 37: 67–78.
- Korablev AN, Serova IA, Serov OL 2017. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the Contactin-6 gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. *BMC Genet.* 18: 112.
- Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL 1997. Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am. J. Med. Genet.* 73: 308–313.
- Koufaris C, Alexandrou A, Papaevripidou I, Alexandrou I, Christophidou-Anastasiadou V, Sismani C 2016. Deletion of SNURF/SNRPN U1B and U1B* upstream exons in a child with developmental delay and excessive

- weight. *J. Genet.* 95: 621–624.
- Kovacs M, Schally A, Varga J, Zarandi M 2008. Endocrine and Antineoplastic Actions of Growth Hormone-Releasing Hormone Antagonists. *Curr. Med. Chem.* 15: 314–321.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
- Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 10684–10689.
- Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA 1999. Prader-Willi Syndrome Is Caused by Disruption of the SNRPN Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 70–76.
- Lee Y, Kim JM, Lee EJ 2008. Functional expression of CXCR4 in somatotrophs: CXCL12 activates GH gene, GH production and secretion, and cellular proliferation. *J. Endocrinol.* 199: 191–199.
- Letelier J, la Calle-Mustienes E de, Pieretti J, Naranjo S, Maeso I, Nakamura T, Pascual-Anaya J, Shubin NH, Schneider I, Martinez-Morales JR, Gómez-Skarmeta JL 2018. A conserved Shh cis-regulatory module highlights a common developmental origin of unpaired and paired fins. *Nat. Genet.* 50: 504–509.
- Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, Malani N, Anguela XM, Sharma R, Ivanciu L, Murphy SL, Finn JD, Khazi FR, Zhou S, Paschon DE, Rebar EJ, Bushman FD, Gregory PD, Holmes MC, High K a 2011. In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 475: 217–221.
- Li J, Shou J, Guo Y, Tang Y, Wu Y, Jia Z, Zhai Y, Chen Z, Xu Q, Wu Q 2015. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. *J. Mol. Cell Biol.* 7: 284–298.
- Liang J, Wen J, Huang Z, Chen X, Zhang B, Chu L 2019. Small Nucleolar

- RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Front. Oncol.* 9.
- Lin J, Wong K-C 2018. Off-target predictions in CRISPR-Cas9 gene editing using deep learning. *Bioinformatics* 34: i656–i663.
- Lindgren AC 2006. Somatropin therapy for children with Prader-Willi syndrome: Guidelines for use. *Treat. Endocrinol.* 5: 223–228.
- Liu F, Wu D, Wang X 2019. Roles of CTCF in conformation and functions of chromosome. *Semin. Cell Dev. Biol.* 90: 168–173.
- Lu M, Flanagan JU, Langley RJ, Hay MP, Perry JK 2019. Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. *Signal Transduct. Target. Ther.* 4: 1–11.
- Maier DA, Brennan AL, Jiang S, Binder-Scholl GK, Lee G, Plesa G, Zheng Z, Cotte J, Carpenito C, Wood T, Spratt SK, Ando D, Gregory P, Holmes MC, Perez EE, Riley JL, Carroll RG, June CH, Levine BL 2013. Efficient Clinical Scale Gene Modification via Zinc Finger Nuclease–Targeted Disruption of the HIV Co-receptor CCR5. *Hum. Gene Ther.* 24: 245–258.
- Makarova KS, Aravind L, Grishin N V, Rogozin IB, Koonin E V 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* 30: 482–496.
- Makarova KS, Grishin N V, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 1: 7.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, Oost J van der, Backofen R, Koonin E V. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 722–736.
- Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S 2019. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci.* 24: 1102–1125.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463: 568–571.
- Martin F, Sánchez-Hernández S, Gutiérrez-Guerrero A, Pinedo-Gomez J,

- Benabdellah K 2016. Biased and Unbiased Methods for the Detection of Off-Target Cleavage by CRISPR/Cas9: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1507.
- Martins-Taylor K, Hsiao JS, Chen P-F, Glatt-Deeley H, Smith AJ De, Blakemore AIF, Lalande M, Chamberlain SJ 2014. Imprinted expression of UBE3A in non-neuronal cells from a Prader–Willi syndrome patient with an atypical deletion. *Hum. Mol. Genet.* 23: 2364–2373.
- Meyer M, Angelis MH de, Wurst W, Kuhn R 2010. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 15022–15026.
- Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC, Goldstone AP, Gold JA, Kimonis V, Dykens E, Butler MG, Shuster JJ, Driscoll DJ 2011a. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* 155: 1040–1049.
- Miller J, Silverstein J, Shuster J, Driscoll DJ, Wagner M 2006. Short-Term Effects of Growth Hormone on Sleep Abnormalities in Prader-Willi Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91: 413–417.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ 2011b. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* 29: 143–148.
- Mogul HR, Lee PDK, Whitman BY, Zipf WB, Frey M, Myers S, Cahan M, Pinyerd B, Louis Southren A 2008. Growth hormone treatment of adults with Prader-Willi syndrome and growth hormone deficiency improves lean body mass, fractional body fat, and serum triiodothyronine without glucose impairment: Results from the United States multicenter trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 1238–1245.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36: 244–246.
- Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Vance ML 2011. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 1587–

- 1609.
- Moon S Bin, Kim DY, Ko JH, Kim YS 2019. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Exp. Mol. Med.* 51: 130.
- Moscou M, Bogdanove A 2009. Recognition by TAL Effectors. *Science* 326: 1501.
- Murrell A, Heeson S, Reik W 2004. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat. Genet.* 36: 889–893.
- Muscogiuri G, Formoso G, Pugliese G, Ruggeri RM, Scarano E, Colao A 2019. Prader- Willi syndrome: An update on endocrine and metabolic complications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 20: 239–250.
- Mushtaq M, Sakina A, Wani SH, Shikari AB, Tripathi P, Zaid A, Galla A, Abdelrahman M, Sharma M, Singh AK, Salgotra RK 2019. Harnessing Genome Editing Techniques to Engineer Disease Resistance in Plants. *Front. Plant Sci.* 10.
- Mussolino C, Alzubi J, Pennucci V, Turchiano G, Cathomen T 2017. Genome and epigenome editing to treat disorders of the hematopoietic system. *Hum. Gene Ther.* 28: hum.2017.149.
- Nagai T, Obata K, Tonoki H, Temma S, Murakami N, Katada Y, Yoshino A, Sakazume S, Takahashi E, Sakuta R, Niikawa N 2005. Cause of sudden, unexpected death of Prader-Willi syndrome patients with or without growth hormone treatment. *Am. J. Med. Genet. Part A* 136A: 45–48.
- Nicholls RD, Knepper JL 2001. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 153–175.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M 1989a. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342: 281–285.
- Nicholls R, Knoll J, Glatt K, Hersh J, Brewster T, Graham JMJ, Wurster-Hill D, Wharton R, Latt S 1989b. Restriction fragment length polymorphisms within proximal 15q and their use in molecular cytogenetics and the Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 33: 66–77.
- Ohlsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson J-

- O, Svensson J 2009. The Role of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocr. Rev.* 30: 494–535.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD 1999. Imprinting-Mutation Mechanisms in Prader-Willi Syndrome. : 397–413.
- Olarescu NC, Gunawardane K, Hansen TK, Møller N, Jørgensen JOL 2019. *Normal Physiology of Growth Hormone in Adults* (K Feingold, B Anawalt, A Boyce, and E Al., Eds.). South Dartmouth (MA).
- Özçelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U 1992. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader–Willi syndrome critical region. *Nat. Genet.* 2: 265–269.
- Peel MT, Ho Y, Liebhaber SA 2018. Transcriptome analyses of female somatotropes and lactotropes reveal novel regulators of cell identity in the pituitary. *Endocrinology*.
- Petersen B 2017. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod. Domest. Anim.* 52: 4–13.
- Pickar-Oliver A, Gersbach CA 2019. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 490–507.
- Prader A, Labhart A, Willi H 1956. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 86: 1260–1261.
- Qi Y, Purtell L, Fu M, Lee NJ, Aepler J, Zhang L, Loh K, Enriquez RF, Baldock PA, Zolotukhin S, Campbell L V., Herzog H 2016. Snord116 is critical in the regulation of food intake and body weight. *Sci. Rep.* 6: 18614.
- Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, Li H, Jiang K, Gao P, Ma D, Chen Y, An X, Li K, Cui W 2015. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscléd phenotype in Meishan pigs. *Sci. Rep.* 5: 14435.
- Radecke S, Radecke F, Cathomen T, Schwarz K 2010. Zinc-finger Nuclease-induced Gene Repair With Oligodeoxynucleotides: Wanted and Unwanted Target Locus Modifications. *Mol. Ther.* 18: 743–753.
- Rajpathak SN, Gunter MJ, Wylie-Rosett J, Ho GYF, Kaplan RC, Muzumdar R,

- Rohan TE, Strickler HD 2009. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 25: 3–12.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8: 2281–2308.
- Ranke MB, Wit JM 2018. Growth hormone-past, present and future. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14: 285–300.
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117: 119–128.
- Renaville R, Hammadi M, Portetelle D 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 351–360.
- Renes JS, Doorn J Van, Hokken-Koelega ACS 2019. Current Insights into the Role of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor System in Short Children Born Small for Gestational Age. *Horm. Res. Paediatr.*
- Richer LP, Shevell MI, Miller SP 2001. Diagnostic profile of neonatal hypotonia: An 11-year study. *Pediatr. Neurol.* 25: 32–37.
- Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Pefiaherrera M, Michaelis RC, Abeliovich D, Schinzel AA 1998. The mechanisms involved in formation of deletions. : 130–136.
- Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ, Yang TP 2005. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res.* 33: 4740–4753.
- Rozhdestvensky TS, Robeck T, Galiveti CR, Raabe CA, Seeger B, Wolters A, Gubar L V., Brosius J, Skryabin B V. 2016. Maternal transcription of non-protein coding RNAs from the PWS-critical region rescues growth retardation in mice. *Sci. Rep.* 6: 20398.
- Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K 2005. Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum. Genet.* 116: 228–230.
- Sacco M, Giorgio G Di 2005. Sudden Death in Prader-Willi Syndrome during Growth Hormone Therapy. *Horm. Res. Paediatr.* 63: 29–32.
- Sahoo T, Gaudio D del, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL 2008. Prader-Willi phenotype caused

- by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat. Genet.* 40: 719–721.
- Santoro SL, Hashimoto S, McKinney A, Mihalic Mosher T, Pyatt R, Reshmi SC, Astbury C, Hickey SE 2017. Assessing the Clinical Utility of SNP Microarray for Prader-Willi Syndrome due to Uniparental Disomy. *Cytogenet. Genome Res.* 152: 105–109.
- Saretzki G 2018. Telomeres, Telomerase and Ageing. In:., pp. 221–308.
- Savage MO, Hwa V, David A, Rosenfeld RG, Metherell LA 2011. Genetic defects in the growth hormone-IGF-I axis causing growth hormone insensitivity and impaired linear growth. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2: 1–12.
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin E V. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15: 169–182.
- Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479: 74–79.
- Siemensma EPC, Tummers-de Lind van Wijngaarden RFA, Festen DAM, Troeman ZCE, Alfen-van der Velden AAEM (Janielle) van, Otten BJ, Rotteveel J, Odink RJH, Bindels-de Heus GCB (Karen), Leeuwen M van, Haring DAJP, Oostdijk W, Bocca G, Mieke Houdijk ECA, Trotsenburg ASP van, Hoorweg-Nijman JJG, Wieringen H van, Vreuls RCFM, Jira PE, Schroor EJ, Pinxteren-Nagler E van, Willem Pilon J, Lunshof L (Bert), Hokken-Koelega ACS 2012. Beneficial Effects of Growth Hormone Treatment on Cognition in Children with Prader-Willi Syndrome: A Randomized Controlled Trial and Longitudinal Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 2307–2314.
- Skryabin B V., Gubar L V., Seeger B, Pfeiffer J, Handel S, Robeck T, Karpova E, Rozhdestvensky TS, Brosius J 2007. Deletion of the MBII-85 snoRNA Gene Cluster in Mice Results in Postnatal Growth Retardation. *PLoS Genet.* 3: e235.

- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D 2000. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 28: 3361–3369.
- Smith AJ de, Purmann C, Walters RG, Ellis RJ, Holder SE, Haelst MM Van, Brady AF, Fairbrother UL, Dattani M, Keogh JM, Henning E, Yeo GSH, O’Rahilly S, Froguel P, Farooqi IS, Blakemore AIF 2009. A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum. Mol. Genet.* 18: 3257–3265.
- Smith A, Hung D 2017. The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Transl. Pediatr.* 5: 46–56.
- Smith A, Lindeman R, Volpato F, Kearney A, White S, Haan E, Trent RJ 1991. A de novo unbalanced reciprocal translocation identified as paternal in origin in the Prader-Willi syndrome. *Hum. Genet.* 86.
- Song S-H, Kim T-Y 2017. CTCF, Cohesin, and Chromatin in Human Cancer. *Genomics Inform.* 15: 114–122.
- Sonnenschein C, Richardson UI, Tashjian AH 1970. Chromosomal analysis, organ-specific function and appearance of six clonal strains of rat pituitary tumor cells. *Exp. Cell Res.* 61: 121–128.
- Stankiewicz P, Khan TN, Szafranski P, Slattery L, Streff H, Vetrini F, Bernstein JA, Brown CW, Rosenfeld JA, Rednam S, Scollon S, Bergstrom KL, Parsons DW, Plon SE, Vieira MW, Quaio CRDC, Baratela WAR, Acosta Guio JC, Armstrong R, Mehta SG, Rump P, Pfundt R, Lewandowski R, Fernandes EM, Shinde DN, Tang S, Hoyer J, Zweier C, Reis A, Bacino CA, Xiao R, Breman AM, Smith JL, Katsanis N, Bostwick B, Popp B, Davis EE, Yang Y 2017. Haploinsufficiency of the Chromatin Remodeler BPTF Causes Syndromic Developmental and Speech Delay, Postnatal Microcephaly, and Dysmorphic Features. *Am. J. Hum. Genet.* 101: 503–515.
- Stefan M, Ji H, Simmons RA, Cummings DE, Ahima RS, Friedman MI, Nicholls RD 2005. Hormonal and Metabolic Defects in a Prader-Willi Syndrome Mouse Model with Neonatal Failure to Thrive. *Endocrinology* 146: 4377–

4385.

- Stefan M, Simmons RA, Bertera S, Trucco M, Esni F, Drain P, Nicholls RD 2011. Global deficits in development, function, and gene expression in the endocrine pancreas in a deletion mouse model of Prader-Willi syndrome. *Am. J. Physiol. Metab.* 300: E909–E922.
- Stella S, Montoya G 2016. The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story. *BioEssays* 38: S4–S13.
- Stemmer M, Thumberger T, Sol Keyer M del, Wittbrodt J, Mateo JL 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool (S Maas, Ed.). *PLoS One* 10: e0124633.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507: 62–67.
- Tang T-H, Bachellerie J-P, Rozhdestvensky T, Bortolin M-L, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Huttenhofer A 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 7536–7541.
- Tashjian AHJ, Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML 1968. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* 82: 342–352.
- Tattersall R 1996. A History of Growth Hormone. *Horm. Res.* 46: 236–247.
- Tauber M, Cutfield W 2007. KIGS highlights: growth hormone treatment in Prader-Willi Syndrome. *Horm. Res.* 68 Suppl 5: 48–50.
- Tebas P, Stein D, Ww T, Frank I, Sq W, Lee G, Sk S, Rt S, Ma G, Nichol G, Mc H 2014. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 370: 901–910.
- Tsai T, Armstrong D, Beaudet AL 1999. Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat. Genet.* 22: 15–16.
- Vitali P, Royo H, Marty V, Bortolin-Cavaille M-L, Cavaille J 2010. Long nuclear-retained non-coding RNAs and allele-specific higher-order chromatin organization at imprinted snoRNA gene arrays. *J. Cell Sci.* 123: 70–83.
- Vogt K, Emerick J 2015. Growth Hormone Therapy in Adults with Prader-Willi

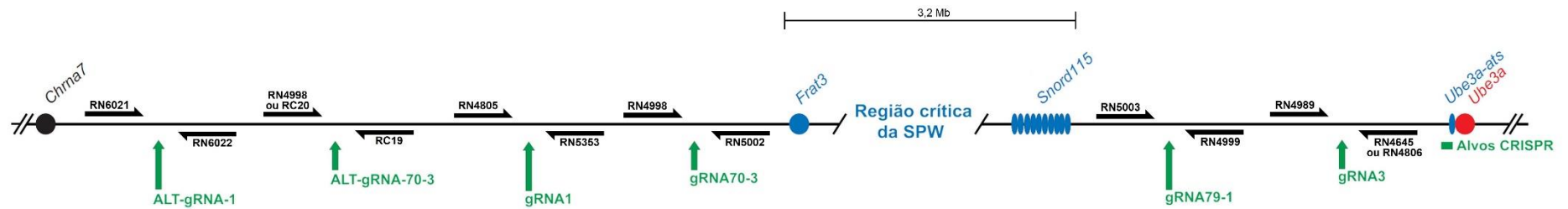
- Syndrome. *Diseases* 3: 56–67.
- Wang P, Zhou W, Yuan W, Huang L, Zhao N, Chen X 2016. Prader–Willi syndrome in neonates: twenty cases and review of the literature in Southern China. *BMC Pediatr.* 16: 124.
- Watkins NJ, Bohnsack MT 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3: 397–414.
- Wattendorf DJ, Muenke M 2005. Prader-Willi syndrome. *Am. Fam. Physician* 72: 827–830.
- Wei J, Wagner S, Lu D, Maclean P, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Laible G 2015. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Sci Rep* 5: 11735.
- Weimer PJ, Silva Cabral L Da, Cacite F 2015. Effects of ruminal dosing of Holstein cows with *Megasphaera elsdenii* on milk fat production, ruminal chemistry, and bacterial strain persistence. *J. Dairy Sci.* 98: 8078–8092.
- White HE, Hall VJ, Cross NCP 2007. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clin. Chem.* 53: 1960–1962.
- Whittington JE 2001. Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region. *J. Med. Genet.* 38: 792–798.
- Whittington JE, Butler J V, Holland AJ 2007. Changing rates of genetic subtypes of Prader-Willi syndrome in the UK. *Eur. J. Hum. Genet.* 15: 127–130.
- Whittington JE, Holland AJ, Webb T 2015. Ageing in people with Prader-Willi syndrome: Mortality in the UK population cohort and morbidity in an older sample of adults. *Psychol. Med.* 45: 615–621.
- Whittington J, Holland A, Webb T, Butler J, Clarke D, Boer H 2004. Academic underachievement by people with Prader-Willi syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 48: 188–200.
- Woelfle J, Chia DJ, Rotwein P 2003. Mechanisms of Growth Hormone (GH) Action. *J. Biol. Chem.* 278: 51261–51266.
- Wormald S, Hilton DJ 2004. Inhibitors of Cytokine Signal Transduction. *J. Biol.*

- Chem.* 279: 821–824.
- Yakar S, Pennisi P, Wu Y, Zhao H, LeRoith D 2005. Clinical Relevance of Systemic and Local IGF-I. In: *IGF-I IGF Bind. Proteins*, KARGER, Basel, pp. 11–16.
- Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC 2010. Uniparental disomy and human disease: An overview. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 154: 329–334.
- Yan Q, Zhang Q, Yang H, Zou Q, Tang C, Fan N, Lai L 2014. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen.* 3: 3:12.
- Yazdi PG, Su H, Ghimbovschi S, Fan W, Coskun PE, Nalbandian A, Knoblach S, Resnick JL, Hoffman E, Wallace DC, Kimonis VE 2013. Differential gene expression reveals mitochondrial dysfunction in an imprinting center deletion mouse model of prader-willi syndrome. *Clin. Transl. Sci.* 6: 347–355.
- Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG 2017. Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16: 387–399.
- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG 2014. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* 32: 551–553.
- Yip M-Y 2014. Uniparental disomy in Robertsonian translocations: strategies for uniparental disomy testing. *Transl. Pediatr.* 3: 98–107.
- Zhang L, Jia R, Palange NJ, Satheka AC, Togo J, An Y, Humphrey M, Ban L, Ji Y, Jin H, Feng X, Zheng Y 2015. Large Genomic Fragment Deletions and Insertions in Mouse Using CRISPR/Cas9 (V Coppola, Ed.). *PLoS One* 10: e0120396.
- Zhang Y-J, Yang J-H, Shi Q-S, Zheng L-L, Liu J, Zhou H, Zhang H, Qu L-H 2014. Rapid Birth-and-Death Evolution of Imprinted snoRNAs in the Prader-Willi Syndrome Locus: Implications for Neural Development in Euarchontoglires (R Feil, Ed.). *PLoS One* 9: e100329.
- Zhou C, Jiao Y, Wang R, Ren SG, Wawrowsky K, Melmed S 2015. STAT3 upregulation in pituitary somatotroph adenomas induces growth hormone

hypersecretion. *J. Clin. Invest.* 125: 1692–1702.

Zunino V, Catalano MG, Zenga F, Penner F, Maletta F, Valerio F, Rinella L, Arvat E, Fortunati N 2019. Benzene affects the response to octreotide treatment of growth hormone secreting pituitary adenoma cells. *Environ. Res.* 173: 489–496.

Anexo 1. Mapa gênico dos *primers* utilizados para as PCRs de caracterização das edições genômicas.



Mapa gênico dos *primers* utilizados para as PCRs de caracterização das edições genômicas. A figura apresenta a distribuição dos *primers* listados na tabela 5 pelos flancos proximal e distal da região crítica da SPW. Setas para a direita, *primers* senso. Setas para a esquerda, *primers* antissenso.