PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MODULAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO EM TRANSCRIPTOMA DE ORGANÓIDES CEREBRAIS TRATADOS COM TIENOTRIAZOLODIAZEPINA PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DE RETT

Aluna: Kelren da Silva Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Roberto H. Herai

Curitiba, julho/2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MODULAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO EM TRANSCRIPTOMA DE ORGANÓIDES CEREBRAIS TRATADOS COM TIENOTRIAZOLODIAZEPINA PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DE RETT

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Roberto H. Herai

Curitiba, julho/2023

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

R696m 2023

Rodrigues, Kelren da Silva
Modulação de splicing alternativo em transcriptoma de organóides cerebrais tratados com tienotriazolodiazepina para o estudo da síndrome de Rett / Kelren da Silva Rodrigues ; orientador: Roberto H. Herai. – 2023.
82 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2023
Bibliografia: f. 66-82

1. Síndrome de Rett. 2. Processamento alternativo. 3. Proteína 2 de ligação a metil-CpG. I. Herai, Roberto Hirochi. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD. 23. ed. – 616.8588

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PUBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFICIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **28 dias do mês de julho de 2023 às 15:00**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **"MODULAÇÃO DE SPLICING ALTERNATIVO EM TRANSCRIPTOMA DE ORGANÓIDES CEREBRAIS TRATADOS COM TIENOTRIAZOLODIAZEPINA PARA O ESTUDO DA SÍNDROME DE RETT"** apresentado por **Kelren da Silva Rodrigues** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai - Presidente	
Prof. Dr. Edson Emilio Scalabrin (PUCPR)	
Prof. Dr. Geison Eduardo Cambri (IBMP)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai — **Conceito:** Aprovado
Prof. Dr. Edson Emilio Scalabrin — **Conceito:** Aprovado
Prof. Dr. Geison Eduardo Cambri — **Conceito:** Aprovado

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

À Deus, o autor da minha vida, que me capacitou em todas as etapas desse trabalho e me deu a oportunidade de trilhar este caminho.

À minha família, em especial aos meus pais Maria Raimunda e João Carlos, pelo apoio e suporte em tudo que precisei durante minha jornada até aqui.

Ao meu orientador, Roberto H. Herai, por todas as horas de orientação que dedicou a mim e por todos os conselhos que contribuíram para a formação da pesquisadora e pessoa que sou hoje.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioinformática e Neurogenética (LaBiN) da PUCPR, em especial Luiz Petroski, Paulo Utumi, Isadora Vaz, Emerson Santos e Bruno Guerra, pelo apoio, suporte técnico e conhecimento científico fornecidos ao longo deste projeto.

Ao Laboratório de Células-Tronco da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD, USA), pela colaboração por meio da disponibilização de recursos para a execução deste trabalho.

À PUCPR, pelo espaço e estrutura cedidos para a realização deste projeto, assim como, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Coordenação de Iniciação Científica da PUCPR pela concessão de uma bolsa de Mestrado.

"Se os teus sonhos não te assustam, eles não são grandes o suficiente."

Ellen Johnson Sirleaf

A dissertação foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioinformática e Neurogenética (LaBiN) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba/PR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente dissertação.

RESUMO

RODRIGUES, Kelren da Silva. Modulação de *splicing* alternativo em transcriptoma de organóides cerebrais tratados com tienotriazolodiazepina para o estudo da Síndrome de Rett. Curitiba, 2023. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Pontifícia Universidade Católica Paraná, 2023. 83 f.

A Síndrome de Rett (RTT) é uma condição que causa distúrbios de ordem neurológica causada por mutações no gene *Methyl-CpG Binding Protein* 2 (*MECP2*), que é um importante fator epigenético na modulação da expressão gênica e na regulação do mecanismo de *splicing*. Estudos recentes relataram o uso de drogas para restaurar fenótipos neuropatológicos presentes em RTT. No entanto, ainda não se sabe se os tratamentos farmacológicos podem restabelecer a níveis normais o perfil de expressão de isoformas de *splicing*. Neste estudo, avaliamos o efeito do tratamento com JQ1, uma tienotriazolodiazepina, na alteração da expressão de isoformas de *splicing* e na expressão de genes do complexo do spliceossomo em transcriptoma de organóides cerebrais contendo uma mutação patogênica no gene *MECP2* que causa a Síndrome de Rett. Para investigar as proteínas envolvidas na maquinaria do spliceossomo e suas alterações em RTT, conduzimos uma revisão abrangente da literatura e construímos um atlas curado de moléculas reguladoras do *splicing*. Além disso, criamos um mapa que descreve todas as etapas envolvidas no mecanismo de *splicing* em seres humanos. O mapeamento da expressão em células que carregam a mutação de RTT demonstrou alteração em várias isoformas de *splicing,* incluindo genes pertencentes a maquinária do spliceossomo. As alterações identificadas foram enriquecidas para vias relacionadas a edição de RNA, funções energéticas celulares, processos de transporte e organização endossomal. Curiosamente, genes com eventos de *splicing* alternativo em RTT foram enriquecidos para fenótipos de neurodegeneração e epilepsia, que são característicos da síndrome. Identificamos também que o tratamento com a droga JQ1 foi capaz de reverter alterações na expressão de isoformas de *splicing* e, consequentemente, restaurar vias metabólicas desreguladas. Além disso, apresentamos pela primeira vez evidências de que o gene *SLU7* é regulado diretamente por MECP2 e que a conexão entre sua isoforma de *splicing* alternativa e a sua localização celular em RTT pode estar ligada a vários fenótipos celulares observados na síndrome, incluindo a própria regulação do *splicing*. De forma consistente, também mapeamos novos eventos de *splicing* alternativo em RTT relacionados a genes essenciais para vias metabólicas alteradas na síndrome. Em conjunto, esses resultados reforçam a importância do mecanismo de *splicing* na regulação dos fenótipos celulares alterados na síndrome e também fornecem novas evidências que apoiam o estudo de novos fármacos para o tratamento de pacientes com RTT.

Palavras chaves: Síndrome de Rett, *Splicing* Alternativo, *Methyl-CpG-Binding Protein* 2, Atlas e JQ1.

ABSTRACT

Rett syndrome (RTT) is a neurological disorder primarily caused by mutations in the Methyl-CpG Binding Protein 2 (*MECP2*) gene, which is an important epigenetic factor involved in the modulation of gene expression and splicing regulation in cells. Recent studies have reported the use of drugs to restore neuropathological phenotypes present in RTT. However, it remains unexplored whether pharmacological treatments can restore normal levels of splicing isoform expression profiles. In this study, we evaluated the effect of treatment with JQ1, a Tienotriazolodiazepine, on the alteration of splicing isoform expression and the expression of genes in the spliceosome complex in brain organoid transcriptomes containing a pathogenic mutation in the *MECP2* gene that causes Rett syndrome. To investigate the proteins involved in the spliceosome machinery and their alterations in RTT, we conducted an extensive literature review and constructed a curated atlas of splicing-regulating molecules. Additionally, we created a map describing all the steps involved in the human splicing mechanism. Expression mapping in RTT mutant cells revealed alterations in several splicing isoforms, including genes belonging to the spliceosome machinery. The identified alterations were enriched for pathways related to RNA editing, cellular energy functions, transport processes, and endosomal organization. Interestingly, genes with alternative splicing events in RTT were enriched for neurodegeneration and epilepsy phenotypes, which are characteristic of the syndrome. Furthermore, we identified that treatment with JQ1 could reverse the alterations in splicing isoform expression and, consequently, restore dysregulated metabolic pathways. Additionally, we presented evidence for the direct regulation of the *SLU7* gene by MECP2 and the potential connection of its alternative splicing isoform and cellular localization in RTT with various cellular phenotypes observed in the syndrome, including splicing regulation itself. Consistently, we also mapped novel alternative splicing events in RTT that were linked to essential genes in altered metabolic pathways. Collectively, these findings reinforce the importance of the splicing mechanism in regulating the altered cellular phenotypes in RTT and provide new evidence supporting the investigation of novel drugs for the treatment of RTT patients.

Keywords: Rett Syndrome, Alternative Splicing, Methyl-CpG-Binding Protein 2, Atlas, and JQ1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do gene *MECP2* no seu nível genômico até o seu papel funcional no reconhecimento de regiões metiladas no DNA. 21

Figura 2 – Visão geral das duas etapas sequenciais do *splicing*.....22

Figura 3 – Principais formas de *splicing* alternativo. 23

Figura 4 – Representação esquemática das análises realizadas a partir dos dados de RNA-seq de INs. 31

Figura 5 – Esquema simplificado dos principais componentes do portal WEB Iara. 37

Figura 6 – Regulação de expressão gênica entre células de INs controle e tratados de RTT. A) Genes diferencialmente expressos entre as amostras *WT_untreated* e *RTT_untreated* (MECP2-R113C). B) Heatmap com contraste geral entre os genes que estão com alta e baixa expressão com diferença significativa entre as diferentes amostras, levando em consideração também o estado de despolarização da membrana. 39

Figura 7 – Contagem do número de eventos de *splicing* alternativo identificados para as comparações entre *WT_untreated* contra *RTT_untreated* (vermelho) e *WT_untreated* contra *RTT_treated* (Verde). 40

Figura 8 – Comparação entre o número de eventos diferenciais significativos identificados para as comparações entre as diferentes amostras do estudo. 41

Figura 9 – Gráficos de *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *SLU7*. 42

Figura 10 – Representação esquemática do possível papel de MECP2 na repressão da expressão de *SLU7* por meio da ligação às regiões ricas em GC de seu promotor. 45

Figura 11 – Representação esquemática do possível papel de MECP2 na regulação do *splicing* do gene SLU7. É possível que a redução da ocupação de MECP2 esteja ocasionando a ocorrência do evento de IR em *SLU7* em células *MECP2* mutadas.....46

Figura 12 – Gráficos de *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *ITGA3*. 49

Figura 13 – *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *MOV10*. ...51

Figura 14 – Vias enriquecidas (FDR < 0,05) para genes com alta expressão significativa em células mutantes *MECP2* (*RTT_untreated*) quando comparadas a células controle (*WT_untreated*).....54

Figura 15 – Vias enriquecidas em células mutantes *MECP2* comparado a células controle (WT) para os genes com eventos de *splicing* alterados significativamente entre as amostras.....55

Figura 16 – Picos de ligação de MECP2 (vermelho) no *locus* gênico de *SLU7*. 57

Figura 17 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica codificante do gene *SLU7* e regiões próximas *down* e *upstream* de *SLU7*. 57

Figura 18 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica de *GOSR2*. 58

Figura 19 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica de MOV10. 58

Figura 20 – Representação esquemática do possível efeito funcional do evento de *splicing* alternativo em SLU7.....59

Figura 21 – Domínios da proteína de SLU7. 60

Figura 22 – Domínios InterPro da proteína de ITGA3.....61

Figura 23 – Nova isoforma detectada de *GOSR2*. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recursos e ferramentas utilizadas neste estudo.....29

Tabela 2 – Amostras de transcriptoma (RNA-seq) de interneurônios gerados por Xiang e colaboradores (2020). Os INs foram gerados a partir do desenvolvimento da eminência ganglionar medial (MGE), cultivada por 10 semanas para maturação dos INs. A mutação R133C está localizada no domínio MBD de MECP2, que permite sua ligação ao DNA metilado. 38

Tabela 3 –Eventos de *splicing* alternativo detectados no transcriptoma de amostras de RTT e que foram revertidos após o tratamento com a droga JQ1. 48

Tabela 4 – Genes com *splicing* alternativo identificados no transcriptoma de amostras de RTT e que são pertencentes ao complexo spliceossomal U2. 53

Tabela 5 – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *SLU7*. 56

LISTA DE SIGLAS

5mC	5-metilcitosina (do inglês: *5-methylCytosine*)
A3SS	Local de *splicing* alternativo 3' (do inglês: *Alternative 3' Splice Site*)
A5SS	Local de *splicing* alternativo 5' (do inglês: *Alternative 5' Splice Site*)
AKT	Proteína quinase B (do inglês: *Protein Kinase B*)
AMPAR	Receptor ionotrópico de glutamato AMPA Tipo Subunidade 1 (do inglês: *Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 1*)
AS	*Splicing* alternativo (do inglês: *Alternative Splicing*)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: *Brain-Derived Neurotrophic Fator)*
BET	Bromodomínio e motivo extra-terminal (do inglês: *Bromodomain and Extra-Terminal motif*)
Bp	Pares de base (do inglês: *Base pairs*)
BP	Ponto de ramificação (do inglês: *Branching Point*)
CAC	Citosina-Adenina-Citosina (do inglês: *Cytosine-Adenine- Cytosine*)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
ChIP-seq	Sequenciamento de imunoprecipitação de cromatina (do inglês: *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*)
CO	Organóides corticais (do inglês: *Cortical Organoids*)
cryo-EM	Microscopia Crioeletrônica (do inglês: *Cryogenic Electron Microscopy*)
CTD	Domínio C-terminal (do inglês: *C-Terminal Domain*)
DDX46	(do inglês: *DEAD-Box Helicase 46)*
DHX8	(do inglês: *DEAH-Box Helicase* 8)

DNMT1	DNA metiltransferase 1 (do inglês: *DNA Methyltransferase* 1)
ELK1	Proteína ETS Like-1 Elk-1 (do inglês: *ETS Like-1 protein Elk-1*)
FDA	Administração de alimentos e medicamentos (do inglês: *Food and Drug Administration*)
FDR	Taxa de descobertas falsas (do inglês: *False Discovery Rate*)
GO	Ontologias gênicas (do inglês: *Gene Ontology*)
GOSR2	Complexo receptor Golgi SNAP membro 2 (do inglês: *Golgi SNAP receptor complex member 2*)
GPE	glicina-prolina-glutamato (do inglês: *glycine-proline-glutamate*)
GRIA2	Receptor Ionotrópico de Glutamato AMPA Tipo Subunidade 2 (do inglês: *Glutamate Ionotropic Receptor AMPA Type Subunit 2*)
GSEA	Análise de enriquecimento de conjunto de genes (do inglês: *Gene Set Enrichment Analysis*)
HDAC1	Histona desacetilase 1 (do inglês: *Histone Deacetylase 1*)
hESC	Células-tronco embrionárias humanas (do inglês: *Human embryonic stem cells*)
HNRNPC	Ribonucleoproteína C nuclear heterogênea (do inglês: *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C*)
ID	Domínio interveniente (do inglês: *Intervening Domain*)
IGB	Navegador de genoma integrado (do inglês: *Integrated Genome Browser*)
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina 1 (do inglês: *Insulin Like Growth Factor 1*)
IGV	Visualizador de genômica integrativa (do inglês: *Integrative Genomics Viewer*)
IN	Interneurônios

iPS	Células tronco com pluripotência induzida (do inglês: *Induced pluripotent stem cell*)
ITGA3	(do inglês: *Integrin alpha-3*)
KCl+	Interneurônios induzidos a despolarização de membrana com KCl
KO	(do inglês: *Knockout*)
LINE1	Elementos nucleares longos intercalados do tipo 1 (do inglês: *Long Interspersed Nuclear Elements 1*)
MBD	Domínio de ligação ao DNA metilado (do inglês: *Methylated DNA-Binding Domain*)
MGEO	Organóides da eminência ganglionar medial (do inglês: *medial ganglionic eminence Organoids*)
MOV10	Mov10 complexo RISC RNA helicase (do inglês: *Mov10 RISC Complex RNA Helicase*)
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina (do inglês: *mammalian Target Of Rapamycin*)
MXE	Exons Mutualmente Exclusivos (do inglês: *Mutually exclusive splicing*)
NCBI	Centro nacional de informações sobre Biotecnologia (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*)
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês: *Next Generation Sequencing*)
NLS	Sinal de localização celular (do inglês: *Cellular Location Signal*)
NTC	Complexo dezenove (do inglês: *Nineteen Complex*)
NTD	N-Terminal domain (do inglês: *N- Terminal Domain*)
NTR	Complexo relacionado a dezenove (do inglês: *Nineteen-Related Complex*)
PCA	Análise de componentes principais (do inglês: *Principal Component Analysis*)
PCBP1	Proteína de ligação poli(RC) 1 (do inglês: *Poly(RC) Binding Protein 1*)

PHF5A	(do inglês: *PHD Finger Protein 5A*)
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase (do inglês: *Phosphoinositide 3-Kinase*)
PRP8	Fator de processamento 8 (do inglês: *Processing Factor 8*)
PSI	(do inglês: *Percent Spliced-In*)
PTBP1	Proteína 1 de Ligação ao Trato de Polipirimidina (do inglês: *Polypyrimidine Tract Binding Protein 1*)
PTBP2	Proteína 2 de Ligação ao Trato de Polipirimidina (do inglês: *Polypyrimidine Tract Binding Protein 2*)
RBM5	Proteína de Motivo de Ligação de RNA 5 (do inglês: *RNA Binding Motif Protein 5*)
RI	Retenção de Íntron (do inglês: *Intron Retention*)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)
mRNA	RNA mensageiro (do inglês: *messenger RNA*)
RNA-seq	Sequenciamento de RNA (do inglês: *RNA Sequence*)
RNPS1	Proteína de ligação de RNA com domínio rico em serina *1* (do inglês: *RNA Binding Protein With Serine Rich Domain 1*)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês: *Reactive Oxygen Species*)
RTT	Síndrome de Rett (do inglês: *Rett Syndrome*)
SE	Salto de Éxon (do inglês: *Exon Skipping*)
SF3A1	Fator de *splicing* 3a Subunidade 1 (do inglês*: Splicing Factor 3a Subunit 1*)
SF3A3	Fator de *splicing* 3a Subunidade 3 (do inglês: *Splicing Factor 3a Subunit 3*)
SF3B2	Fator de *splicing* 3b Subunidade 2 (do inglês: *Splicing Factor 3b Subunit 2*)
SF3B4	Fator de *splicing* 3b Subunidade 4 (do inglês: *Splicing Factor 3b Subunit 4*)

SFPQ,	Fator de splicing rico em prolina e glutamina (do inglês: *Splicing Factor Proline And Glutamine Rich*)
SLU7	Fator de splicing sinérgico letal com U5 snRNA 7 (do inglês: *Splicing factor synergistic lethal with U5 snRNA 7*)
snRNA	Pequenos RNAs nucleares (do inglês: *Small Nuclear RNAs*)
snRNP	Pequenas Ribonucleoproteínas Nucleares (do inglês: Small Nuclear Ribonucleoproteins)
SNRPD2	Polipeptídeo D2 de Ribonucleoproteína Nuclear Pequena (do inglês: *Small Nuclear Ribonucleoprotein D2 Polypeptide*)
SNV	Variação V de nucleotídeo único (do inglês: *Single Nnucleotide V variation*)
SP1	Proteína de Especificidade 1 (do inglês: *Specificity Protein 1*)
SRSF1	Fator de *splicing* rico em serina e arginina 1 (do inglês: *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*)
SRSF2	Fator de *splicing* rico em serina e arginina 2 (do inglês: *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*)
SRSF3	Fator de *splicing* rico em serina e arginina 3 (do inglês: *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3*)
SRSF5	Fator de *splicing* rico em serina e arginina 3 (do inglês: *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 5*)
SRSF6	Fator de *splicing* rico em serina e arginina 6 (do inglês: *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 6*)
TEA	Transtorno do Espectro do Autismo
TRD	Domínio de Repressão Transcricional (do inglês: *Transcriptional Repressor Domain*)

USP7	Ubiquitina-específica peptidase 7 (do inglês: *Ubiquitin Specific Peptidase 7*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA 19

2.1 Síndrome de Rett 19

2.2 *Splicing* 21

2.3 Alterações moleculares e tratamentos existentes para RTT 24

3 OBJETIVOS 27

3.1 Objetivo geral 27

3.2 Objetivos específicos 27

4 MATERIAL E MÉTODOS 28

4.1 Atlas de moléculas que regulam o *splicing* 28

4.2 Obtenção e processamento de dados de transcriptoma 29

4.3 Análise de expressão gênica 31

4.3.1 Mapeamento no genoma de referência 31

4.3.2 Cálculo de significância estatística 31

4.4 Análise de *splicing* 32

4.4.1 Contagem de eventos 32

4.4.2 Associação dos genes significativamente alterados com a maquinária do Spliceossomo e vias moleculares alteradas em RTT. 33

4.4.3 Visualização dos eventos de *splicing* com IGV 33

4.5 Análise de enriquecimento 34

4.6 Análise epigenética a partir de dados de sequenciamento de imunoprecitação da proteína (ChIP-seq) 34

4.7 Análise InterPro 35

4.8 Comitê de ética em pesquisa 35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

5.1 Atlas de moléculas que regulam o *splicing* 36

5.2 Análise de expressão gênica 37

5.3 Análise de *splicing* alternativo 39

5.4 Reversão de genes alterados em RTT 40

5.5 Correlação molecular de SLU7 e RTT 43

5.6 *Splicing* alternativo de genes com ocorrência exclusiva em amostras de RTT 47

5.7 Análise de Ontologia Gênica e de enriquecimento de conjuntos de genes 52

5.8 Análise ChIP-seq 56

5.9 Análise de domínios de proteínas relacionados com eventos de *splicing* 58

6 CONCLUSÃO 62

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 64

REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

Transtornos neurológicos envolvem uma vasta gama de doenças e condições, incluindo os transtornos do espectro do autismo, a Síndrome do X Frágil (SXF) e a Síndrome de Rett (RTT) (LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014; WON et al., 2012). A RTT, assim como outras desordens mentais, é uma condição que afeta principalmente crianças do sexo feminino, com uma incidência de 1 em cada 10.000 nascimentos (ITO-ISHIDA et al., 2015; LONG et al., 2011). Embora ainda não haja cura para RTT, sabe-se que sua principal causa são diferentes tipos de mutações no gene *MECP2* (*Methyl-CpG Binding Protein 2*), que codifica para um fator epigenético importante na modulação do desenvolvimento normal e função neuronal (LI et al., 2020; MARCHETTO et al., 2010; NA et al., 2013).

Além de atuar como um fator de transcrição, *MECP2* também desempenha um papel importante no processo de regulação do *splicing.* Estudos em modelos de camundongos para RTT, com *knockout* de *Mecp2*, observaram alterações na produção de isoformas de *splicing* para os genes *Ampar* e *Gria2* (LI et al., 2016). Também foi observado em transcriptoma do hipocampo de camundongos que o *knockdown* de *Mecp2* alterou o *splicing*, resultando principalmente na retenção de íntrons e no salto de éxons, afetando apenas classes específica de genes relacionados com funções de síntese de neurotransmissores, aprendizado e de memória (BRITO et al., 2020).

Estudos anteriores relataram o uso de drogas para a recuperação dos fenótipos neuropatológicos observados em neurônios, células da glia, organóides corticais (CO) e organóides da eminência ganglionar medial (MGEO) com mutações no gene *MECP2* (TRUJILLO et al., 2021; XIANG et al., 2020). Neste último estudo, foram combinadas as tecnologias de *drug-screening*, sequenciamento de RNA (RNA-seq) e de reprogramação de células tronco com pluripotência induzida (iPS) para criação de organóides cerebrais contendo as mutações em *MECP2* relacionadas às formas clínicas mais frequentes na RTT. Quando comparadas com suas respectivas amostras controle, foram encontradas alterações na expressão de genes relacionados às vias da sinapse, desenvolvimento neuronal e regulação da transdução do sinal de cálcio. O uso da técnica de *drug-screening* também permitiu identificar drogas capazes de reverter os fenótipos neuropatológicos de RTT, como as drogas nefiracetam (TRUJILLO et al., 2021), PHA 543613 (TRUJILLO et al., 2021) e JQ1 (XIANG et al., 2020).

Outros estudos relataram que *MECP2* atua diretamente na regulação de expressão de isoformas de genes, indicando que a maquinaria de regulação de *splicing* alternativo, chamada spliceossomo, também é modulada por MEPC2 (CHENG et al., 2017a; MAUNAKEA et al., 2013; YOUNG et al., 2005). Portanto é fundamental investigar as moléculas do spliceossomo, uma vez que o gene *MECP2* é um leitor epigenético de regiões metiladas do DNA (LEWIS et al., 1992; VUU; ROBERTS; RASTEGAR, 2023) e, neste contexto tem o potencial de interferir diretamente na transcrição de genes do spliceossomo. Além disso, não se sabe ainda se drogas testadas em laboratório, capazes de recuperar o fenótipo celular de RTT, também são capazes de restaurar o perfil de expressão gênica das isoformas de *splicing* e de genes que compõem o complexo do spliceossomo em células cerebrais. Além disso, não há pesquisas que tenham mapeado o perfil completo de alterações que envolvem a maquinaria do spliceossomo e a expressão de isoformas de *splicing* em amostras de pacientes com diferentes tipos de variantes no gene *MECP2*.

Nesta dissertação, realizamos um *screening in silico* de dados de transcriptoma do perfil de isoformas de *splicing* em células de pacientes com RTT. Também identificamos moléculas que fazem parte da maquinaria do spliceossomo e que estão alteradas em células de pacientes com síndrome de RTT. Em seguida, analisamos o impacto da droga JQ1, uma tienotriazolodiazepina, em amostras de RTT e sua capacidade em reverter o fenótipo celular por meio da alteração da expressão das isoformas de *splicing*. As alterações identificadas foram então submetidas a análise de ontologias gênicas (GO), evidenciando uma associação funcional das modificações genéticas, considerando a função molecular, processos biológicos e componentes celulares a partir de grupos de genes e isoformas de *splicing* alteradas em RTT.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Síndrome de Rett

A síndrome de Rett, descrita pela primeira vez pelo Dr. Andreas Rett em 1966 (RETT, 1966), é uma condição que causa distúrbios de ordem neurológica, afetando em sua maioria crianças do sexo feminino(SMEETS; PELC; DAN, 2012). Os sintomas incluem deficiência intelectual e motora, limitações na fala que surgem entre os 6 e 18 meses a partir da data do nascimento da criança, movimentos repetitivos e unilaterais com as mãos, quase sempre acompanhadas de picos centrotemporais síncronos que são medidos por eletroencefalografia (NISSENKORN; BEN-ZEEV, 2013; RICCERI; DE FILIPPIS; LAVIOLA, 2013; SHIMADA et al., 2013). Em determinadas situações, a desaceleração do crescimento craniano pode ser um dos primeiros indícios de RTT (NEUL et al., 2010). Outros sintomas possíveis compreendem crises epilépticas, traços autistas, variações na respiração, disfunção no sistema nervoso autônomo, problemas cardíacos e perturbações no sono (NEUL et al., 2010; PETRITI et al., 2023).

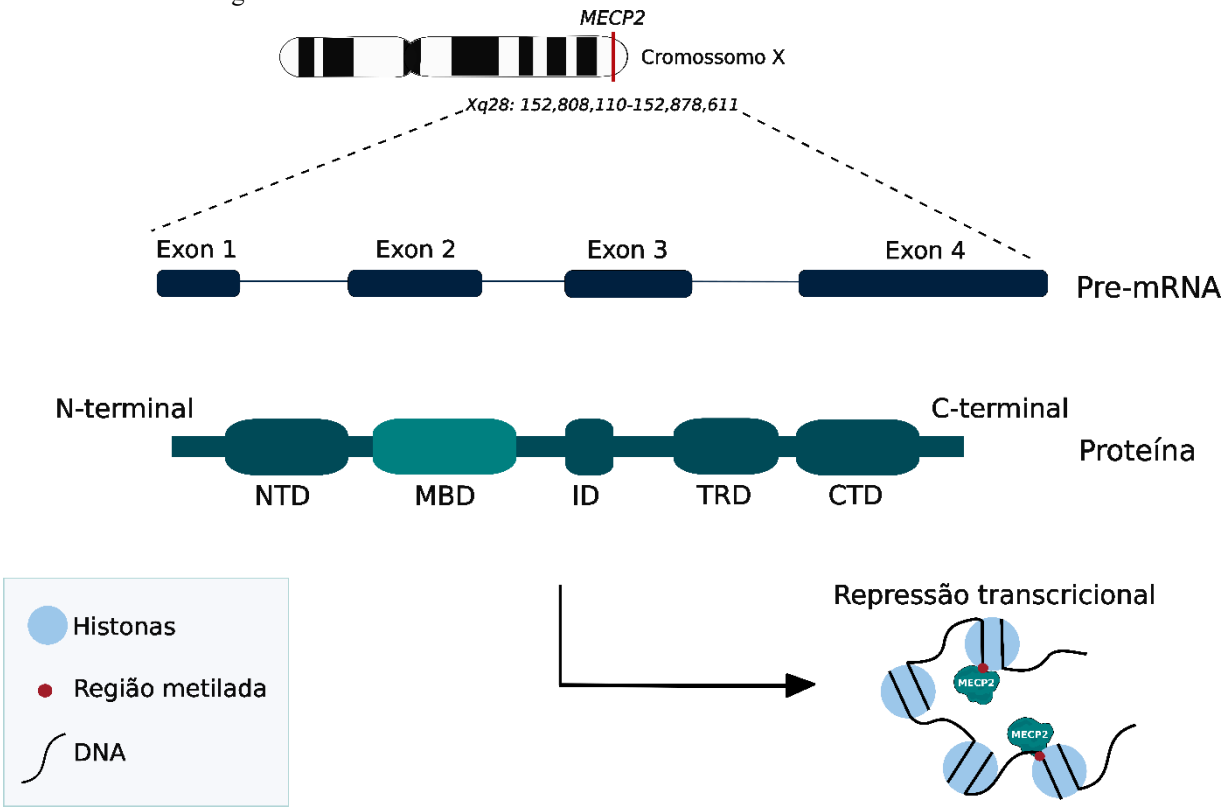
A Síndrome de Rett é considerada uma condição rara e, portanto, não temos dados exatos sobre incidência da síndrome no Brasil. No entanto, a estimativa da prevalência global de RTT na população feminina é de 7,1 por 100.000 mulheres (intervalo de confiança de 95%: 4,8 a 10,5)(PETRITI et al., 2023). Além disso, uma análise combinada sobre a prevalência de Transtornos do Espectro Autista (TEA) em crianças com RTT revelou que 61% apresentam TEA (RICHARDS et al., 2015). Estudos de coorte indicam que a longevidade de pacientes com RTT situa-se entre 25 e 30 anos, com uma taxa geral de sobrevida em torno de 78% aos 25 anos de idade (FREILINGER et al., 2010; KIRBY et al., 2010).

A descoberta da base genética dessa síndrome só ocorreu em 1999, e apesar de ainda não existir cura para RTT, sabe-se atualmente que sua principal causa é uma mutação no gene que codifica para a proteína MECP2 (MARCHETTO et al., 2010). Tal gene se encontra no cromossomo X e atua como um fator epigenético que se liga a regiões específicas do DNA (Figura 1), modulando a expressão de outros genes, além de atuar como um importante regulador epigenético na estabilidade e desenvolvimento do sistema nervoso central em humanos e outros mamíferos (NA et al., 2013). Além de sua capacidade de ligação a regiões

enriquecidas em 5-metilcitosina (5mC) (LEWIS et al., 1992), estudos mais recentes em cérebro de camundongo, demonstraram que (i) MeCP2 é um componente dinâmico dos condensados de heterocromatina (LI et al., 2020a), (ii) demonstrou alta afinidade para as sequências trinucleotídeos citosina-adenina-citosina (CAC) metilados (TILLOTSON et al., 2021) e (iii) apresenta ligação dinucleotídeos citosina-adenina (CpA) metilados e hidroximetilados (SPERLAZZA et al., 2017).

A proteína MECP2 apresenta vários domínios importantes para suas funções, tais como o domínio *Methylated DNA-Binding Domain* (MBD) que permite sua ligação ao DNA metilado e consequente repressão transcricional, além de estar associado a remodelação da cromatina; os domínios *N- Terminal Domain* (NTD) (CLAVERIA-GIMENO et al., 2017) e *Intervening Domain* (ID), que modulam a capacidade de ligação de MBD (MARTÍNEZ DE PAZ et al., 2019); o domínio *C-Terminal Domain* (CTD) que contém duas regiões de ligação de DNA e estão envolvidos na interação com proteínas que regulam a estrutura da cromatina; e o domínio *Transcription Repression Domain* (TRD) que pode atuar na repressão transcricional por meio do recrutamento de corepressores e complexos de remodelação da cromatina (GADALLA; BAILEY; COBB, 2011; GOOD; VINCENT; AUSIÓ, 2021) (Figura 1) . Já foram descritas centenas de mutações patogênicas causais de RTT no gene *MECP2*, com diferentes impactos na proteína, como *missense*, *nonsense* e *frameshift* (EHRHART et al., 2021). Dentre os tipos de mutações, incluem-se as SNV, *InDels* (do inglês: *Insertions e Deletions*) e duplicação completa do gene *MECP2*, com vários estudos de correlação genótipo-fenótipo (CHAHROUR; ZOGHBI, 2007; EHRHART et al., 2021).

Figura 1 – Representação esquemática do gene *MECP2* no seu nível genômico até o seu papel funcional no reconhecimento de regiões metiladas no DNA.



Fonte: A autora (2022).

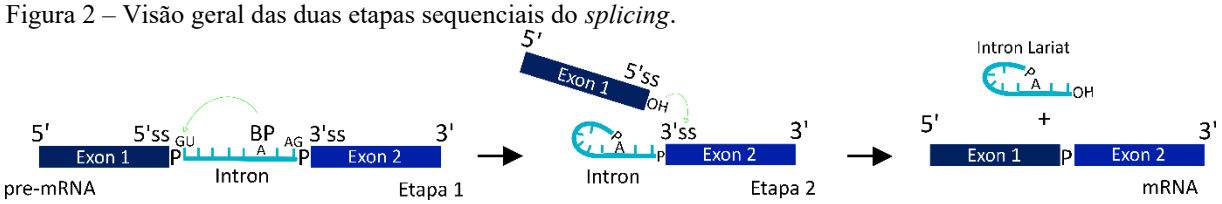
A função da proteína MECP2 no controle da transcrição varia dependendo das moléculas envolvidas e das interações proteína-proteína existentes. Há estudos com MECP2 que demonstraram que seu domínio C-Terminal permite interação com fatores de *splicing* e com moléculas de pré-mRNA, promovendo a regulação mediada por ligação proteína-RNA (CHENG et al., 2017a).

2.2 *Splicing*

O *splicing* é uma etapa crucial na expressão gênica. Nesse processo ocorre a maturação de uma molécula de pré-mRNA em duas etapas sequenciais de transesterificação, pela retirada de regiões chamadas de íntrons e união dos éxons. O transcrito resultante do *splicing*, a molécula de mRNA maduro, seguirá para o processo de tradução em proteína (MATERA; WANG, 2014) (Figura 2). Na primeira etapa do *splicing*, uma região de adenosina conservada, conhecida como *Branch Point* (BP) localizada dento da região intronica, liga-se a um fosfato no local de *splice*

5' (5'ss, extremidade 5’ do intron) e resulta na liberação do exon 5' e na formação de um intron intermediário (PADGETT et al., 1984; RODRIGUES et al., 2023; SHI, 2017a; WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009b). A segunda etapa permite a ligação entre os éxons 5' e 3' do transcrito, por meio da ligação realizada pelo grupo hidroxila do éxon 5' ao local de *splice* 3' (3'ss, extremidade 3’ do íntron), o que causa a liberação completa do íntron Lariat e ligação dos éxons (RODRIGUES et al., 2023; SHI, 2017b; WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009a) (Figura 2).

Figura 2 – Visão geral das duas etapas sequenciais do *splicing*.



Fonte: RODRIGUES et al., (2023).

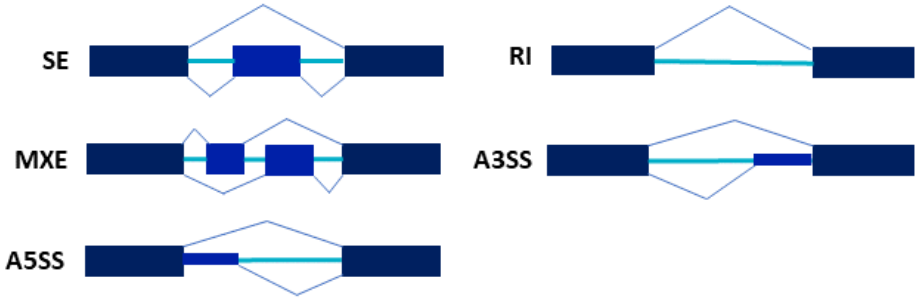
O mecanismo completo do *splicing* é catalisado pela maquinaria do spliceossomo, onde também se incluem fatores de *splicing* que são proteínas auxiliares do spliceossomo e que interagem com seus componentes principais para regular o *splicing* (MATERA; WANG, 2014; WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009a). O spliceossomo possui cinco moléculas principais chamadas de pequenos RNAs nucleares (snRNAs), U1, U2, U4, U5 e U6, que são individualmente capazes de interagir com várias pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP), bem como com outros fatores de *splicing* como os complexos *NineTeen Complex* (NTC) e *NineTeen-Related Complex* (NTR) (CHAN et al., 2003; GRABOWSKI; SHARP, 1986; LERNER; ARGETSINGER STEITZ, 1979; RODRIGUES et al., 2023; SHI, 2017b).

O processamento do *splicing* de pré-mRNA pode funcionar de maneiras alternativas por meio de *splicing* alternativo (AS), mantendo íntrons ou removendo éxons, para formar diferentes isoformas da molécula de mRNA canônica (CHEN; MANLEY, 2009; RODRIGUES et al., 2023) (Figura 3). Assim, o AS permite a codificação de sequências diferentes a partir de um mesmo transcrito, o que resulta na produção de proteínas funcionalmente distintas, sendo responsável por um grande aumento na variabilidade do transcriptoma e proteoma celular (PAN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2023).

Dentre as principais formas de *splicing* alternativo estão o Salto de Exon (SE), Retenção de Intron (RI), Exons Mutualmente Exclusivos (MXE), Local de *Splicing* Alternativo 3’ (A3SS)

e Local de *Splicing* Alternativo 5' (A5SS) (WANG et al., 2015) (Figura 3). Dentre os principais fatores que influenciam o *splicing* alternativo estão os potenciadores (do inglês: *enhancers*), silenciadores (do inglês: *silencers*) e fatores de *splicing* (BARALLE; GIUDICE, 2017; TAZI; BAKKOUR; STAMM, 2009). Esses elementos podem modular o reconhecimento dos sítios de *splicing* interagindo com o pré-mRNA ou com os componentes do spliceossomo (BARALLE; GIUDICE, 2017; DVINGE, 2018a) Adicionalmente, a taxa de elongação da RNA polimerase II ao longo do gene também exerce influência nos eventos de *splicing* alternativo: uma Polimerase mais lenta pode levar ao recrutamento de proteínas de ligação ao RNA, impulsionando eventos de inclusão ou exclusão de éxons (FONG et al., 2014). A interação combinatória entre esses elementos regulatórios e fatores determina a seleção de sítios de *splicing* alternativos. Deficiências nesse mecanismo podem desencadear a desregulação na formação de isoformas de mRNA, contribuindo para a manifestação de doenças, inclusive transtornos mentais (ARANDA-ABREU et al., 2015; LICATALOSI; DARNELL, 2006; TAZI; BAKKOUR; STAMM, 2009).

Figura 3 – Principais formas de *splicing* alternativo.



Legenda: SE: Salto de Exon. RI: Retenção de Intron. MXE: Exons Mutualmente Exclusivos. A3SS: Local de *Splicing* Alternativo 3'. A5SS: Local de *Splicing* Alternativo 5'.
Fonte: A autora (2022).

Young e colaboradores, em 2005, relataram em um modelo de RTT em camundongos que a proteína Mecp2 altera o *splicing* do um gene repórter *Cd44*, promovendo um aumento na inclusão de éxons por meio da interação dependente de RNA com o fator de *splice Yb1*. Isso indica que *Mecp2* tem um papel direto na regulação de *splicing* (YOUNG et al., 2005). Além disso, a proteína MECP2 ainda desempenha um importante papel na regulação do *splicing* por meio de sua interação com marcadores epigenéticos (CHENG et al., 2017b; MAUNAKEA et al., 2013), ligando-se a DNA exônico metilado e promovendo a redução de saltos de éxons alternativos. Neste contexto, já foi identificado enriquecimento da ligação da proteína MECP2

no éxon 10 do gene *HAUS8* em células *HCT116* e *IMR90*, causando metilação do locus genômico de tais genes, e foi observado que o *knockdown* de *MECP2* provocou o aumento no número de éxons excluídos de forma aberrante, evidenciando a ideia de que *MECP2* promove a inclusão de éxons (MAUNAKEA et al., 2013).

Tais achados apenas ressaltam o longo caminho pela frente que existe para entender o papel do *MECP2* na regulação do *splicing*, bem como a importância de uma cuidadosa interpretação específica do contexto dos estudos realizados.

2.3 Alterações moleculares e tratamentos existentes para RTT

Dentre suas principais alterações moleculares e morfológicas, a RTT é caracterizada por disfunções sinápticas que implicam em conectividade reduzida entre neurônios glutamatérgicos no córtex e deficiências na rede neuronal (GOFFIN; ZHOU, 2012; SANDWEISS; BRANDT; ZOGHBI, 2020). Além disso, ocorre também a redução em número e comprimento dos dendritos, assim como alterações nas estruturas sinápticas, formação e plasticidade neuronal (BOGGIO et al., 2010; DELLA SALA; PIZZORUSSO, 2014). Diante disso, a reversão das alterações encontradas nas funções sinápticas tem sido alvo de possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento de RTT.

Chang et al. e Martinowich et al., demonstraram que o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) é regulado por *Mecp2* no cérebro e apresenta expressão reduzida em cérebro de camundongos *Mecp2 knockout* (KO) (CHANG et al., 2006; MARTINOWICH et al., 2003). BDNF é uma proteína que participa ativamente da regulação da plasticidade cerebral, formação de circuitos sinápticos e desenvolvimento neuronal (CHENG et al., 2011; GOTTMANN; MITTMANN; LESSMANN, 2009). Partindo desses achados, Chang e colaboradores em um estudo com camundongos, conseguiram neutralizar a deficiência de *Mecp2* por meio da superexpressão de *Bdnf*, melhorando as funções sinápticas alteradas, apresentando um potencial terapêutico para o tratamento da RTT (CHANG et al., 2006).

Assim como o *BDNF*, o Fator de Crescimento Semelhante a Insulina 1 (*IGF1*) também é capaz de mediar a plasticidade neuronal e compartilha funções semelhantes com o BDNF (TROPEA et al., 2006; YUAN et al., 2020). Estudos com camundongos modelos para a síndrome e com pacientes com RTT, demonstraram que a expressão endógena de *Igf1* é reduzida

no cérebro. IGF1 atua regulando a expressão de genes envolvidos na via da PI3K-AKT-mTOR e está diretamente ligada com o aumento da transmissão, maturação e remodelação sináptica (YUAN et al., 2020). IGF1 compensa a sinalização negativa da via PI3K-AKT-mTOR encontrada em RTT e pesquisas em animais demonstraram que sua administração sistémica teve um impacto positivo na sobrevida e comportamento fisiológico de camundongos mutantes para o gene *Mecp2* (CASTRO et al., 2014; YUAN et al., 2020). Além disso, ao contrário de BDNF, essa molécula é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, o que possibilita sua administração periférica para o tratamento de RTT (REINHARDT; BONDY, 1994).

Na busca por tratamentos específicos para RTT, recentemente foi anunciado pela *Acadia Pharmaceuticals* de que a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, aprovou o uso da droga DAYBUE ™ (trofinetide). Ela é a primeira e única droga para o tratamento da síndrome de RTT (Acadia Pharmaceuticals, 2023). A droga é baseada em um análogo sintético do tripeptídeo amino-terminal glicina-prolina-glutamato (GPE) de IGF1 com resultados promissores em um estudo de Fase 3 chamado LAVANDER, onde a segurança e eficácia do tratamento foi avaliada em 187 pacientes com RTT (entre 5 a 20 anos de idade) (GLAZE et al., 2017; KHWAJA et al., 2014; NEUL et al., 2022). Dentre os fenótipos que apresentaram melhora significativa estão a função motora, comportamentos noturnos, movimentos respiratórios, anormalidades do humor e melhora na assimetria frontal do eletroencefalograma (NEUL et al., 2022; YUAN et al., 2020). Embora o tratamento tenha sido aprovado, ainda não são compreendidos completamente os mecanismos moleculares envolvidos na recuperação de tais fenótipos e ainda não existem trabalhos que investigaram o impacto na regulação da expressão gênica em células contendo diferentes mutações no gene *MECP2*.

Já em um estudo realizado por Xiang e colaboradores, os autores publicaram recentemente dados onde JQ1, droga pertencente a classe de inibidores de *Bromodomain and Extra-Terminal motif* (BET), foi capaz de reverter o perfil molecular de diferentes modelos celulares (XIANG et al., 2020). O trabalho foi fundamentado principalmente no estudo de Interneurônios (INs), células criticamente envolvidas na fisiopatologia de RTT (KRISHNAN et al., 2015; MORELLO et al., 2018; TOMASSY et al., 2014). Os INs foram gerados a partir do desenvolvimento da eminência ganglionar medial (MGE), cultivada por 10 semanas para maturação dos INs (XIANG et al., 2020). Um protocolo de edição via *CRISPR/cas9* foi aplicado em células hESC (Célula Tronco Embrionária humana) para a inserção das 3 mutações causais

de RTT mais frequentes no gene *MECP2*. Dentre elas, a mutação R133C (C397T), um SNV que causa a troca de C para T na posição 397 da região codificante do gene *MECP2* (XIANG et al., 2020). A droga JQ1 é uma tienotriazolodiazepina que tem como principal mecanismo de ação a interrupção com alta especificidade de proteínas BET, principalmente a proteína BRD4, importante regulador da transcrição gênica (FILIPPAKOPOULOS et al., 2010; ZHOU et al., 2020). JQ1 age por meio da ligação competitiva com o domínio de reconhecimento da acetil-lisina presente nas proteínas BET, o que impede sua a associação com histonas acetiladas, levando à supressão da elongação da transcrição e subsequente modulação dos padrões de expressão gênica (DEVAIAH et al., 2016). Através desse mecanismo, JQ1 demonstrou exercer efeitos anti-proliferativos potentes em uma variedade de tipos de células, tornando-o em um candidato promissor para estratégias terapêuticas inovadoras (ZHOU et al., 2020).

Além do tratamento com drogas, outras abordagens experimentais como terapias gênicas para a entrega de *MECP2* funcional por meio de vetores virais em células afetadas também vem sendo estudadas (GADALLA et al., 2013; GARG et al., 2013), mas distantes do emprego em ensaios clínicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com JQ1, uma tienotriazolodiazepina, na alteração da expressão de isoformas de *splicing* e na expressão de genes do complexo do spliceossomo em transcriptoma de organóides cerebrais contendo mutação patogênica no gene *MECP2*.

3.2 Objetivos específicos

- Construir um atlas de moléculas que fazem parte do complexo do spliceossomo;
- Analisar dados de transcriptoma (RNA-seq) para identificar isoformas de *splicing* alternativo diferencialmente expressas entre amostras controle e de RTT, e entre amostras de RTT tratadas com a droga JQ1;
- Caracterizar e descrever funcionalmente os genes e isoformas alteradas em RTT com relação a ontologias gênicas e com relação a diferentes tipos de eventos de *splicing*;
- Identificar interações moleculares entre os genes envolvidos no mecanismo de regulação de *splicing* e os genes alterados deste estudo, para posterior correlação com os mecanismos de regulação de *splicing*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atlas de moléculas que regulam o *splicing*

Embora haja literatura disponível a respeito da maquinaria do spliceossomo, os dados encontram-se em milhares de publicações independentes e muitas vezes com dados conflitantes. Desta forma, havia a necessidade de se obter e construir uma base de dados curada e atualizada, e que incluísse quais moléculas estão envolvidas no processo de regulação do mecanismo de *splicing,* que correspondem à maquinaria do spliceossomo em seres humanos.

A construção do atlas foi feita a partir de uma revisão abrangente da literatura, com artigos publicados em periódicos internacionais, todos disponíveis no portal PUBMED. Para a seleção de artigos aplicamos uma busca que utilizou as palavras-chaves "*human*", "*splicing*", "*gene*", e sinônimos correspondentes. A partir disso, selecionamos estudos recentes e com maior abrangência de informações, dentre eles 4 revisões bibliográficas e 1 base de dados de fatores de *splicing*, chamado "*SpliceAid-F*" (DVINGE, 2018b; GIULIETTI et al., 2013; LEE; RIO, 2015; RAMANOUSKAYA; GRINEV, 2017; SOTO et al., 2019). Todos os genes coletados desses trabalhos foram manualmente curados, e o critério estabelecido para inclusão dos genes no atlas foi a existência de no mínimo 2 artigos de pesquisa original que foram publicados na literatura científica, que identificaram e demonstraram experimentalmente o envolvimento do gene selecionado com um papel na regulação do *splicing* (RODRIGUES et al., 2023).

Além disso, realizamos o levantamento de trabalhos publicados nos últimos 5 anos, todos baseados na técnica de *cryo-electron microscopy* (cryo-EM). Essa revisão revelou mais detalhes sobre a arquitetura e organização molecular do spliceossomo durante sua ativação e atividade catalítica em seres humanos (AGAFONOV et al., 2016; BERTRAM et al., 2017a, 2017b; ZHAN et al., 2018; ZHANG et al., 2017, 2018, 2019), permitindo a adição de novas moléculas pertencentes a maquinaria do spliceossomo. Também realizamos o levantamento de dados quanto a função de cada gene curado pertencente ao atlas e todos foram classificados de acordo com sua associação aos complexos do spliceossomo. Para esta etapa, utilizamos a literatura científica e a ferramenta online *REACTOME*, uma base de dados com curadoria manual e revisão por pares.

O atlas construído foi disponibilizado na forma de um portal WEB e hospedado em um repositório público no *GitHub*. Está disponível online por um serviço de hospedagem de sites estáticos, *GitHub Pages*[1], que executa um processo de construção para publicar o site.

4.2 Obtenção e processamento de dados de transcriptoma

Todos os dados utilizados neste estudo estão disponíveis publicamente na literatura e foram gerados a partir de estudos independentes. Para o processamento e análise dos dados várias ferramentas foram utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Recursos e ferramentas utilizadas neste estudo.

Dados	**Fonte**	**Identificador**
Dados de RNA-seq	XIANG et al., 2020	GSE117511
Dados de ChIP-seq	LEE et al., 2020	GSE122364
Ferramentas	**Fonte**	**Acesso Web**
Cutadapt (v.2.8)	MARTIN, 2011	https://github.com/marcelm/cutadapt
FASTQC (v.0.11.9)	PATEL; JAIN, 2012	https://github.com/s-andrews/FastQC
STAR (v.2.7.10a)	DOBIN et al., 2013	https://github.com/alexdobin/STAR
DESeq2 (v.1.38.3)	LOVE; HUBER; ANDERS, 2014	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html
rMATS (v.4.1.2)	SHEN et al., 2014	https://github.com/Xinglab/rmats-turbo
maser (v.1.14.0)	VEIGA, 2020	https://github.com/DiogoVeiga/maser
SpliceTools (v.1.1)	FLEMINGTON et al., 2023	https://github.com/flemingtonlab/SpliceTools
Kallisto (v0.46.2)	BRAY et al., 2016	https://github.com/pachterlab/kallisto
InteractiVenn	HEBERLE et al., 2015	http://www.interactivenn.net/
IARA	RODRIGUES et al., 2023	https://pucpr-bioinformatics.github.io/atlas/
DAVID	DENNIS et al., 2003	https://david.ncifcrf.gov/
GSEA (v.4.3.2)	SUBRAMANIAN et al., 2005	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp
SRA toolkit	PATEL; JAIN, 2012	https://github.com/ncbi/sra-tools
MACS2 (v.2.2.8)	ZHANG et al., 2008	https://pypi.org/project/MACS2/
IGB	FREESE; NORRIS; LORAINE, 2016	https://www.bioviz.org/

[1] https://docs.github.com/en/pages

Homer (v.4.11.1)	HEINZ et al., 2010	http://homer.ucsd.edu/homer/
Bowtie2 (v.2.3.5.1)	LANGMEAD; SALZBERG, 2012,	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
REACTOME	JASSAL et al., 2020	https://reactome.org/
InterPro	APWEILER et al., 2001	https://www.ebi.ac.uk/interpro/
Phobius	KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007	https://phobius.sbc.su.se/

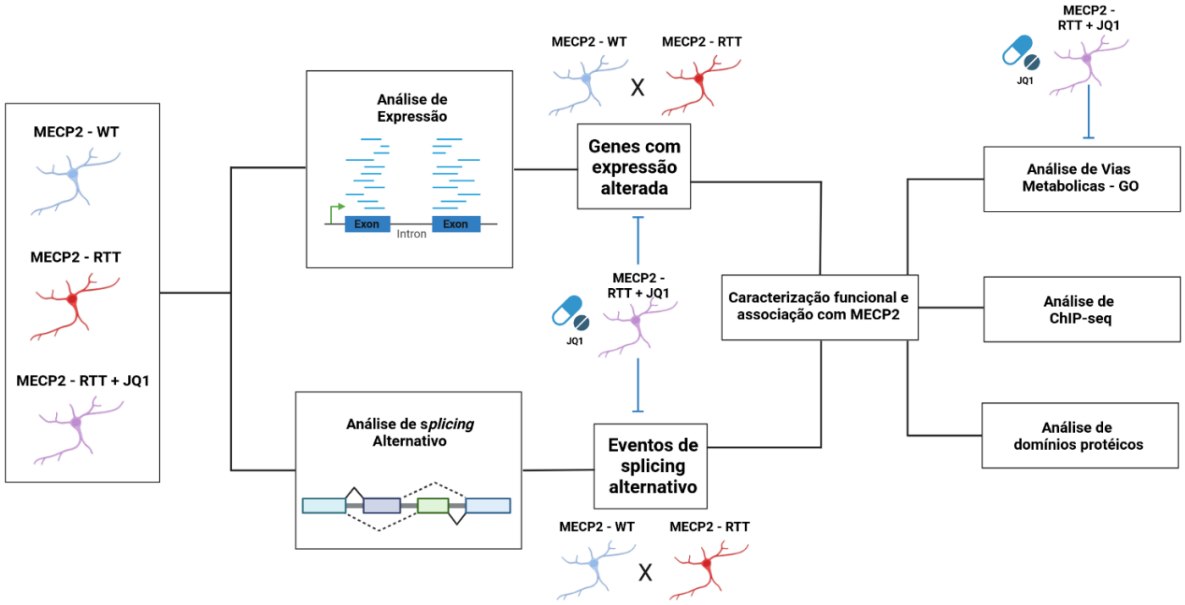
Fonte: A autora (2023).

Xiang e colaboradores publicaram recentemente dados onde a droga JQ foi capaz de reverter o perfil molecular de diferentes modelos celulares (XIANG et al., 2020). Os autores realizaram experimentos de RNA-seq de INs maturados (dia 74) tratados com JQ1 (75nM) e de seus respectivos controles (XIANG et al., 2020). Os dados publicados foram obtidos utilizando a ferramenta SRA toolkit (PATEL; JAIN, 2012), no formato SRA comprimido e posteriormente transformados para o formato digital FASTQ.

Verificamos a qualidade dos dados sequenciados utilizando a ferramenta FASTQC v.0.11.9 (PATEL; JAIN, 2012). Com base no relatório gerado, foram realizadas as correções necessárias. Para a remoção de *barcodes* de sequenciamento e de sequências de baixa qualidade, utilizamos o software *Cutadapt* v.2.8 (MARTIN, 2011).

Conforme representado (Figura 4), as etapas seguintes têm como foco a análise dos dados de RNA-seq aqui descritos.

Figura 4 – Representação esquemática das análises realizadas a partir dos dados de RNA-seq de INs.



Legenda – A direita, o primeiro bloco trata-se de uma representação das principais amostras analisadas no estudo. Seguindo o fluxo no sentido da direita para esquerda, estão representadas todas as análises as quais as amostras foram submetidas, concentrando-se principalmente nas comparações entre as amostras MECP2-WT (*MECP2 Wild type*/sem mutação no gene *MECP2*) e MECP2-R133C (Com a mutação causal de RTT R133C no domínio MBD de MECP2), assim como na análise do impacto do tratamento com JQ1 sobre as alterações identificadas.
Fonte: A autora (2023).

4.3 Análise de expressão gênica

4.3.1 Mapeamento no genoma de referência

Neste processo, os dados filtrados são mapeados no genoma humano de referência (*build* Hg38) com a ferramenta de alinhamento *STAR* v.2.7.10a (DOBIN et al., 2013), com as opções *--sjdbGTFfile, --twopassMode Basic, --sjdbOverhang 86, SortedByCoordinate, --quantMode TranscriptomeSAM GeneCounts*. Os fragmentos alinhados são então comparados com o transcriptoma de referência (genes preditos e reais anotados no genoma de referência) disponibilizado pela base de dados RefSeq. Nesta etapa, é possível identificar novos genes ou novas isoformas de *splicing* de genes (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

4.3.2 Cálculo de significância estatística

Esta etapa visa calcular a significância estatística da análise de expressão gênica, que se baseia em duas técnicas. A primeira é baseada na métrica *transcripts per million* (TPM), para comparar a variação de expressão gênica entre os transcritos de uma mesma amostra. A segunda,

conhecida como contagem de fragmentos, baseia-se em distribuição binomial negativa, e é aplicada para calcular a variação de expressão de um mesmo transcrito entre diferentes amostras. A partir de tais análises, é feito o controle de erros estatísticos do Tipo 1 (probabilidade da ocorrência de falso positivos) para os testes estatísticos realizados utilizando *False Discovery Rate* (FDR) ajustado para testes múltiplos com o método de Benjamini- Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). As análises estatísticas com correção FDR utilizam a nomenclatura *p-adj*, que são calculados sobre os valores de *p-value*. Consideramos eventos alterados com valores de *p-adj/FDR* inferiores a 0,05 de significância estatística. Para esta etapa foi utilizada a ferramenta DESeq2 v.1.38.3 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

4.4 Análise de *splicing*

4.4.1 Contagem de eventos

Esta etapa combina os métodos descritos para a análise da expressão gênica, incluindo o mapeamento no genoma humano de referência com a ferramenta de alinhamento *STAR* e comparação com o transcriptoma de referência. A partir dos dados gerados utilizamos a ferramenta computacional rMATS v.4.1.2 (SHEN et al., 2014), com as configurações padrão, que permite detectar eventos de *splicing* a nível de genes e isoformas conhecidas, novas isoformas de *splicing* ou de novos genes a partir de dados de RNA-seq. A ferramenta rMATS também classifica os eventos de *splicing* de acordo com o seu tipo, sendo estes SE, RI, MXE, A3SS e A5SS.

Para as análises *downstream* dos dados gerados a partir do rMATS utilizamos o pacote *maser* v.1.14.0 (*Mapping Alternative Splicing Events to pRoteins*) (VEIGA, 2020). O pacote possibilita a filtragem de eventos de *splicing* rMATS com base na cobertura de RNA-seq, valores de *p* e porcentagem diferencial de *splicing-in* (PSI ou ψ), e permite a análise de efeitos globais de *splicing* usando *boxplots*, análise de componentes principais (PCA) e gráficos de vulcão. O valor de PSI corresponde a uma medida que indica a eficiência de *splicing* de um éxon específico no conjunto total de transcrição de um gene (SCHAFER et al., 2015; VEIGA, 2020). Quando o PSI é igual 1, isso indica um éxon constitutivo, que está incluído em todas as isoformas de *splicing* existentes na anotação do transcriptoma de referência utilizado (SCHAFER et al., 2015). Já os valores inferiores a 1 implicam na inclusão reduzida do éxon

alternativo, o que indica a porcentagem de isoformas que possuem o éxon em comparação com o conjunto total de transcritos (SCHAFER et al., 2015).

Ainda para manipulação dos resultados da análise com o rMATS, aplicamos um conjunto de módulos de processamento de dados fornecidos a partir da ferramenta SpliceTools v.1.1 (FLEMINGTON et al., 2023). Aplicamos os módulos de processamento SEFractionExpressed e RIFractionExpressed, que permitem a filtragem de eventos de *splicing* de SE e RI significativos a partir dos arquivos de Contagens de Junções e Cobertura de Exon (JCEC) do rMATS juntamente arquivos de expressão gênica (em TPM). Os valores de expressão gênica em TPM foram determinados usando a ferramenta Kallisto v0.46.2 (BRAY et al., 2016) com alinhamentos das leituras ao transcriptoma humano (ensemble Hg38). Seguindo os parâmetros estabelecidos pela ferramenta, aplicamos um limite de FDR de 0,0005 para eventos de *splicing* estatisticamente significativos.

4.4.2 Associação dos genes significativamente alterados com a maquinária do Spliceossomo e vias moleculares alteradas em RTT.

Com base na identificação dos genes que sofrem *splicing* alternativo entre as diferentes condições, utilizamos a ferramenta InteractiVenn (HEBERLE et al., 2015) e os dados do atlas de *splicing* IARA (RODRIGUES et al., 2023) para verificar a sobreposição desses genes com genes pertencentes a maquinaria do spliceossomo. Também utilizamos a literatura disponível e anotamos as vias moleculares alteradas em RTT, assim como a associação dos genes pertencentes a essas vias com os genes alterados em nosso estudo.

4.4.3 Visualização dos eventos de *splicing* com IGV

Para visualização e confirmação dos eventos de *splicing* detectados pela ferramenta rMATS utilizamos a ferramenta *Integrative Genomics Viewer* (IGV). A ferramenta IGV permite a revisão manual de leituras de dados de sequenciamento de próxima geração (NGS) alinhadas a um genoma de referência e a confirmação e interpretação de eventos que podem ser comparados entre diferentes amostras (ROBINSON et al., 2011). Além disso, é possível explorar pontualmente informações como profundidade e cobertura de sequenciamento do gene de interesse.

4.5 Análise de enriquecimento

Após análise de expressão diferencial, realizamos a análise de associação funcional das modificações genéticas. Esta etapa da análise visa anotar funcionalmente os genes diferencialmente expressos pela técnica de ontologias gênicas (GO). Análises GO consideram função molecular, processos biológicos e componentes celulares de cada gene, permitindo que sejam feitas inferências biológicas a partir de grupos de genes, ao invés de considerar a análise dos genes apenas de forma individual. As ferramentas utilizadas para as análises GO são o software GSEA v.4.3.2 (SUBRAMANIAN et al., 2005), utilizando a função *GSEAPreranked* com 1000 por conjunto de genes e estatística de enriquecimento ponderado e a ferramenta DAVID (DENNIS et al., 2003), um programa de acesso via WEB que permite a integração de listas de genes ou proteínas para obtenção de uma anotação funcional de acordo com as diferentes categorias de GO e vias bioquímicas. Além disso, as alterações genéticas encontradas em RTT foram analisadas para detectar quais vias metabólicas estão possivelmente afetadas em pacientes com RTT. Para isso, foram empregadas as ferramentas computacionais do pacote Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004) e CytoScape (SHANNON et al., 2003).

4.6 Análise epigenética a partir de dados de sequenciamento de imunoprecitação da proteína (ChIP-seq)

Lee e colaboradores (2020), estudando o papel de *MECP2* na regulação da expressão gênica, geraram dados de Sequenciamento de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP-seq) para o mapeamento das regiões de ligação direta ao DNA do MECP2 (LEE et al., 2020). Para o experimento os autores utilizaram a linhagem celular SH-SY5Y (Korean Cell Line Bank, 22266). O sequenciamento foi conduzido em multiplex em um equipamento Illumina NextSeq500 (Illumina, Inc., SanDiego, Califórnia, USA) usando sequenciamento de *single-end* de 75 bp (LEE et al., 2020).

Recuperamos os dados utilizando a ferramenta SRA toolkit (PATEL; JAIN, 2012). Aplicamos em seguida análises de controle de qualidade para remoção de duplicatas de PCR e sequencias de baixa qualidade. As sequências foram alinhadas contra o genoma de referência humano Hg38 usando o alinhador Bowtie2 v.2.3.5.1 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), com

as configurações padrão de alinhamento. Os picos de ligação de MECP2 no genoma foram identificados utilizando as ferramentas Homer v.4.11.1 (*Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment*)(HEINZ et al., 2010), com a opção -*checkGC* e MACS2 v.2.2.8 (Model-based Analysis for ChIP-Seq)(ZHANG et al., 2008) com as opções -*g hs –q 0,05–broad*. Para a visualização dos picos de ligação identificados a partir da análise de ChIP-seq utilizamos o software *Integrated Genome Browser* (IGB) (FREESE; NORRIS; LORAINE, 2016) e a ferramenta web Genome Browser UCSC (NASSAR et al., 2023).

4.7 Análise InterPro

Para os genes que apresentaram isoformas de *splicing* alternativo nos dados de RTT em comparação com os respectivos controles, utilizamos a ferramenta InterPro e bases de dados vinculadas, como o preditor de sequencias de aminoácidos *Phobius*, para identificar se as regiões que sofrem *splicing* alternativo no transcrito de RNA podem impactar em alterações na composição de domínios de proteínas. Para tal, de forma complementar, também utilizadas a literatura científica para analisar a relação entre o domínio envolvido com o impacto funcional na alteração das proteínas codificadas por estes genes.

4.8 Comitê de ética em pesquisa

Todos os dados mencionados já foram gerados e estão disponíveis publicamente. Desta forma, como este trabalho envolve somente a utilização de dados digitais não identificados e que já estão públicos, este projeto não requer aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para seres humanos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção abordamos os seguintes resultados: a construção e disponibilização de um atlas, chamado Iara, que contém moléculas que regulam o mecanismo de *splicing* em seres humanos; a identificação de genes e isoformas de *splicing* que estão alteradas em amostras de interneurônios com mutação no gene *MECP2*; o impacto no transcriptoma a partir dos tratamento com JQ1, que foi capaz de reverter os fenótipos celulares de RTT; a análise dos processos moleculares e celulares que podem estar associados às alterações identificadas em RTT; análise de dados de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP-seq) para o gene *MECP2*; e análise dos domínios proteícos alterados decorrente dos eventos de *splicing* alternativo. Cada um deles é detalhado a seguir.

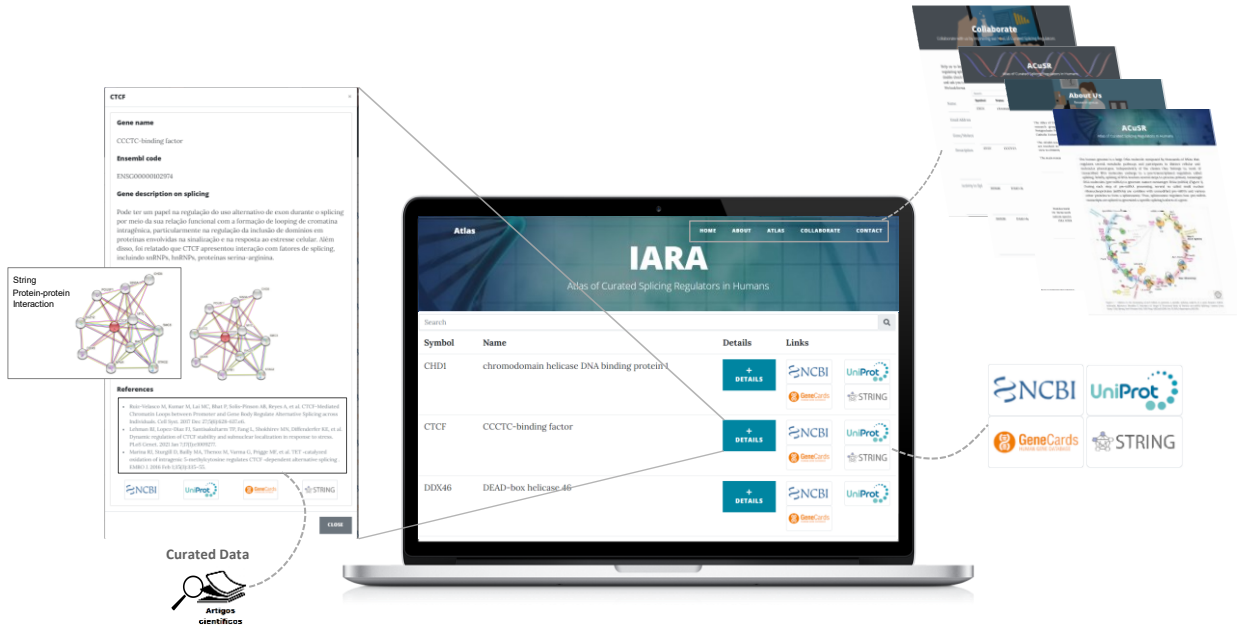
5.1 Atlas de moléculas que regulam o *splicing*

A primeira etapa deste trabalho envolveu a construção do atlas chamado Iara, que contém moléculas envolvidas na regulação do mecanismo de *splicing.* Ao todo, geramos um atlas contendo mais de 150 moléculas curadas, pertencentes a maquinaria do spliceossomo, que é responsável pelo mecanismo de regulação de *splicing* em seres humanos. Todos os genes foram anotados e classificados de acordo com o seu papel no *splicing* e dentro dos seguintes complexos que fazem parte do spliceossomo: E, A, B, B^{act}, B *, C, C * e ILS, bem como sua associação com as 5 principais moléculas de snRNAs, onde incluem-se o U1, o U2, o U4, o U5 e o U6. Os complexos NTC (complexo de dezenove) e NTR (complexo de dezenove relacionados) também foram considerados.

O atlas é composto por cinco páginas principais, divididos nos seguintes itens de menu: *Home, About*, *Atlas*, *Collaborate* e *Contact* (Figura 5). A principal funcionalidade se encontra na página “Atlas”, onde um usuário pode buscar diretamente por um gene de interesse e clicando no botão “+ *Details*”, que apresentará mais informações sobre o gene. Dentre as informações fornecidas pelo atlas, estão a descrição do gene no *splicing*, uma imagem correspondente a interações proteína-proteína conhecidas do gene e que é gerada a partir da plataforma STRING-db, os valores de expressão gênica, expressão de éxon e expressão de isoforma por tecido

recuperados em tempo real do Portal GTEx[2]. Além disso, ainda na janela de detalhes, é possível visualizar as referências curadas e links rápidos para as informações do gene no NCBI, UniProt, GeneCards e String-db.

Figura 5 – Esquema simplificado dos principais componentes do portal WEB Iara.



Fonte: A autora (2023).

O atlas apresenta um mapa do *splicing*, totalmente curado e contendo uma extensa discussão de todas as etapas envolvidas no mecanismo de *splicing*, e uma visão detalhada das moléculas envolvidas ao longo das distintas etapas do spliceossomo (RODRIGUES et al., 2023).

5.2 Análise de expressão gênica

Para investigar o perfil de expressão gênica, incluindo de isoformas de *splicing* e da maquinaria spliceossome em dados de transcriptoma de RTT tratadas com drogas, reunimos os dados de RNA-seq publicados por Xiang e colaboradores (XIANG et al., 2020). Foram utilizadas 4 tipos de amostras de Interneurônios provenientes de organóides da MGE neste estudo, sendo 2 controles e 2 com R133C (Tabela 2).

[2] https://gtexportal.org/

Tabela 2 – Amostras de transcriptoma (RNA-seq) de interneurônios gerados por Xiang e colaboradores (2020). Os INs foram gerados a partir do desenvolvimento da eminência ganglionar medial (MGE), cultivada por 10 semanas para maturação dos INs. A mutação R133C está localizada no domínio MBD de MECP2, que permite sua ligação ao DNA metilado.

Amostras	**Origem celular**	**Mutação**	**Tratamento**
WT_untreated	Interneurônio (MGE)	WT	Não tratada
WT_treated	Interneurônio (MGE)	WT	JQ1
RTT_untreated	Interneurônio (MGE)	R133C	Não tratada
RTT_treated	Interneurônio (MGE)	R133C	JQ1

Legenda – WT: *Wild type*; RTT: Síndrome de Rett; R133C: alteração de aminoácido indicando troca de arginina por cisteína na posição 133 da MECP2.

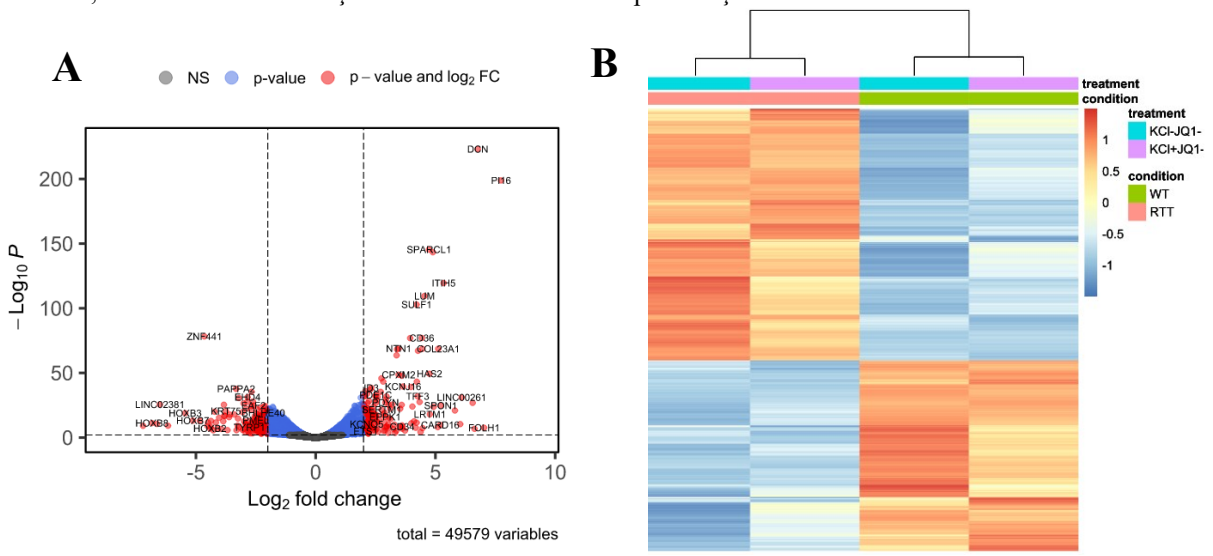
As amostras de transcriptoma foram comparadas da seguinte forma:

- *WT_untreated* contra *RTT_untreated*: para identificar alterações na expressão gênica causadas pela mutação em *MECP2*;
- *WT_untreated* contra *RTT_treated*: para verificar se ocorre reversão das alterações transcricionais causadas pela mutação em *MECP2*;
- *RTT_untreated* contra *RTT_treated*: para verificar se existe um padrão com relação as alterações encontradas na análise das amostras *WT_untreated* contra *RTT_untreated*;
- *WT_untreated* contra *WT_treated*: para identificar se a droga não está provocando alteração na expressão de genes essenciais da célula normal.

Primeiro, realizamos uma análise de expressão diferencial entre as amostras *WT_untreated* contra *RTT_untreated* e identificamos que, de fato, INs *MECP2* mutados (*MECP2*-R133C) sofrem uma forte desregulação na expressão de vários genes (Figura 6A). Para avaliar as mudanças em diferentes estados de atividade neuronal, os INs também foram estimulamos com despolarização de KCl, onde o potencial de membrana se torna menos negativo permitindo a abertura de canais íons Na+ na membrana (RIENECKER; POSTON; SAHA, 2020; XIANG et al., 2020). Com base na análise, geramos um mapa de calor (do inglês: *Heatmap)* dos genes com expressão diferencial significativa (*FDR*<0,05) entre *WT_untreated* e *RTT_untreated* e é possível observar um aumento significativo da expressão de genes em células *MECP2*-R133C (Figura 6B). A proteína MECP2 é descrita como um repressor epigenético da transcrição de vários genes, o que vai de acordo com o observado aqui. Observamos ainda que

despolarização de KCl+ provoca a indução no aumento da expressão de conjuntos de genes regulados negativamente em células WT e de RTT. O efeito contrário é observado em genes regulados positivamente (Figura 6B).

Figura 6 – Regulação de expressão gênica entre células de INs controle e tratados de RTT. A) Genes diferencialmente expressos entre as amostras *WT_untreated* e *RTT_untreated* (MECP2-R113C). B) Heatmap com contraste geral entre os genes que estão com alta e baixa expressão com diferença significativa entre as diferentes amostras, levando em consideração também o estado de despolarização da membrana.



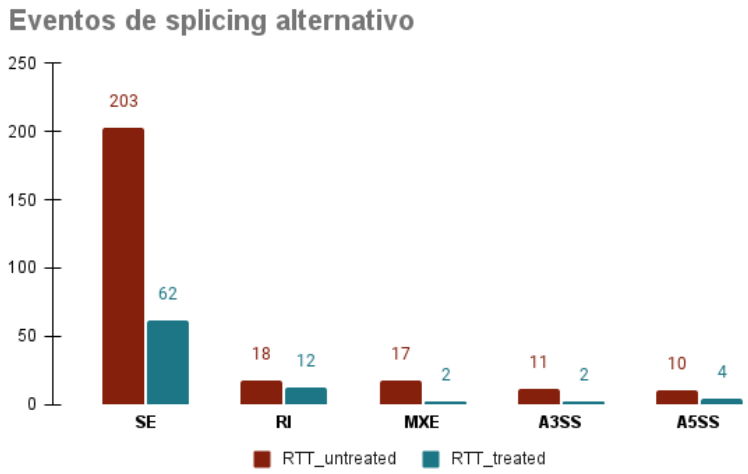
Legenda – WT: *Wild type*; R133C: alteração de aminoácido indicando troca de arginina por cisteína na posição 133 da MECP2; KCl-JQ1-: células não estimuladas com despolarização de KCl e que não foram tratadas com JQ1; KCl+JQ1-: células estimuladas com despolarização de KCl e que não foram tratadas com JQ1.
Fonte: A autora (2023).

5.3 Análise de *splicing* alternativo

A análise da expressão a nível de isoformas de *splicing* foi realizada para verificar se o tratamento com JQ1 também foi capaz de recuperar molecularmente as células de RTT para o estado normal. Primeiro, comparamos os eventos de *splicing* *WT_untreated* contra *RTT_untreated* utilizando a ferramenta rMATS. Filtramos os eventos de *splicing* considerados significativos utilizando os valores de *FDR*<0,05, valor de ΔPSI mínimo de 0,5 (*mudança mínima de 50%*) e removemos os eventos de baixa cobertura de sequenciamento. Com todos os filtros aplicados, identificamos 259 eventos de *splicing* alternativo, dos quais 203 são de SE, 18 eventos são de RI, 17 eventos são de MXE, 11 eventos são de A3SS e 10 eventos são de A5SS (Figura 7). Verificamos também que o tratamento com JQ1 foi capaz de reduzir as alterações nos eventos de *splicing* identificados em células *MECP2*-R133C. Ao comparar as amostras de

WT_untreated contra *RTT_treated*, identificamos que o tratamento com JQ1 gerou uma redução no número de eventos de *splicing* alternativos identificados, com redução do número total de eventos de *splicing* alternativo para 83, dos quais 62 são de SE, 12 são de RI, 3 são de MXE, 2 são de A3SS e 4 eventos são de A5SS (Figura 7).

Figura 7 – Contagem do número de eventos de *splicing* alternativo identificados para as comparações entre *WT_untreated* contra *RTT_untreated* (vermelho) e *WT_untreated* contra *RTT_treated* (Verde).



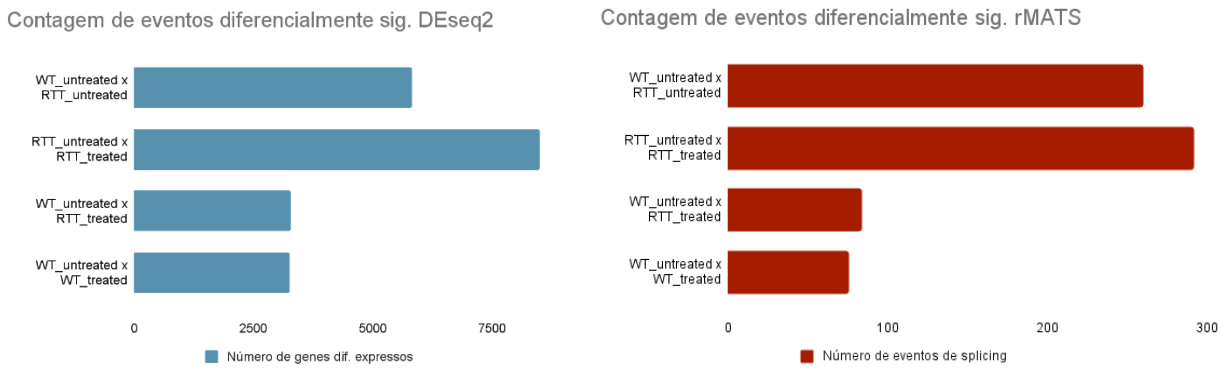
Legenda – SE: Salto de Exon. RI: Retenção de Intron. MXE: Exons Mutualmente Exclusivos. A3SS: Local de *Splicing* Alternativo 3'. A5SS: Local de *Splicing* Alternativo 5'.
Fonte: A autora (2023).

5.4 Reversão de genes alterados em RTT

Realizamos a análise de expressão gênica e a nível de isoformas de *splicing* para as demais amostras comparando *RTT_untreated* contra *RTT_treated* e *WT_untreated* contra *WT_treated***.** O tratamento das células *MECP2*-R133C com JQ1 reduziu o número de genes diferencialmente expressos e o número de eventos de *splicing* alternativo. Conforme observado nos resultados das análises (Figura 8), é possível identificar ainda um padrão no número de eventos alterados para as comparações entre as amostras, *WT_untreated* contra *RTT_treated* e *RTT_untreated* contra *RTT_treated*, as quais teoricamente, representam comparações entre amostras equivalentes, no caso, estado afetado (*MECP2-R133C*) e o estado revertido para "neurotípico" (*WT_untreated* e *RTT_treated*). Analisamos a sobreposição entre os eventos alterados utilizando a ferramenta *InteractiVenn* e verificamos que, a nível de expressão gênica

(resultados Deseq2), 77,3% dos genes significativamente alterados tiveram sobreposição entre as análises para as diferentes amostras. A nível de *splicing* alternativo houve 24,2% de sobreposição entre os eventos significativos de *splicing* entre as análises.

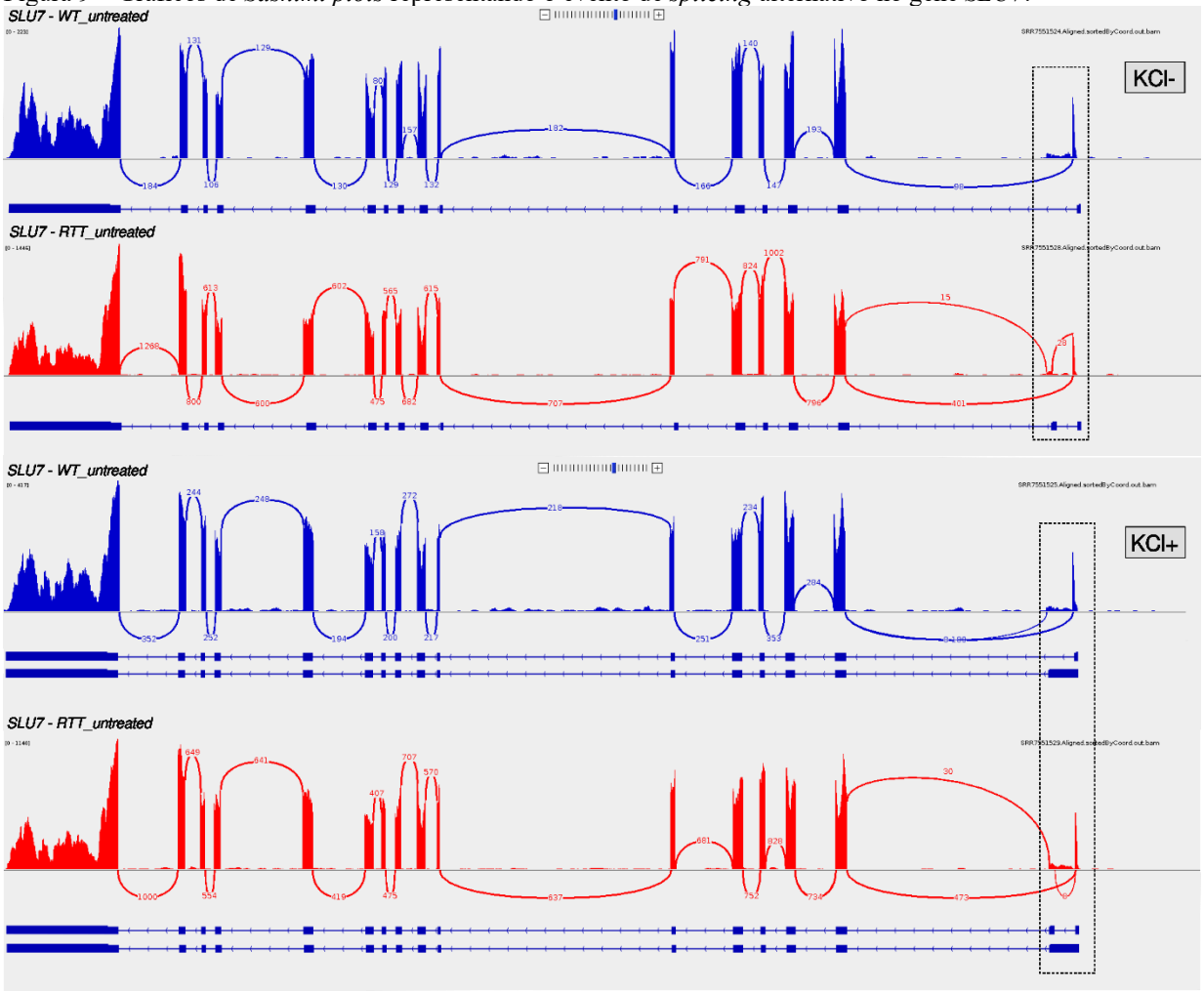
Figura 8 – Comparação entre o número de eventos diferenciais significativos identificados para as comparações entre as diferentes amostras do estudo.



Fonte: A autora (2023).

A partir dos resultados da análise do transcriptoma, os eventos significativos de *splicing* alternativos também foram comparados com os genes pertencentes a maquinaria do spliceossomo (atlas IARA). Separamos os resultados com sobreposição de acordo com o tipo de evento de *splicing* (SE, IR, MXE, A5SS, A3SS). Identificamos 3 genes da maquinaria de *splicing* que apresentaram alteração na sua expressão a nível de *splicing* alternativo em RTT. Entretanto, buscamos validá-los *in silico* utilizando a ferramenta IGV e apenas o gene *Splicing factor synergistic lethal with U5 snRNA 7* (*SLU7*) (Figura 9) apresentou um evento de RI (FDR < 0,05).

Figura 9 – Gráficos de *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *SLU7*.



Legenda – Eventos de *splicing* alternativo para as 4 condições do estudo para o gene *SLU7* divididas em INs com despolarização da membrana (KCl+) e sem despolarização (KCl-). Para cada condição, o gene está representado na forma de um *sashimi plot*, onde os picos em azul (controle) e em vermelho (RTT) representam a cobertura de leituras alinhadas na região. Os arcos indicam leituras de junção de *splicing*, com a espessura do arco correlacionada com o número de leituras de junção abrangendo os dois éxons conectados pelo arco. Cada isoforma está representada em azul abaixo de seu respectivo *sashimi plot*, os blocos azuis representam os éxons e as linhas entre os blocos representam os íntrons. A caixa tracejada em preto indica a região de *splicing* alternativo no gene.
Fonte: A autora (2023).

SLU7 também apresentou expressão significativamente aumentada nas células *MECP2*-R133C (*FDR* <0,05). Curiosamente o tratamento com JQ1 foi capaz de reverter tanto a alteração na expressão gênica de *SLU7* como também o evento de IR em *SLU7* detectado nessas células. Concordante com o padrão de reversão de eventos (Figura 8), quando comparamos as amostras *RTT_untreated* contra *RTT_treated*, o evento de *splicing* alternativo em *SLU7* está presente. Porém, quando comparamos *WT_untreated* contra *WT_treated*, o evento de IR detectado em

SLU7 não está ocorrendo. Logo, é possível que esse gene possa estar associado com a manutenção das vias alteradas em RTT e que foram revertidas com o tratamento de JQ1.

5.5 Correlação molecular de SLU7 e RTT

A proteína SLU7 compõe a maquinaria do spliceossomo, e é recrutada a partir da segunda etapa catalítica do *splicing* (complexos C*), atuando diretamente na identificação correta da região de *splicing* 3' (3'SS) quando há mais de um sítio AG nessa região (CHAN et al., 2003; ZHANG et al., 2019). SLU7 atua interagindo principalmente com Pré-mRNA *Processing Factor 8* (PRP8) e *CWC22 Spliceosome Associated Protein Homolog* (CWC22), garantindo o posicionamento correto do 3'SS no centro catalítico, onde ocorre justaposição da hidroxila 3' (3'OH) do éxon 5' com o 3'SS, formando então o complexo pós-catalítico (complexo P) (BRYS; SCHWER, 1996; CHUA; REED, 1999; ZHANG et al., 2019). Nesse contexto, o papel de SLU7 é proteger essas interações para que a interação molecular não se quebre de forma precoce (ZHANG et al., 2019). Além disso, a transição do complexo P para a última etapa do *splicing* (complexo ILS) é conduzida por *DEAH-Box Helicase* 8 (DHX8), permitindo a ligação dos éxons e a liberação do íntron lariat, e consequentemente a liberação dos componentes proteicos, incluindo SLU7 (ZHANG et al., 2019). É importante destacar que SLU7 reconhece a região de 3'SS de modo dependente da distância entre o ponto de ramificação e o nucleotídeo AG, sendo necessária para fornecer o encaixe eficiente do 3'SS ao sítio ativo para distâncias maiores que 7 nucleotídeos entre essas duas regiões (BRYS; SCHWER, 1996). Distâncias menores de 7 nucleotídeos dispensam a presença de SLU7 para que o *splicing* ocorra (BRYS; SCHWER, 1996; OHRT et al., 2013).

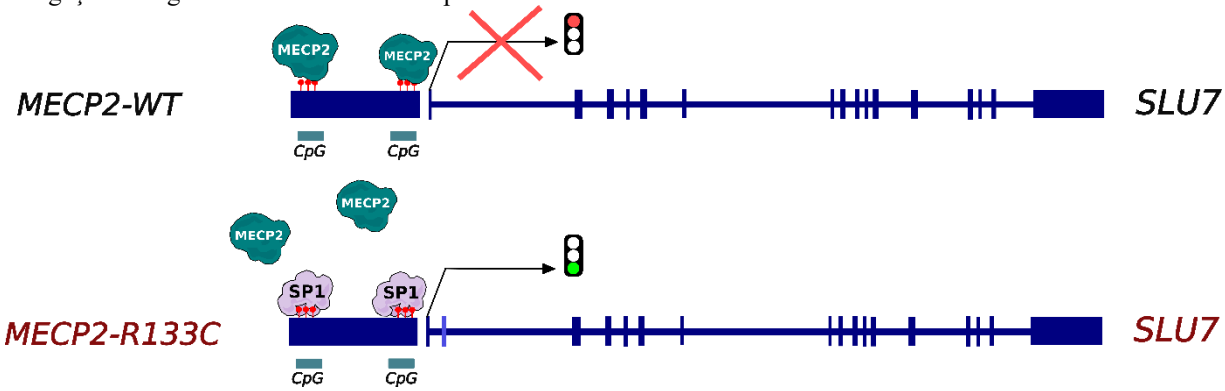
Ao investigar na literatura as possíveis relações de *SLU7* com RTT, identificamos que não existem estudos contendo essa relação, embora seja um gene altamente expresso em diferentes tipos de células do cérebro (GÁRATE-RASCÓN et al., 2022). No entanto, em um estudo recente, que contou com a maior coorte de Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) até sua data de publicação (31 indivíduos controle e 33 com TEA), foi realizada uma avaliação de transcriptoma a nível de célula única (*single nucleus RNA sequenc*ing - snRNAseq) de cérebros *post mortem*, e foi detectada expressão aumentada de *SLU7* em dados de indivíduos

com TEA (WAMSLEY et al., 2023), embora o seu papel funcional na condição não tenha sido investigado.

Neste estudo, identificamos vários fatores que sugerem fortemente que essa proteína deve ser investigada, tanto a sua relação com RTT quanto a sua função molecular no cérebro. Primeiro, *SLU7* também foi encontrado com sua expressão aumentada em RTT (*FDR* < 0,05) nas amostras de células que contém uma mutação na região MBD (*methylated DNA-binding domain*) de MECP2, a qual é responsável pela redução da atividade de ligação de MECP2 ao DNA metilado. Verificamos então que o promotor do gene *SLU7* possui duas regiões ricas em GC (ALBERSTEIN et al., 2007), o que também sugere fortemente que MECP2 pode estar envolvido diretamente com a repressão da expressão de *SLU7* por meio da ligação às regiões ricas em GC de seu promotor (Figura 10).

Ainda sobre a relação de MECP2 com a regulação de *SLU7*, embora não se compreenda completamente os processos de regulação da expressão desse gene, duas proteínas, *Specificity Protein 1* (SP1) e *ETS Like-1 protein Elk-1* (ELK1) foram identificadas como reguladoras antagonistas da expressão de SLU7 (ALBERSTEIN et al., 2007). SP1 se liga nas regiões ricas em GC do promotor de *SLU7* e promove o aumento da sua expressão. ELK1, por outro lado, se liga a regiões de aproximadamente 10pb com um núcleo central de GGAA (Ets) e promove a repressão da expressão de SLU7 (ALBERSTEIN et al., 2007). Foi reportado que MECP2 foi capaz de reprimir eventos de transcrições ativados por SP1 na célula (DRAGICH; HOUWINK-MANVILLE; SCHANEN, 2000; KUDO, 2023; MARIN et al., 1997). Desta forma, tais dados sugerem que em RTT, com a perda da função de MECP2, a ativação transcricional ativada por SP1 não esteja sendo reprimida por MECP2, o que pode estar promovendo o aumento da expressão de *SLU7* em RTT (Figura 9). Além disso, como ambos se ligam às regiões ricas em CG para a regulação da expressão, é possível que esteja ocorrendo uma competição sítio específico no promotor de *SLU7* entre essas duas proteínas. É importante ressaltar ainda que *ELK1* está com a expressão aumentada (*FDR* < 0,05) nos dados de RTT utilizados nesta pesquisa, o que também pode indicar uma tentativa da célula de compensar o aumento da expressão de *SLU7*.

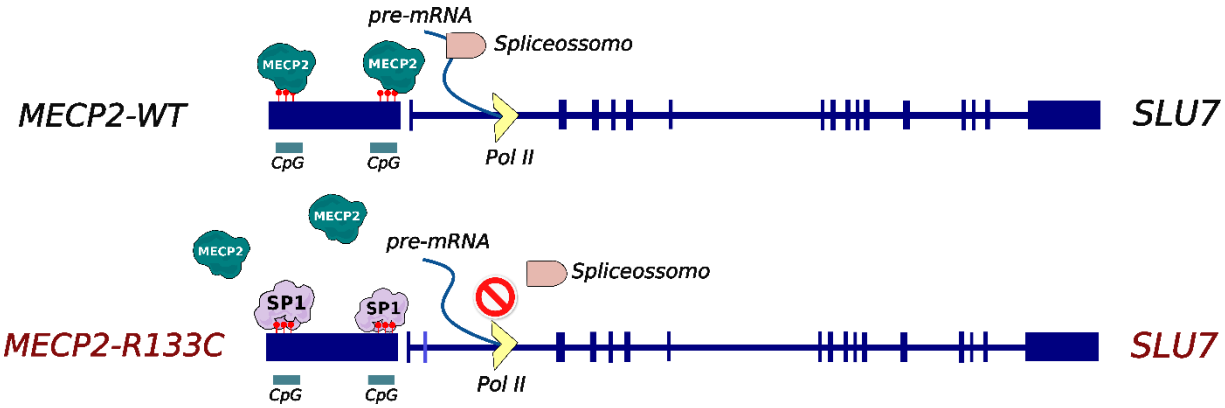
Figura 10 – Representação esquemática do possível papel de MECP2 na repressão da expressão de *SLU7* por meio da ligação às regiões ricas em GC de seu promotor.



Fonte: A autora (2023).

Além disso, a capacidade de ligação de MECP2 a regiões ricas em GC pode estar ligada ao evento de *splicing* alternativo identificado no presente trabalho. Complementarmente, estudos recentes também observaram que o *knockdown* de *MECP2* e a ocupação genômica reduzida de MECP2 próximo a regiões de junção de *splicing* teve impacto no aumento de eventos de IR (BRITO et al., 2020; WONG et al., 2017). A ocupação reduzida de MECP2 também está associada com o bloqueio da RNA polimerase II, o que influencia no recrutamento de fatores e no reconhecimento de locais de *splicing* (WONG et al., 2017). O evento de IR identificado no gene *SLU7* nos dados de RTT utilizados nesta pesquisa, ocorre na região 5' do transcrito de pré-mRNA (Figura 9), provocando a retenção de uma região que seria equivalente a uma parte do íntron 1 na isoforma canônica (genoma humano GRCh38 - chr5:160,418,596-160,418,685), gerando um novo "éxon 2" na isoforma alternativa (*RefSeq: NM_001364523.2*). Logo, levantando a hipótese de que se MECP2 está se ligando a regiões ricas em GC presentes em *SLU7*, é possível que a redução da ocupação de MECP2 esteja provocando a ocorrência do evento de IR em *SLU7* em células *MECP2* mutadas (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática do possível papel de MECP2 na regulação do *splicing* do gene SLU7. É possível que a redução da ocupação de MECP2 esteja ocasionando a ocorrência do evento de IR em *SLU7* em células *MECP2* mutadas.



Fonte: A autora (2023).

A nível funcional, a proteína SLU7 possui 4 motivos com diferentes papéis na regulação da sua localização celular e que também participam na sua função como regulador do *splicing* (GÁRATE-RASCÓN et al., 2022; SHOMRON; REZNIK; AST, 2004). Dentre eles, 2 estão presentes na região N-terminal de SLU7, que são o sinal de localização celular (NLS) e um motivo de zinco (*Knucke Zinc motif*) que se sobrepõe ao domínio de NLS, que juntos são necessários para a translocação de SLU7 para o núcleo (NLS) e para a sua permanência no motivo de zinco. Shomron e colaboradores relataram que a diminuição nos níveis nucleares de SLU7 leva a seleção subótima de 3'SS, o que por consequência pode ter impacto na geração de eventos de salto de éxon no *splicing* (SHOMRON et al., 2005). Outro fator importante é que o domínio N-terminal de SLU7 contém regiões ricas em resíduos de Arg e Lys, os quais estão envolvidos no reconhecimento da região de 3'SS durante o *splicing* (ZHANG et al., 2017). Diante disso, embora ainda seja necessária a predição da função de domínios proteicos alterados em SLU7 e validações *in vitro,* é possível que a região de íntron retido na isoforma alternativa de *splicing* gerada nos dados de RTT esteja influenciando na regulação da localização celular de SLU7, ou até mesmo na sua capacidade de interação com outras moléculas do splicessomo.

Além de seu papel no *splicing*, SLU7 é importante na regulação de outras vias celulares. SLU7 já foi associado a regulação da estabilidade do genoma, resposta ao estresse e progressão do ciclo celular (GÁRATE-RASCÓN et al., 2022; JIMÉNEZ et al., 2019; RECALDE et al., 2021; SHOMRON et al., 2005). SLU7 também está associado a proteção contra a formação de híbridos RNA-DNA (R-loop) por meio da regulação indireta do *splicing* e expressão da proteína

Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1 (SRSF1) (ELIZALDE et al., 2014; GÁRATE-RASCÓN et al., 2022). SLU7 também contribui para a estabilidade de *DNA Methyltransferase* 1 (DNMT1), facilitando as interações com Histona desacetilase 1 (HDAC1) e Ubiquitina-específica peptidase 7 (USP7), evitando sua acetilação e degradação, o que implica na manutenção da metilação correta do DNA (RECALDE et al., 2021). O silenciamento de SLU7 resulta, por consequência, na hipometilação do DNA (RECALDE et al., 2021). Quanto a sua função na resposta ao estresse, SLU7 impede o acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e seu *knockdown* demonstrou induzir o aumento no estresse oxidativo na célula (GÁRATE-RASCÓN et al., 2021). Condições de estresse também foram relacionadas a alteração na distribuição da localização celular de SLU7, aumentando o seu deslocamento para o citoplasma (SHOMRON et al., 2005). Já na regulação do ciclo celular, SLU7 participa na indução da progressão do ciclo de células cancerígenas de diferentes origens, o que também pode estar associada ao seu papel na manutenção dos níveis de DNMT1, que quando silenciado induz a parada das fases G2/M do ciclo celular, e a apoptose (CHEN et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 2019).

5.6 *Splicing* alternativo de genes com ocorrência exclusiva em amostras de RTT

A análise de transcriptoma permitiu identificar diferentes categorias de eventos de *splicing* entre as amostras controle e de RTT. Dentre esses eventos, três genes identificados (Tabela 3), *Golgi SNAP receptor complex member 2* (*GOSR2)*, *Integrin alpha-3* (*ITGA3*) e *Mov10 RISC Complex RNA Helicase* (*MOV10*), possuem associação com vias metabólicas alteradas em RTT. Assim como ocorre com SLU7, o tratamento com JQ1 também foi capaz de reverter os eventos de *splicing* alternativo identificados nos 3 genes para o perfil de isoformas das amostras controle, o que também pode ser um indicativo de que esses eventos estejam contribuindo para a desregulação dos fenótipos celulares identificados em RTT.

Tabela 3 –Eventos de *splicing* alternativo detectados no transcriptoma de amostras de RTT e que foram revertidos após o tratamento com a droga JQ1.

Análise	***GOSR2***	***ITGA3***	***MOV10***
WT_untreated contra *RTT_untreated*	SE	SE	RI
RTT_untreated contra *RTT_treated*	SE	SE	RI
WT_untreated contra *RTT_treated*	-	-	-
WT_untreated contra *WT_treated*	-	-	-

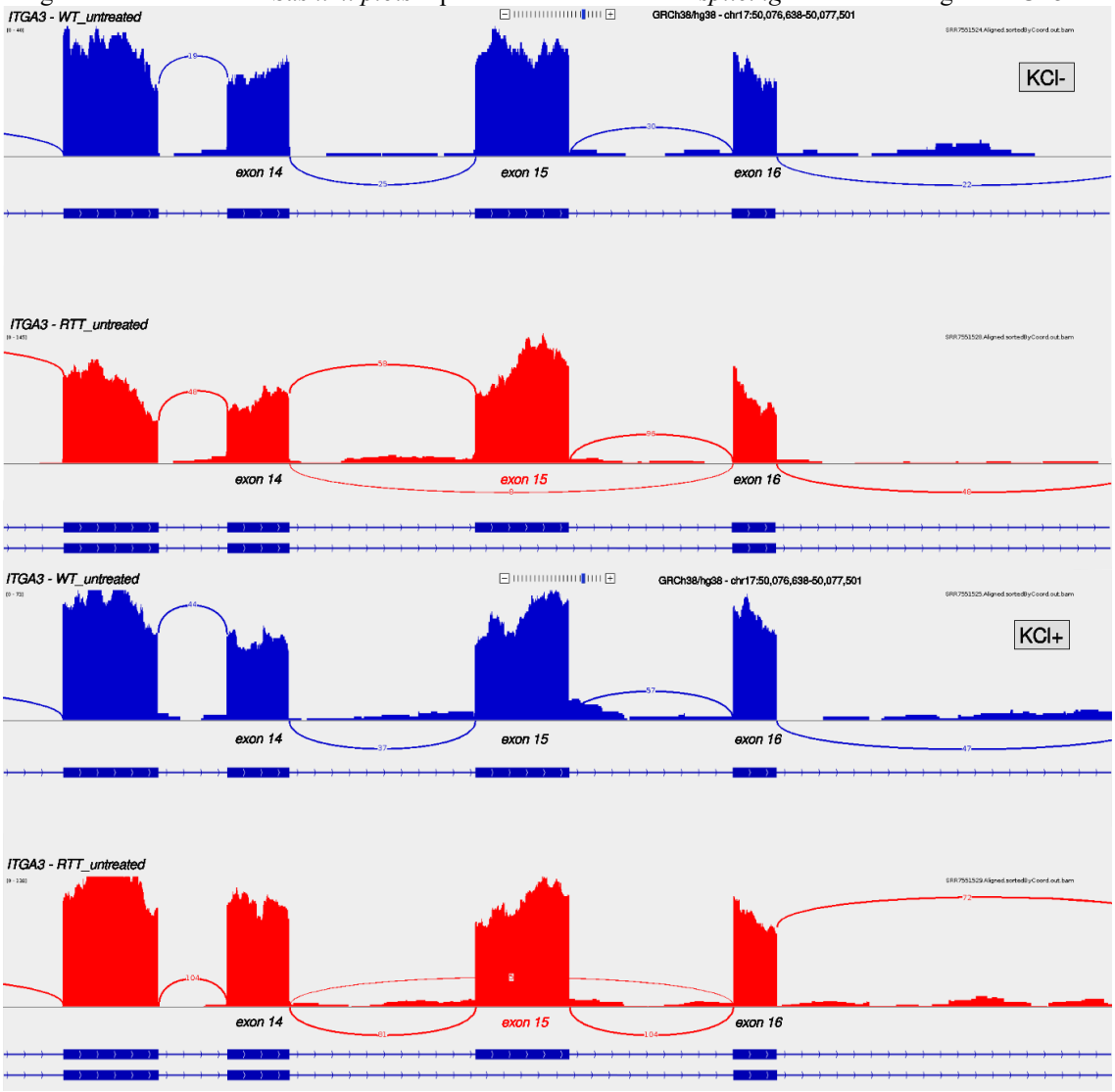
Legenda – WT: *Wild type*; RTT: Síndrome de Rett; SE: Salto de Éxon; RI: Retenção de Íntron.
Fonte: A autora (2023).

O gene *GOSR2* codifica para uma proteína de membrana que tem função no transporte de proteínas entre os compartimentos cis/medial-Golgi para a rede trans-Golgi (BOISSÉ LOMAX et al., 2013; JEPSON; PRASCHBERGER; KRISHNAKUMAR, 2019). Além da ocorrência de *splicing* neste gene, ele também apresentou expressão significativamente aumentada (*FDR* <0,05) nas amostras de RTT. Conforme já descrito, defeitos no tráfico de Golgi e funções secretoras são críticas para a maturação cerebral, tráfico de compartimentos axonal e dendrítico (PASSEMARD et al., 2017). Dentro da célula, os lipídios necessários para o crescimento da membrana de neurônios são sintetizados e transportado por meio do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, o qual se liga diretamente ao crescimento dendrítico neuronal (JEPSON; PRASCHBERGER; KRISHNAKUMAR, 2019; PFENNINGER; JOHNSON, 1983). Tais funções tem relação com os déficits no crescimento de axônios/detritos identificados por Xiang e colaboradores, os quais também foram revertidos com o tratamento com JQ1 (XIANG et al., 2020). Mutações no gene *GOSR2* também já foram associadas a defeitos no controle do movimento (ataxia), escoliose, convulsões, integridade de neurônios motores e neurodegeneração (BOISSÉ LOMAX et al., 2013; CORBETT et al., 2011; EGMOND et al., 2015; JEPSON; PRASCHBERGER; KRISHNAKUMAR, 2019).

O gene *ITGA3* (Figura 12) faz parte de um conjunto de proteínas de membrana heterodiméricas, atuando juntamente com a subunidade *beta-1* (duplex α3β1) e contribuindo com um papel na migração neuronal e corticogênese (JONES; VAN DER FLIER; SONNENBERG, 1998; TAKADA et al., 1991). Recentemente, Xu e colaboradores geraram modelos de neurônios e organóides corticais *MECP2*-KO e identificaram que as vias PI3K/Akt, envolvidas na regulação da síntese proteica e da função neural estavam alteradas em RTT. Essas vias foram associadas a diferenciação neuronal prejudicada e alterações morfológicas em

modelos neuronais de seres humanos após deleção de *MECP2* (XU et al., 2022). Curiosamente, após o tratamento dessas células com a droga KW-2449 ou VPA, que promove a ativação da via PI3K-AKT, houve redução nos déficits neuronais em células *MECP2*-KO e os genes alterados relacionados com a via PI3K-Akt, incluindo *ITGA3*, tiveram suas expressões restabelecidas em organóides *MECP2*-KO após o tratamento com KW2449 (XU et al., 2022), o que reforça ainda mais a associação dessa molécula com os fenótipos alterados em RTT.

Figura 12 – Gráficos de *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *ITGA3*.

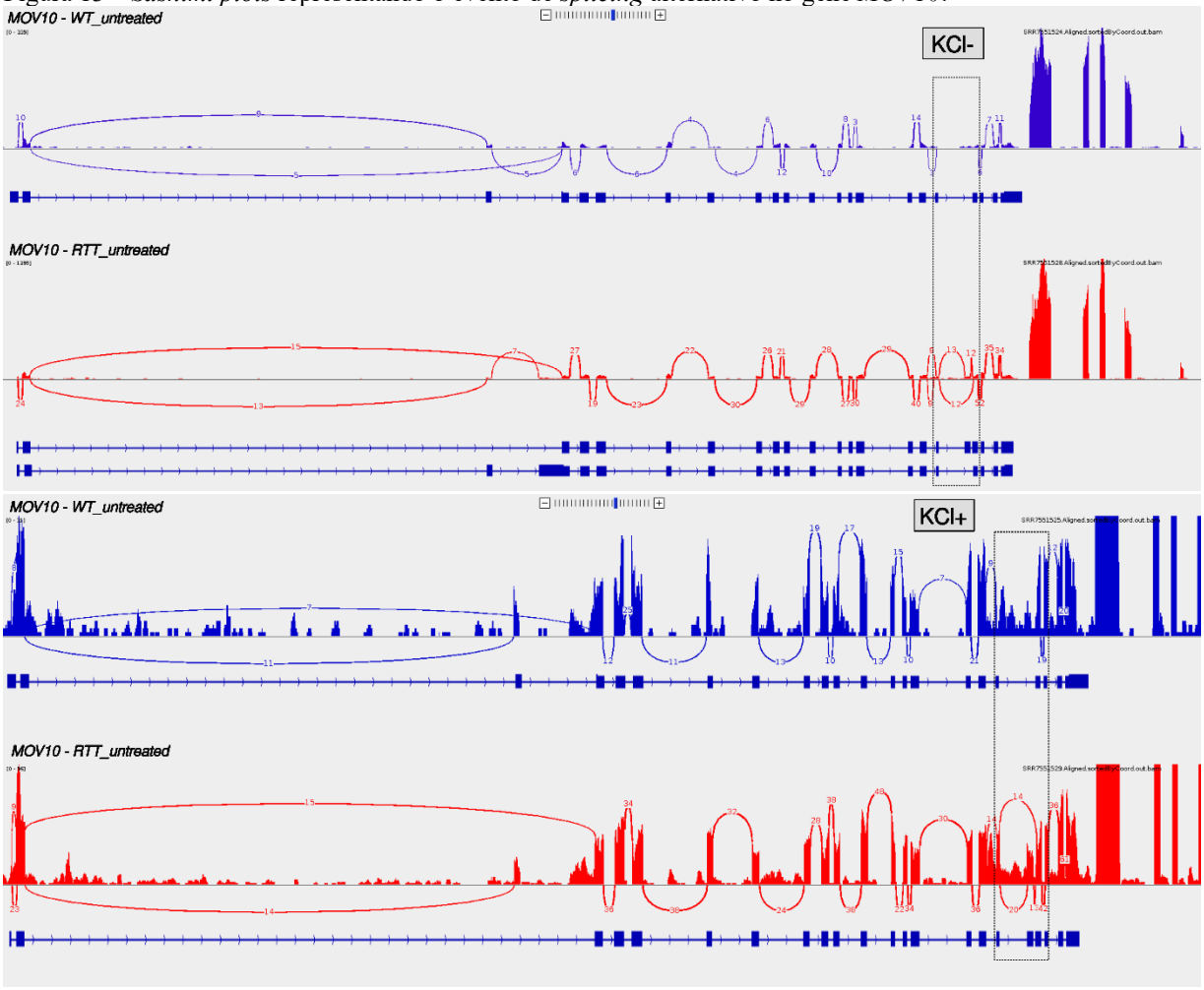


Legenda – Eventos de *splicing* alternativo em *ITGA3,* divididas em INs com despolarização da membrana (KCl+) e sem despolarização (KCl-). Para cada condição, o gene está representado na forma de um *sashimi plot*, onde os picos em azul (controle) e em vermelho (RTT) representam a cobertura de leituras alinhadas na região. Os arcos indicam leituras de junção de *splicing*, com a espessura do arco correlacionada com o número de leituras de junção abrangendo os dois éxons conectados pelo arco. Cada isoforma está

representada em azul abaixo de seu respectivo *sashimi plot*, os blocos azuis representam os éxons e as linhas entre os blocos representam os íntrons.
Fonte: A autora (2023).

Por último, o gene *MOV10* (Figura 13) codifica para uma Helicase de RNA. Esse gene é bem conhecido pelo seu papel associado ao fator Argonauta 2 (*AGO2*) do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que está envolvido no mecanismo de modulação de expressão de proteínas (MEISTER et al., 2005). Não menos relevante, *MOV10* também atua na inibição da retrotransposição e na regulação de projeções neuronais por meio da regulação de mRNAs que codificam para proteínas envolvidas no crescimento de neurites e citoesqueleto (BANERJEE; NEVEU; KOSIK, 2009; GOODIER; CHEUNG; KAZAZIAN, 2012; LANNOM et al., 2021; LI et al., 2013a). Já foi reportado que níveis normais de *MOV10* são necessários para o desenvolvimento normal da arborização dendrítica, sendo altamente expresso no cérebro em desenvolvimento com posterior redução da sua expressão na fase adulta (SKARIAH et al., 2017). *MOV10* também está com expressão significativamente aumentada nos dados analisados de RTT quando comparado ao controle (*FDR* <0,05), o que também pode estar relacionada com a alteração no crescimento de dendritos identificados nos experimentos que geraram os dados deste estudo (XIANG et al., 2020). Ainda em concordância, a expressão reduzida de *MOV10* em um modelo animal também provocou a redução no tamanho do soma de neurônios quando comparado a camundongos WT, sendo esta uma característica não só presente em RTT (RANGASAMY et al., 2016; XIANG et al., 2020), mas também em outros distúrbios ligados ao cromossomo X, como a Síndrome do X frágil (TELIAS et al., 2015). Outra associação importante é que MOV10 suprime os retroelementos no núcleo, principalmente de elementos nucleares longos intercalados do tipo 1 (LINE1), que tem sua expressão elevada durante a diferenciação neuronal (GOODIER; CHEUNG; KAZAZIAN, 2012; LI et al., 2013a; SKARIAH et al., 2017). Camundongos knockout *Mecp2* apresentam aumento nos eventos de retrotransposição de LINE1 bem como em pacientes RTT (MUOTRI et al., 2010; SKARIAH et al., 2017). De forma semelhante, a redução da expressão de *MOV10* também levou ao aumento da retrotransposição de LINE1 (LI et al., 2013a; SKARIAH et al., 2017). Portanto, tais dados recapitulam evidências indicando que é possível que, em células com redução ou perda da atividade em *MECP2,* a expressão de *MOV10* esteja sendo induzida para a repressão do aumento dos eventos de retrotransposição de LINE1.

Figura 13 – *Sashimi plots* representando o evento de *splicing* alternativo no gene *MOV10*.



Legenda – A figura mostra os eventos de *splicing* alternativo em *MOV10,* divididas em INs com despolarização da membrana (KCl+) e sem despolarização (KCl-). Para cada condição, o gene está representado na forma de um *sashimi plot*, onde os picos em azul (controle) e em vermelho (RTT) representam a cobertura de leituras alinhadas na região. Os arcos indicam leituras de junção de *splicing*, com a espessura do arco correlacionada com o número de leituras de junção abrangendo os dois éxons conectados pelo arco. Cada isoforma está representada em azul abaixo de seu respectivo *sashimi plot*, os blocos azuis representam os éxons e as linhas entre os blocos representam os íntrons. A caixa tracejada em preto indica a região de *splicing* alternativo no gene.
Fonte: A autora (2023).

Apesar de tais evidências, são necessárias análises complementares para uma melhor compressão de como os eventos de *splicing* alternativo detectado em *MOV10* e nos demais genes (*GOSR3* e *ITGA3*) estão relacionados com as alterações moleculares discutidas.

5.7 Análise de Ontologia Gênica e de enriquecimento de conjuntos de genes

Complementarmente à análise de expressão gênica, realizamos uma análise de GO e de enriquecimento de conjuntos de genes diferencialmente expressos entre as amostras de RTT e respectivos controle (WT). Observamos que os genes com maior expressão em RTT (*up-regulated genes*) foram enriquecidos principalmente para os processos de regulação das modificações de RNA, funções mitocondriais e energéticas da célula, processos de transporte e organização endossomal do complexo de golgi e do retículo endoplasmático (Figura 14). Vários estudos já reportaram a presença de mitocôndrias com alterações morfológicas e bioquímicas em RTT, o que implica em alteração na homeostase metabólica, incluindo energia e equilíbrio redox (BEBENSEE; CAN; MÜLLER, 2017; LI et al., 2013b; MÜLLER; CAN, 2014). Além disso, uma das principais características de RTT são as disfunções sinápticas que implicam na comunicação entre os neurônios (GOFFIN; ZHOU, 2012; SANDWEISS; BRANDT; ZOGHBI, 2020), o que está ligado não só com o metabolismo energético, como também a atividade anormal de cálcio na célula. Essa atividade anormal pode gerar sobrecarga de cálcio no retículo endoplasmático, que é o principal local deste cátion (DONG et al., 2018; SUN et al., 2022). Defeitos no complexo de golgi também já foram associados a outras condições neurológicas, uma vez que a regulação do tráfico molecular envolvendo o complexo de golgi e funções secretoras são críticas para a maturação cerebral, incluindo tráfico de compartimentos axonal e dendrítico (PASSEMARD et al., 2017).

A análise de GO em conjunto com análise de enriquecimento de vias metabólicas previamente conhecidas e estabelecidas em seres humanos, também demonstrou que os genes alterados em RTT encontram-se relacionadas com vias enriquecidas de modificação de RNA (Figura 14), destacando-se o complexo spliceossomal U2, que é essencial para o reconhecimento do ponto de ramificação (do inglês: *Branching Point -BP*) presente no íntron do transcrito de pré-mRNA durante a montagem do splicessomo (BLACK; CHABOT; STEITZ, 1985; KRÄMER et al., 1984).

Interessados também em estudar o que ocorre com o *splicing* em RTT, realizamos uma análise de sobreposição entre os genes alterados em RTT e os genes pertencentes ao atlas de *splicing* IARA. Identificamos 62 fatores de *splicing* com expressão significativamente alterada em RTT, dos quais, 16 genes ainda não apresentam correlação específica com qual complexo

da maquinaria do spliceossomo estão envolvidos. Além disso, outros 18 genes com *splicing* alternativo identificados são pertencentes ao complexo spliceossomal U2 (tabela 4).

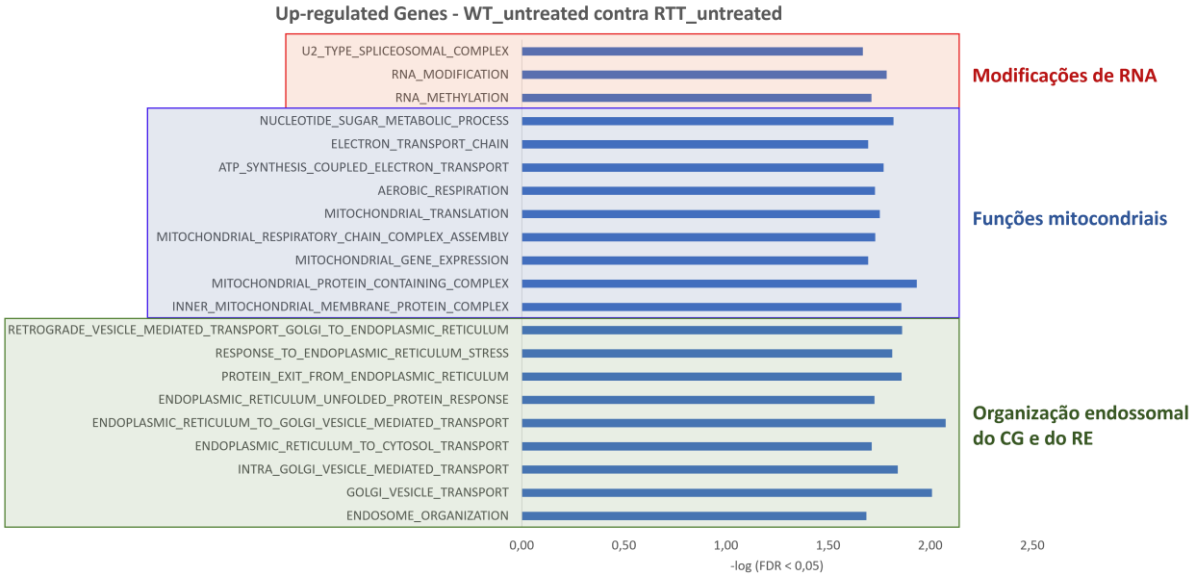
Tabela 4 – Genes com *splicing* alternativo identificados no transcriptoma de amostras de RTT e que são pertencentes ao complexo spliceossomal U2.

Símbolo	**Nome**	**FDR**
DDX46	*DEAD-Box Helicase 46*	0,0429
PTBP1	*Polypyrimidine Tract Binding Protein 1*	0,0498
PTBP2	*Polypyrimidine Tract Binding Protein 2*	0,0004
RNPS1	*RNA Binding Protein with Serine Rich Domain 1*	0,0198
SRSF2	*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*	0,0179
SRSF3	*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3*	0,0008
SRSF5	*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 5*	0,0301
HNRNPC	*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C*	0,0262
PCBP1	*Poly(RC) Binding Protein*	0,0384
SFPQ	*Splicing Factor Proline and Glutamine Rich*	0,0000
RBM5	*RNA Binding Motif Protein 5*	0,0012
SRSF6	*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 6*	0,0049
SF3A1	*Splicing Factor 3a Subunit 1*	0,0026
SF3A3	*Splicing Factor 3a Subunit 3*	0,0000
SF3B2	*Splicing Factor 3b Subunit 2*	0,0000
SF3B4	*Splicing Factor 3b Subunit 4*	0,0211
PHF5A	*PHD Finger Protein 5A*	0,0012
SNRPD2	*Small Nuclear Ribonucleoprotein D2 Polypeptide*	0,0022

Legenda – FDR: *False Discovery Rate*.
Fonte: A autora (2023).

Em seguida, verificamos se o tratamento com JQ1 foi capaz de reverter os eventos de expressão diferencial em RTT e daqueles pertencentes a maquinaria do spliceossomo. Para isso comparamos a expressão entre as amostras *WT_untreated* contra *RTT_treated*, e mais de 50% dos genes significativamente alterados em amostras de RTT deixaram de apresentar alteração significativa após as mesmas amostras de RTT serem tratadas com com a droga JQ1. Além disso, a análise GO para a comparação entre as amostras *WT_untreated* contra *RTT_treated* também não apresentou conjuntos de genes significativamente enriquecidos para as vias de *splicing* e edição de RNA que estão alteradas em RTT sem o tratamento com a droga JQ1. Todas as demais vias que estão significativamente enriquecidas em RTT (Figura 14) deixaram de apresentar alteração significativa após o tratamento com JQ1.

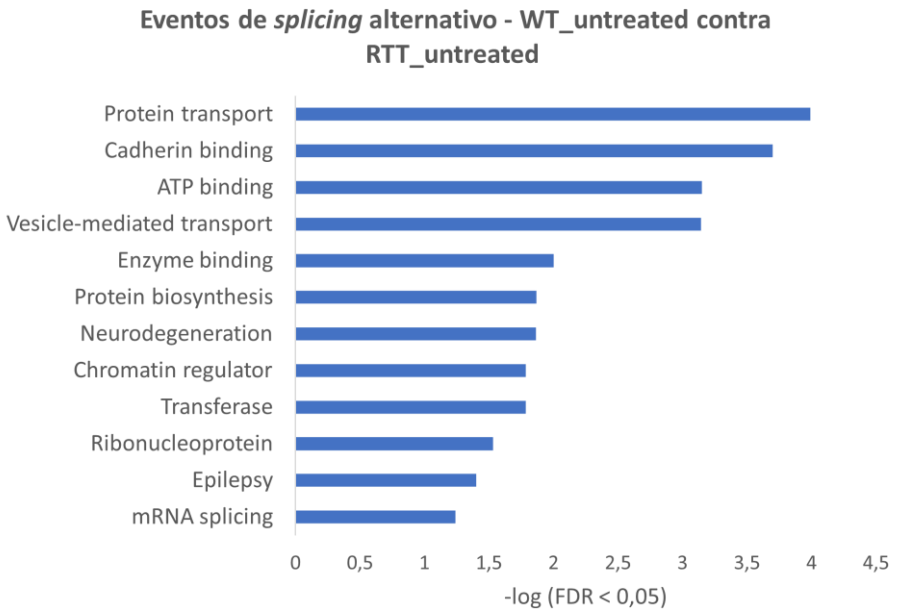
Figura 14 – Vias enriquecidas (FDR < 0,05) para genes com alta expressão significativa em células mutantes *MECP2* (*RTT_untreated*) quando comparadas a células controle (*WT_untreated*).



Legenda: As vias com funções semelhantes foram agrupadas em 3 funções principais destacadas em vermelho, azul e verde.
Fonte: A autora (2023).

Em seguida, realizamos análise de GO em conjunto com análise de enriquecimento de vias metabólicas para os genes que apresentaram eventos de *splicing* alternativo quando comparamos as amostras *WT_untreated* e *RTT_untreated*. Algumas limitações ainda são encontradas nas ferramentas atuais de detecção de eventos de *splicing* a partir de dados de RNA-seq, o que pode levar a detecção de eventos falso-positivos e falso-negativos (MEHMOOD et al., 2020). As variações na profundidade de sequenciamento é um dos principais fatores que influência na detecção errônea de eventos de *splicing*, levando a necessidade de posterior validação *in sílico* utilizando ferramentas de verificação e curagem manual. Diante disso, aplicamos um conjunto de módulos de processamento de dados fornecidos a partir da ferramenta *SpliceTools* v.1.1 (FLEMINGTON et al., 2023), que permitem a filtragem de eventos de *splicing* de SE e RI significativos detectados com o uso da ferramenta rMATS, levando em consideração dados de expressão gênica normalizada para cada amostra. A partir disso, realizamos a análise de enriquecimento para os genes que estão sofrendo *splicing* alternativo quando comparamos *WT_untreated* e *RTT_untreated* (Figura 15).

Figura 15 – Vias enriquecidas em células mutantes *MECP2* comparado a células controle (WT) para os genes com eventos de *splicing* alterados significativamente entre as amostras.



Fonte: A autora (2023).

Consistente com a análise de enriquecimento para os genes com expressão alterada, aqui também podemos observar alterações significativas (FDR < 0,05) em vias ligadas com a edição de RNA (*ribonucleoproteins* e *splicing*), funções mitocondriais e energéticas da célula (atividades de transferases e proteínas de ligação ao ATP) e processos de transporte e organização endossomal (Vesicle-mediated transport e Protein transport). Além disso, os genes com eventos de *splicing* alterado foram enriquecidos para o processo de regulação da cromatina, que é totalmente consistente com o papel já descrito de MECP2 como componente chave da heterocromatina constitutiva, que é crucial para a manutenção dos cromossomos e silenciamento transcricional (LI et al., 2020). Tais dados evidenciam ainda mais a associação da desregulação de eventos de *splicing* com os fenótipos moleculares observados em RTT. Mais intrigante ainda é o fato de que há eventos alterados de *splicing*, também de forma enriquecida, para neurodegeneração e epilepsia, fenótipos característicos de RTT (GOFFIN; ZHOU, 2012; SMEETS; PELC; DAN, 2012).

5.8 Análise ChIP-seq

Conforme descrito, identificamos alteração significativa no gene *SLU7* nas amostras de RTT tanto a nível de expressão gênica, como também na expressão alternativa de isoforma de *splicing* quando comparado ao controle. Para investigar se MECP2 está se ligando nas regiões ricas em GC presentes no gene *SLU7* e por consequência, se está envolvido na regulação direta da expressão desse gene, analisamos dados de ChIP-seq para o mapeamento das regiões de ligação direta de MECP2 no genoma humano. Para isso, aplicamos o *pipeline* da ferramenta *Homer*, que executa todas as análises de identificação e chamadas de pico (relativos com a ocupação do fator de transcrição MECP2 em regiões distintas do genoma).

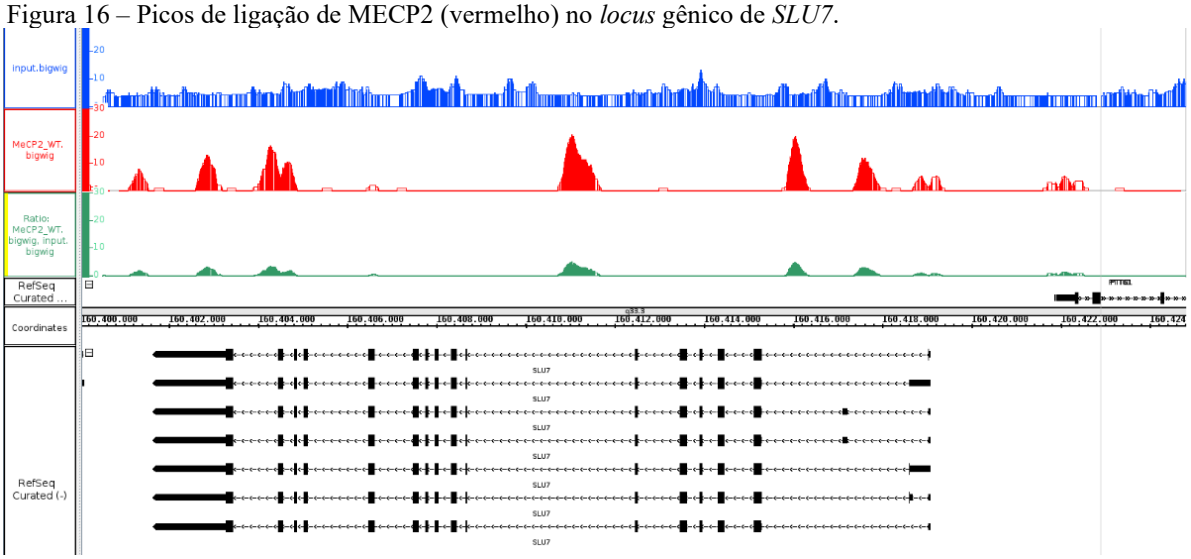
Como resultado, observamos que MECP2 apresentou picos significativos de ocupação ao longo do *locus* do gene *SLU7*, principalmente em regiões intrônicas e ricas em conteúdo GC (Tabela 5 e Figuras 16 e 17). Embora as regiões CpG no promotor de *SLU7* apresentem pequenos picos (Figura 16), estes não apresentaram significância estatística. Por outro lado, quatro picos significativos foram detectados ao longo do gene *SLU7* (Tabela 5), os quais se concentraram principal em regiões de íntron e um deles (PeakID: 5-41608) está próximo da região retida durante o evento de *splicing* alternativo em *SLU7* aqui descrito (Figura 9). Tais evidências, fundamentam ainda mais a hipótese de que MECP2 pode de fato estar regulando diretamente a expressão do gene *SLU7*, assim como também pode ter um papel na regulação do evento de *splicing* alternativo detectado neste estudo.

Tabela 5 – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *SLU7.*

Gene	*PeakID*	Chr	*Start*	*End*	*p-value*
SLU7	5-1727	5	34791820	34792084	9,47E-28
SLU7	5-76750	5	160410895	160411159	1,82E-8
SLU7	5-14037	5	160415921	160416185	6,44E-14
SLU7	5-41608	5	160417438	160417702	2,07E-7

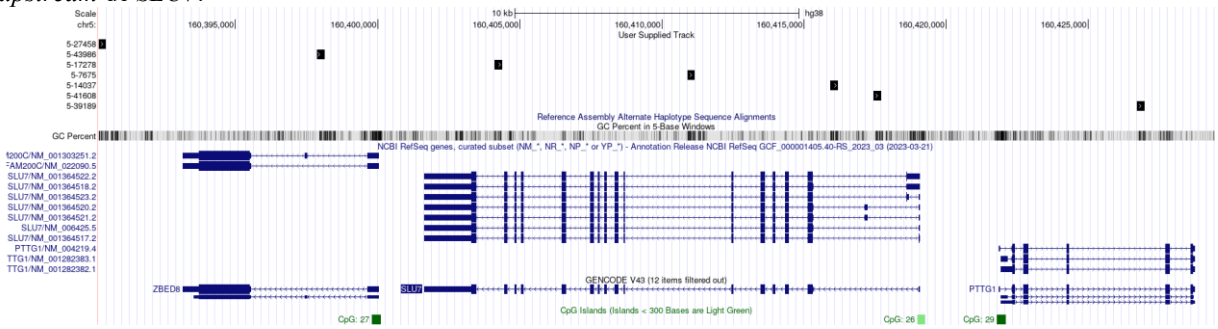
Legenda – PeakID: nome exclusivo para cada pico; Chr: cromossomo onde o pico está localizado; *Start*: posição inicial do pico; *End:* posição final do pico; p-value: significância atribuída a ocorrência do pico.
FONTE: A autora (2023).

Figura 16 – Picos de ligação de MECP2 (vermelho) no *locus* gênico de *SLU7*.



Legenda – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *SLU7*. Azul: input.bigwig, específica os picos do diretório de tags do experimento de controle (sem imunopreciptação com anticorpo específico); Vermelho: MeCP2_WT.bigwig, picos do diretório de tags do experimento de imunopreciptação de MECP2; Verde: Calculo da razão entre o experimento controle e de MECP2, filtrando possíveis picos com resultado falso positivo.
Fonte: A autora (2023).

Figura 17 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica codificante do gene *SLU7* e regiões próximas *down* e *upstream* de *SLU7*.

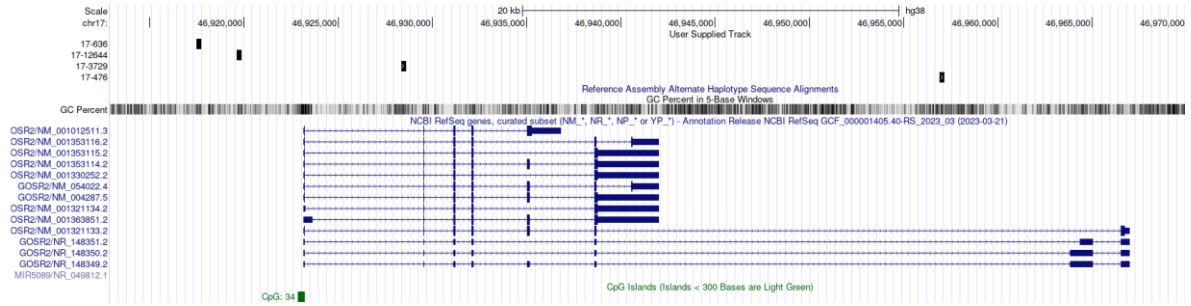


Legenda – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *SLU7*. Parte superior: tags em preto marcando as regiões de pico ocupadas por MECP2; GC *Percent*: representação de regiões ricas em conteúdo GC, quanto mais escuro maior a quantidade de GC presente; NCBI RefSeq: Anotação das Isoformas dos genes.
Fonte: A autora (2023).

Além do gene *SLU7*, verificamos se MECP2 está se ligando aos genes *GOSR2*, *ITGA3* e *MOV10*, que também apresentaram isoformas de *splicing* alternativo nos dados de transcriptoma de RTT analisados nesta pesquisa, conforme já discutido anteriormente. Destes, apenas *GOSR2* apresentou forte ocupação de MECP2, com picos significativos de ligação tanto no *locus* do gene quando em sua região *upstream* (Figura 18). *GOSR2* está com sua expressão aumentada nos dados de RTT (FDR < 0,05), o que pode indicar que em células WT a proteína MECP2 atue na repressão de *GOSR2*. *ITGA3* e *MOV10* não apresentaram picos significativos

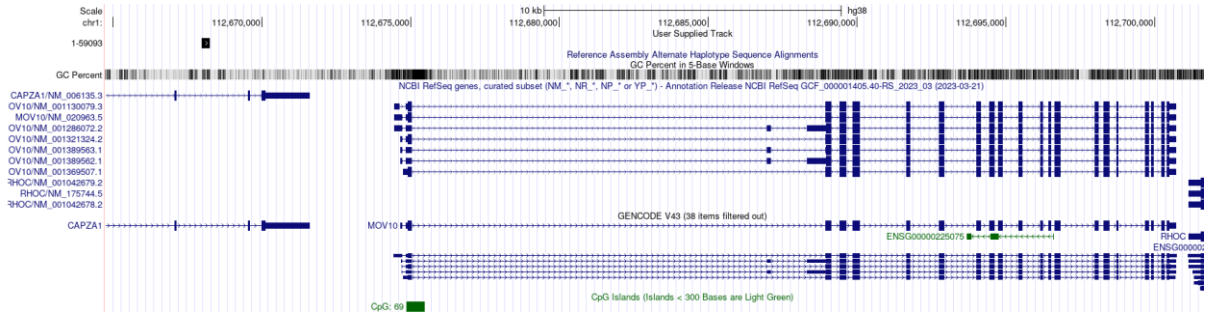
de ligação de MECP2, embora *MOV10* tenha apresentado um pico de ocupação de MECP2 em sua região *upstream* (Figura 19), o que pode estar ligado a uma região de regulação de sua transcrição por MECP2. Tais achados requerem experimentos adicionais para que sejam confirmados de forma definitiva.

Figura 18 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica de *GOSR2*.



Legenda – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *GOSR2*. Parte superior: tags em preto marcando as regiões de pico ocupadas por MECP2; GC *Percent*: representação de regiões ricas em conteúdo GC, quanto mais escuro maior a quantidade de GC presente; NCBI *RefSeq*: Anotação das Isoformas dos genes.
Fonte: A autora (2023).

Figura 19 – Picos de ligação de MECP2 na região gênica de MOV10.



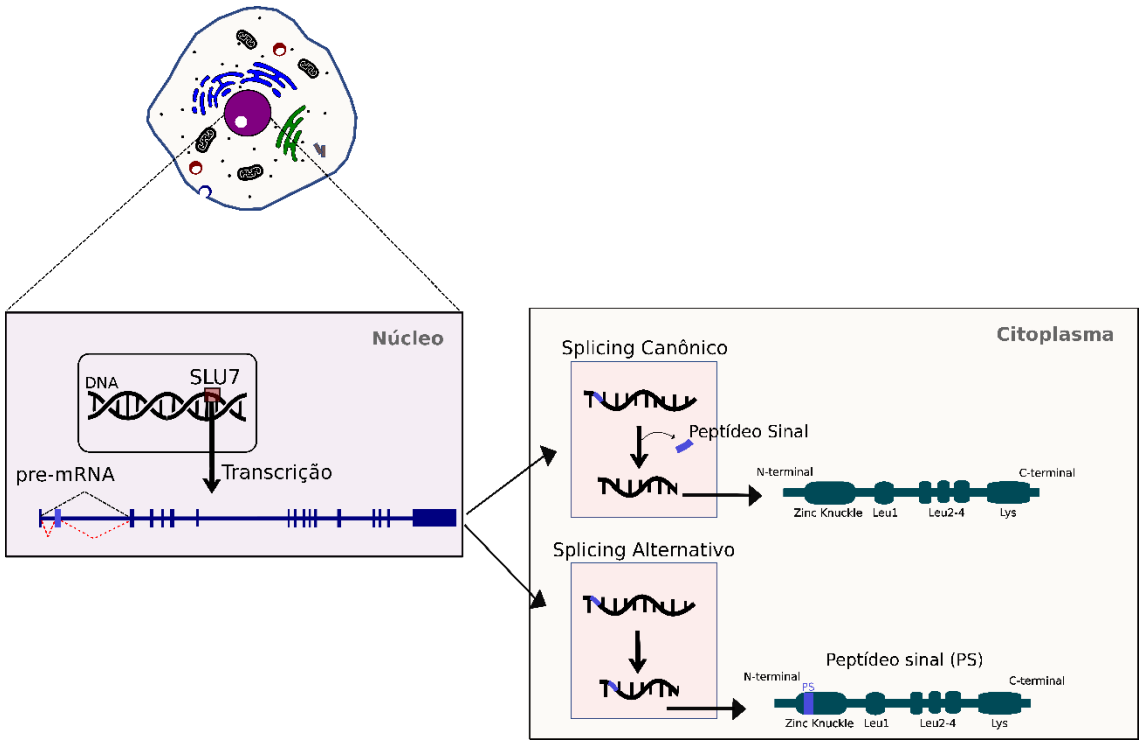
Legenda – Eventos de pico de ligação de MECP2 em *MOV10*. Parte superior: tags em preto marcando as regiões de pico ocupadas por MECP2; GC *Percent*: representação de regiões ricas em conteúdo GC, quanto mais escuro maior a quantidade de GC presente; NCBI *RefSeq*: Anotação das Isoformas dos genes.
Fonte: A autora (2023).

5.9 Análise de domínios de proteínas relacionados com eventos de *splicing*

Como discutido anteriormente, já foi relado que alterações nos níveis nucleares de SLU7 pode ter impacto na geração de eventos de *splicing* alternativo na célula (SHOMRON et al., 2005). Portanto, uma vez que o evento de *splicing* detectado em *SLU7* se encontra na região N-terminal de seu transcrito, levantamos a hipótese de que o *splicing* alternativo deste gene, detectado em amostras de RTT, pode estar alterando um domínio de peptídeo sinal na região N-

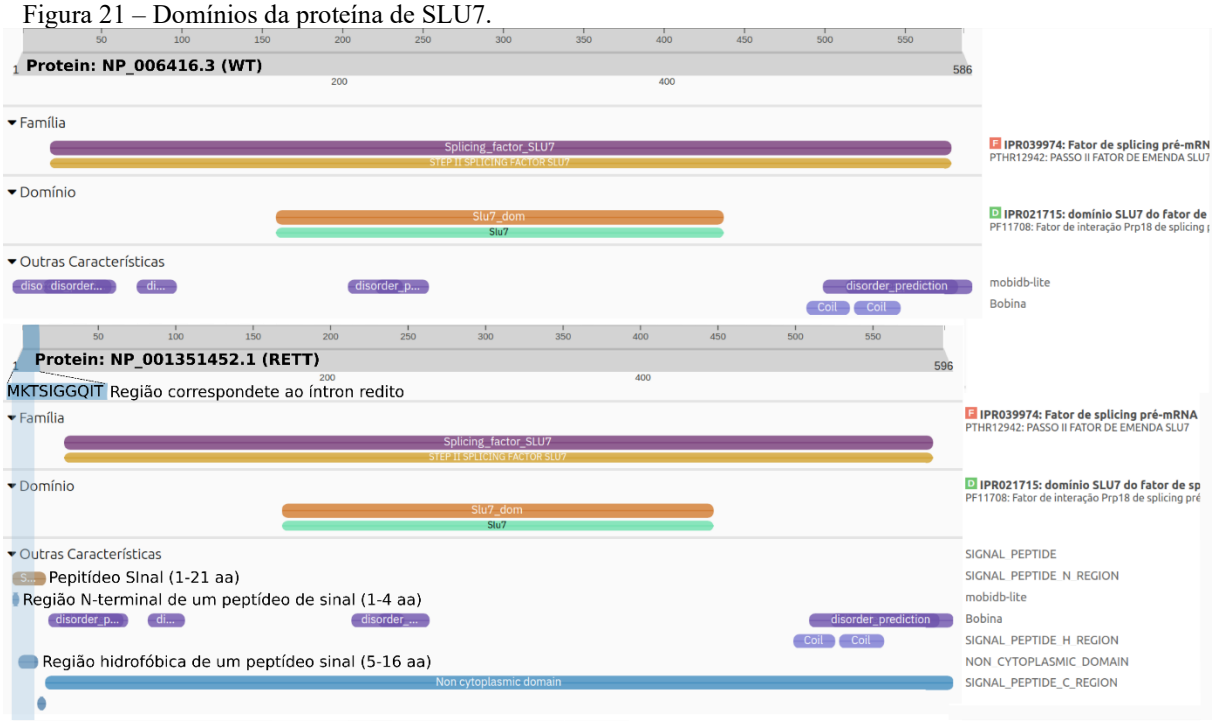
terminal da proteína de SLU7 (Figura 20). Para fundamentar essa hipótese, utilizamos a ferramenta InterPro para análise de domínios de proteína. Neste contexto, verificamos que, de fato, o íntron retido na isoforma presente nas amostas de RTT apresenta a adição de 10 novos aminoácidos (MKTSIGGQIT) na proteína de SLU7, resultando em 3 possíveis regiões de peptídeo sinal envolvendo a região N-terminal da proteína (Figura 21). É importante salientar que as regiões de peptídeo sinal destacadas não estão anotadas diretamente na base de dados do InterPro, pois trata-se de uma informação recuperada a partir da ferramenta Phobius, um programa que permite análises de predição peptídeo sinal a partir de uma sequência de aminoácido de proteína (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007). Embora os dados ainda não sejam conclusivos, os resultados obtidos indicam que a regulação da localização celular da proteína SLU7 pode estar sendo afetada pelo evento de *splicing* alternativo detectado em RTT e que isso, por consequência, pode estar envolvido com a desregulação das vias metabólicas discutidas neste estudo (Figura 20).

Figura 20 – Representação esquemática do possível efeito funcional do evento de *splicing* alternativo em SLU7.



Fonte: A autora (2023).

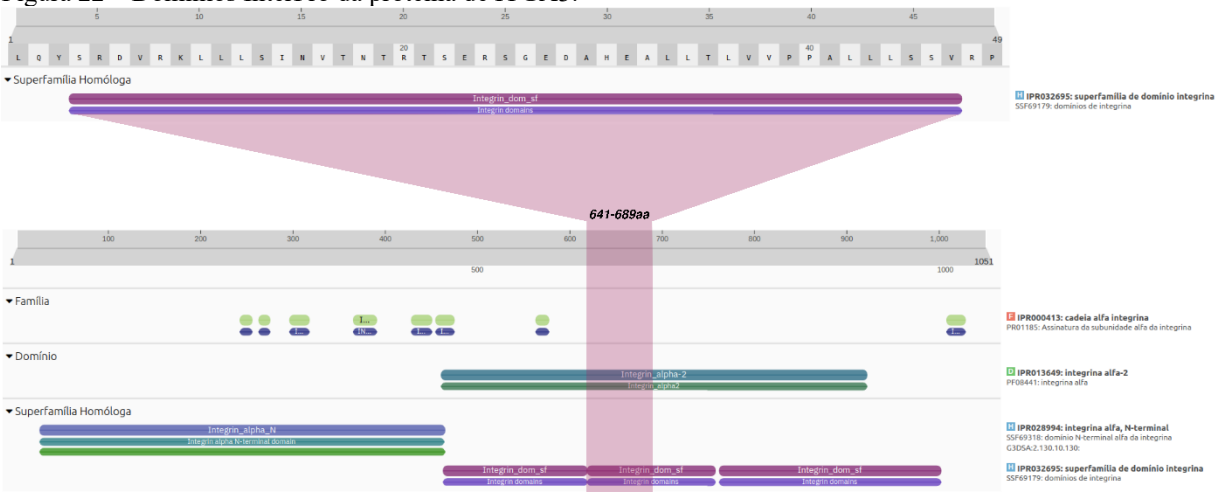
Figura 21 – Domínios da proteína de SLU7.



Legenda: Figura gerada a partir da ferramenta InterPro. A parte superior da figura demonstra os domínios de proteína codificados a partir da isoforma da *splicing* de *SLU7* expressa em nossos dados de INs WT. A parte inferior da figura demonstra os domínios de proteína codificados a partir da isoforma da *splicing* de *SLU7* expressa em nossos dados de INs com a mutação R133C em *MECP2*, presente em RTT. A isoforma de RTT apresenta a inclusão de 10aa na sua região N-terminal, o que leva a inclusão de sequencias de peptídeo sinal que não estão presentes em sua isoforma canônica.
Fonte: A autora (2023).

Também investigamos alterações a nível de domínios proteicos para os demais genes que sofreram *splicing* discutidos neste estudo (Tabela 4). Ao investigar a sequência de nucleotídeos correspondente ao salto de éxon do gene *ITGA3* (Figura 12), verificamos que a região corresponde é uma cadeia de integrina alfa na estrutura da proteína (Figura 22). O domínio integrina alfa de ITGA3 atua no reconhecimento de proteínas da matriz extracelular, como glicoproteínas e o colágeno, influenciando diretamente no seu papel na regulação da migração celular e desenvolvimento de tecidos (COOPER; GIANCOTTI, 2019; ELLERT-MIKLASZEWSKA et al., 2020). ITGA3 já foi relatado como um regulador da migração neuronal e corticogênese (JONES; VAN DER FLIER; SONNENBERG, 1998; TAKADA et al., 1991), e desregulação nesse mecanismo já foi observado em RTT (FELDMAN; BANERJEE; SUR, 2016). Desta forma, é possível que o evento de *splicing* alternativo em *ITGA3*, detectado nos dados de RTT desta pesquisa, esteja desempenhado um papel significativo nos fenótipos neurológicos observados na síndrome.

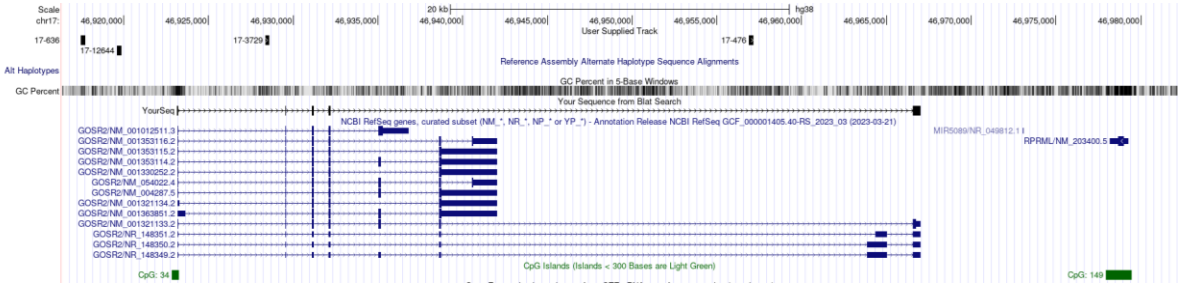
Figura 22 – Domínios InterPro da proteína de ITGA3.



Legenda: Figura gerada a partir da ferramenta InterPro. A parte superior da figura representa a região de salto de éxon excluída na isoforma de *SLU7* expressa em nossos dados de INs com a mutação R133C em *MECP2*, presente em RTT. A parte inferior da figura demonstra os domínios de proteína codificados a partir da isoforma da *splicing* canônica de *ITGA3*. É possível identificar que o evento de salto de éxon detectado em RTT é correspondente a uma cadeia de integrina alfa na estrutura da proteína.
Fonte: A autora (2023).

Quanto ao evento de *splicing* detectado em *MOV10*, embora o evento de retenção de intron já tenha sido anotado previamente (ENST00000688698), a anotação se trata de uma isoforma de tamanho reduzido, sem a presença de vários éxons anotados na isoforma canônica. Consequentemente, essa isoforma não possui uma sequência de proteína já descrita. Além disso, ao buscarmos por domínios de proteínas presentes no local da sequência do íntron retido, nenhum domínio correspondente foi detectado. Já o gene *GOSR2* apresentou um evento novo de *splicing* (Figura 23), onde é possível observar a ocorrência de vários éxons consecutivos. Também não foi possível detectar a ocorrência de domínios de proteínas relacionadas com a região alternativa do *splicing* no gene *GOSR2*.

Figura 23 – Nova isoforma detectada de *GOSR2*.



Legenda – Yourseq: Corresponde ao novo evento de *splicing* detectado nos dados de RTT. Anotação completa do gene *GOSR2* contendo as informações de: os eventos de pico de ligação de MECP2 em *GOSR2* (parte superior: *tags* em preto marcando as regiões de pico ocupadas por MECP2); GC *Percent* com o conteúdo GC na sequência; e NCBI *RefSeq* com a anotação das Isoformas dos genes.
Fonte: A autora (2023).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi gerado um atlas de moléculas que regulam o *splicing*, totalmente curado, assim como um mapa que descreve todas as etapas envolvidas no mecanismo de *splicing* em seres humanos.

A partir da análise de dados de transcriptoma de indivíduos com RTT, detectamos vários genes com a expressão alterada, incluindo moléculas que fazem parte da maquinaria do spliceossomo, assim como eventos de *splicing* alternativo ocorrendo exclusivamente em interneurônios de organoides da MGE com mutação patogênica em *MECP2*. A análise de enriquecimento de vias metabólicas para os genes com expressão alterada em RTT foi consistente com processos frequentemente alterados na condição, dentre eles as vias de modificações de RNA, funções mitocondriais, processos de transporte e organização endossomal do Complexo de Golgi e do reticulo endoplasmático. O complexo spliceossomal U2 apresentou alteração significativa nos dados de RTT, destacando a importância desse mecanismo nas alterações moleculares e fenotípicas presentes em RTT. Complementar a isso, a análise de enriquecimento para os genes que apresentaram eventos de *splicing* alternativo se mostrou consistente com a análise anterior, ressaltando ainda os fenótipos de neurodegeneração e epilepsia, característicos de RTT. O impacto da droga JQ1 em amostras de RTT foi capaz de reverter grande parte das alterações transcricionais causadas pela mutação no gene *MECP2,* tanto a nível de expressão quanto na reversão de eventos de *splicing* alternativo. Recuperando por consequência, todas as vias alteradas pela mutação.

O gene *SLU7* apresentou expressão aumentada em INs de RTT, assim como um evento de RI na região N-terminal de seu transcrito. Ambos, tanto a expressão como o evento de *splicing* alternativo detectado em *SLU7* foram revertidos pelo tratamento com JQ1. Concordante a isso, a análise de dados de ChIP-seq identificou que MECP2 apresenta picos de ocupação significativos no gene *SLU7*, indicando pela primeira vez que MECP2 pode estar ligado diretamente com a regulação da expressão de *SLU7* em células neuronais. Além disso, a isoforma de *splicing* de *SLU7* detectada nos dados de RTT gera uma cadeia peptídica de 10 aa na proteína de SLU7, a qual foi associada a regiões de peptídeo sinal em sua cadeia peptídica. Uma vez que alterações nos níveis nucleares de SLU7 pode ter impacto na geração de eventos de *splicing* alternativo na célula, apresentamos aqui pela primeira vez evidências de que a

regulação da localização celular da proteína SLU7 pode estar sendo afetada por um evento de *splicing* alternativo em RTT e que isso pode estar levando alterações em fenótipos celulares encontrados nesta síndrome.

Outros genes também foram encontrados com o *splicing* alterado em RTT, dentre eles destacamos os genes *GOSR2*, *MOV10* e *ITGA3*, envolvidos respectivamente no tráfico de Golgi, silenciamento pós-transcricional de genes e migração celular. Todos os três genes possuem funções que estão associadas com as vias desreguladas em RTT. Em especial, o evento de *splicing* de SE detectado no gene *ITGA3*, que corresponde a uma cadeia de integrina alfa na estrutura de sua proteína, o qual está ligado com a regulação dos processos de migração neuronal.

Em conjunto, esses resultados reforçam a importância do mecanismo de *splicing* na regulação dos fenótipos celulares alterados em RTT. Também apresenta evidências *in silico* de que o tratamento com a droga JQ1 é capaz de reverter alterações na expressão a nível de isoformas de *splicing*, promovendo mais evidências que apoiam o estudo de novos fármacos para o tratamento de pacientes com RTT. Além disso, apresentamos pela primeira vez evidências de que o gene *SLU7* é regulado diretamente por MECP2 e que a conexão entre sua isoforma de *splicing* alternativa e a sua localização celular em RTT pode estar ligada a vários fenótipos celulares observados na síndrome, incluindo a própria regulação do *splicing*. Em concordância, também mapeamos novos eventos de *splicing* alternativo em RTT relacionados a genes essenciais para vias metabólicas alteradas na síndrome.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados se mostrem promissores, nosso estudo possui algumas limitações, dentre elas está o número reduzido de amostras por experimento. Quando se trata de análise de dados ômicos, vários fatores podem influenciar os resultados obtidos, tais como variações experimentais, baixa qualidade de reagentes, erros de sequenciamento e falhas de captura de eventos, logo um número maior de amostras e réplicas experimentais aumentam significativamente o poder estatístico dos achados biológicos. Além disso, algumas limitações ainda são encontradas nas ferramentas atuais de detecção de eventos de *splicing* a partir de dados de RNA-seq. Fatores como o tamanho curto das leituras de sequenciamento, um número pequeno de réplicas por amostra, variações na profundidade de sequenciamento e os fatores que podem gerar variações entre as amostras ainda durante o processo de geração dos dados podem influenciar na detecção de eventos de *splicing* alterados.

Logo, as etapas futuras contarão com validação experimental dos resultados aqui discutidos, incluindo os eventos de *splicing* detectados e a possível associação funcional desses genes com os fenótipos presentes em RTT. A validação experimental contribuirá para uma melhor compreensão do papel molecular do mecanismo de *splicing* em RTT, possibilitando a identificação de potenciais biomarcadores relacionados com isoformas de *splicing* exclusivamente expressos em células de pacientes RTT e impulsionará o estudo e desenvolvimento de novos tratamentos futuros.

REFERÊNCIAS

ACADIA PHARMACEUTICALS ANNOUNCES U.S. FDA approval of DAYBUE (trofinetide) for the treatment of Rett syndrome in adult and pediatric patients two years of age and older. **Acadia Pharmaceuticals**. March 10, 2023. Accessed March 13, 2023.

AGAFONOV, D. E. et al. Molecular architecture of the human U4/U6.U5 tri-snRNP. p. 1416–20, 2016.

ALBERSTEIN, M. et al. Regulation of transcription of the RNA splicing factor hSlu7 by Elk-1 and Sp1 affects alternative splicing. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 11, p. 1988–1999, nov. 2007.

APWEILER, R. et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 37, 1 jan. 2001.

ARANDA-ABREU, G. E. et al. Alternative Splicing in Alzheimer's Disease. **Journal of Parkinson's disease and Alzheimer's disease**, v. 2, n. 2, p. 39–50, jan. 2015.

BANERJEE, S.; NEVEU, P.; KOSIK, K. S. A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation. **Neuron**, v. 64, n. 6, p. 871–884, 24 dez. 2009.

BARALLE, F. E.; GIUDICE, J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2017 18:7**, v. 18, n. 7, p. 437–451, 10 maio 2017.

BEBENSEE, D. F.; CAN, K.; MÜLLER, M. Increased Mitochondrial Mass and Cytosolic Redox Imbalance in Hippocampal Astrocytes of a Mouse Model of Rett Syndrome: Subcellular Changes Revealed by Ratiometric Imaging of JC-1 and roGFP1 Fluorescence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1 jan. 1995.

BERTRAM, K. et al. Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. **Nature 2017 542:7641**, v. 542, n. 7641, p. 318–323, 11 jan. 2017a.

BERTRAM, K. et al. Cryo-EM Structure of a Pre-catalytic Human Spliceosome Primed for Activation. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 701- 713.e11, 10 ago. 2017b.

BLACK, D. L.; CHABOT, B.; STEITZ, J. A. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. **Cell**, v. 42, n. 3, p. 737–750, 1 out. 1985.

BOGGIO, E. M. et al. Synaptic determinants of Rett syndrome. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 2, n. aug, 2010.

BOISSÉ LOMAX, L. et al. 'North Sea' progressive myoclonus epilepsy: phenotype of subjects with GOSR2 mutation. **Brain**, v. 136, n. 4, p. 1146–1154, 1 abr. 2013.

BRAY, N. L. et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology 2016 34:5**, v. 34, n. 5, p. 525–527, 4 abr. 2016.

BRITO, D. V. C. et al. MeCP2 gates spatial learning-induced alternative splicing events in the mouse hippocampus. **Molecular Brain**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2020.

BRYS, A.; SCHWER, B. Requirement for SLU7 in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site. **RNA**, v. 2, n. 7, p. 707, 1996.

CASTRO, J. et al. Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 27, p. 9941–9946, 8 jul. 2014.

CHAHROUR, M.; ZOGHBI, H. Y. **The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology**. **Neuron**Elsevier, 8 nov. 2007.

CHAN, S. P. et al. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 279–282, 10 out. 2003.

CHANG, Q. et al. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. **Neuron**, v. 49, n. 3, p. 341–348, 2 fev. 2006.

CHEN, M.; MANLEY, J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2009 10:11**, v. 10, n. 11, p. 741–754, set. 2009.

CHEN, T. et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. **Nature Genetics 2007 39:3**, v. 39, n. 3, p. 391–396, 18 fev. 2007.

CHENG, P.-L. et al. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 45, p. 18430–18435, 8 nov. 2011.

CHENG, T. L. et al. Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 17 fev. 2017a.

CHENG, T. L. et al. Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. **Scientific Reports**, v. 7, 17 fev. 2017b.

CHUA, K.; REED, R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. **Nature**, v. 402, n. 6758, p. 207–210, 11 nov. 1999.

CLAVERIA-GIMENO, R. et al. The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 31 jan. 2017.

COOPER, J.; GIANCOTTI, F. G. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. **Cancer Cell**, v. 35, n. 3, p. 347–367, 18 mar. 2019.

CORBETT, M. A. et al. A Mutation in the Golgi Qb-SNARE Gene GOSR2 Causes Progressive Myoclonus Epilepsy with Early Ataxia. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 5, p. 657, 5 may 2011.

DELLA SALA, G.; PIZZORUSSO, T. Synaptic plasticity and signaling in Rett syndrome. **Developmental neurobiology**, v. 74, n. 2, p. 178–196, fev. 2014.

DENNIS, G. et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. **Genome biology**, v. 4, n. 5, p. 1–11, 14 ago. 2003.

DEVAIAH, B. N. et al. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. **Nature Structural & Molecular Biology 2016 23:6**, v. 23, n. 6, p. 540–548, 9 may 2016.

DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.

DONG, Q. et al. Mechanism and consequence of abnormal calcium homeostasis in rett syndrome astrocytes. **eLife**, v. 7, 29 mar. 2018.

DRAGICH, J.; HOUWINK-MANVILLE, I.; SCHANEN, C. Rett syndrome: a surprising result of mutation in MECP2. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 16, p. 2365–2375, 1 oct. 2000.

DVINGE, H. Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives. **FEBS Letters**, v. 592, n. 17, p. 2987–3006, 1 sept. 2018a.

DVINGE, H. **Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives**. **FEBS Letters**Wiley Blackwell, , 1 set. 2018b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29856907/>. Acesso em: 21 fev. 2021

EGMOND, M. E. VAN et al. Cortical Myoclonus in a Young Boy with GOSR2 Mutation Mimics Chorea. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 2, n. 1, p. 61, mar. 2015.

EHRHART, F. et al. A catalogue of 863 Rett-syndrome-causing MECP2 mutations and lessons learned from data integration. **Scientific Data 2021 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 15 jan. 2021.

ELIZALDE, M. et al. Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2909, 7 jul. 2014.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, A. et al. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 1 fev. 2020.

FELDMAN, D.; BANERJEE, A.; SUR, M. Developmental Dynamics of Rett Syndrome. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

FILIPPAKOPOULOS, P. et al. Selective inhibition of BET bromodomains. **Nature 2010 468:7327**, v. 468, n. 7327, p. 1067–1073, 24 set. 2010.

FLEMINGTON, E. K. et al. SpliceTools, a suite of downstream RNA splicing analysis tools to investigate mechanisms and impact of alternative splicing. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 7, p. e42–e42, 24 abr. 2023.

FONG, N. et al. Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. **Genes & Development**, v. 28, n. 23, p. 2663–2676, 1 dez. 2014.

FREESE, N. H.; NORRIS, D. C.; LORAINE, A. E. Integrated genome browser: visual analytics platform for genomics. **Bioinformatics**, v. 32, n. 14, p. 2089–2095, 15 jul. 2016.

FREILINGER, M. et al. Survival with Rett syndrome: comparing Rett's original sample with data from the Australian Rett Syndrome Database. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 52, n. 10, p. 962–965, 1 out. 2010.

GADALLA, K. K. et al. Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene transfer to neonatal and juvenile male Mecp2 knockout mice. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 21, n. 1, p. 18–30, 2013.

GADALLA, K. K. E.; BAILEY, M. E. S.; COBB, S. R. **MeCP2 and Rett syndrome: Reversibility and potential avenues for therapy**. **Biochemical Journal**Portland Press, , 1 out. 2011.

GÁRATE-RASCÓN, M. et al. Splicing Factor SLU7 Prevents Oxidative Stress-Mediated Hepatocyte Nuclear Factor 4α Degradation, Preserving Hepatic Differentiation and Protecting From Liver Damage. **Hepatology**, v. 74, n. 5, p. 2791–2807, 1 nov. 2021.

GÁRATE-RASCÓN, M. et al. SLU7: A New Hub of Gene Expression Regulation—From Epigenetics to Protein Stability in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 13411**, v. 23, n. 21, p. 13411, 2 nov. 2022.

GARG, S. K. et al. Systemic Delivery of MeCP2 Rescues Behavioral and Cellular Deficits in Female Mouse Models of Rett Syndrome. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 34, p. 13612–13620, 21 ago. 2013.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, p. R80, jan. 2004.

GIULIETTI, M. et al. SpliceAid-F: A database of human splicing factors and their RNA-binding sites. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D125, 1 jan. 2013.

GLAZE, D. G. et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Study of Trofinetide in the Treatment of Rett Syndrome. **Pediatric Neurology**, v. 76, p. 37–46, 1 nov. 2017.

GOFFIN, D.; ZHOU, Z. (JOE). The neural circuit basis of Rett syndrome. **Frontiers in biology**, v. 7, n. 5, p. 428, 1 out. 2012.

GOOD, K. V.; VINCENT, J. B.; AUSIÓ, J. **MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics**. **Frontiers in Genetics**Frontiers Media S.A., , 21 jan. 2021.

GOODIER, J. L.; CHEUNG, L. E.; KAZAZIAN, H. H. MOV10 RNA Helicase Is a Potent Inhibitor of Retrotransposition in Cells. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 10, p. e1002941, out. 2012.

GOTTMANN, K.; MITTMANN, T.; LESSMANN, V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. **Experimental brain research**, v. 199, n. 3–4, p. 203–234, dez. 2009.

GRABOWSKI, P. J.; SHARP, P. A. Affinity Chromatography of Splicing Complexes: U2, U5, and U4 + U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles in the Spliceosome. **Science**, v. 233, n. 4770, p. 1294–1299, 1986.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 22 maio 2015.

HEINZ, S. et al. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. **Molecular Cell**, v. 38, n. 4, p. 576–589, 28 maio 2010.

ITO-ISHIDA, A. et al. Loss of MeCP2 in Parvalbumin-and Somatostatin-Expressing Neurons in Mice Leads to Distinct Rett Syndrome-like Phenotypes. **Neuron**, v. 88, n. 4, p. 651–8, nov. 2015.

JASSAL, B. et al. The reactome pathway knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D498–D503, 8 jan. 2020.

JEPSON, J. E. C.; PRASCHBERGER, R.; KRISHNAKUMAR, S. S. Mechanisms of Neurological Dysfunction in GOSR2 Progressive Myoclonus Epilepsy, a Golgi SNAREopathy. **Neuroscience**, v. 420, p. 41–49, 10 nov. 2019.

JIMÉNEZ, M. et al. Splicing events in the control of genome integrity: role of SLU7 and truncated SRSF3 proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 7, p. 3450–3466, 23 abr. 2019.

JONES, S. D.; VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Genomic Organization of the Human α3 Integrin Subunit Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, n. 3, p. 896–898, 30 jul. 1998.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W429–W432, 1 jul. 2007.

KHWAJA, O. S. et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecasermin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. 4596–4601, 25 mar. 2014.

KIRBY, R. S. et al. Longevity in Rett Syndrome: Analysis of the North American Database. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. 135- 138.e1, 1 jan. 2010.

KRÄMER, A. et al. The 5′ terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 299–307, 1 ago. 1984.

KRISHNAN, K. et al. MeCP2 regulates the timing of critical period plasticity that shapes functional connectivity in primary visual cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 34, p. E4782–E4791, 25 ago. 2015.

KUDO, S. Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 Represses Sp1-Activated Transcription of the Human Leukosialin Gene When the Promoter Is Methylated. **https://doi.org/10.1128/MCB.18.9.5492**, v. 18, n. 9, p. 5492–5499, 1 set. 2023.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 4 mar. 2012.

LANNOM, M. C. et al. FMRP and MOV10 regulate Dicer1 expression and dendrite development. **PLOS ONE**, v. 16, n. 11, p. e0260005, 1 nov. 2021.

LEE, W. et al. MeCP2 regulates gene expression through recognition of H3K27me3. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 19 jun. 2020.

LEE, Y.; RIO, D. C. **Mechanisms and regulation of alternative Pre-mRNA splicing**. **Annual Review of Biochemistry**Annual Reviews Inc., , 2 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25784052/>. Acesso em: 21 fev. 2021

LERNER, M. R.; ARGETSINGER STEITZ, J. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 11, p. 5495–5499, 1979.

LEWIS, J. D. et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 905–914, 12 jun. 1992.

LI, C. H. et al. MeCP2 links heterochromatin condensates and neurodevelopmental disease. **Nature 2020 586:7829**, v. 586, n. 7829, p. 440–444, 22 jul. 2020.

LI, R. et al. Misregulation of Alternative Splicing in a Mouse Model of Rett Syndrome. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2016.

LI, X. et al. The MOV10 helicase inhibits LINE-1 mobility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 29, p. 21148–21160, 19 jul. 2013a.

LI, Y. et al. Global Transcriptional and Translational Repression in Human-Embryonic-Stem-Cell-Derived Rett Syndrome Neurons. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 446–458, 3 out. 2013b.

LICATALOSI, D. D.; DARNELL, R. B. **Splicing Regulation in Neurologic Disease**. **Neuron**Neuron, , out. 2006.

LONG, S. W. et al. A brain-derived MeCP2 complex supports a role for MeCP2 in RNA processing. **Biosci Rep.**, v. 31(5), p. 333–343, 2011.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOZANO, R.; ROSERO, C. A.; HAGERMAN, R. J. Fragile X spectrum disorders. **Intractable & rare diseases research**, v. 3, n. 4, p. 134–46, nov. 2014.

MARCHETTO, M. C. N. et al. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527–539, 12 nov. 2010.

MARIN, M. et al. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 619–628, 16 maio 1997.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2 maio 2011.

MARTÍNEZ DE PAZ, A. et al. MeCP2-E1 isoform is a dynamically expressed, weakly DNA-bound protein with different protein and DNA interactions compared to MeCP2-E2. **Epigenetics and Chromatin**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 10 out. 2019.

MARTINOWICH, K. et al. DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. **Science**, v. 302, n. 5646, p. 890–893, 31 out. 2003.

MATERA, A. G.; WANG, Z. **A day in the life of the spliceosome**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 1 fev. 2014.

MAUNAKEA, A. K. et al. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. **Cell Research**, v. 23, n. 11, p. 1256–1269, 13 nov. 2013.

MEHMOOD, A. et al. Systematic evaluation of differential splicing tools for RNA-seq studies. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 6, p. 2052–2065, 1 dez. 2020.

MEISTER, G. et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. **Current Biology**, v. 15, n. 23, p. 2149–2155, 6 dez. 2005.

MORELLO, N. et al. Loss of Mecp2 Causes Atypical Synaptic and Molecular Plasticity of Parvalbumin-Expressing Interneurons Reflecting Rett Syndrome–Like Sensorimotor Defects. **eNeuro**, v. 5, n. 5, p. 86–104, 1 set. 2018.

MÜLLER, M.; CAN, K. Aberrant redox homoeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 4, p. 959–964, 1 ago. 2014.

MUOTRI, A. R. et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. **Nature 2010 468:7322**, v. 468, n. 7322, p. 443–446, 17 nov. 2010.

NA, E. S. et al. The impact of MeCP2 loss- or gain-of-function on synaptic plasticity. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 212–9, jan. 2013.

NASSAR, L. R. et al. The UCSC Genome Browser database: 2023 update. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D1188–D1195, 6 jan. 2023.

NEUL, J. L. et al. Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 6, p. 944–950, 1 dez. 2010.

NEUL, J. L. et al. Design and outcome measures of LAVENDER, a phase 3 study of trofinetide for Rett syndrome. **Contemporary Clinical Trials**, v. 114, p. 106704, 1 mar. 2022.

NISSENKORN, A.; BEN-ZEEV, B. Unilateral rhythmic hand tapping in rett syndrome: Is this stereotypy? **Journal of Child Neurology**, v. 28, n. 10, p. 1210–1214, out. 2013.

OHRT, T. et al. Molecular dissection of step 2 catalysis of yeast pre-mRNA splicing investigated in a purified system. **RNA**, v. 19, n. 7, p. 902–915, 1 jul. 2013.

PADGETT, R. A. et al. Lariat RNA's as Intermediates and Products in the Splicing of Messenger RNA precursors. **Science**, v. 225, n. 4665, p. 898–903, 1984.

PAN, Q. et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nature Genetics 2008 40:12**, v. 40, n. 12, p. 1413–1415, nov. 2008.

PASSEMARD, S. et al. Golgi trafficking defects in postnatal microcephaly: The evidence for "Golgipathies". **Progress in Neurobiology**, v. 153, p. 46–63, 1 jun. 2017.

PATEL, R. K.; JAIN, M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. **PloS one**, v. 7, n. 2, 1 fev. 2012.

PETRITI, U. et al. Global prevalence of Rett syndrome: systematic review and meta-analysis. **Systematic Reviews**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2023.

PFENNINGER, K. H.; JOHNSON, M. P. Membrane biogenesis in the sprouting neuron. I. Selective transfer of newly synthesized phospholipid into the growing neurite. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 4, p. 1038–1042, 1 out. 1983.

RAMANOUSKAYA, T. V.; GRINEV, V. V. **The determinants of alternative RNA splicing in human cells**. **Molecular Genetics and Genomics**Springer Verlag, , 1 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28707092/>. Acesso em: 21 fev. 2021

RANGASAMY, S. et al. Reduced neuronal size and mTOR pathway activity in the Mecp2 A140V Rett syndrome mouse model. **F1000Research 2016 5:2269**, v. 5, p. 2269, 8 set. 2016.

RECALDE, M. et al. The splicing regulator SLU7 is required to preserve DNMT1 protein stability and DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 15, p. 8592–8609, 7 set. 2021.

REINHARDT, R. R.; BONDY, C. A. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1753–1761, 1 nov. 1994.

RETT, A. Uber ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindersalter. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 116, n. 37, p. 723–726, 10 set. 1966.

RICCERI, L.; DE FILIPPIS, B.; LAVIOLA, G. **Rett syndrome treatment in mouse models: Searching for effective targets and strategies**. **Neuropharmacology**Neuropharmacology, , maio 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22940001/>. Acesso em: 21 fev. 2021

RICHARDS, C. et al. Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Psychiatry**, v. 2, n. 10, p. 909–916, 1 out. 2015.

RIENECKER, K. D. A.; POSTON, R. G.; SAHA, R. N. Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium. **ASN Neuro**, v. 12, 30 nov. 2020.

ROBINSON, J. T. et al. Integrative genomics viewer. **Nature Biotechnology 2011 29:1**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 1 jan. 2011.

RODRIGUES, K. S. et al. IARA: a complete and curated atlas of the biogenesis of spliceosome machinery during RNA splicing. **Life science alliance**, v. 6, n. 3, 1 mar. 2023.

SANDWEISS, A. J.; BRANDT, V. L.; ZOGHBI, H. Y. Advances in understanding of Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome: prospects for future therapies. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 8, p. 689–698, 1 ago. 2020.

SCHAFER, S. et al. Alternative Splicing Signatures in RNA-seq Data: Percent Spliced in (PSI). **Current Protocols in Human Genetics**, v. 87, n. 1, p. 11.16.1-11.16.14, 1 out. 2015.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–504, nov. 2003.

SHEN, S. et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 51, p. E5593–E5601, 23 dez. 2014.

SHI, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2017 18:11**, v. 18, n. 11, p. 655–670, set. 2017a.

SHI, Y. Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2017 18:11**, v. 18, n. 11, p. 655–670, set. 2017b.

SHIMADA, S. et al. MECP2 duplication syndrome in both genders. **Brain and Development**, v. 35, n. 5, p. 411–419, 1 maio 2013.

SHOMRON, N. et al. Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 6, p. 1151–1159, 15 mar. 2005.

SHOMRON, N.; REZNIK, M.; AST, G. Splicing factor hSlu7 contains a unique functional domain required to retain the protein within the nucleus. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 8, p. 3782–3795, 4 ago. 2004.

SKARIAH, G. et al. Mov10 suppresses retroelements and regulates neuronal development and function in the developing brain. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–19, 29 jun. 2017.

SMEETS, E. E. J.; PELC, K.; DAN, B. Rett Syndrome. **Molecular syndromology**, v. 2, n. 3–5, p. 113–127, abr. 2012.

SOTO, XE. J. L. et al. **Mechanisms of neuronal alternative splicing and strategies for therapeutic interventions**. Journal of Neuroscience. **Anais**...Society for Neuroscience, 16 out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1149-19.2019>. Acesso em: 21 fev. 2021

SPERLAZZA, M. J. et al. Structural Basis of MeCP2 Distribution on Non-CpG Methylated and Hydroxymethylated DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 10, p. 1581–1594, 19 maio 2017.

SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–50, out. 2005.

SUN, H. et al. The regulatory role of endoplasmic reticulum chaperone proteins in neurodevelopment. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 1950, 15 nov. 2022.

TAKADA, Y. et al. Molecular cloning and expression of the cDNA for alpha 3 subunit of human alpha 3 beta 1 (VLA-3), an integrin receptor for fibronectin, laminin, and collagen. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 1, p. 257, 10 out. 1991.

TAZI, J.; BAKKOUR, N.; STAMM, S. Alternative splicing and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 1, p. 14–26, 1 jan. 2009.

TELIAS, M. et al. Functional Deficiencies in Fragile X Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 46, p. 15295–15306, 18 nov. 2015.

TILLOTSON, R. et al. Neuronal non-CG methylation is an essential target for MeCP2 function. **Molecular Cell**, v. 81, n. 6, p. 1260- 1275.e12, 18 mar. 2021.

TOMASSY, G. S. et al. Developmental abnormalities of cortical interneurons precede symptoms onset in a mouse model of Rett syndrome. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 1, p. 115–127, 1 out. 2014.

TROPEA, D. et al. Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. **Nature Neuroscience 2006 9:5**, v. 9, n. 5, p. 660–668, 23 abr. 2006.

TRUJILLO, C. A. et al. Pharmacological reversal of synaptic and network pathology in human *MECP2* -KO neurons and cortical organoids. **EMBO Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. e12523, jan. 2021.

VEIGA, DIOGO F. T. maser: Mapping Alternative Splicing Events to pRoteins. **R package version 1.14.0**, v. 1, 2020.

VUU, Y. M.; ROBERTS, C. T.; RASTEGAR, M. MeCP2 Is an Epigenetic Factor That Links DNA Methylation with Brain Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 4218**, v. 24, n. 4, p. 4218, 20 fev. 2023.

WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701–718, fev. 2009a.

WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701–718, 20 fev. 2009b.

WAMSLEY, B. et al. Molecular cascades and cell-type specific signatures in ASD revealed by single cell genomics. **bioRxiv**, p. 2023.03.10.530869, 10 mar. 2023.

WANG, Y. et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 2, p. 152, mar. 2015.

WON, H. et al. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 261–265, 2012.

WONG, J. J. L. et al. Intron retention is regulated by altered MeCP2-mediated splicing factor recruitment. **Nature Communications 2017 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 8 maio 2017.

XIANG, Y. et al. Dysregulation of BRD4 Function Underlies the Functional Abnormalities of MeCP2 Mutant Neurons. **Molecular cell**, v. 79, n. 1, p. 84- 98.e9, 2 jul. 2020.

XU, Y. J. et al. KW-2449 and VPA exert therapeutic effects on human neurons and cerebral organoids derived from MECP2-null hESCs. **Stem cell research & therapy**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

YOUNG, J. I. et al. Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 49, p. 17551–17558, 6 dez. 2005.

YUAN, Z. F. et al. Insulin-Like Growth Factor-1 Down-Regulates the Phosphorylation of FXYD1 and Rescues Behavioral Deficits in a Mouse Model of Rett Syndrome. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, 29 jan. 2020.

ZHAN, X. et al. Structure of a human catalytic step I spliceosome. **Science**, v. 359, n. 6375, p. 537–545, 2 fev. 2018.

ZHANG, X. et al. An Atomic Structure of the Human Spliceosome. **Cell**, v. 169, n. 5, p. 918-929.e14, 18 maio 2017.

ZHANG, X. et al. Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. **Cell Research 2018 28:3**, v. 28, n. 3, p. 307–322, 23 jan. 2018.

ZHANG, X. et al. Structures of the human spliceosomes before and after release of the ligated exon. **Cell Research 2019 29:4**, v. 29, n. 4, p. 274–285, 6 fev. 2019.

ZHANG, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome Biology**, v. 9, n. 9, p. 1–9, 17 set. 2008.

ZHOU, S. et al. BET protein inhibitor JQ1 downregulates chromatin accessibility and suppresses metastasis of gastric cancer via inactivating RUNX2/NID1 signaling. **Oncogenesis 2020 9:3**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 10 mar. 2020.