

Subproject 16: Analysis of histone deacetylase inhibition on nuclear reprogramming mediated by nuclear transfer or induced pluripotency.

Principal Investigator: *Flávio Vieira Meirelles*

Abstract

In 1997, reproductive cloning was reported possible using adult somatic cells in mammals (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997). Since then, somatic cell nuclear transfer has become a promising technology. This technology was pushed forward by the viability to produce valuable transgenic animals, and also, presents great potential in terms of regenerative medicine through of capacity to derivate patient-specific stem cells (Gurdon & Melton, 2008). In 2006 a different technology to achieve nuclear reprogramming was described. This technique consists in overexpressing genes related to pluripotency in somatic cells, allowing an easy way to generate stem cells lineages from various sources (Takahashi & Yamanaka, 2006). However, the wide use of these technologies are hampered due to low efficiency of nuclear reprogramming (Lee, Hore, & Reik, 2014). One of the reasons is that cloned embryos or stem cells lineages produced by these methodologies present epigenetic abnormalities. These alterations lead to aberrant patterns of gene expression, compromising the desired outcome, in this case, stem cells lineages safe to transplantation in patients or viable cloned offspring (Ng & Gurdon, 2005; Wutz, 2012). A strategy that has been used aiming improve nuclear reprogramming is the use of chromatin modifying agents. Among these drugs, the most promising family of chemical probes is the histone deacetylase inhibitors. These molecules have been showed to increase the efficiency of stem cells derivation by SCNT or induced pluripotency, as well as viable cloned offspring (Huangfu et al., 2008; Kishigami et al., 2006). This improvement is supposed to be mediated by the effects of these molecules on cellular epigenome and metabolism. Nevertheless, the mechanisms are elusive and need to be investigated. In this project, we proposed to investigate the effect of β -hydroxybutyric acid, a histone deacetylase inhibitor, during the nuclear reprogramming process.

Goals

1. Evaluate the effects of β -hydroxybutyric acid on developmental rates in cloned embryos produced by SCNT and derivation of induced pluripotent stem cells (iPS cells).
2. Determine the transcript levels of genes involved in epigenetic process or controlling cellular metabolism in cloned embryos or iPS cells.

3. Investigate the epigenetic alterations occurring in imprinted genes such as IGF2R and H19 during the nuclear reprogramming process mediated by SCNT or induced pluripotency.

Specific Goals

1. Increase the efficiency of nuclear reprogramming process achieved by SCNT or induced pluripotency.
2. Derivate safe lineages of stem cells aiming cell therapy with low incidence of metabolic or epigenetic alterations.
3. Produce cloned embryos with low incidence of metabolic or epigenetic alterations.

Implementation schedule

Specific goals	Semesters											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Embryo and iPS generation												
Analysis of gene expression												
Epigenome analysis												
Manuscripts preparation and submission												

Researches:

Fabiana Fernandes Bressan

Flávio Vieira Meirelles

Juliano Rodrigues Sangalli

Felipe Percin

Juliano Coelho da Silveira

Rafael Vilar Sampaio

Associated Researchers

Lawrence Charles Smith

Willian Allan King

References

- Gurdon, J. B., & Melton, D. a. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1811–5. doi:10.1126/science.1160810
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., & Melton, D. a. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*, 26(7), 795–7. doi:10.1038/nbt1418
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. Van, Wakayama, S., ... Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 183–9. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.164
- Lee, H. J., Hore, T. a, & Reik, W. (2014). Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. *Cell Stem Cell*, 14(6), 710–719. doi:10.1016/j.stem.2014.05.008
- Ng, R. K., & Gurdon, J. B. (2005). Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 1957–62. doi:10.1073/pnas.0409813102
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Wilmut, I., Schnieke, a E., McWhir, J., Kind, a J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–3. doi:10.1038/385810a0
- Wutz, A. (2012). Epigenetic alterations in human pluripotent stem cells: a tale of two cultures. *Cell Stem Cell*, 11(1), 9–15. doi:10.1016/j.stem.2012.06.012

Subprojeto 16: Estudo da inibição de histonas deacetilases na reprogramação celular por transferência de núcleo ou indução gênica à pluripotência (células iPS)

Pesquisador Responsável: *Flávio Vieira Meirelles*

Introdução

Em 1997, a clonagem reprodutiva foi demonstrada ser possível usando células somáticas de mamíferos adultos (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997). Desde então, a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tornou-se uma tecnologia promissora. Sua viabilidade para produzir animais transgênicos e seu grande potencial em termos de aplicações médicas, assim como a capacidade de derivar células-tronco embrionária paciente-específica, são aspectos que suportam tal crença (Gurdon & Melton, 2008). Uma outra metodologia para reprogramar células somáticas foi descrita em 2006, que consiste na superexpressão de genes relacionados a pluripotência, tornando-se uma maneira prática de obter linhagens de células tronco a partir das mais variadas fontes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Entretanto, o amplo uso destas tecnologias são impedidos devido a baixa eficiência em obter uma reprogramação nuclear adequada (Lee, Hore, & Reik, 2014). Os embriões clonados ou as linhagens de células tronco obtidas por meio destas metodologias apresentam uma série de alterações epigenéticas. Estas levam a padrões aberrantes de expressão gênica, culminando com uma falha em se obter o resultado desejado, neste caso a obtenção de linhagens seguras para terapia celular ou obtenção de animais clonados saudáveis (Ng & Gurdon, 2005; Wutz, 2012). Uma das estratégias para aumentar a eficiência da reprogramação nuclear tem sido o emprego de moléculas modificadoras de cromatina. Entre as classes de drogas, a mais promissora, são os inibidores das histonas deacetilases. Estas moléculas tem sido demonstradas aumentar a eficiência na obtenção de linhagens de células tronco tanto por TNCS como por indução a pluripotência, assim como aumento na produção de animais clonados (Huangfu et al., 2008; Kishigami et al., 2006). Este incremento é causado pelo efeito destas moléculas sobre o metabolismo e epigenoma celular. Porém o mecanismo de ação destas moléculas ainda são elusivos, e uma melhor compreensão destes levará a otimização dos processos de reprogramação nuclear. Neste projeto nós propomos investigar o efeito do inibidor de histonas deacetilases Ácido β -Hidroxi-butírico (β -OHB) durante o processo de reprogramação nuclear.

Objetivos:

1. Avaliar o efeito do ácido beta-hidroxi-butírico (β -OHB) sobre a taxa de produção de embriões clonados por transferência de núcleo ou células induzidas a pluripotência (iPS).
2. Analisar a expressão de genes envolvidos em processos epigenéticos e no controle do metabolismo celular nos embriões clonados e células induzidas a pluripotência.
3. Investigar as alterações epigenéticas ocorridas nos genes *imprinted* IGF2R e H19 durante o processo de reprogramação nuclear por TNCS e indução a pluripotência.

Metas

1. Aumentar a eficiência dos processos de reprogramação nuclear tanto por TNCS como por indução a pluripotência.
2. Produzir linhagens de células tronco para uso em terapia celular com menor incidência de alterações metabólicas e epigenéticas.
3. Gerar embriões clonados com menor incidências de alterações metabólicas e epigenéticas.

Cronograma de execução referente a seis anos de projeto

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Produção de Embriões e Células tronco	■	■	■	■	■	■						
Análise da expressão gênica					■	■	■	■				
Análise do epigenoma					■	■	■	■	■	■		
Confecção de Artigos Científicos			■	■			■	■			■	■

PESQUISADORES:

Fabiana Fernandes Bressan

Felipe Perecin

Flávio Vieira Meirelles
Juliano Rodrigues Sangalli

Juliano Coelho da Silveira
Rafael Vilar Sampaio

PESQUISADORES COLABORADORES:

Lawrence Charles Smith
Willian Allan King

Referências

- Gurdon, J. B., & Melton, D. a. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), 1811–5. doi:10.1126/science.1160810
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., & Melton, D. a. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*, 26(7), 795–7. doi:10.1038/nbt1418
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. Van, Wakayama, S., ... Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), 183–9. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.164
- Lee, H. J., Hore, T. a, & Reik, W. (2014). Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. *Cell Stem Cell*, 14(6), 710–719. doi:10.1016/j.stem.2014.05.008
- Ng, R. K., & Gurdon, J. B. (2005). Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 1957–62. doi:10.1073/pnas.0409813102
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Wilmut, I., Schnieke, a E., McWhir, J., Kind, a J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–3. doi:10.1038/385810a0
- Wutz, A. (2012). Epigenetic alterations in human pluripotent stem cells: a tale of two cultures. *Cell Stem Cell*, 11(1), 9–15. doi:10.1016/j.stem.2012.06.012