

Inativação do cromossomo X em mamíferos

X-Chromosome inactivation in mammals

A.R. Ferreira¹, M.M. Franco^{2,3}

¹Aluna do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³Correspondência: mfranco@cenargen.embrapa.br

Resumo

Fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, enquanto machos possuem apenas um. Isto levou à evolução de um mecanismo de compensação de dose chamado de inativação do cromossomo X, um importante evento epigenético que deve ocorrer em embriões fêmeas de todos os mamíferos. Durante a embriogênese, um dos dois cromossomos X é aleatoriamente inativado em cada célula da massa celular interna, preferencialmente o cromossomo X paterno no trofoblasto, formando indivíduos adultos que são mosaicos de dois tipos de células, expressando um ou outro cromossomo X.

Palavras-chave: Cromossomo sexual, compensação de dose, epigenética.

Abstract

Mammalian females have two X chromosomes and males only one. This led to the creation of an evolutionary mechanism of dosage compensation, called the X-chromosome inactivation, an important epigenetic event that must occur in female embryos of all mammals. During embryogenesis, one of the two X chromosomes is randomly inactivated in each cell of the inner cell mass, and preferably the paternal X chromosome in trophoblast, turning into adult mosaics of two cell types, expressing either X chromosome.

Keywords: dosage compensation, epigenetic, Sex chromosome.

Introdução

Diferenças na expressão gênica que não dependem de alterações na sequência do DNA são mantidas herdáveis por meio de mecanismos epigenéticos (Jaenisch e Bird, 2003). Esses mecanismos podem envolver desde a metilação de DNA até a metilação, fosforilação, acetilação, glicosilação, SUMOilação, ubiquitinação e ADPribosilação das proteínas histonas (Strahl e Allis, 2000; Li, 2002).

As histonas não são somente proteínas estruturais. São também fundamentais, principalmente por meio de modificações por acetilação e fosforilação, para o controle da expressão gênica (McGraw et al., 2006), ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004), sendo relacionadas ao silenciamento da cromatina no genoma. Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal, tendo importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na modificação da cromatina (Surani, 1998; Ng e Bird, 1999; Reik et al., 2001; Simonsson e Gurdon, 2004).

As fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, e machos apenas um. Tal fato levou a um mecanismo especial de evolução conhecido como compensação de dose (Lyon, 1961). Este é um evento que representa um dos maiores paradigmas da epigenética, sendo herdável ao longo das divisões celulares (Lucifero et al., 2004). A inativação de um cromossomo X em fêmeas equaliza a expressão gênica entre os sexos. Em mamíferos placentários, a inativação do cromossomo X afeta o cromossomo X paterno ou materno de uma maneira aleatória durante o desenvolvimento embrionário, sendo que o estado inativo é herdado de forma estável, gerando adultos de dois tipos celulares (Heard e Distèche, 2006). Ou seja, nestes indivíduos, devido à escolha ao acaso do cromossomo X a ser inativado em cada célula somática, o organismo como um todo é um mosaico dos produtos gênicos ligados ao X.

Portanto, busca-se com esta revisão discutir e atualizar o conhecimento sobre os principais mecanismos moleculares envolvidos na inativação do cromossomo X em mamíferos, subsidiando uma melhor compreensão destes eventos.

O estabelecimento da inativação do cromossomo X

A compensação de dose, relacionada à quantidade de produtos gênicos, entre fêmeas (XX) e machos (XY) é conseguida pela inativação de um dos dois cromossomos X em fêmeas de mamíferos durante o início da

embriogênese (Lyon, 1961). Em mamíferos que apresentam aneuploidia de X, todos os cromossomos X em excesso são inativados, sugerindo que o cromossomo X que permanece ativo estaria definido desde o início (Goto e Takagi, 2000). No início, estudos relacionados à inativação do cromossomo X identificaram uma região genômica denominada XIC (Centro de Inativação do Cromossomo X), agindo em *cis*, ou seja, no mesmo cromossomo, necessária para que ocorresse a inativação do cromossomo (Russel, 1963). Uma marcação diferencial, que protege o cromossomo X materno (Xm) da inativação do cromossomo X, é adquirida durante a maturação do ovócito (Goto e Takagi, 2000; Tada et al., 2000).

Em camundongos, após a fecundação, o cromossomo X paterno (Xp) está transcricionalmente ativo nos zigotos, e no estágio de quatro células inicia-se o processo de inativação do Xp com a transcrição do gene XIST (*X Inactivation-Specific Transcript*) e o revestimento do cromossomo a ser inativado com o RNA XIST (Okamoto et al., 2004, 2005). Por outro lado, outros estudos sugerem que o Xp começa a ser inativado no estágio de oito células (Huynh e Lee, 2003; Mak et al., 2004). Okamoto et al. (2004) constataram que o Xp inativo é mantido neste estado nas células embrionárias isoladas da massa celular interna até o estágio de blastocisto. No entanto, no estágio de blastocisto expandido, o Xp inativo é reativado nessas células, permitindo a remodelação da cromatina e finalmente procedendo à inativação aleatória do X nos derivados embrionários.

De La Fuente et al. (1999), trabalhando com embriões bovinos produzidos *in vitro*, sugerem que a inativação ocorre por volta do estágio de blastocisto. Em um experimento recente com embriões bovinos produzidos *in vitro*, foi caracterizado pela primeira vez o processo de inativação do cromossomo X nesta espécie (Ferreira et al., 2010). Estes autores mostraram que a inativação é estabelecida no estágio de mórula, onde o X paterno está inativado, sendo imediatamente reativado no estágio de blastocisto, provavelmente para acontecer o segundo ciclo de inativação aleatória nas células da massa celular interna.

Em marsupiais, o cromossomo Xp é preferencialmente inativado em todos os tecidos (Cooper et al., 1971), enquanto em camundongos é observada uma inativação preferencial do Xp somente em tecidos extra-embrionários (Takagi e Sasaki, 1975). Em humanos, já existem relatos de inativação aleatória em tecidos extra-embrionários (Mello et al., 2010).

Turner et al. (2004) comentaram a importância de se compreender os mecanismos que silenciam o cromossomo X paterno no início do desenvolvimento. Durante a espermatogênese, ocorre um processo conhecido como inativação meiótica do cromossomo sexual. De acordo com Turner (2007), a inativação meiótica do cromossomo sexual na espermatogênese silencia os cromossomos sexuais (X e Y) no momento em que o pareamento dos cromossomos homólogos autossômicos está concluído, sendo mediada por um remodelamento da cromatina em ambos os cromossomos. Este processo é iniciado no DNA por várias proteínas de reparo e mantido por modificações nas histonas que estão associadas com o silenciamento transcricional.

Alguns estudos questionam se a inativação meiótica do cromossomo sexual é somente restrita à meiose, pois os cromossomos X e Y mantêm um estado reprimido durante todo o desenvolvimento espermático. Resultados abordando o evento da inativação meiótica do cromossomo sexual podem fornecer importantes contribuições para uma melhor compreensão sobre a programação epigenética que ocorre nas células germinativas, na dinâmica meiótica do cromossomo e, mais genericamente, na infertilidade, pois é um evento que acontece na linha germinal masculina de quase todos os organismos que possuem cromossomos sexuais diferenciados (Turner, 2007).

O gene XIST

A iniciação do processo de inativação do cromossomo X é dependente de um *locus* denominado centro de inativação do cromossomo X (XIC; Avner e Heard, 2001). O evento inicial que ocorre no XIC é a transcrição do gene XIST (*X Inactivation-Specific Transcript*), com o acúmulo de seu RNA sobre o cromossomo X a ser inativado (Penny et al., 1996). Segundo Heard e Disteche (2006), o XIC, que transcreve o RNA do gene XIST, é responsável por desencadear o silenciamento ao agir em *cis*. A melhor forma de se entender como a inativação do X é regulada virá obviamente por meio da identificação de fatores que estão ligados ao XIC. Antes da inativação, a expressão de XIST é detectada em pequenos locais em ambos os cromossomos X ativos, até que os transcritos se acumulem e se localizem no futuro cromossomo X inativo (Sheardown et al., 1996; Panning et al., 1997). No entanto, está claro que os componentes do XIC estão envolvidos, e tem sido proposto que as concentrações de RNA XIST poderiam influenciar no processo de inativação (Nesterova et al., 2003).

Há a possibilidade da existência de um fator autossômico produzido em quantidade limitada por células diploides, bem como a de que este fator ligado ao XIC teria a função de proteger o cromossomo X da inativação (Heard, 2004).

A associação do RNA XIST com o futuro X inativo resulta em modificações na cromatina. Enquanto o XIST é essencial para o início da inativação do cromossomo, uma vez inativado, o gene XIST trabalha sinergicamente com outras modificações adquiridas na cromatina para manter a estabilidade do estado inativo (De La Fuente et al., 1999; Csankovszki et al., 2001). A cromatina do cromossomo X inativo é convertida em heterocromatina, a qual permanece condensada ao longo da maior parte do ciclo celular e se replica após a maioria da eucromatina do X ativo. Esta heterocromatina é chamada de corpúsculo de Barr, sendo

frequentemente vista sob o envoltório nuclear de células femininas (Barr e Bertram, 1949). Dentro do núcleo, na fase de interfase, é possível localizar o RNA XIST como parte do corpúsculo de Barr (Chang et al., 2006).

O gene TSIX

Outro gene importante nesse processo é o TSIX, um transcrito *antisense* do gene XIST, que está envolvido na inativação aleatória e *imprinting* do X (Debrand et al., 1999). É expresso em células não diferenciadas antes da inativação e parece opor-se à expressão de XIST em *cis* (Heard et al., 2001), inibindo fisicamente a transcrição do XIST pela interferência no recrutamento de RNA polimerase (Luikenhuis et al., 2001; Stavropoulos et al., 2001). Um excesso de transcrição de TSIX inibe o acúmulo de RNA XIST, mas não afeta a escolha do cromossomo X a ser inativado (Stavropoulos et al., 2001). A transcrição do TSIX é regulada pelo gene XITE, localizado no *locus* XCE (elemento controlador de X) abaixo ao TSIX. O gene XITE é um dos responsáveis pela inativação do cromossomo X pelo fato de sua transcrição promover a transcrição do TSIX em *cis*. Ogawa e Lee (2003) citam que, em humanos, o XITE é apontado como um dos principais candidatos na escolha de qual cromossomo X será inativado. Uma interação física entre as regiões XICs é necessária para uma troca de informações entre os genes XIST e TSIX homólogos, estabelecendo um padrão de regulação monoalélica de TSIX e regulação do XIST em um cromossomo X e não no outro (Heard e Disteche, 2006).

Sun et al. (2006), trabalhando com uma linhagem celular mutante para o TSIX, propuseram o envolvimento do RNA TSIX no bloqueio da metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27) no *locus* XIST, já que a sua ausência resultava no aparecimento desta marca em todo o *locus* XIST pouco antes da sua transcrição. Este estudo revelou também que, durante as fases iniciais de diferenciação das células-tronco, a inativação do cromossomo X pode ser revertida “desligando” o gene XIST, mas, posteriormente, o estado reprimido torna-se irreversível, não sendo mais dependente de XIST.

O código das histonas

As histonas são proteínas estruturais fundamentais e, por modificações pós-traducionais, exercem controle sobre a expressão gênica (McGraw et al., 2006). Estas proteínas estão relacionadas ao silenciamento da cromatina (Strahl e Allis, 2000), desempenhando um papel importante na ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004).

A cobertura do cromossomo X a ser inativado pelo RNA XIST é seguida pelo acúmulo de um complexo de proteínas denominado Eed-Ezh2 e metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27; Plath et al., 2003; Silva et al., 2003). As modificações adicionais nas histonas associadas ao X inativo incluem hipacetilação de H3 e H4, hipometilação da lisina 4 e metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K4; H3K9), além da associação da histona macro H2A com o cromossomo X a ser inativado (Plath et al., 2002).

Em embriões de camundongos de oito células, ocorrem a hipometilação de H3K4 e a hipacetilação de H3K9, enquanto o recrutamento de Eed-Ezh2, metilação da histona H3K27 e a associação da macro-histona H2A aparecem posteriormente, no estágio de 16 células, na fase de mórula inicial (Okamoto et al., 2004). A metilação da lisina nove da histona H3 (H3K9) ocorre mais tarde, no estágio de 32 células, na fase de blastocisto (Okamoto et al., 2004). No entanto, durante o crescimento do blastocisto, o Xp é reativado na massa celular interna, e os cromossomos perdem rapidamente seu revestimento de RNA XIST, o complexo Eed/Ezh2 e as modificações características das histonas do X inativado (Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004).

Mak et al. (2004) e Okamoto et al. (2004) mostraram que o complexo Eed/Ezh2, associado às histonas no Xp, ocorre na maioria das células no estágio de mórula e desaparece nas células que passam a fazer parte da massa celular interna. A perda destas modificações nas histonas neste momento significa a reativação do Xp, de modo que a inativação aleatória possa ocorrer na massa celular interna. Existem algumas teorias que buscam entender o que ocorre no estágio de mórula, onde determinados blastômeros são selecionados para formação da massa celular interna. Jonhson e Ziomek (1981) acreditam que o resultado de uma divisão polarizada assimétrica de oito blastômeros seria responsável por formar as células internas da massa celular interna. Por outro lado, Huynh e Lee (2003) sugeriram que certas células na mórula inicial podem escapar da inativação *imprinting* do Xp, e que estas são as células destinadas a formar a massa celular interna.

A metilação do DNA

Elementos adicionais devem ser responsáveis pelo silenciamento do gene XIST em machos e expressão de apenas um cromossomo X em fêmeas. A hipermetilação do DNA é observada na região promotora do gene XIST do cromossomo X ativo, mas não é observada no cromossomo X inativo, e em genes que escapam do processo de inativação, no X inativo (Hendrich et al., 1993; Norris et al., 1994). A metilação é um evento tardio no processo de inativação do cromossomo X e parece estar envolvida na manutenção do estado inativo mais do que na iniciação do processo (Lock et al., 1987; Singer-Sam et al., 1990).

O fato de a metilação ser um evento tardio é confirmado com estudos mostrando que células deficientes

em enzimas *Dnmt1* e *Dnmt3a/Dnmt3b* apresentam expressão adequada do XIST e silenciamento dos genes ligados ao cromossomo X (Panning e Jaenisch, 1996; Sado et al., 2004). Estas enzimas são responsáveis pela manutenção do padrão de metilação do DNA na divisão celular (Li, 2002) e para o início da metilação *de novo in vivo* na formação dos gametas e o estabelecimento do padrão de metilação *de novo* do DNA durante o desenvolvimento embrionário inicial (Okano et al., 1999).

Por outro lado, a importância da metilação num momento posterior ao início da inativação do cromossomo X é apoiada por estudos que mostram a reativação de alguns genes após o tratamento com agentes desmetilantes, conjuntamente com alterações de alguns fatores relacionados à estabilidade do cromossomo X inativo (Chang et al., 2006).

Genes que escapam da inativação

Embora a região XIC afete a maioria do cromossomo X, vários genes ligados a este cromossomo são conhecidos por escaparem ao processo de inativação. Isto mostra, dentro de uma visão epigenômica, como um gene inserido na heterocromatina pode “resistir” a um estado repressor ao seu redor. Genes que escapam à inativação do X estão ativamente expressos no contexto da cromatina silenciada (Boggs et al., 2002), tendo um importante papel na determinação das diferenças entre os sexos (Heard e Disteche, 2006). A expressão de genes no X inativo resulta em diferenças de dose entre machos e fêmeas. Sudbrak et al. (2001) e Craig et al. (2004), trabalhando com humanos, identificaram diferenças de expressão gênica entre os sexos para genes do cromossomo X.

Existem também genes que estão presentes nos dois cromossomos sexuais (X e Y), dentro das regiões homólogas (região pseudoautossômica-PAR). Estes genes não são inativados, e isto se dá devido ao fato de serem expressos nos dois alelos em machos, não podendo ser inativados em nenhum dos alelos da fêmea, equalizando, assim, a expressão gênica entre os sexos (Chang et al., 2006).

Em síntese, um maior conhecimento sobre o estabelecimento do processo de inativação do cromossomo X pode subsidiar uma melhor compreensão dos principais eventos epigenéticos responsáveis pela regulação da expressão gênica em mamíferos. Especificamente na área da reprodução animal, a compreensão deste processo é essencial, pois seu correto estabelecimento é necessário ao desenvolvimento embrionário normal. Como seu controle pode ser susceptível a influências ambientais, apesar de ser um evento herdável, sua compreensão se torna mais importante ainda quando se pretende lançar mão de alguma biotécnica de reprodução assistida para a multiplicação animal. Finalmente, apesar dos muitos avanços nos estudos da inativação do cromossomo X, várias questões ainda precisam ser esclarecidas.

Referências bibliográficas

- Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, v.2, p.59-67, 2001.
- Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, v.163, p.676, 1949.
- Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, v.30, p.73-76, 2002.
- Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ. Mechanisms of X-Chromosome Inactivation. *Front Biosci*, v.11, p.852-866, 2006.
- Cooper DW, VandeBerg JL, Sharman GB, Poole WE. Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nat New Biol*, v.230, p.155-157, 1971.
- Craig IW, Mill J, Craig GM, Loat C, Schalkwyk LC. Application of microarrays to the analysis of the inactivation status of human X-linked genes expressed in lymphocytes. *Eur J Hum Genet*, v.12, p.639-46, 2004.
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of XIST RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*, v.153, p.773-783, 2001.
- De La Fuente R, Hahnel A, Basrur PK, King WA. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod*, v.60, p.769-75, 1999.
- Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Avner P, Heard E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of XIST expression. *Mol Cell Biol*, v.19, p.8513-8525, 1999.
- Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland MP, Lonergan P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev*, v.67, p.136-144, 2004.
- Ferreira AR, Machado GM, Diesel TO, Carvalho JO, Rumpf R, Melo EO, Dode MAN, Franco MM. Allele-Specific Expression of the MAOA Gene and X Chromosome Inactivation in In Vitro Produced Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.615-621, 2010.
- Goto Y, Takagi N. Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental

- imprinting. *Chromosome Res*, v.8, p.101-109, 2000.
- Heard E.** Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol*, v.16, p.247-255, 2004.
- Heard E, Disteché CM.** Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev*, v.20, p.1848-1867, 2006.
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL.** Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X-inactivation. *Cell*, v.107, p.727-738, 2001.
- Hendrich BD, Brown CJ, Willard HF.** Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine *XIST* genes. *Hum Mol Genet*, v.2, p.663-672, 1993.
- Huynh KD, Lee JT.** Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature*, v.426, p.857-862, 2003.
- Jaenisch R, Bird A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, v.33, p.245-254, 2003.
- Johnson MH, Ziemek CA.** The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, v.24, p.71-80, 1981.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev*, v.3, p.662-673, 2002.
- Lock LF, Takagi N, Martin GR.** Methylation of the *Hprt* gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell*, v.48, p.39-46, 1987.
- Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM.** Potential significance of genomic *imprinting* defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update*, v.10, p.3-18, 2004.
- Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R.** Antisense transcription through the *XIST* locus mediates TSIX function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, v.21, p.8512-8520, 2001.
- Lyon MF.** Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*). *Nature*, v.190, p.372-373, 1961.
- Mak W, Nesterova TB, De Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N.** Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, v.303, p.666-669, 2004.
- McGraw S, Vigneault C, Tremblay K, Sirard MA.** Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.692-699, 2006.
- Mello JCM, Araújo ESS, Stabellini R, Fraga AM, Souza JES, Sumita DR, Camargo AA, Pereira LV.** Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PLoS One*, v.5, p.1-8, 2010.
- Nesterova TB, Johnston CM, Appanah R, Newall AE, Godwin J, Alexiou M, Brockdorff N.** Skewing X chromosome choice by modulating sense transcription across the *XIST* locus. *Genes Dev*, v.17, p.2177-2190, 2003.
- Ng HH, Bird A.** DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev*, v.9, p.158-163, 1999.
- Norris DP, Patel D, Kay GF, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA, Rastan S.** Evidence that random and *imprinted* *XIST* expression is controlled by preemptive methylation. *Cell*, v.77, p.41-51, 1994.
- Ogawa Y, Lee JT.** XITE, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol Cell*, v.11, p.731-743, 2003.
- Okamoto I, Arnaud D, Le Baccon P, Otte AP, Disteché CM, Avner P, Heard E.** Evidence for *de novo imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. *Nature*, v.438, p.369-373, 2005.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of *imprinted* X inactivation during early mouse development. *Science*, v.303, p.644-649, 2004.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.** DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, v.99, p.247-257, 1999.
- Panning B, Dausman J, Jaenisch R.** X chromosome inactivation is mediated by RNA stabilization. *Cell*, v.90, p.907-916, 1997.
- Panning B, Jaenisch R.** DNA hypomethylation can activate *XIST* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*, v.10, p.1991-2002, 1996.
- Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N.** Requirement for *XIST* in X chromosome inactivation. *Nature*, v.379, p.131-137, 1996.
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, De La Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y.** Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, v.300, p.131-135, 2003.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B.** *XIST* RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*, v.36, p.233-278, 2002.
- Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.
- Russell LB.** Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. *Science*, v.140, p.976-978, 1963.
- Sado T, Okano M, Li E, Sasaki H.** *De novo* DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation

- of X chromosome inactivation. *Development*, v.131, p.975-982, 2004.
- Sheardown S, Norris D, Fisher A, Brockdorff N.** The mouse *Smcx* gene exhibits developmental and tissue specific variation in degree of escape from X inactivation. *Hum Mol Genet*, v.5, p.1355-1360, 1996.
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N.** Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, v.4, p.481-495, 2003.
- Simonsson S, Gurdon J.** DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*, v.6, p.984-990, 2004.
- Singer-Sam J, Grant M, Lebon JM, Okuyama K, Chapman V, Monk M, Riggs AD.** Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. *Mol Cell Biol*, v.10, p.4987-4989, 1990.
- Stavropoulos N, Lu N, Lee JT.** A functional role for TSIX transcription in blocking XIST RNA accumulation but not in X-chromosome choice. *Proc Nat Acad Sci*, v.98, p.10232-10237, 2001.
- Strahl B, Allis CD.** The language of covalent histone modification. *Nature*, v.403, p.41-45, 2000.
- Sudbrak R, Wieczorek G, Nuber UA, Mann W, Kirchner R, Erdogan F, Brown CJ, Wohrle D, Sterk P, Kalscheuer VM, Berger W, Lehrach H, Ropers HH.** X chromosome-specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications. *Hum Mol Genet*, v.10, p.77-83, 2001.
- Sun BK, Deaton AM, Lee JT.** A transient heterochromatic state in XIST preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell*, v.21, p.617-628, 2006.
- Surani MA.** Imprinting and the initiation of gene silencing in the germline. *Cell*, v.93, p.309-312, 1998.
- Tada T, Obata Y, Tada M, Goto Y, Nakatsuji N, Tan S, Kono T, Takagi N.** Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development*, v.127, p.3101-3105, 2000.
- Takagi N, Sasaki M.** Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, v.256, p.640-642, 1975.
- Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng CX.** BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*, v.14, p.2135-2142, 2004.
- Turner JMA.** Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *Development*, v.134, p.1823-1831, 2007.
-