

MÓDULO I: Análise de expressão diferencial em transcriptomas

T1. Genômica e os avanços da genética na compreensão das respostas transcricionais.

Nilce M. Martinez Rossi
Departamento de Genética
nmmrossi@usp.br

Respostas Transcrpcionais: expressão gênica

Em Procariotos:

- ✓ A regulação da expressão gênica serve principalmente para permitir que as células se ajustem às mudanças nutricionais e a presença de inibidores no ambiente, de forma que o seu crescimento e divisão celular sejam otimizados.

Respostas Transcrpcionais: expressão gênica

Em organismos eucariotos:

- ✓ **Permite respostas diferenciais ao estresse (resposta a fármacos) e a estímulos ambientais.**
- ✓ **a expressão gênica controla um programa genético fundamental para o desenvolvimento embrionário e a diferenciação celular.**

Respostas Transcricionais: expressão gênica

Temporal quando um determinado gene só é expresso em um determinado “tempo”. Estágio do desenvolvimento ou diferenciação.

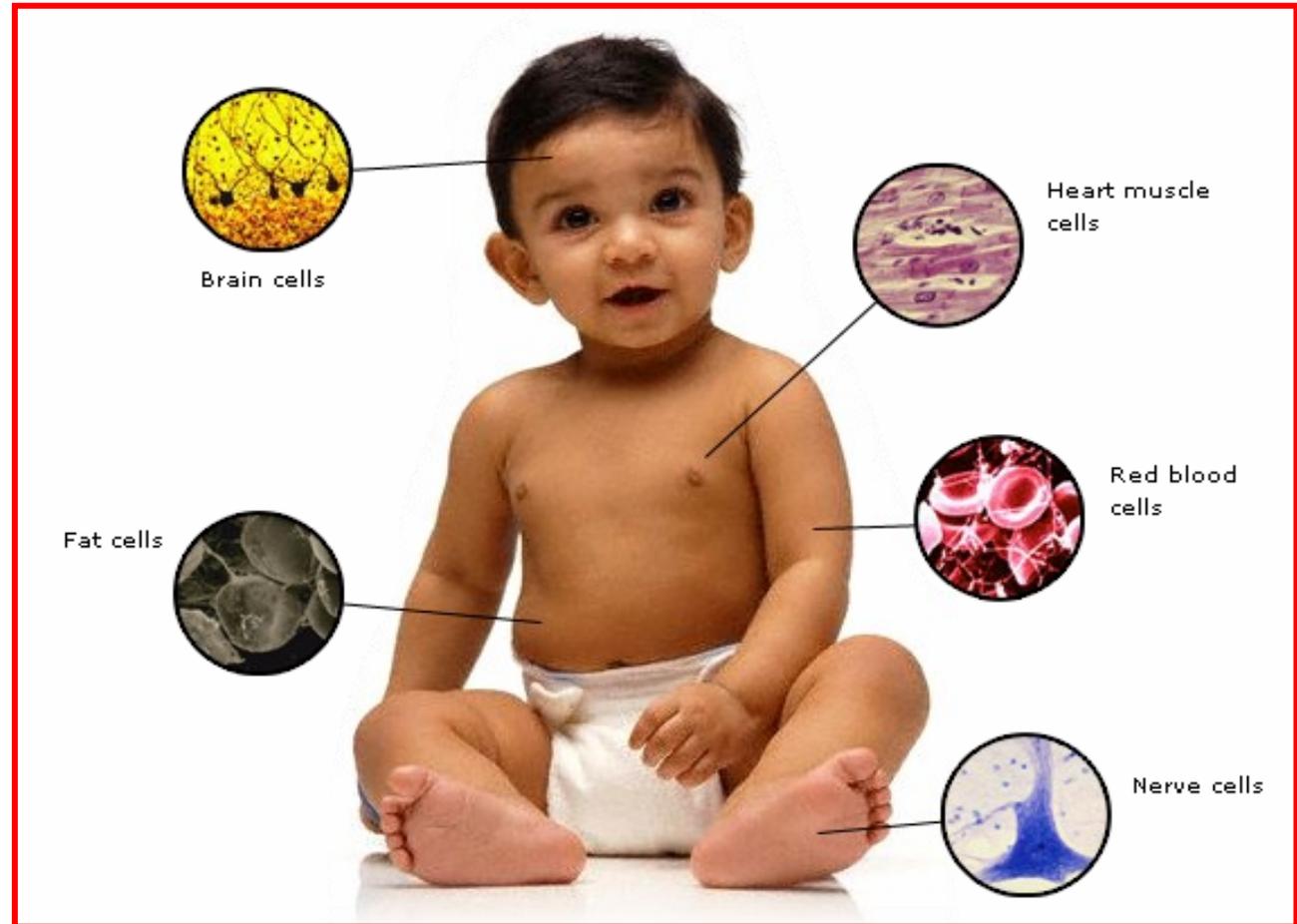
Ex: Genes que são expressos só no embrião, ou durante uma determinada fase do ciclo celular.

Espacial quando a expressão de determinado gene depende do tipo celular. Especificidade do tecido.

Ex: Genes que só são expressos em células nervosas (ex: mielina) ou no tecido muscular (ex: miosina)

Respostas Transcrpcionais: expressão gênica

Se todas as células de um eucarioto tem a mesma composição gênica (com exceção das células germinativas) o que faz as células terem funções e morfologia diferentes?



É a expressão diferencial dos genes

É a expressão diferencial dos genes

More than just transcription and translation, gene expression also involves epigenetic and environmental factors.



A monarch butterfly and caterpillar.

Both the monarch butterfly and its caterpillar have the same genes, so why do they look so different? The answer lies in gene expression.

Como ocorre a regulação da expressão gênica??

Os primeiros estudos foram em bactérias por Jacob e Monod (Instituto Pasteur, Paris)

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965



François Jacob

Prize share: 1/3



André Lwoff

Prize share: 1/3

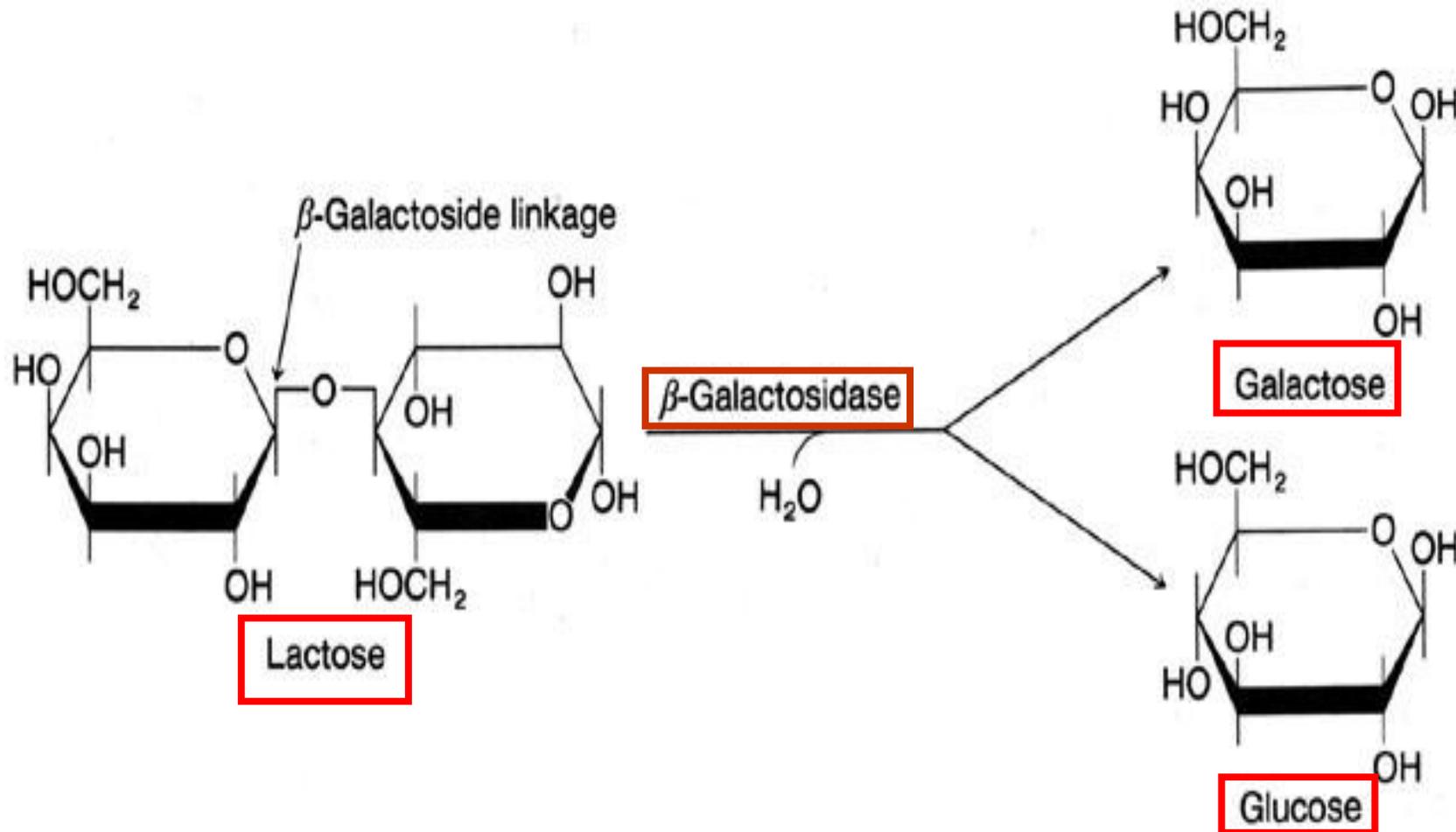


Jacques Monod

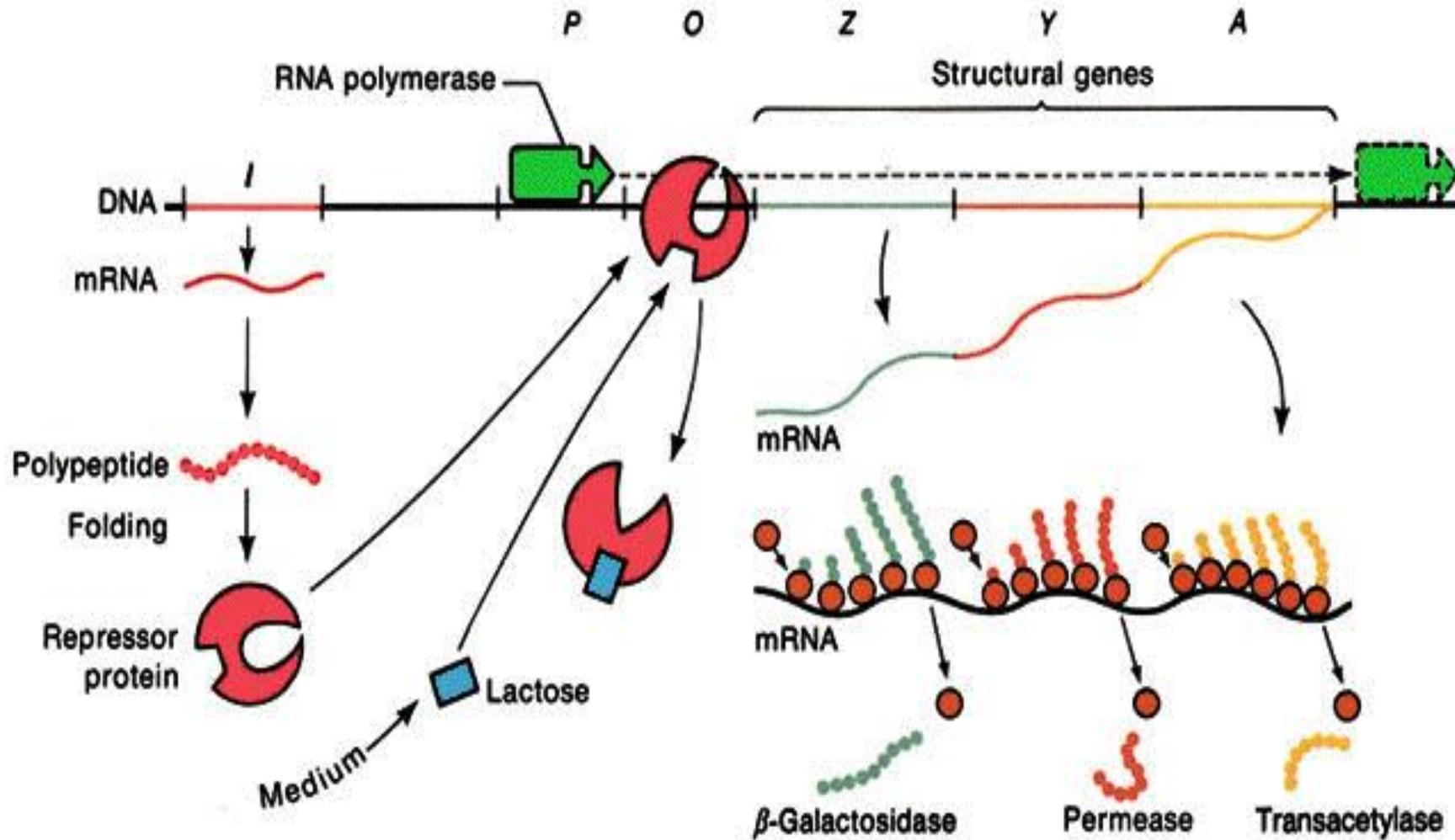
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965 was awarded jointly to François Jacob, André Lwoff and Jacques Monod *"for their discoveries concerning genetic control of enzyme and virus synthesis"*.

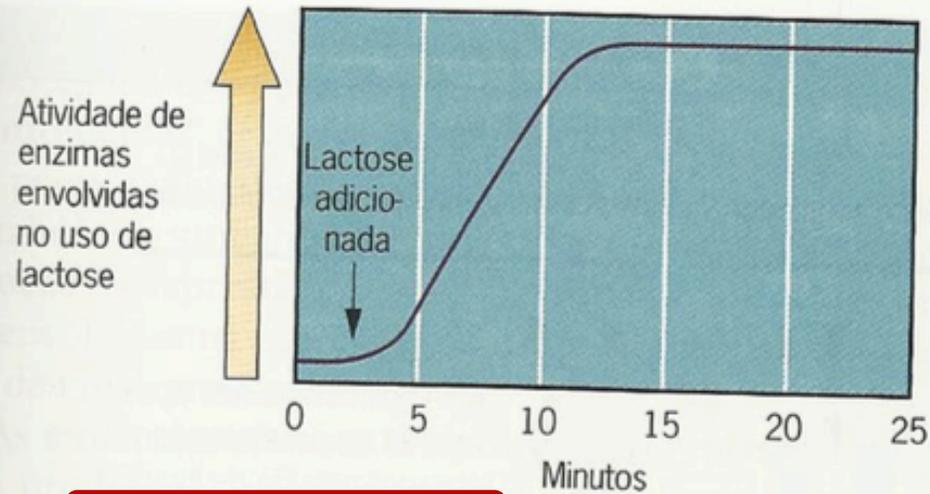
E. coli usando lactose como fonte de carbono



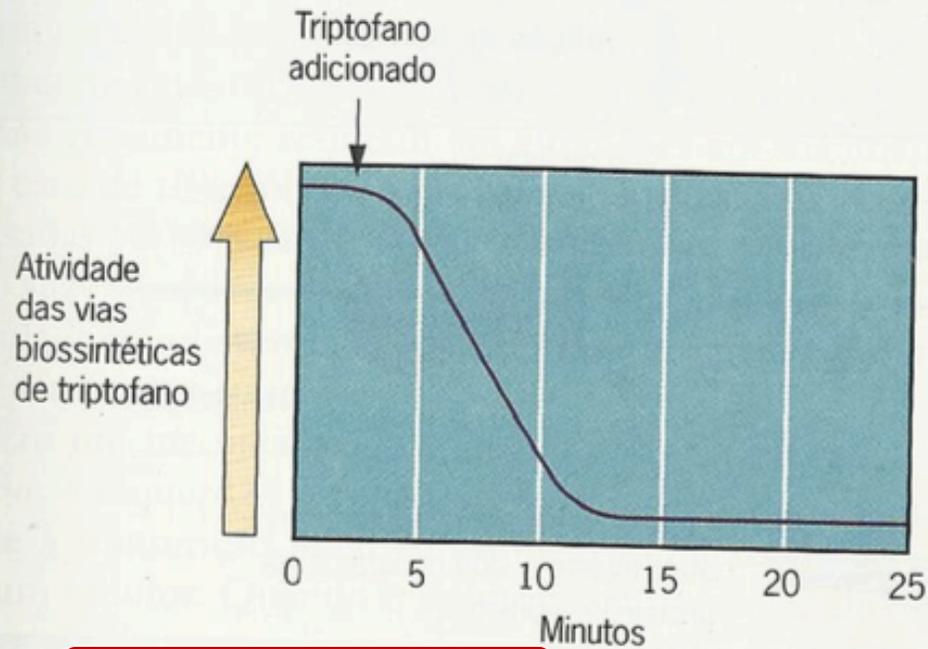
Funcionamento do operon Lactose



P: promotor O: operador



(a) Indução da síntese de enzima.



(b) Repressão da síntese de enzimas

Lactose tem de ser degradada para ser usada quando não há glicose que é fonte de carbono preferencial.

Triptofano é um aminoácido importante para a síntese proteica. Mas o triptofano só é fabricado pela célula se não houver este aminoácido disponível.

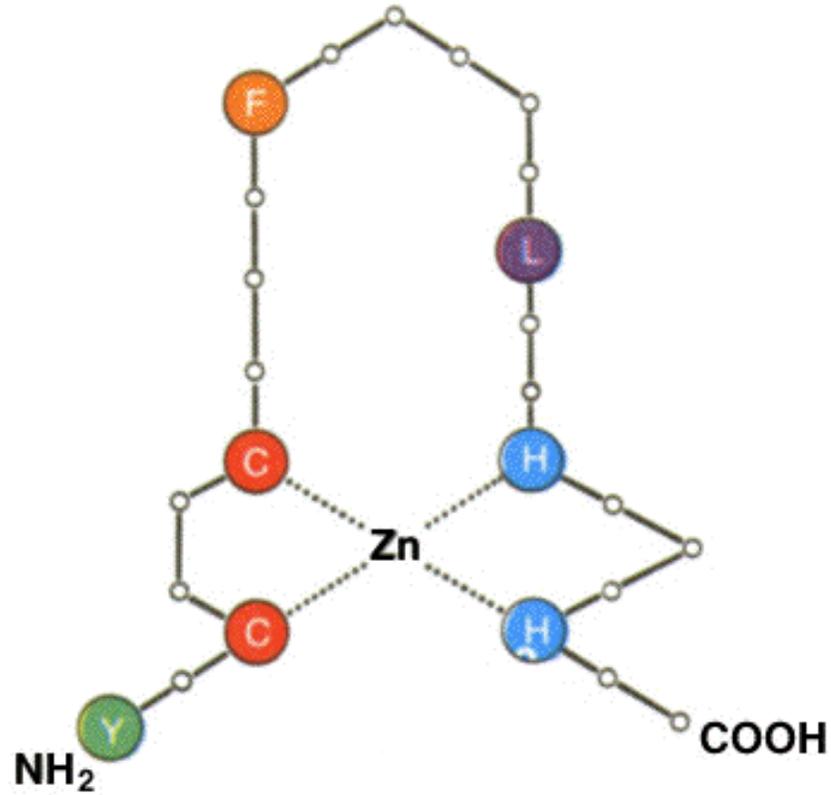
Resumo: procariotos

- Os organismos usam várias estratégias moleculares para regular a expressão de seus genes.
- Indução enzimática e repressão enzimática foram exemplificadas nos procariotos. Técnica da época de Jacob e Monod.
- Procariotos usam promotor para receber a RNAPol e iniciar a transcrição dependendo da presença ou ausência de uma proteína repressora.
- Estes mecanismos visam a sobrevivência do organismo produzindo somente enzimas necessárias para cada condição fisiológica.

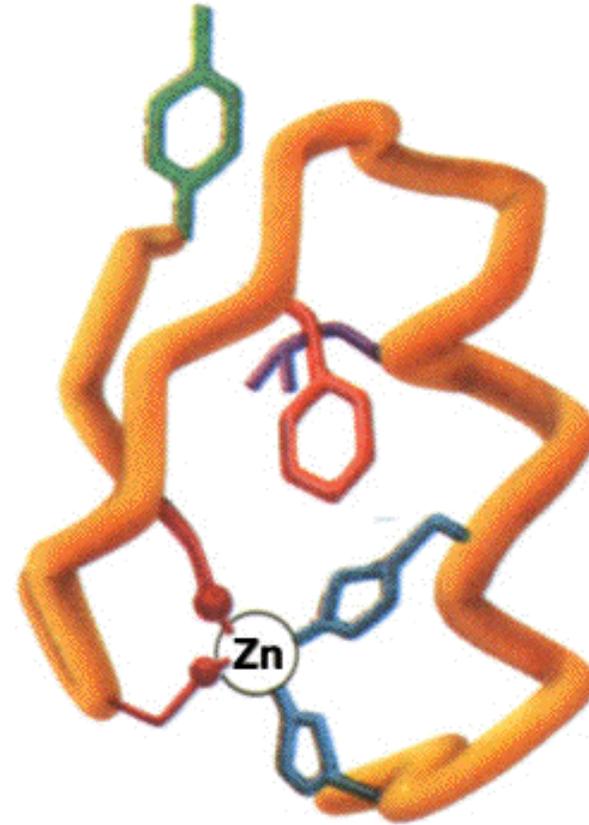
Controle da expressão em eucariotos

Fatores de transcrição: são proteínas sintetizadas geralmente pelo próprio organismo que se ligam a sequencias específicas de DNA, na região promotora, controlando o fluxo de informação gênica. Controlam vários genes na mesma célula.

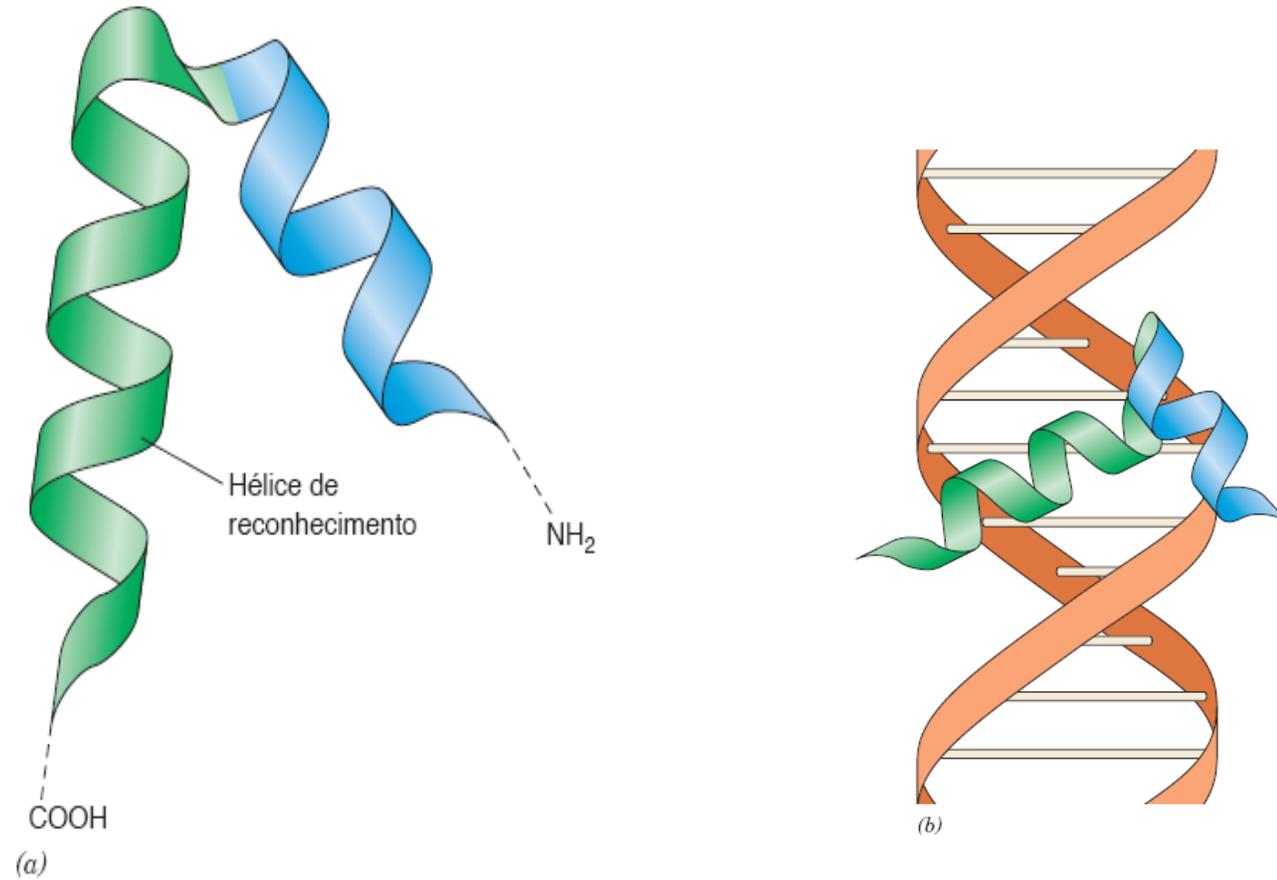
Fator de Transcrição com estrutura de Dedos de zinco



C₂H₂ zinc finger

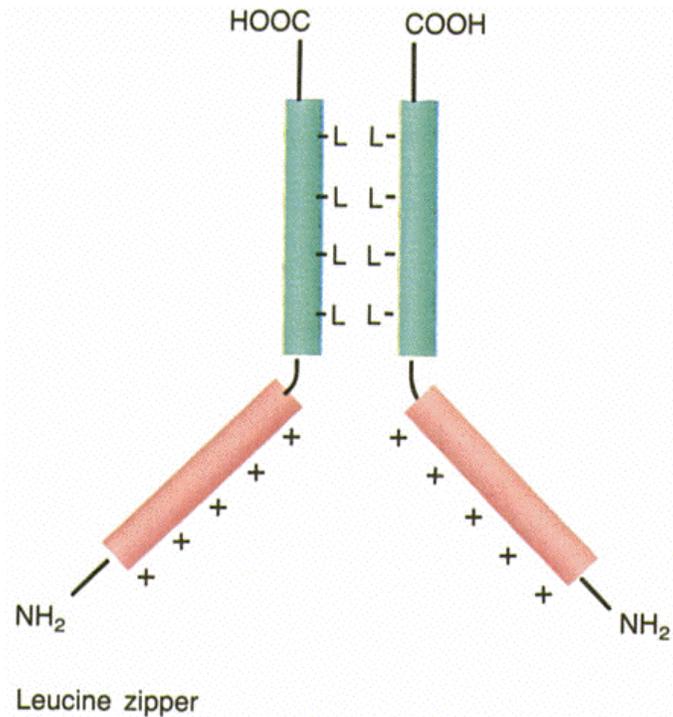


Fator de Transcrição com estrutura de Hélice-alça-hélice



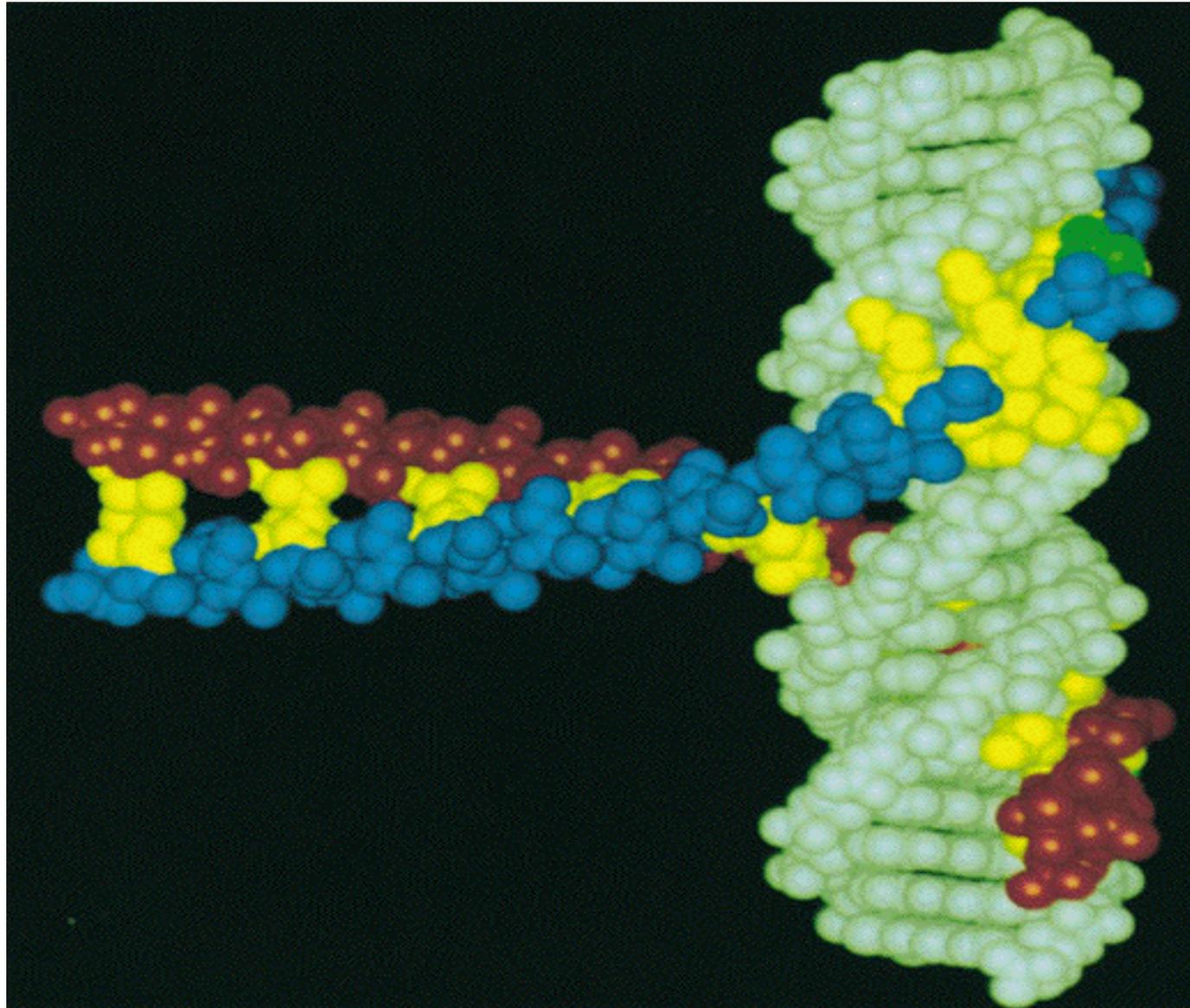
Proteínas hélice-volta-hélice usam uma das hélice para ligar na fenda maior do DNA.

Fator de Transcrição com estrutura de Zíper de leucina



Proteínas zíper de leucina formam dímeros em virtude da colocação periódica de uma leucina a cada sete resíduos ao longo de uma α -hélice.

Fator de transcrição interagindo com o DNA



Papel do *enhancer* (acentuador)

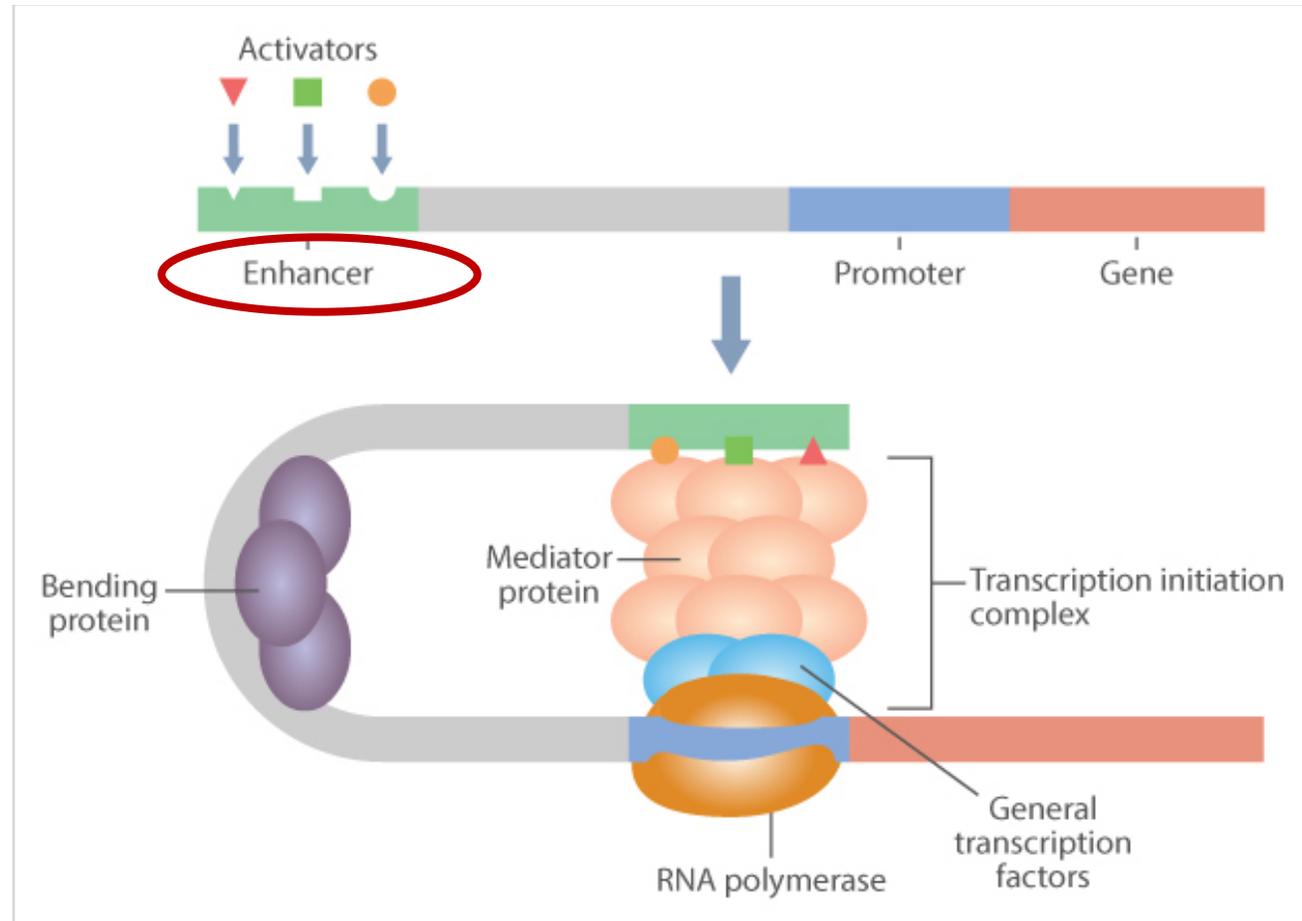
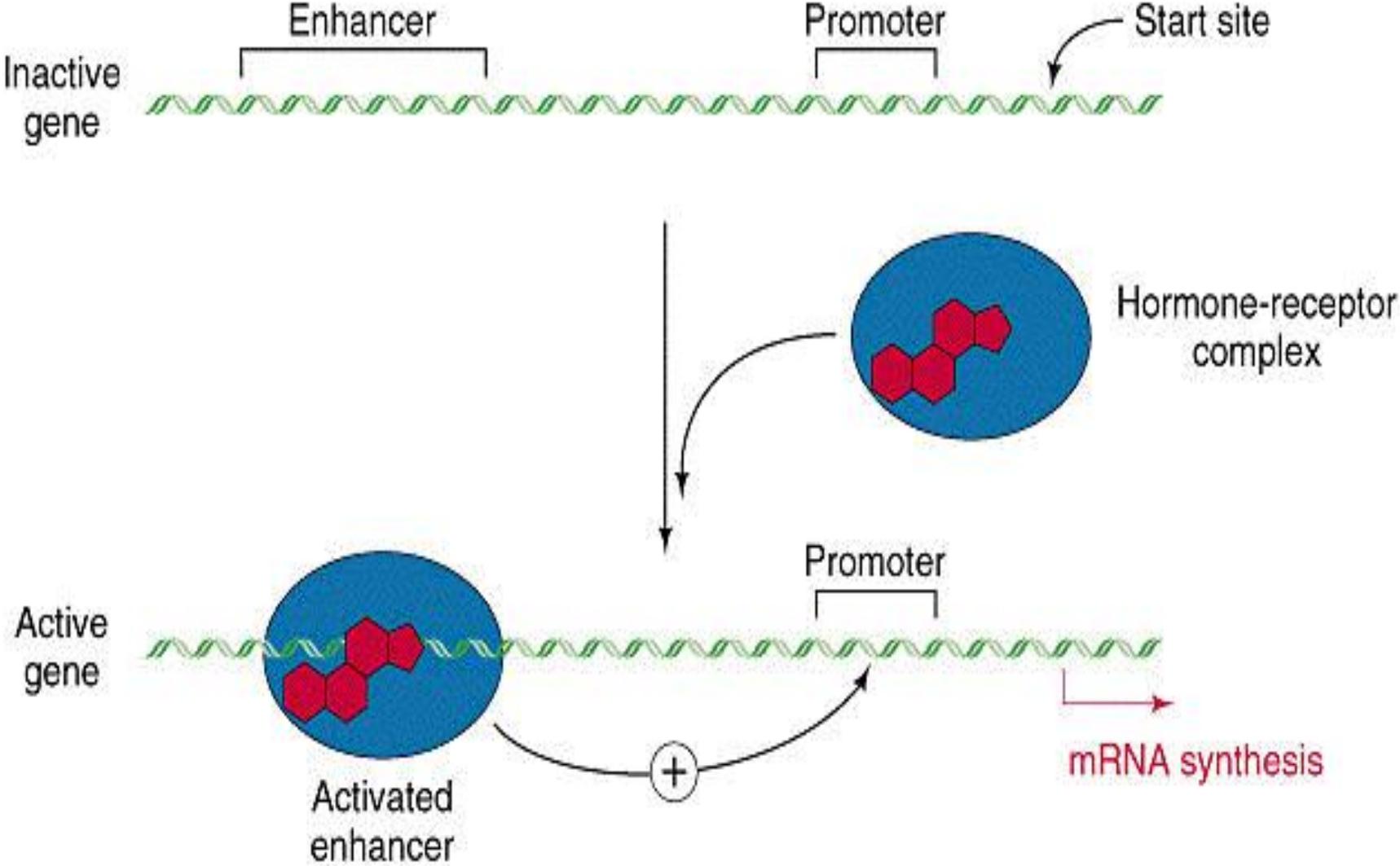


Figure 4: Possible mode of action of enhancers and transcription activators.

When activator proteins bind to a group of distal control elements (an enhancer), the bound activators are brought closer to the promoter by a DNA-bending protein. The activators bind to a mediator protein and general transcription factors, forming an active transcription initiation complex on the promoter.

Papel do *enhancer* (ou acentuador)



Resumo: eucariotos

- Controle transcricional depende de promotores, enhancer, fatores de transcrição.
- O promotor recebe a RNAPol, fatores de transcrição, um complex proteico e ativadores do enhancer para iniciar a transcrição.
- Vários tipos de RNAs são produzidos, inclusive os ncRNA.
- Descontrole da expressão gênica: pode gerar doenças como o cancer. Exemplo: genes que controlam a divisão celular são inativados.

Como estudar expressão genica atualmente? Quais são as tecnologias existentes?

Northern Blotting
Biblioteca subtrativa

Análise de Microarray
RNAseq

RNA-seq

RNA-seq: tecnologia de sequenciamento (Next-generation sequencing) aplicadas aos transcriptomas (RNAs).

Comparação de 2 condições ou 2 tecidos
(controle X “desafio”)

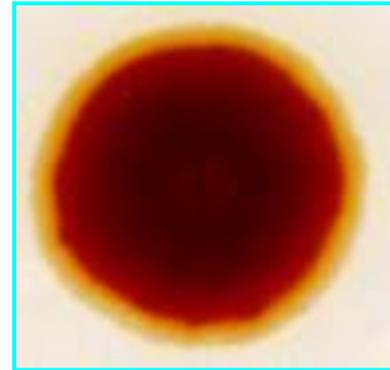
Qual será o organismo modelo de estudo para entender a tecnologia do RNA-seq?

Quais serão as perguntas biológicas que deverão ser respondidas com o uso desta tecnologia?

Trichophyton rubrum

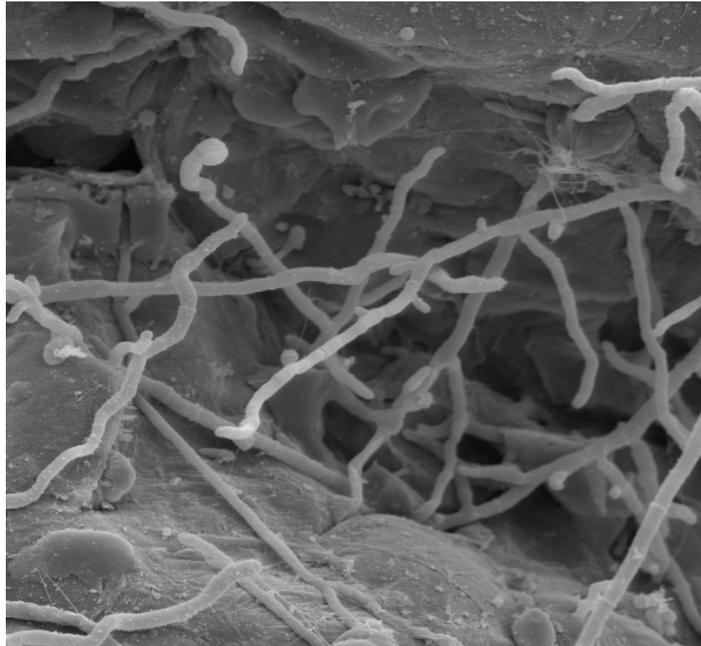
É um dermatófito mais isolado: 80-90% das dermatofitoses

Antropofílico
cosmopolita



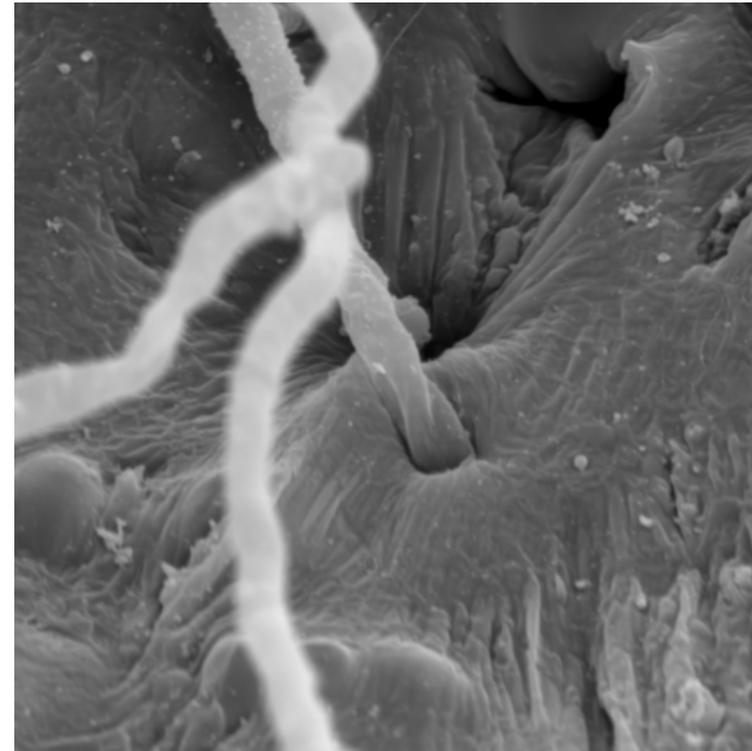
**Dermatófito: usa queratina
como fonte de nutriente**

Trichophyton rubrum: interação com a pele humana



(1000X)

T. rubrum skin and nail infections are the most prevalent in immunocompetent individuals worldwide.



Scanning Electron Microscopy
(3000X)

Peres et al 2016. Medical Micology.

Dermatófitos: fungos que causam micoses

- ✓ Fungos queratinofílicos capazes de infectar tecidos queratinizados em humanos e animais

Dermatofitoses ou Tineas

- ✓ Pele, pêlos, cabelos e unhas



Tinea pedis



Tinea capitis



Tinea unguium
onicomicose





AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



AN OPEN ACCESS JOURNAL PUBLISHED BY
THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

2012

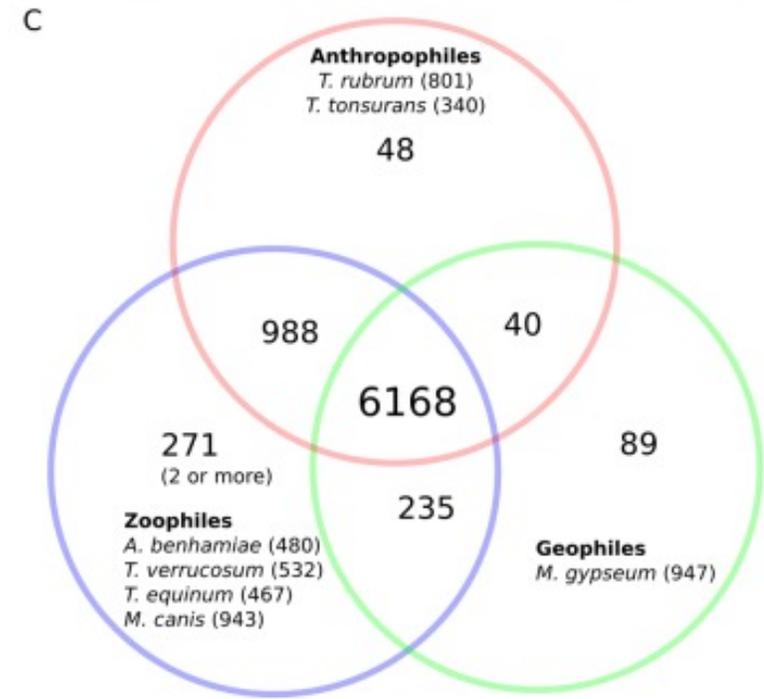
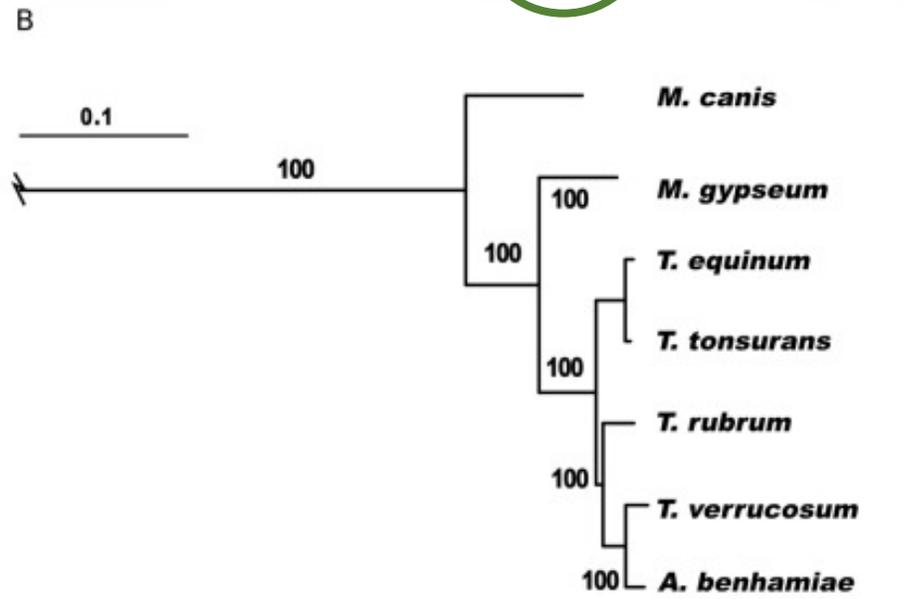
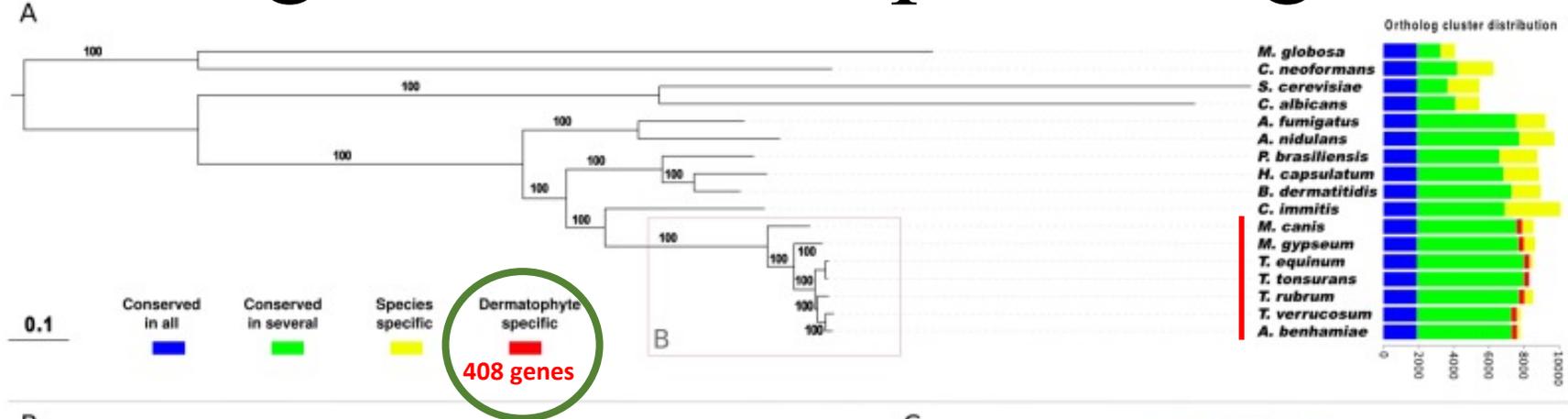
RESEARCH ARTICLE

Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection

Diego A. Martinez,^a Brian G. Oliver,^b Yvonne Gräser,^c Jonathan M. Goldberg,^a Wenjun Li,^d Nilce M. Martinez-Rossi,^e Michel Monod,^f Ekaterina Shelest,^g Richard C. Barton,^h Elizabeth Birch,ⁱ Axel A. Brakhage,^g Zehua Chen,^a Sarah J. Gurr,ⁱ David Heiman,^a Joseph Heitman,^d Idit Kosti,^j Antonio Rossi,^e Sakina Saif,^a Marketa Samalova,ⁱ Charles W. Saunders,^k Terrance Shea,^a Richard C. Summerbell,^l Jun Xu,^k Sarah Young,^a Qiandong Zeng,^a Bruce W. Birren,^a Christina A. Cuomo,^a and Theodore C. White^m

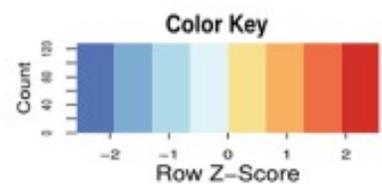
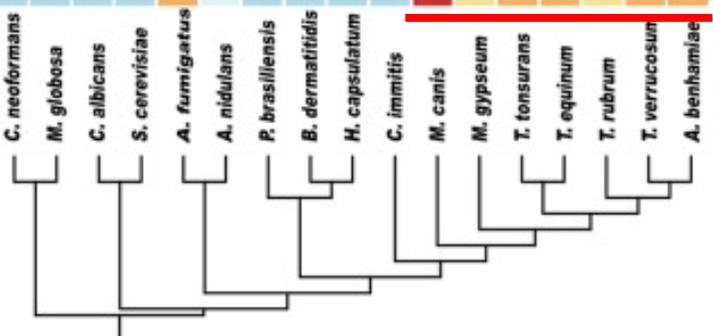
mBio 3(5): e00259-12. doi:10.1128/mBio.00259-12 2012.

Análise genômica comparativa global



Preferência por nicho/hospedeiro

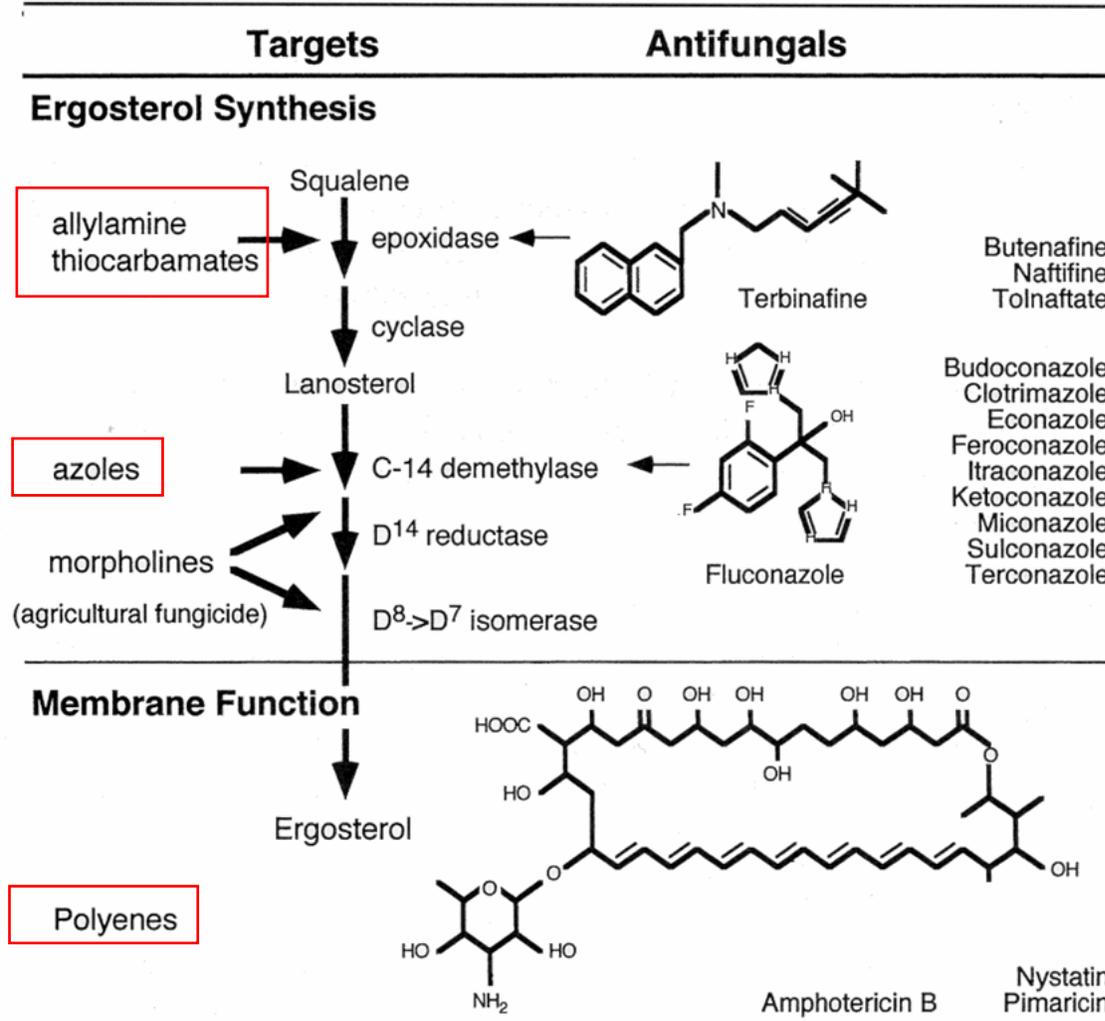
Secondary metabolism	2	0	2	1	15	7	9	43	51	62	107	53	59	60	51	61	58	IPR002575::Aminoglycoside phosphotransferase
	5	6	10	3	77	121	39	39	44	45	84	70	60	62	64	69	66	IPR001128::Cytochrome P450
	4	7	3	2	39	56	12	13	12	21	47	39	31	34	30	34	35	IPR009081::Acyl carrier protein-like
	4	5	3	2	39	50	11	10	11	18	44	34	30	33	28	31	33	IPR006163::Phosphopantetheine-binding
	0	4	0	0	14	19	4	4	7	7	21	17	15	17	15	19	17	IPR001242::Condensation domain
	1	2	1	1	14	14	4	4	5	7	17	15	15	18	14	14	14	IPR010071::Amino acid adenylation
	4	2	1	1	45	76	17	16	16	25	43	38	35	32	35	35	32	IPR002401::Cytochrome P450, E-class, group I
	1	0	0	0	10	39	0	2	5	14	19	23	19	20	18	5	6	IPR020806::Polyketide synthase, phosphopantetheine-binding
	6	9	5	9	39	48	26	30	28	31	48	41	34	35	34	39	38	IPR020845::AMP-binding, conserved site
	0	0	0	0	10	16	2	2	2	6	10	8	11	11	10	13	12	IPR001077::O-methyltransferase, family 2
	9	12	10	10	51	68	38	41	41	39	56	51	44	46	46	51	48	IPR000873::AMP-dependent synthetase/ligase
	Kinase	110	98	109	134	148	138	167	238	245	270	329	230	227	227	233	232	228
74		0	19	41	57	71	2	20	64	87	37	87	91	87	92	9	9	IPR020635::Tyrosine-protein kinase, catalytic domain
90		46	62	87	87	95	52	64	120	144	114	133	133	127	136	52	53	IPR002290::Serine/threonine-protein kinase domain
LysM	1	0	1	0	8	17	1	4	1	2	25	20	8	9	12	8	8	IPR018392::Peptidoglycan-binding lysin domain
	0	0	1	0	7	12	2	4	1	3	23	19	8	8	10	7	7	IPR002482::Peptidoglycan-binding Lysin subgroup
Protease	3	3	5	4	5	4	4	6	6	18	19	15	18	17	17	17	17	IPR015500::Peptidase S8, subtilisin-related
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	5	5	5	5	6	5	5	IPR001842::Peptidase M36, fungalysin
	0	0	2	2	2	3	3	3	4	2	9	7	9	10	9	10	11	IPR009003::Serine/cysteine peptidase, trypsin-like
	3	3	5	4	6	4	6	8	9	17	19	15	19	17	17	18	17	IPR022398::Peptidase S8/S53, subtilisin, active site
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	5	5	5	5	5	5	5	IPR011096::Propeptide, peptidase M4/M36
	2	2	4	5	11	8	6	7	5	18	18	17	18	15	18	18	17	IPR009020::Proteinase inhibitor, propeptide
	3	3	5	4	10	7	9	11	9	21	22	17	21	19	19	20	19	IPR000209::Peptidase S8/S53, subtilisin/kexin/sedolisin
	1	1	4	3	4	2	2	2	2	14	11	12	13	12	12	12	12	IPR010259::Proteinase inhibitor I9, subtilisin propeptide
0	0	0	0	5	2	0	0	0	0	8	3	5	5	4	5	5	IPR022085::Protein of unknown function DUF3632	



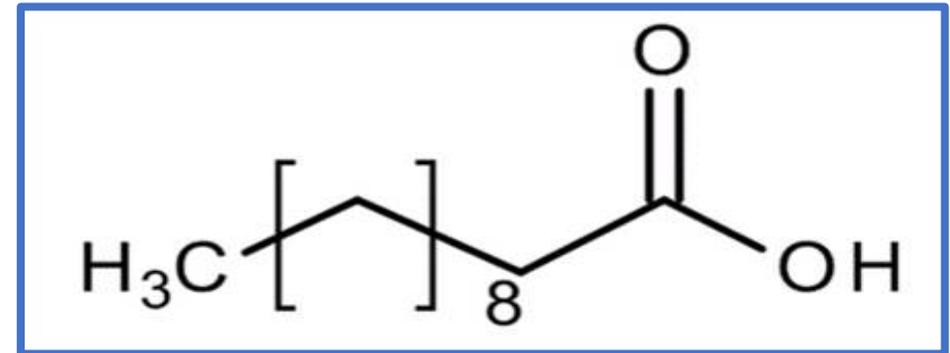
**4 Famílias
gênica super
representadas
no genoma dos
dermatófitos**

Drogas antifúngicas e alvos celulares

Common antifungal drugs in the market and their cellular targets



Ácido undecanóico (UDA): ação inespecífica



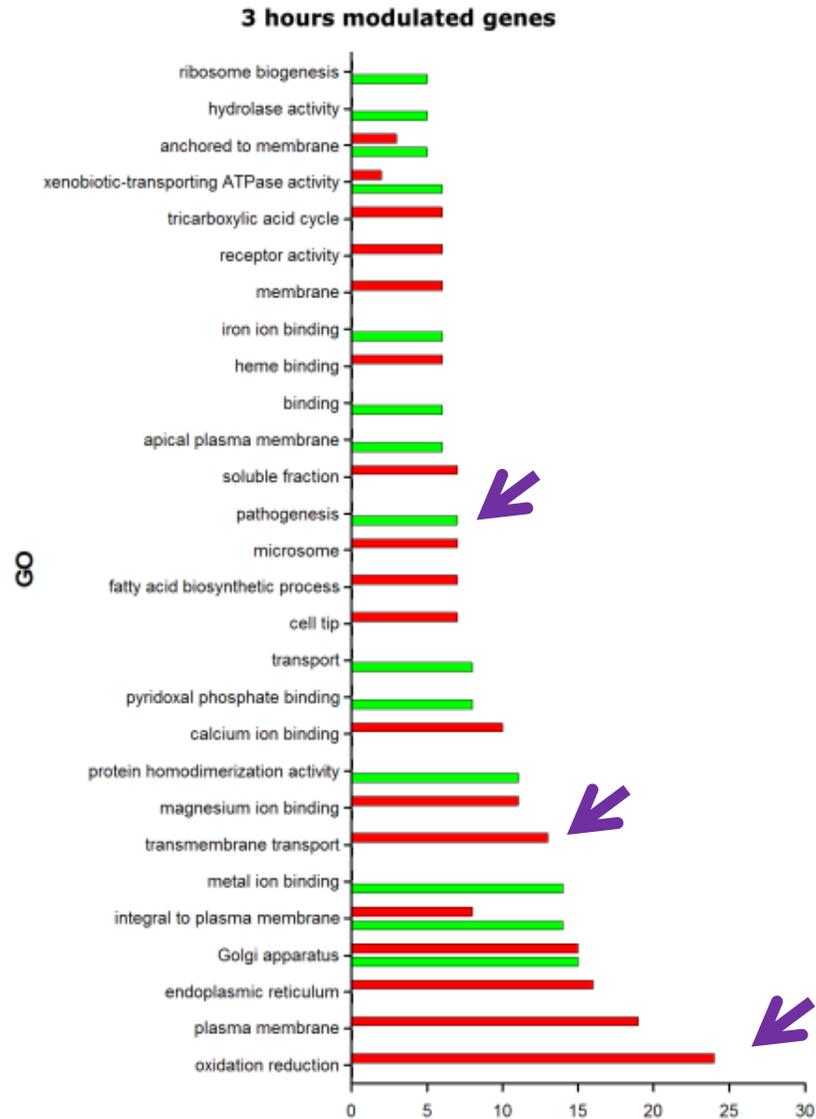
Ácido undecanóico, um ácido graxo de cadeia média, é o mais fungitóxico da série C7:0-C18:0 e pode ser usado topicamente no tratamento de dermatofitoses.

Quais perguntas biológicas poderão ser respondidas com o uso desta tecnologia?

- ✓ Como os genes deste dermatófito se expressam frente ao antifúngico denominado ácido undecanóico (UDA)? Concentração sub-inibitória.
- ✓ Como seria a expressão dos genes envolvidos na resistência a drogas?
- ✓ Como seria a expressão dos genes que codificam fator de transcrição?
- ✓ Como seria a expressão dos genes envolvidos em reparo de DNA?

Este conhecimento que norteia o uso ou o desenvolvimento de novos antifúngicos

Caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos em resposta a um determinado fármaco



█ down-regulated
█ up-regulated

Mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos

Mecanismos moleculares de resistência a um fármaco

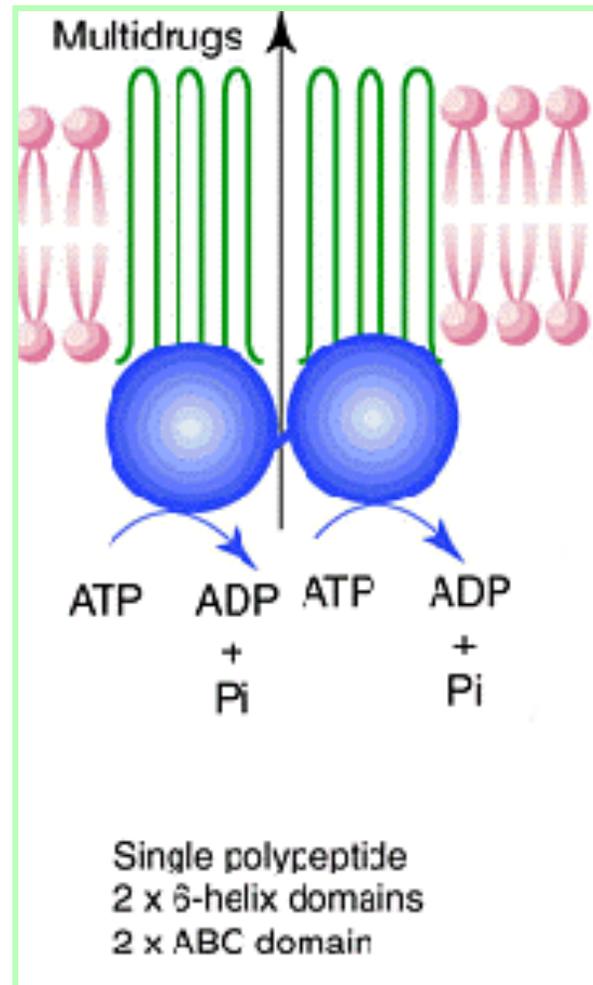
- **1. Modificação da enzima alvo por mutação.**
- **2. Efluxo de drogas (expressão de genes de múltipla Resistencia, MDR).**
- **3. Respostas gênicas a presença do fármaco (adaptação).**
- **4. Degradação do fármaco.**

Mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos

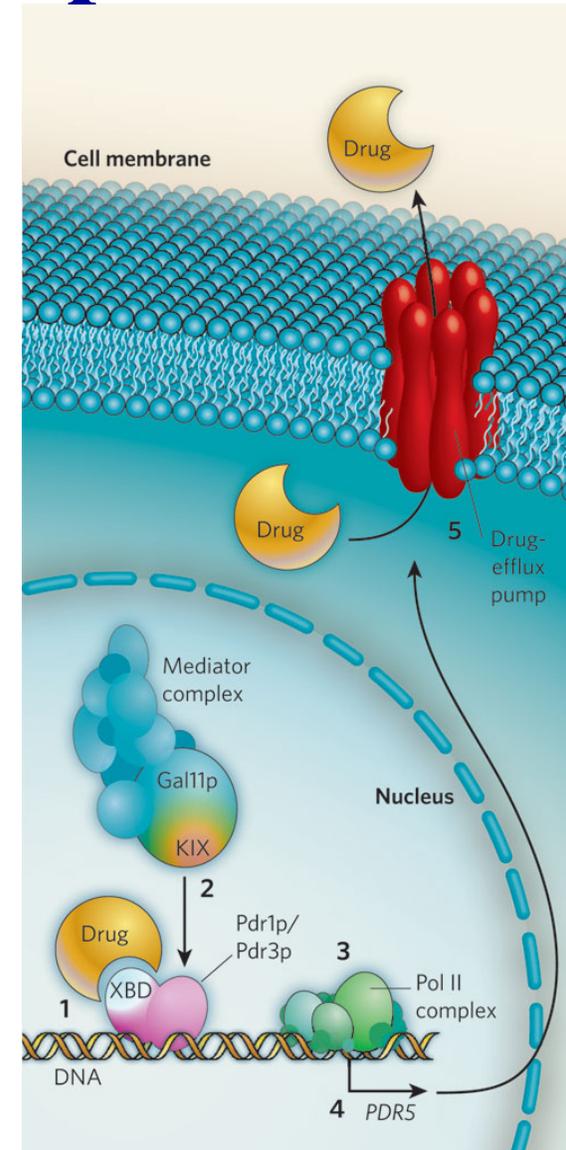
Efluxo

**O primeiro mecanismo de defesa é a
superexpressão de genes que codificam
bombas de efluxo**

Multidrug-resistance pump MDR



Bomba de eflujo de drogas



Goffeau, 2008

Mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos

Respostas gênicas a presença da droga (adaptação ao estresse)

Por exemplo:

Expressão aumentada de genes que codificam catalases. Catalases degradam o peróxido de hidrogênio protegendo as células contra o estresse oxidativo.

Diminuição de expressão de genes de virulência e outros não essenciais em situação de estresse.

Expressão aumentada de genes envolvidos no reparo de DNA.

Os dados brutos de RNA-seq do trabalho abaixo serão utilizados para uma reanálise utilizando-se outros programas e outros parâmetros.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid

Received: 6 September 2017

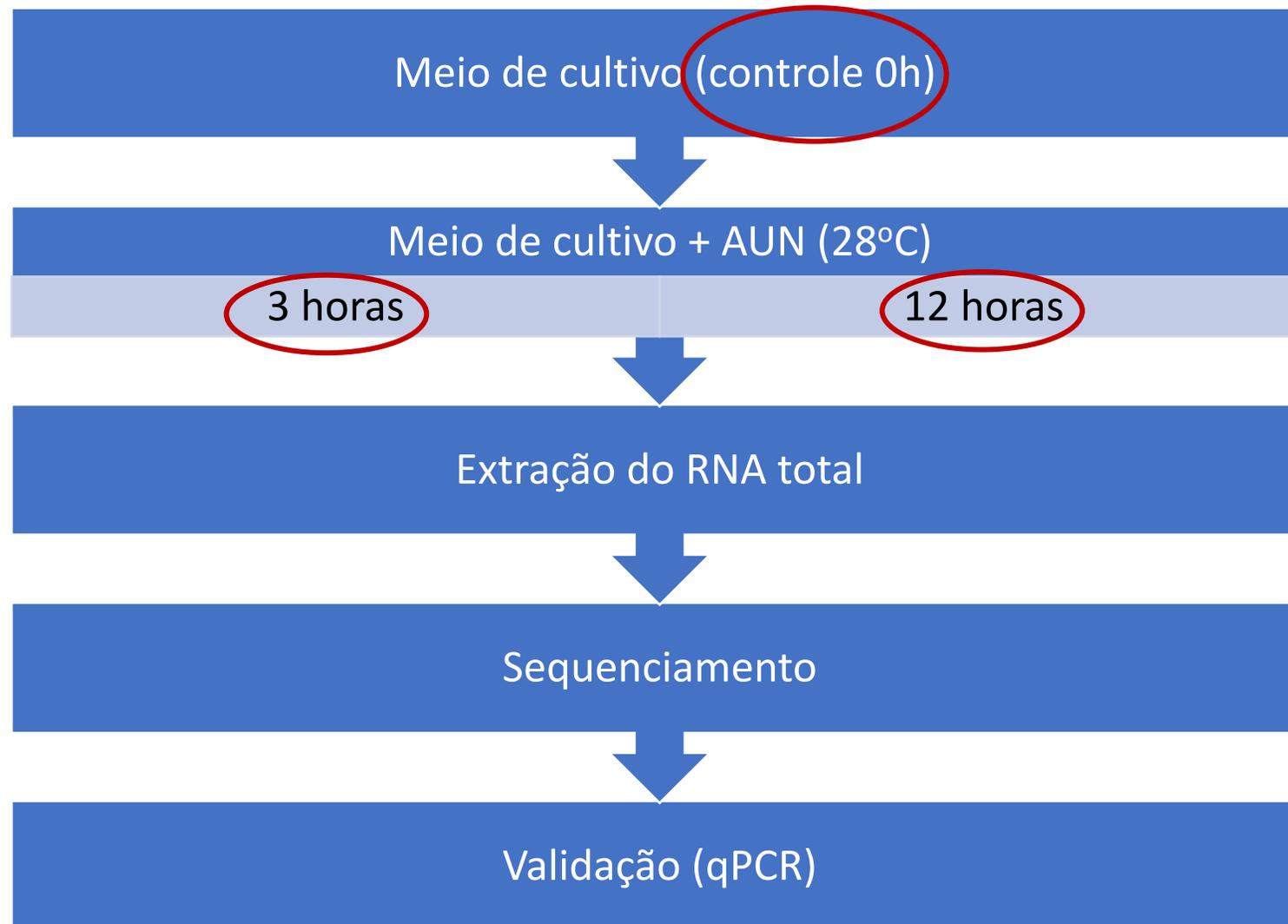
Accepted: 18 January 2018

Published online: 06 February 2018

Niege S. Mendes¹, Tamires A. Bitencourt¹, Pablo R. Sanchez¹, Rafael Silva-Rocha²,
Níle M. Martinez-Rossi¹ & Antonio Rossi¹

While fatty acids are known to be toxic to dermatophytes, key physiological aspects of the *Trichophyton rubrum* response to undecanoic acid (UDA), a medium chain saturated fatty acid (C_{11:0}), are not well understood. Thus, we analysed RNA-seq data from *T. rubrum* exposed to sub-lethal doses of UDA for 3 and 12 h. Three putative pathways were primarily involved in UDA detoxification: lipid metabolism and cellular membrane composition, oxidative stress, and pathogenesis. Biochemical assays showed cell membrane impairment, reductions in ergosterol content, and an increase in keratinolytic activity following UDA exposure. Moreover, we assessed differential exon usage and intron retention following UDA exposure. A key enzyme supplying guanine nucleotides to cells, inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), showed high levels of intron 2 retention. Additionally, phosphoglucomutase (PGM), which is involved in the glycogen synthesis and degradation as well as cell wall biosynthesis, exhibited a significant difference in exon 4 usage following UDA exposure. Owing to the roles of these enzymes in fungal cells, both have emerged as promising antifungal targets. We showed that intron 2 retention in *impdh* and exon 4 skipping in *pgm* might be related to an adaptive strategy to combat fatty acid toxicity. Thus, the general effect of UDA fungal toxicity involves changes to fungal metabolism and mechanisms for regulating pre-mRNA processing events.

Delineamento experimental



Questões

1. Discuta a evolução das técnicas de expressão gênica.
2. O que você entende por RNA-seq?
3. Qual objetivo de usar RNA-seq de um fungo tratado com um fármaco?
4. Dos mecanismos de resistência a antifúngicos quais podem ser observados por RNA-seq? Porque?
5. O que são enzimas induzíveis e enzimas repressíveis em procariotos.
6. O que vc entende por fator de transcrição? Qual é a importância de buscar fatores de transcrição em um transcritoma?