

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 Transcricionais: 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, etc) 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

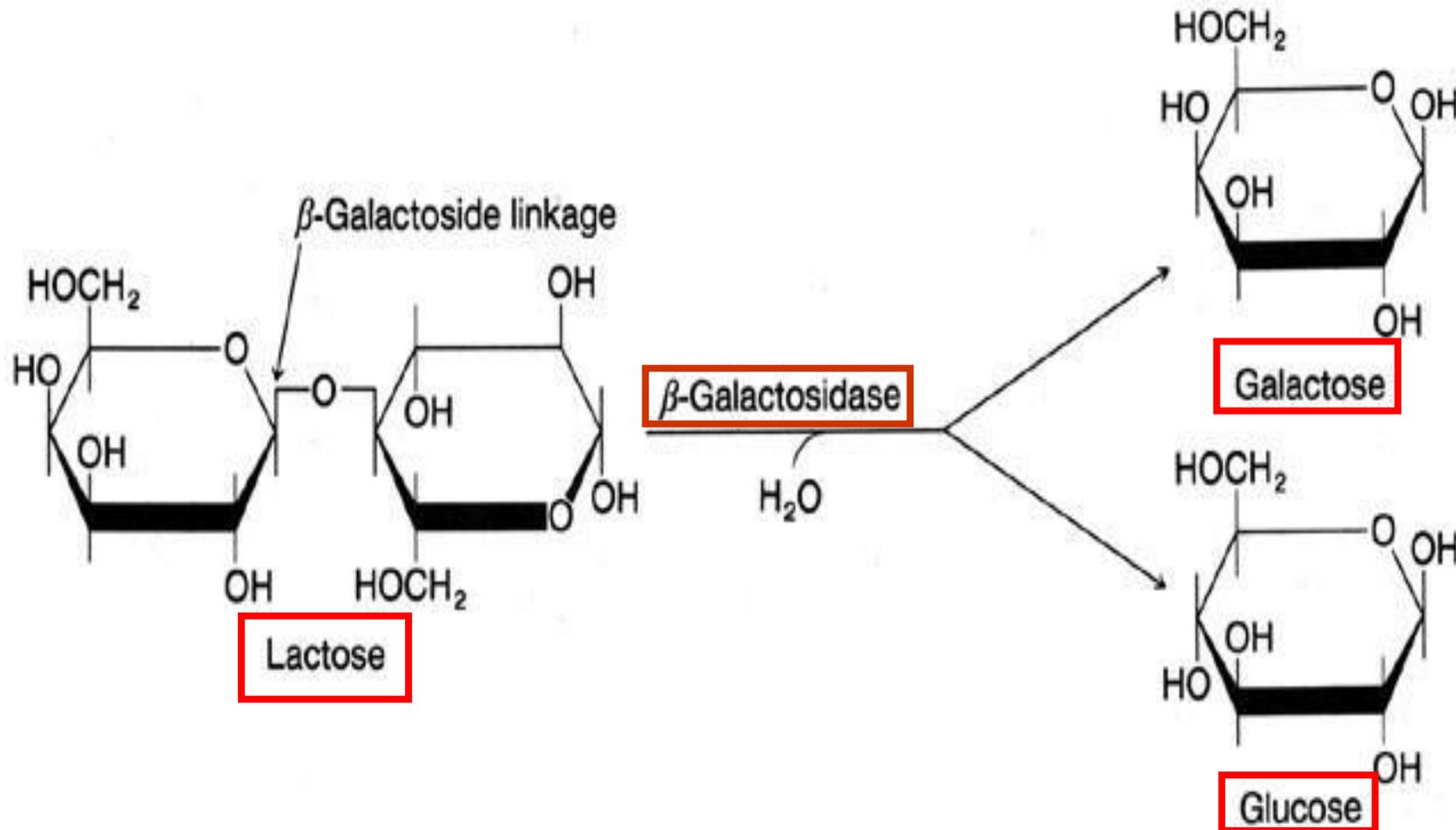


Jacques Monod

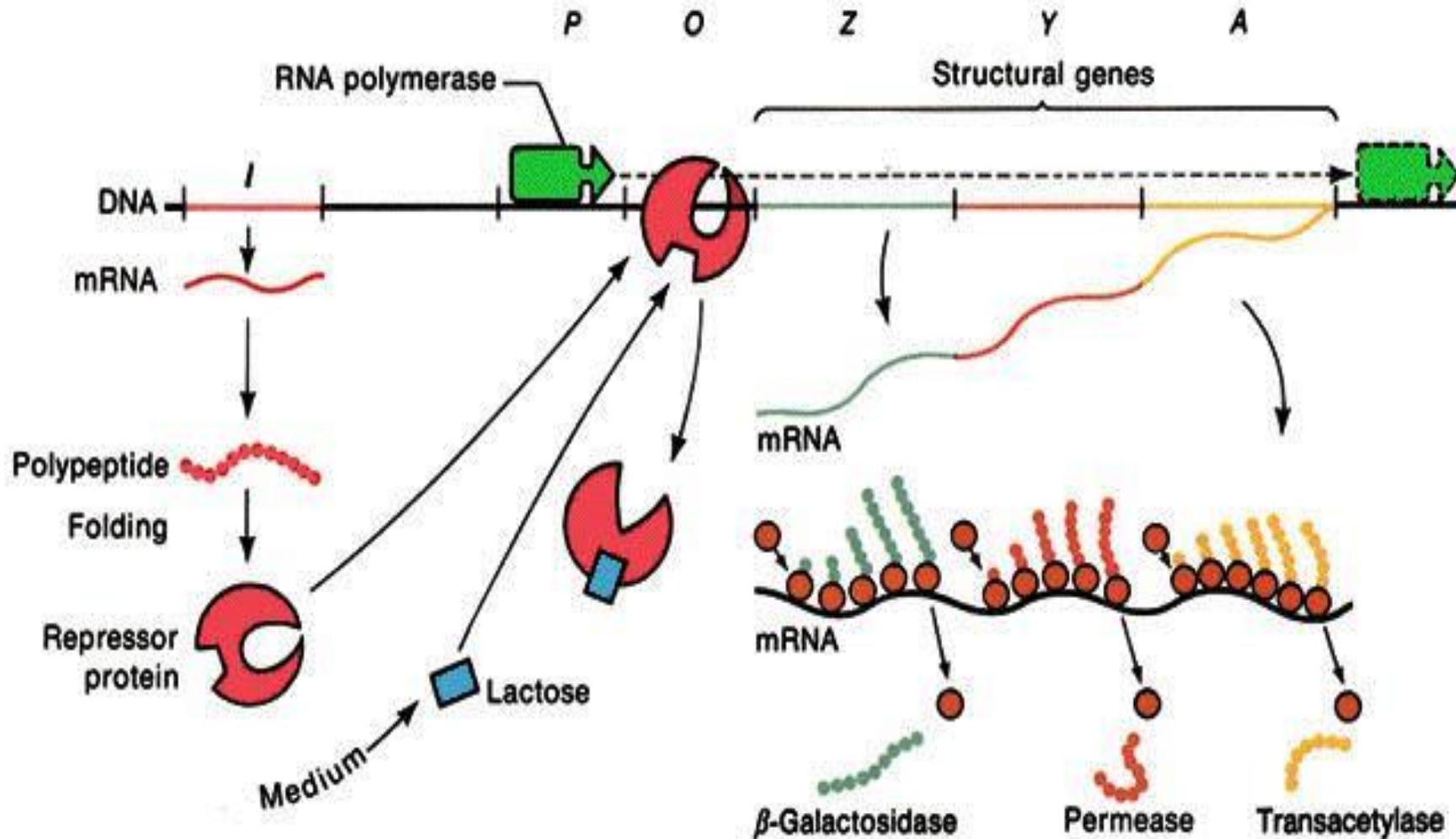
Prize share: 1/3

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"*.

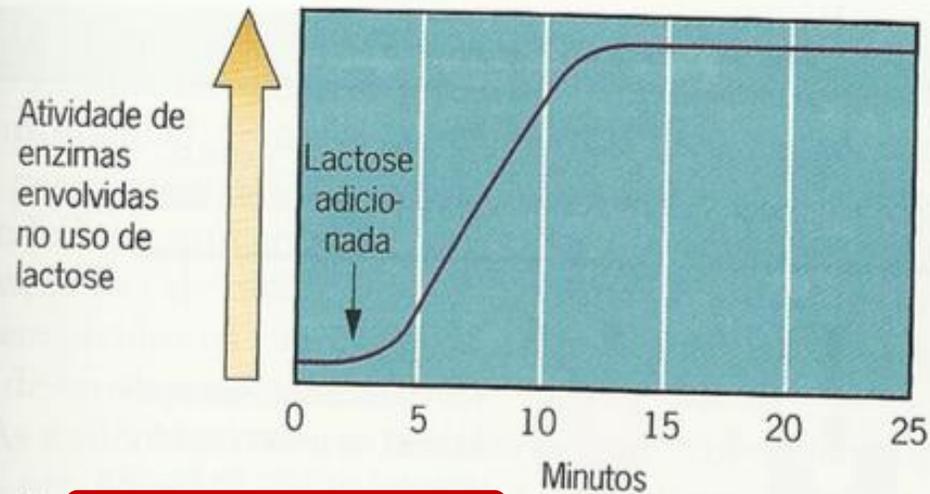
E. coli usando lactose como fonte de carbono



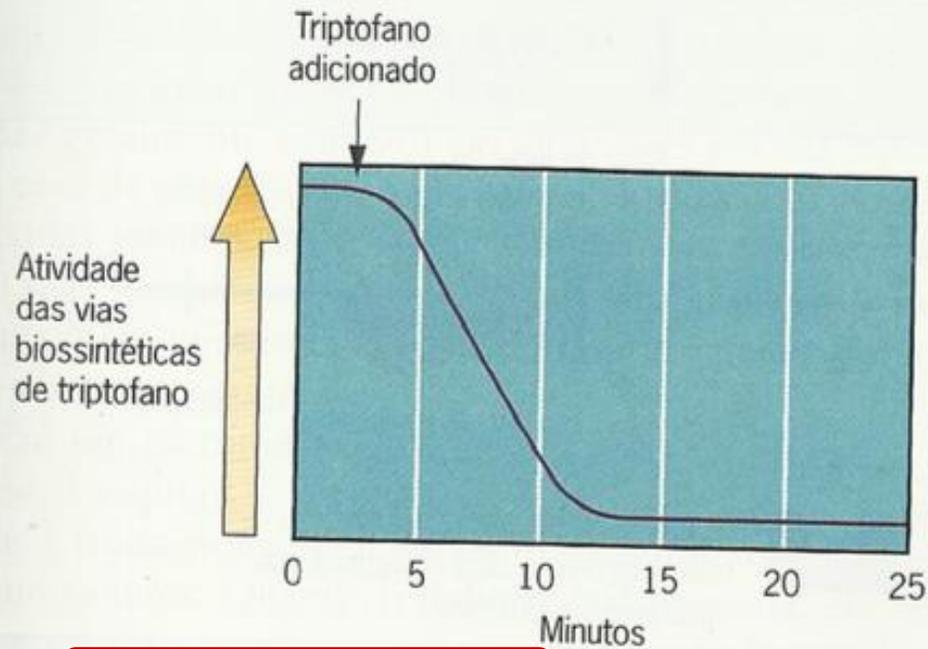
Funcionamento do operon Lactose



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.

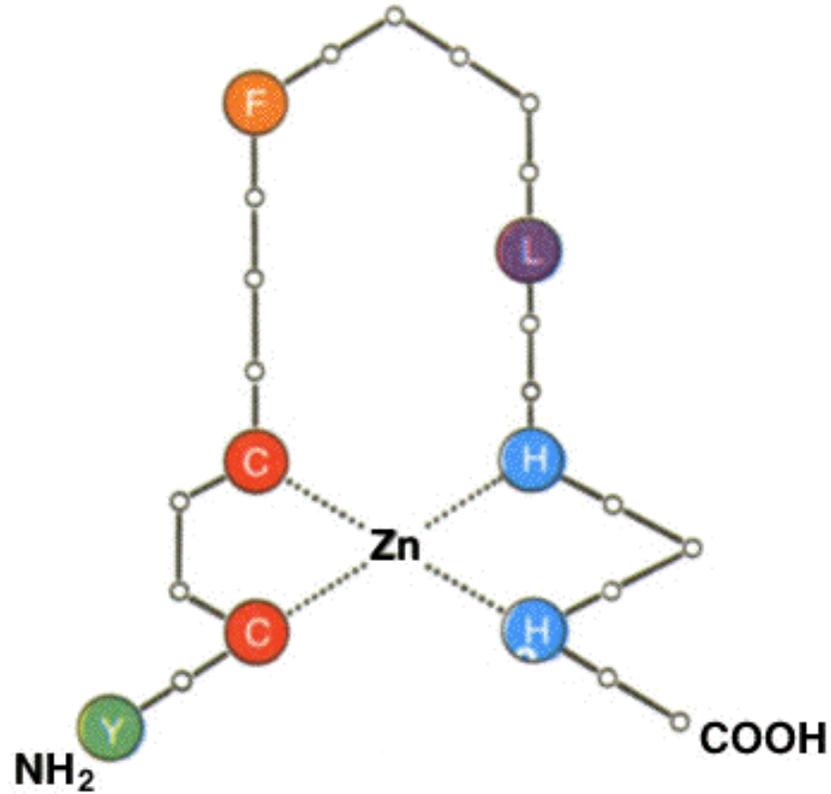
- Indução enzimática e repressão enzimática foram exemplificadas nos procariotos. Mecanismo descrito por Jacob e Monod.
- Procariotos usam promotor para receber a RNAPol e iniciar a transcrição dependendo da presença ou ausência de uma proteína repressora.
- Estes mecanismos visam a sobrevivência do organismo produzindo somente enzimas necessárias para cada condição fisiológica.

Controle da expressão em eucariotos

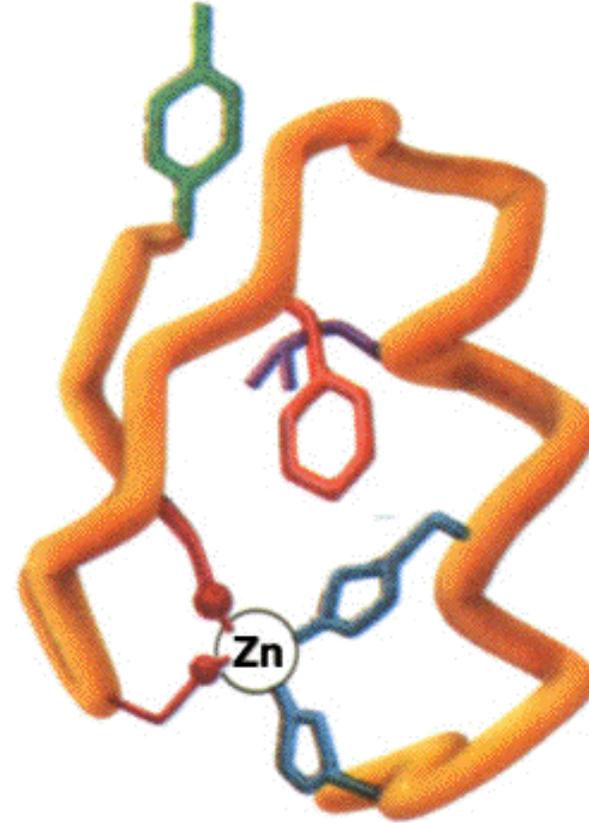
Fatores de transcrição: são proteínas sintetizadas geralmente pelo próprio organismo que se ligam a sequencias específicas de DNA, na região promotora dos genes, controlando o fluxo de informação gênica.

Controlam vários genes na mesma célula.

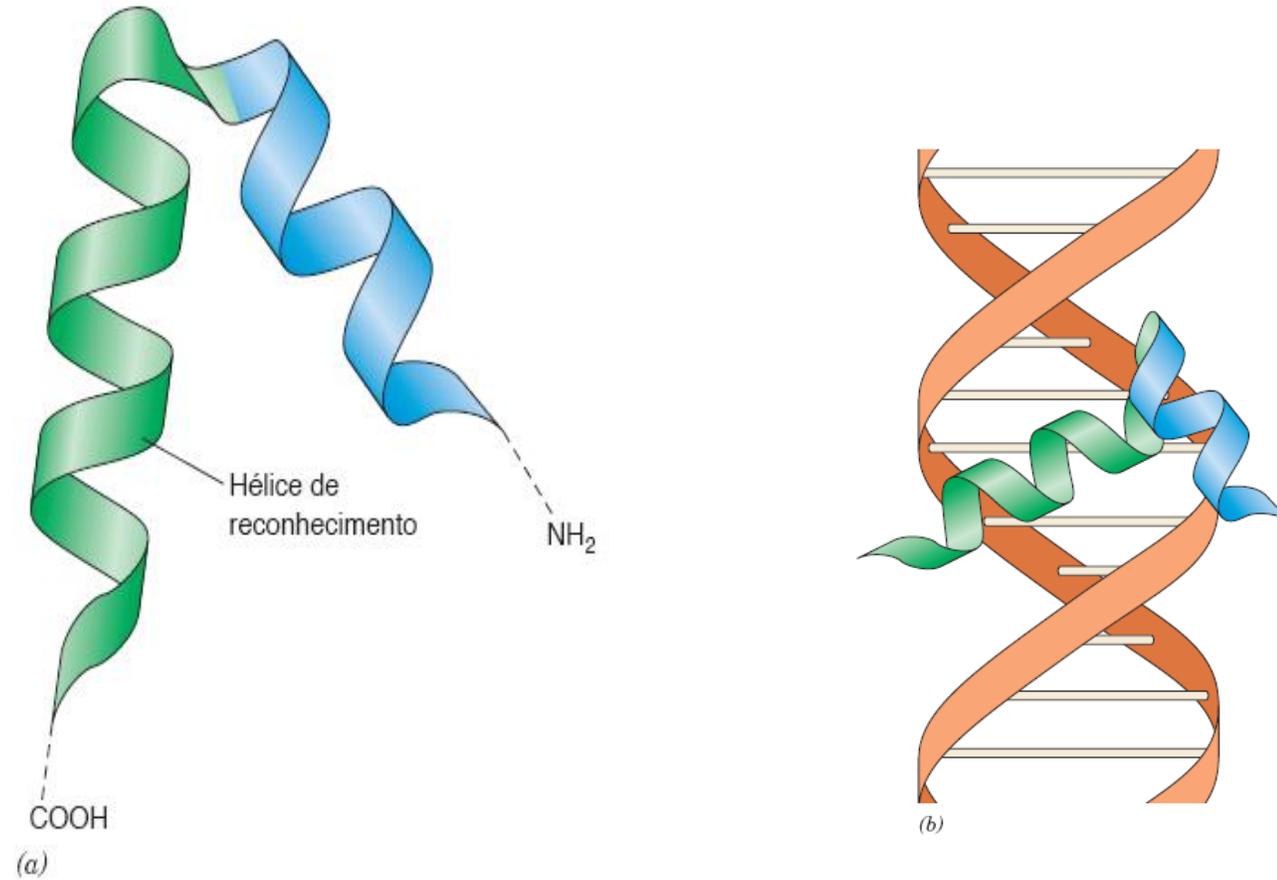
Fator de Transcrição com estrutura de Dedos de zinco



C₂H₂ zinc finger

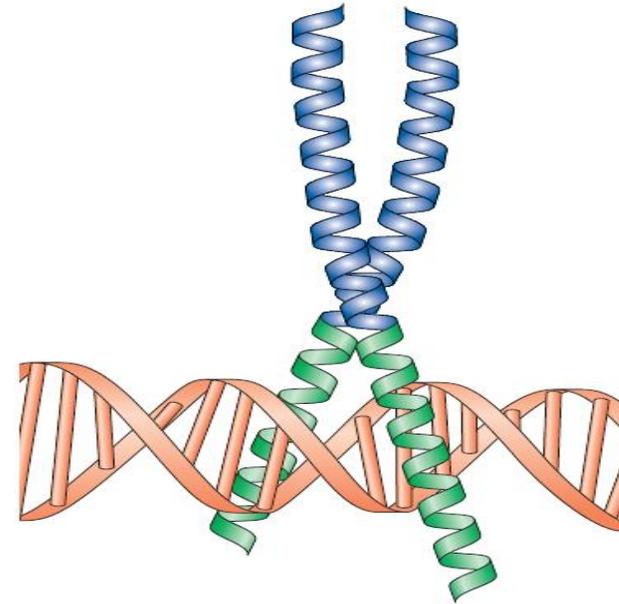
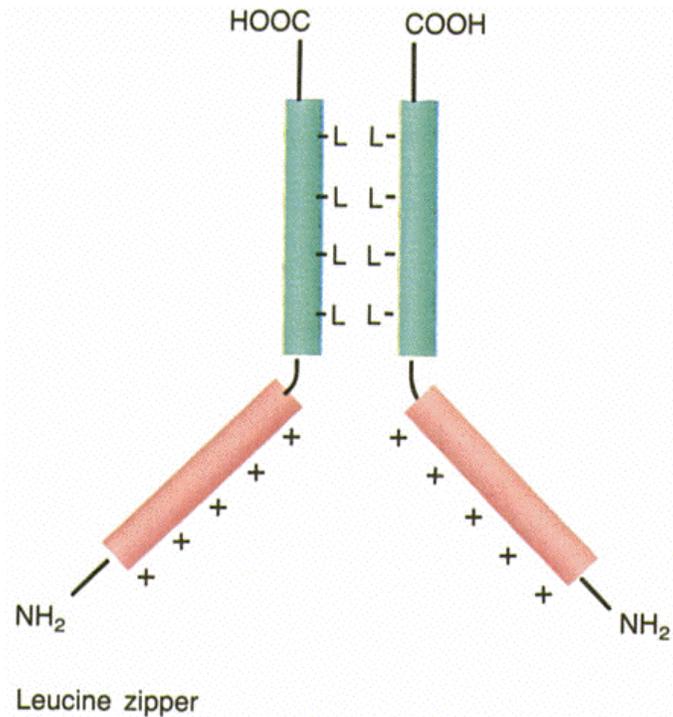


Fator de Transcrição com estrutura de Hélice-alça-hélice



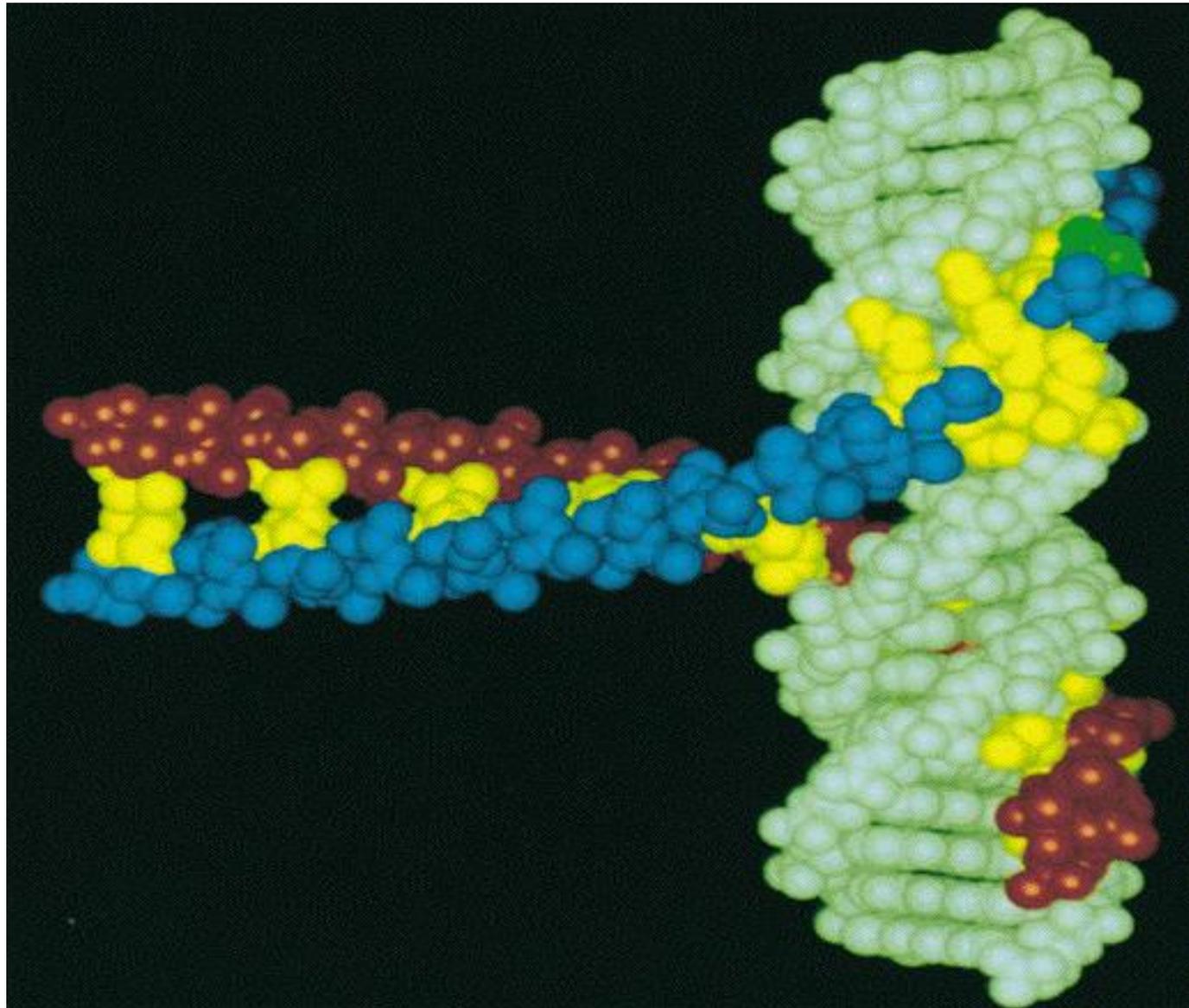
Proteínas hélice-volta-hélice usam uma das hélice para ligar na fenda maior do DNA.

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)

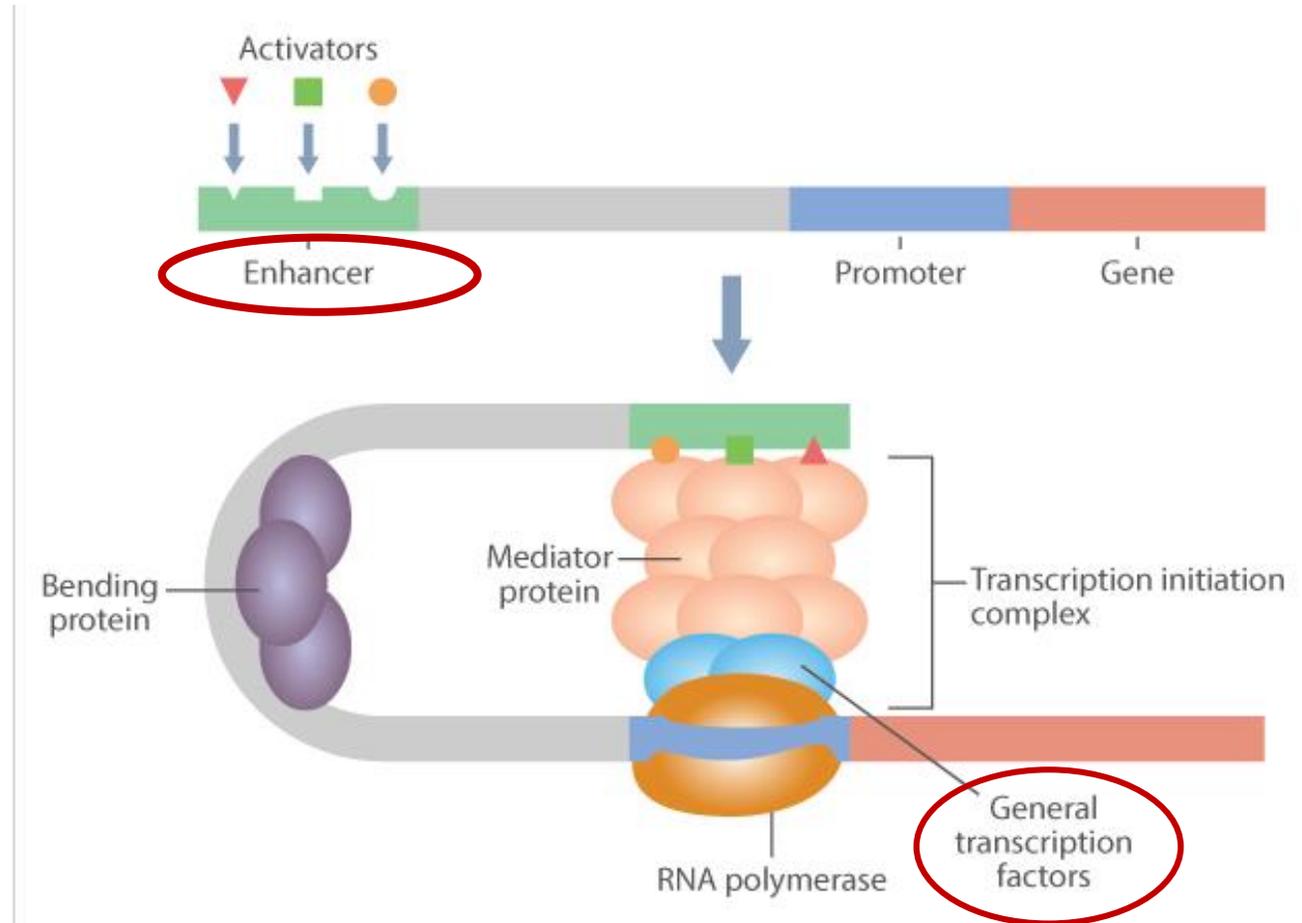
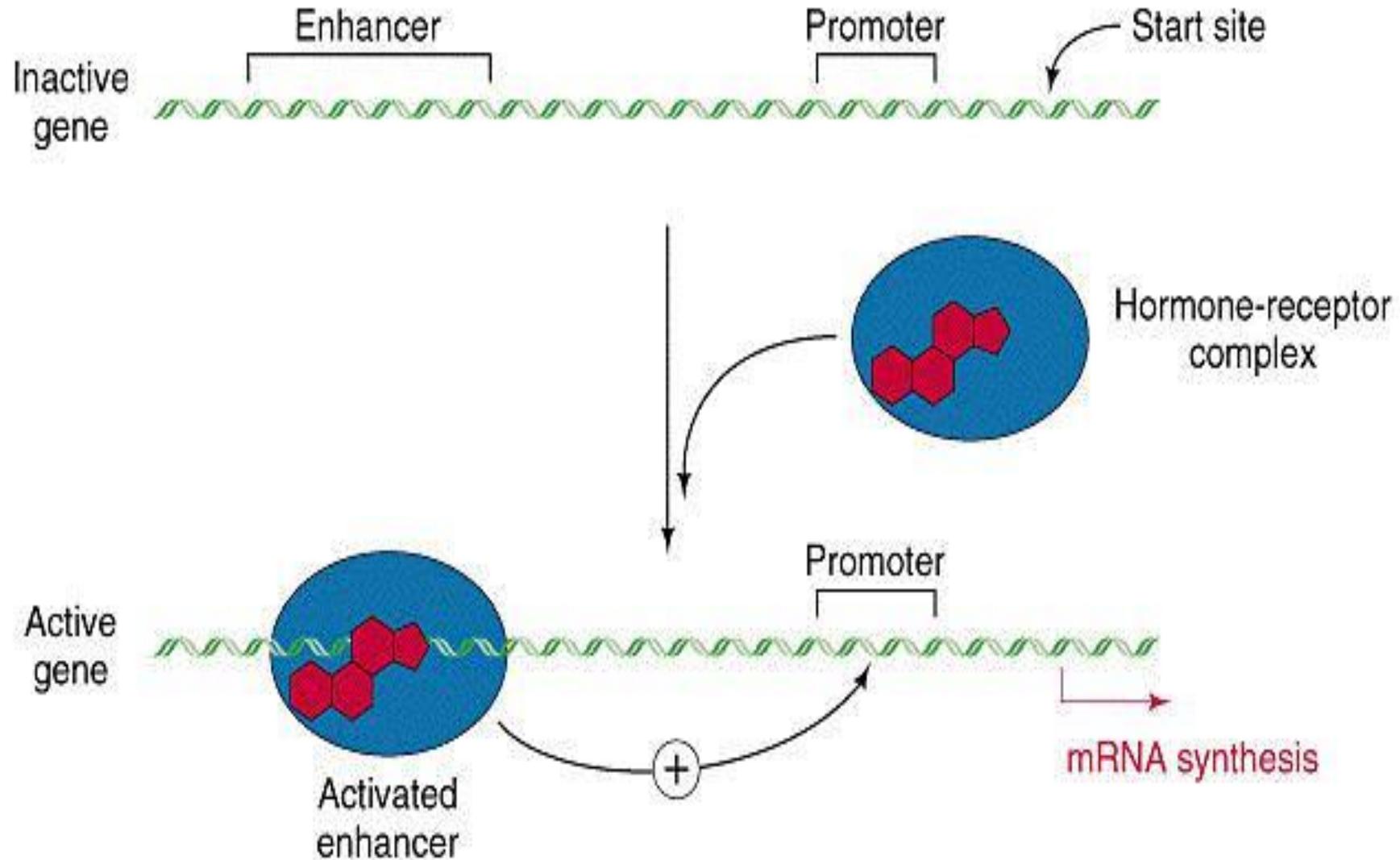


Figure 4: Possible mode of action of enhancers and transcription activators.

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
RNA-seq

RNA-seq

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

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

Módulo 1

Relevância da Genômica para a compreensão da variabilidade genética na resposta a drogas. Compreender a atuação de genes na resposta a drogas

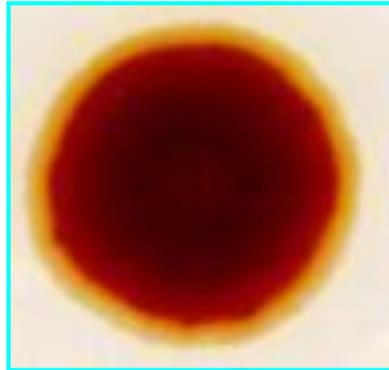
Qual será o organismo modelo de estudo para entender a tecnologia do RNA-seq?

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**

Quais perguntas biológicas poderão ser respondidas com o uso desta tecnologia em *T. rubrum* (RNA-seq)?

- ✓ Como os genes deste dermatófito se expressam frente ao fármaco denominado Sertralina? Um fármaco usado em humanos para tratar depressão (reposicionamento de drogas).
- ✓ Como seria a expressão de genes envolvidos na resistência a drogas?
- ✓ Como seria a expressão dos genes que codificam fator de transcrição?

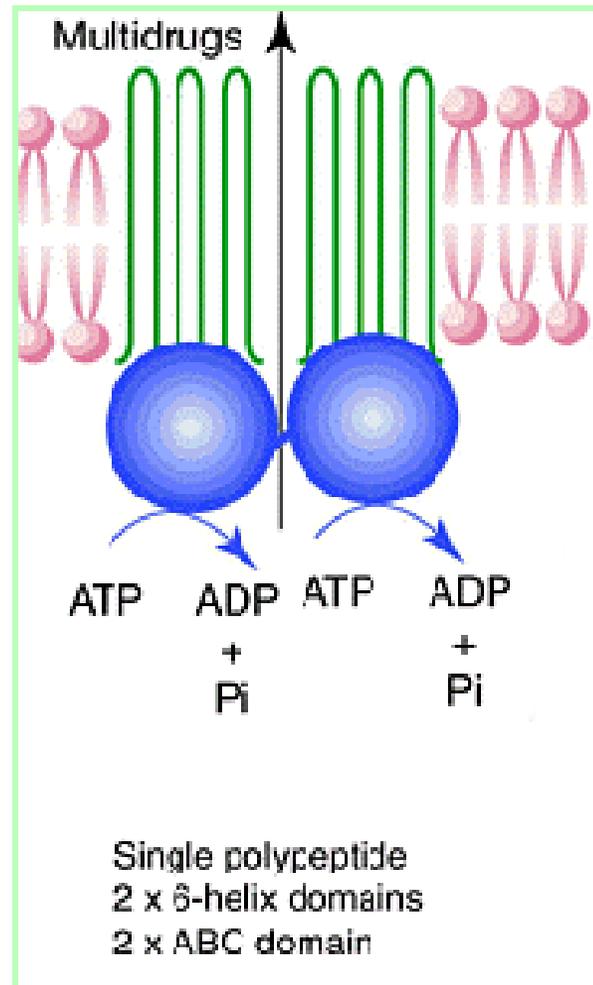
Este conhecimento que norteia o uso ou o desenvolvimento de novos antifúngicos

Um dos mecanismos de resistência a antifúngicos: expressão de genes de múltipla resistência, MDR

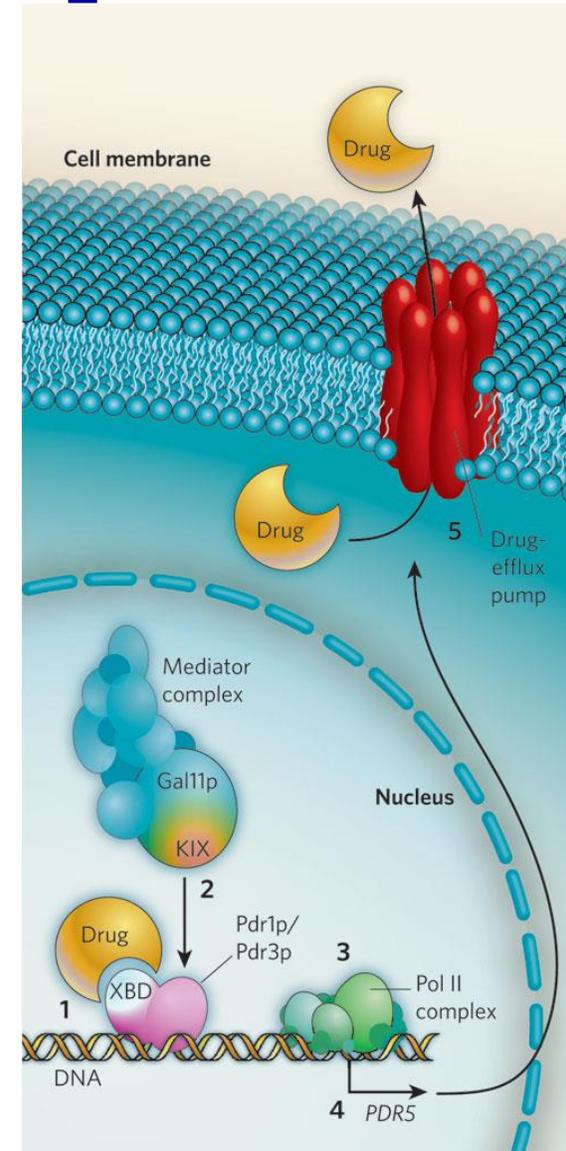
Efluxo

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, et al

Os dados brutos de RNA-seq do trabalho abaixo serão utilizados para uma reanálise com outros programas.

Sertralina: um antidepressivo humano (SRT)



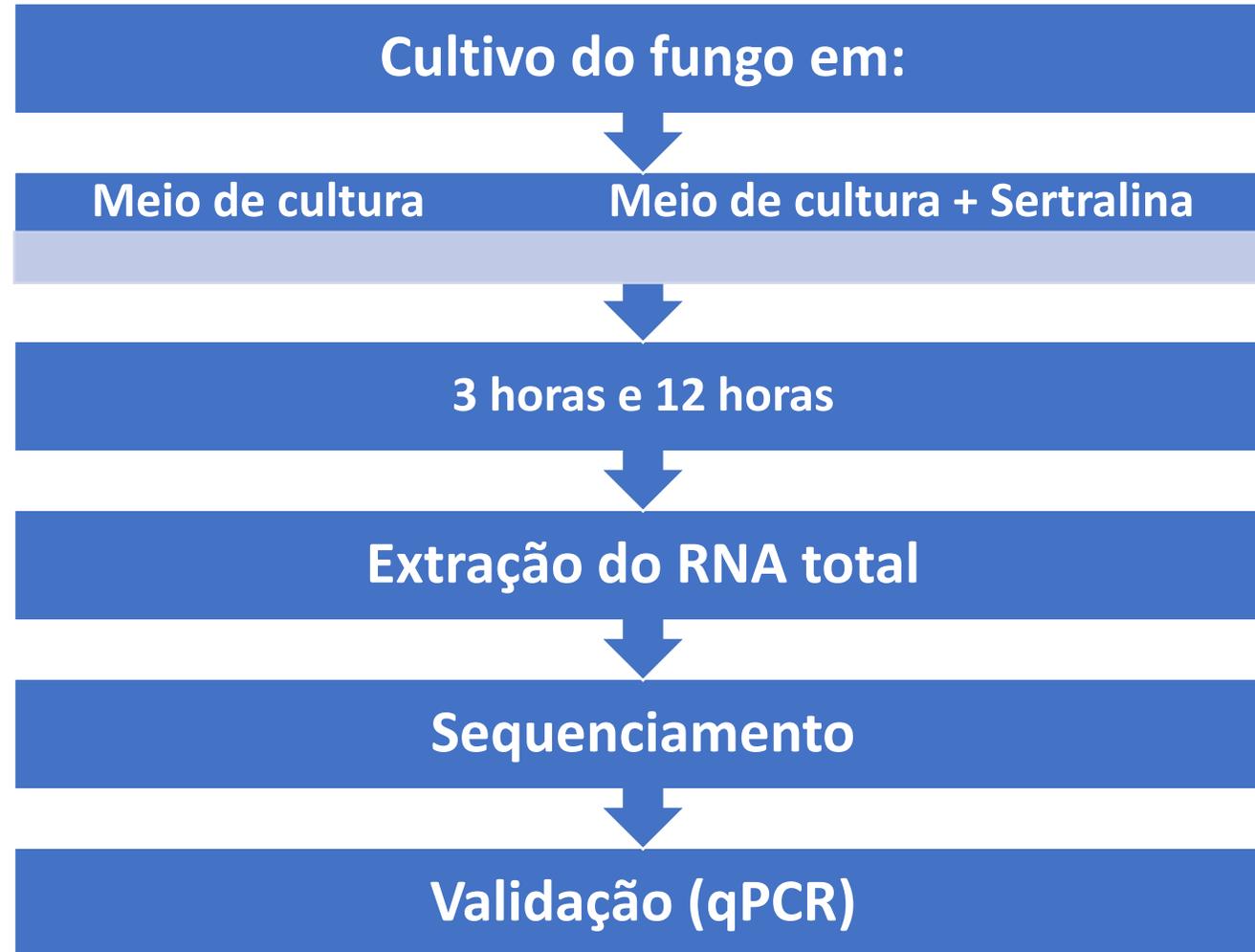
Article

The Antidepressant Sertraline Affects Cell Signaling and Metabolism in *Trichophyton rubrum*

Flaviane M. Galvão-Rocha ¹, Carlos H. L. Rocha ¹, Máira P. Martins ¹, Pablo R. Sanches ¹,
Tamires A. Bitencourt ¹, Matthew S. Sachs ², Nilce M. Martinez-Rossi ¹ and Antonio Rossi ^{1,*}

J Fungi (Basel). 2023 Feb 20;9(2):275. doi: 10.3390/jof9020275

Delineamento experimental



Análise por Bioinformática dos resultados do sequenciamento do RNA

- **Programas específicos para:**
- Identificar a qual gene pertence cada RNA sequenciado.
- Contabilizar quantos RNAs de cada gene foram sintetizados na condição controle e na condição desafiada com o fármaco.
- Calcular estatisticamente se cada gene foi ou não diferencialmente expresso. Se foi diferencialmente expresso foi positivamente ou negativamente.



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



AN OPEN ACCESS JOURNAL PUBLISHED BY
THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

2012

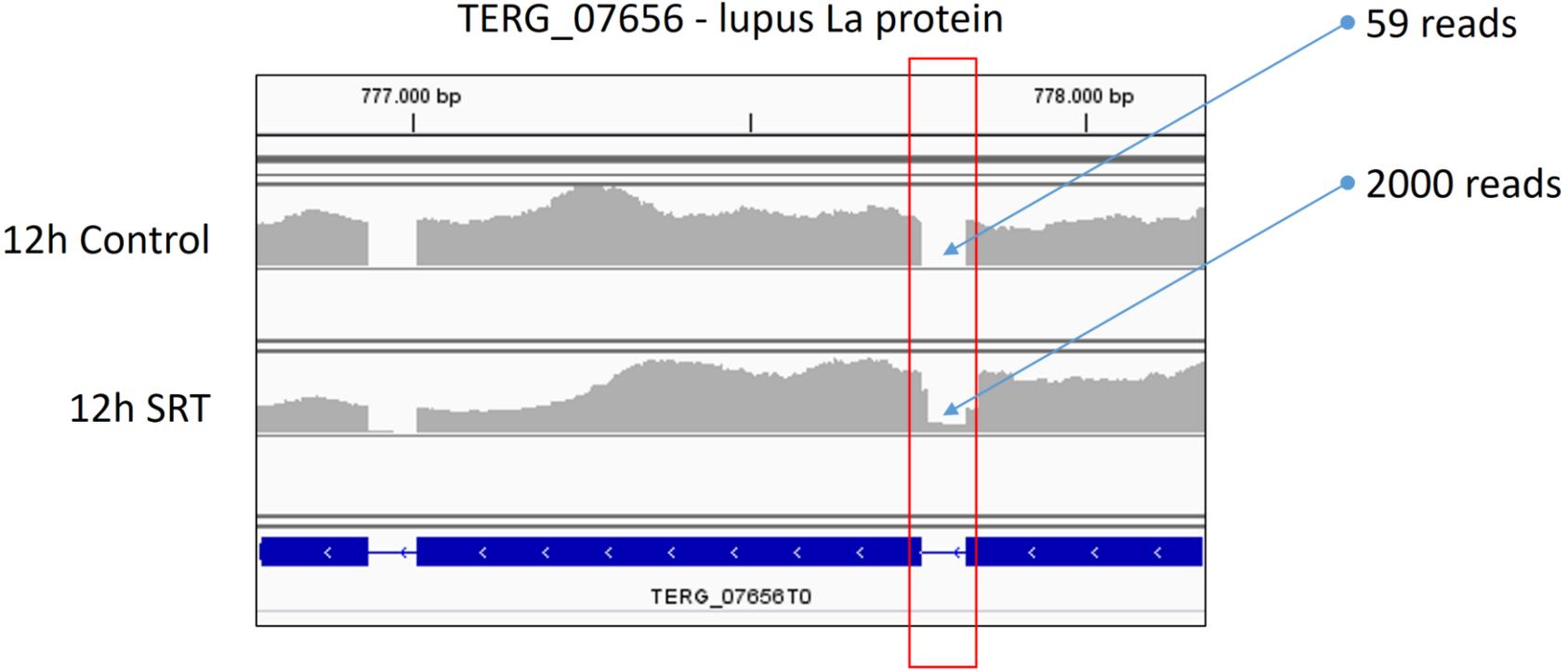
RESEARCH ARTICLE

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.

Exploring alternative splicing data in RNAseq (intron retention)

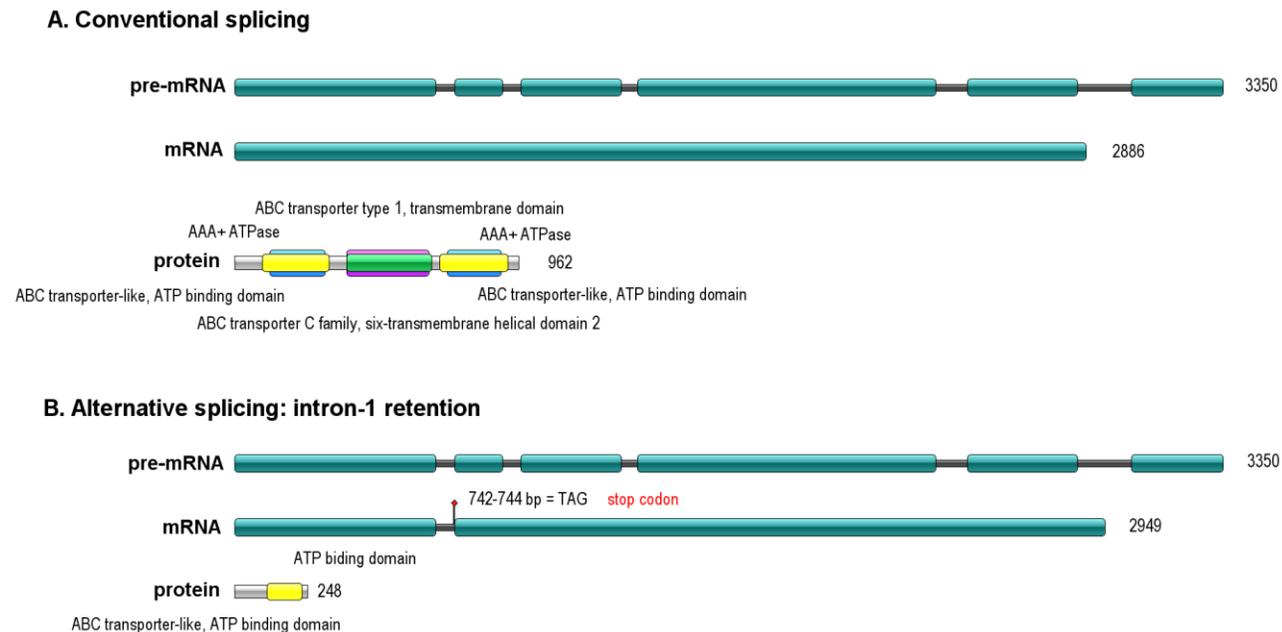


Apresentação dos alunos dos resultados do Módulo 1:

Grupo 1: busca por genes de resistência envolvidos no efluxo de fármacos. Análise de *splicing* alternativo de alguns destes genes.

Grupo 2: Busca por genes que codificam fatores de transcrição. Análise de *splicing* alternativo de alguns destes genes.

Exemplo de análise de *splicing* alternativo



Questões

1. O que você entende por RNA-seq?
2. Qual objetivo de usar RNA-seq de um fungo tratado com um fármaco?
3. Dos mecanismos de resistência a antifúngicos quais podem ser observados por RNA-seq? Porque?
4. O que são enzimas induzíveis e enzimas repressíveis em procarionotos.
5. O que voce entende por fator de transcrição? Qual é a importância de buscar fatores de transcrição em um transcritoma?
6. Qual é o papel do *splicing* alternativo para a célula? Quais organismos apresentam *splicing* alternativo?