The background features a light yellow color with a faint, repeating pattern of DNA double helix structures and light switch icons. The light switches are circular with a rectangular slider and the words 'ON' and 'OFF' printed on them. The DNA helices are shown in a light tan color, winding across the page.

Métodos para estudo da Epigenética em

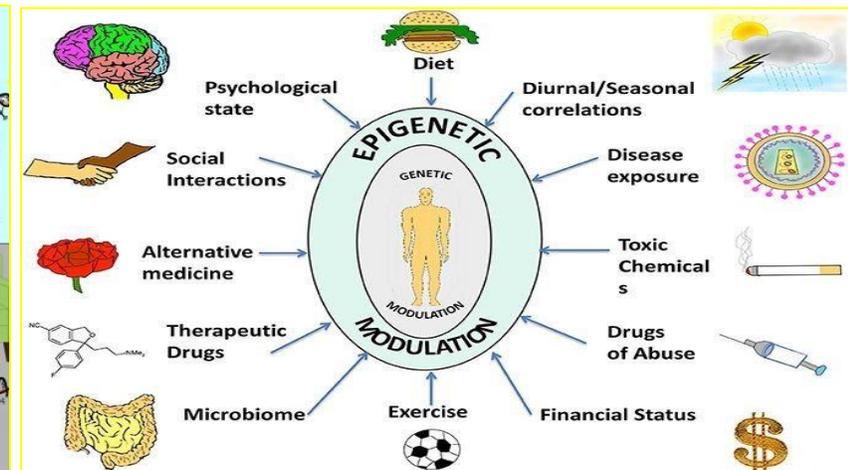
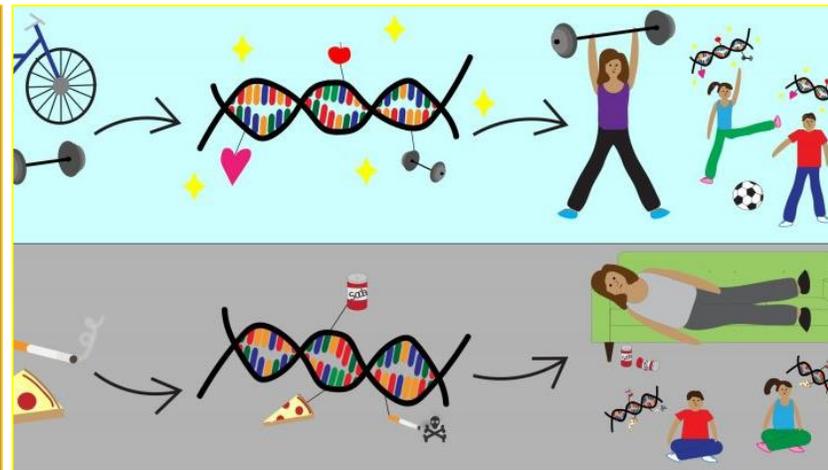
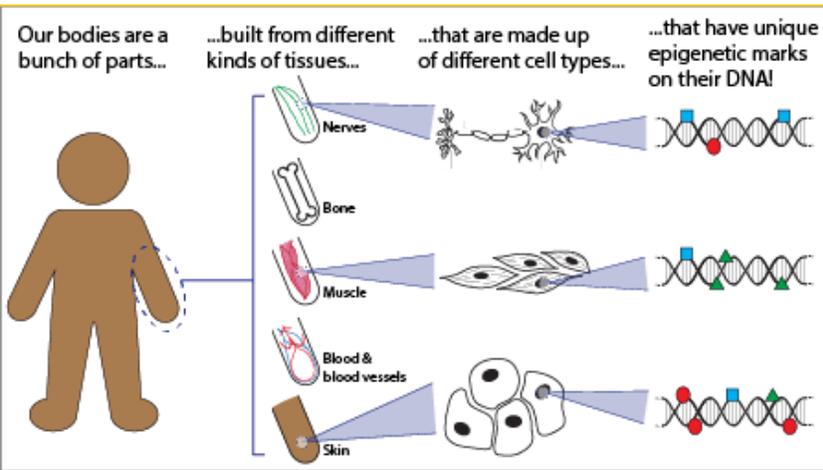
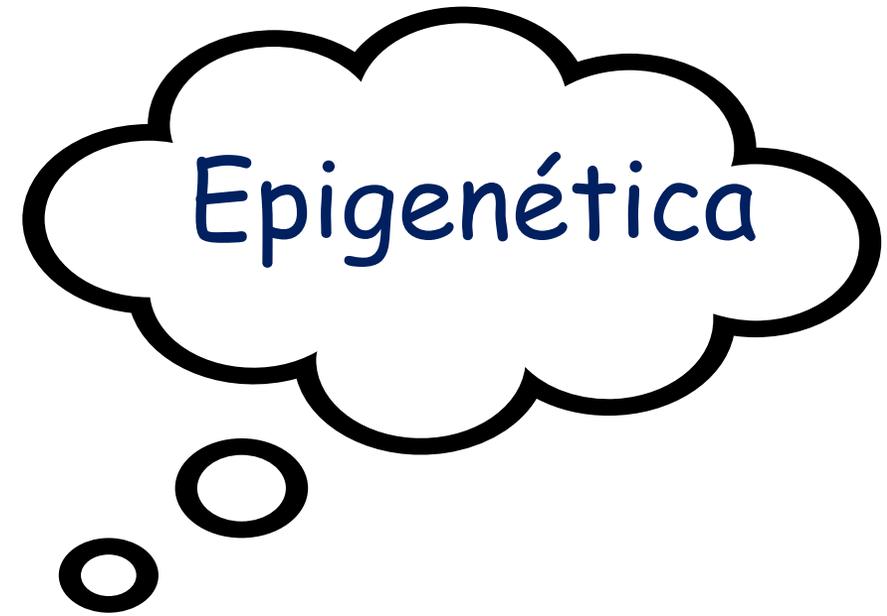
Trypanosoma cruzi

Dra. Ana Paula Menezes

Jul/21



Como nosso **genoma** integra sinais intrínsecos e ambientais sem que haja alteração da sequência de DNA?



Epigenética



Se refere aos fenótipos e processos transmitidos para outras células e para futuras gerações

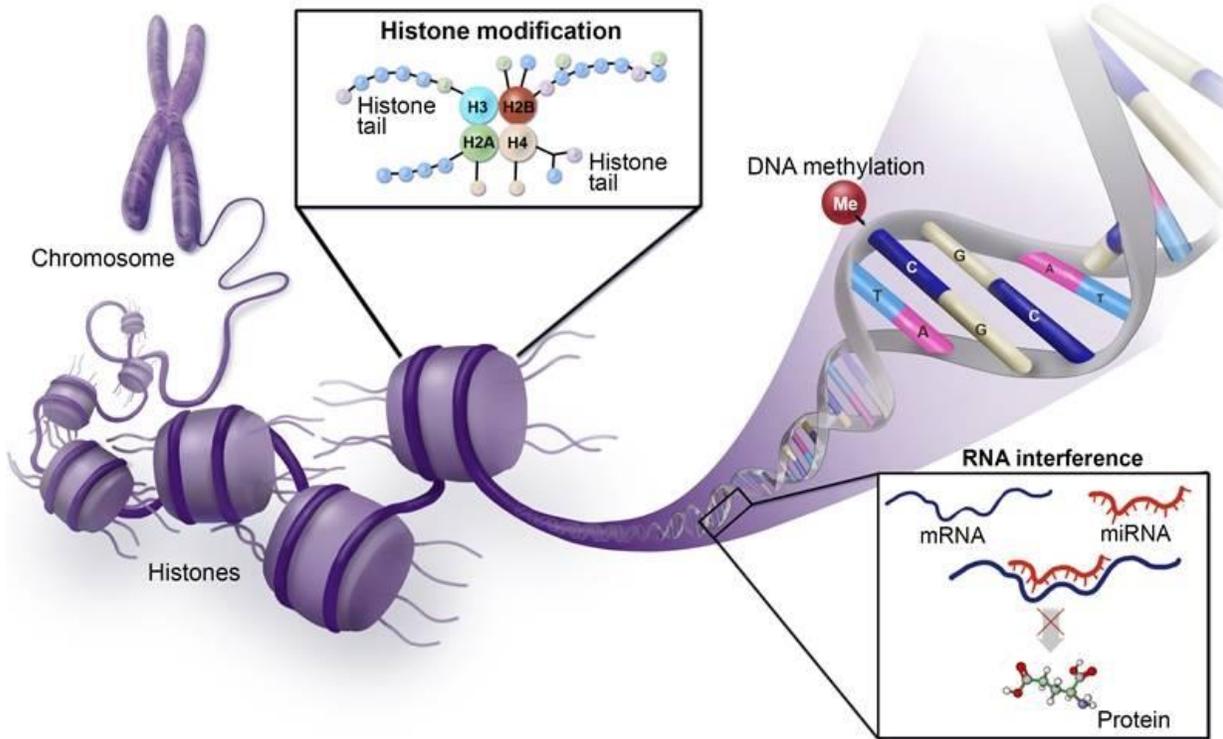


Não resultam de diferenças nas sequências de nucleotídeos de DNA



Causados por mudanças na expressão gênica

Mecanismos epigenéticos



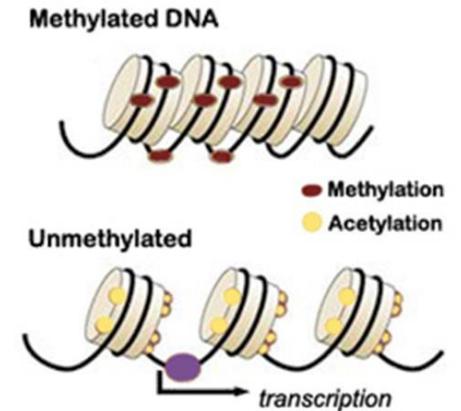
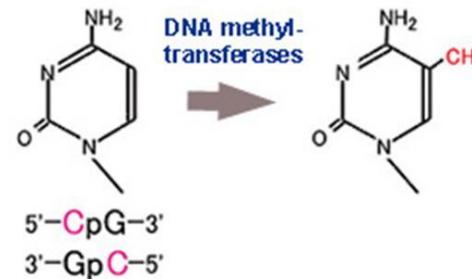
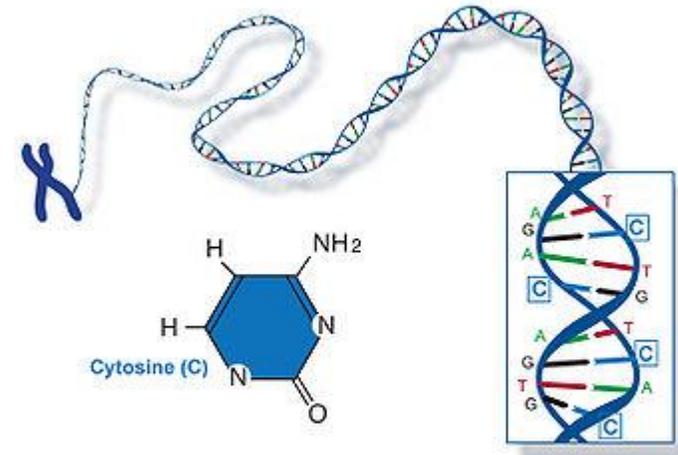
Mecanismos moleculares que alteram a cromatina e sustentam fenótipos epigenéticos:

- Mudanças no padrão de metilação do DNA;
- Modificações químicas das proteínas histonas;
- Moléculas de RNA que afetam a estrutura da cromatina.

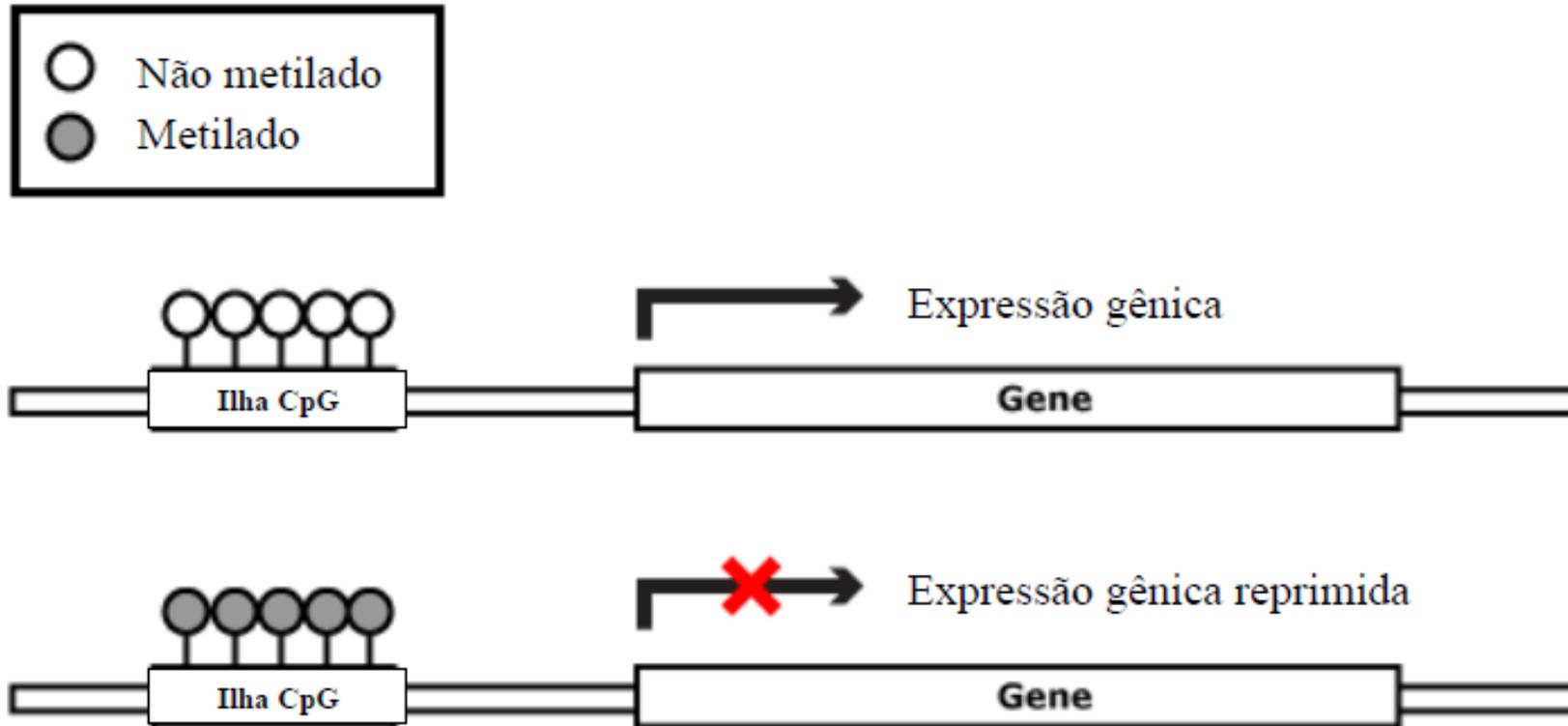
Metilação do DNA

Adição do radical metil (CH_3) no carbono 5 da base nitrogenada Citosina (C) seguida da base Guanina (G) CpG

DNA metiltransferases (DMTs)
Está associado à repressão da transcrição



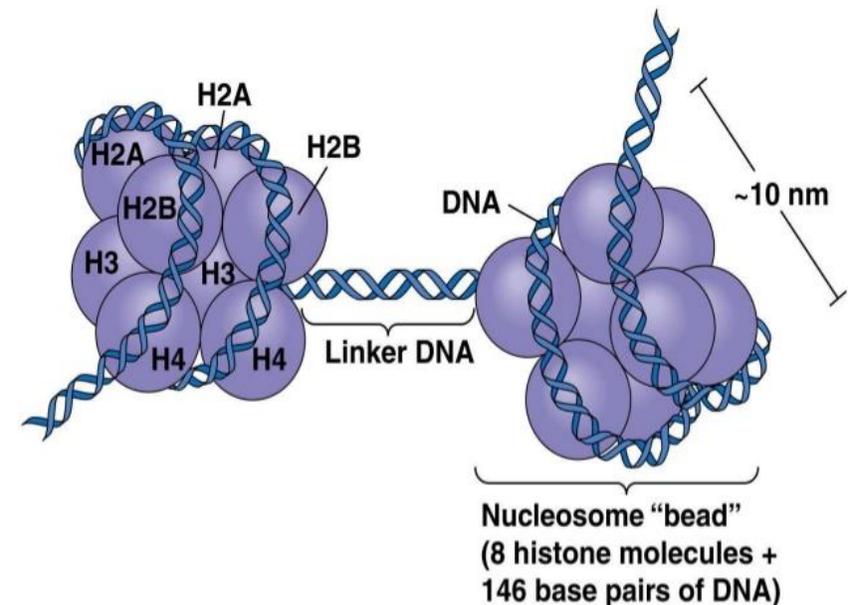
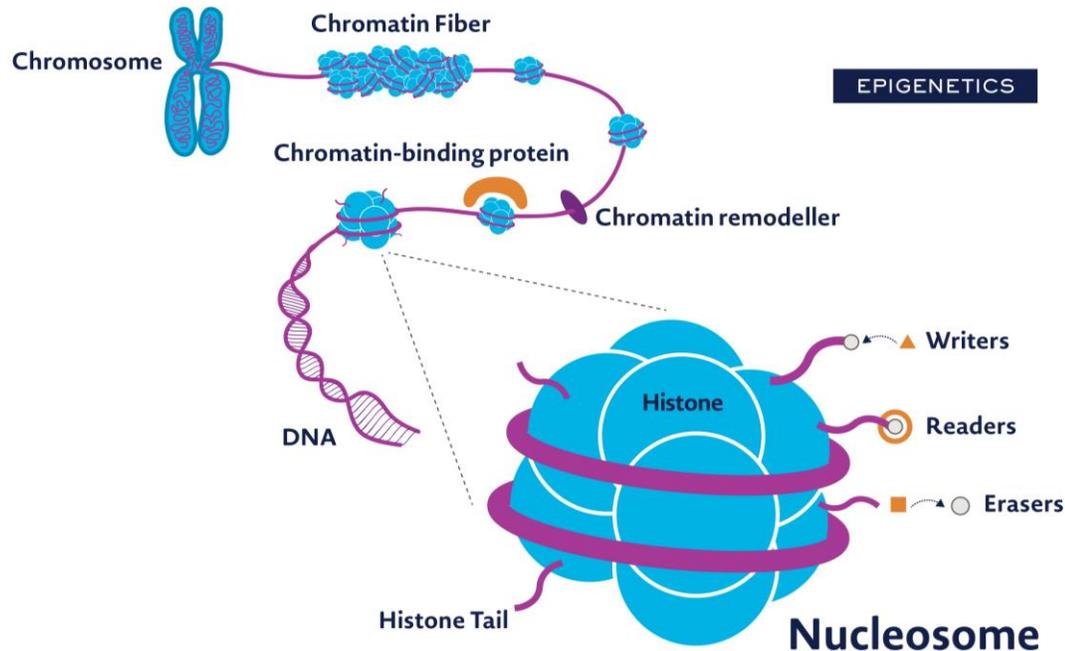
Metilação do DNA



- 60% dos promotores de todos os genes humanos contém regiões ricas em CpG - "Ilhas CpG";
- Metilação destas regiões é associado ao "silenciamento gênico".

Modificações pós-traducionais

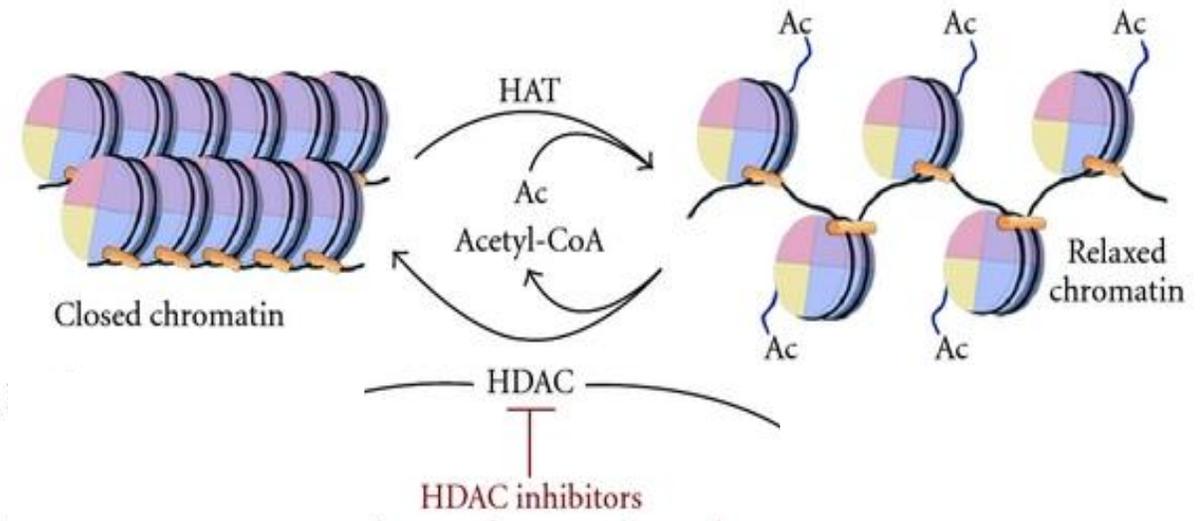
- Nucleossomos são formados por um octâmero de proteínas histonas (2x H2A, H2B, H3 e H4);
- Grupamento N terminal das histonas: aminoácidos conservados (lis, ser e arg) sujeitos a modificações.



Acetilação de histonas

Adição de radicais acetil (COCH^3) nos resíduos de lisinas por enzimas histonas acetil transferases (**HATs**)

Enzimas histonas deacetilases (**HDACs**) fazem a remoção dos grupos acetil das histonas, promovendo a compactação da cromatina e impedindo a transcrição



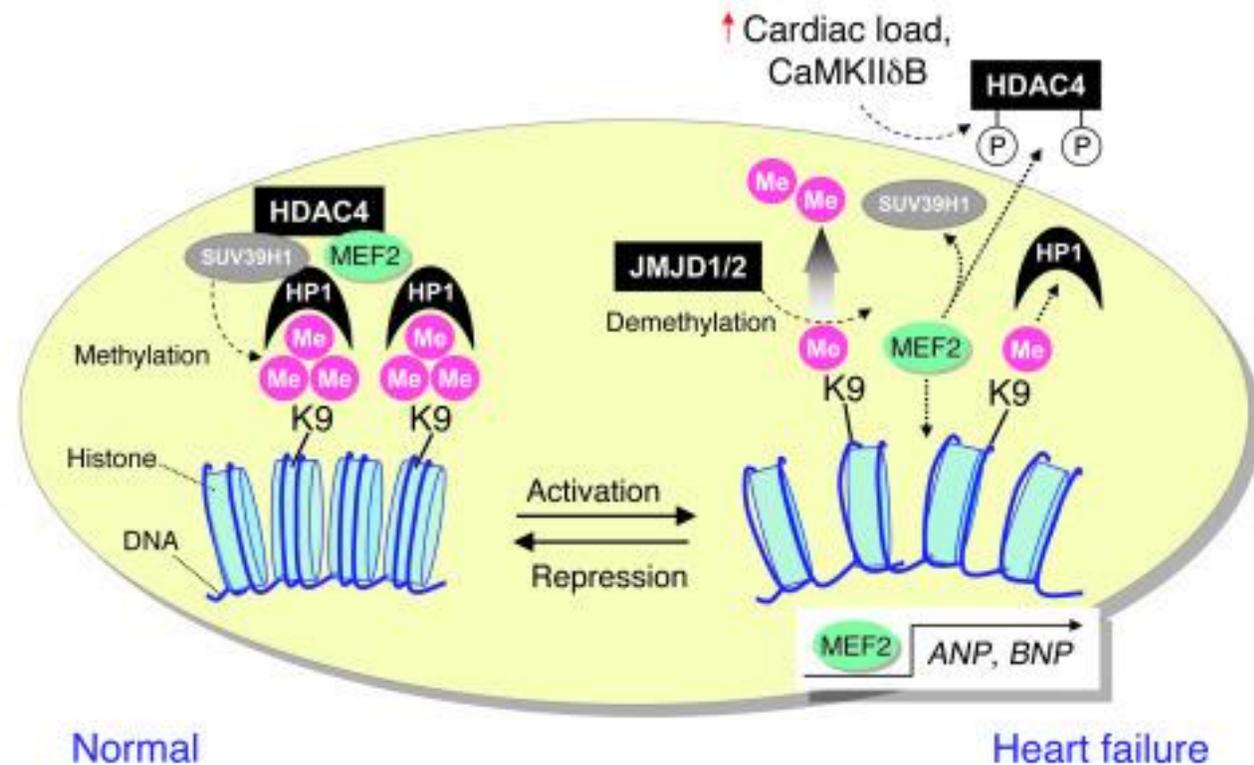
Metilação de Histonas

Adição de radicais metil nos resíduos de lisinas por meio de histonas metiltransferases (HMTs)

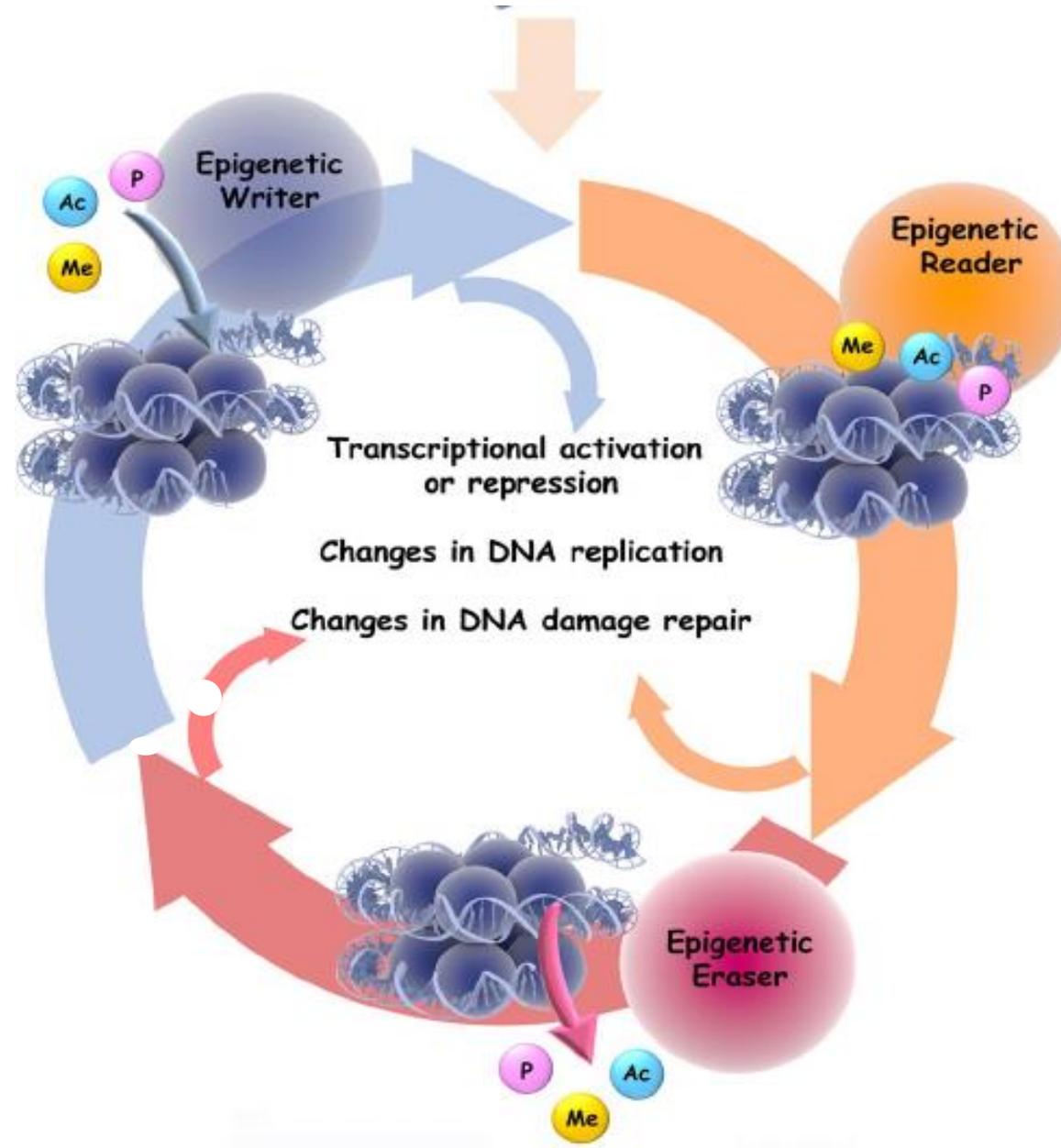
Ativam ou reprimem a transcrição

Fornecem sítios específicos de reconhecimento e ancoragem para fatores de transcrição.

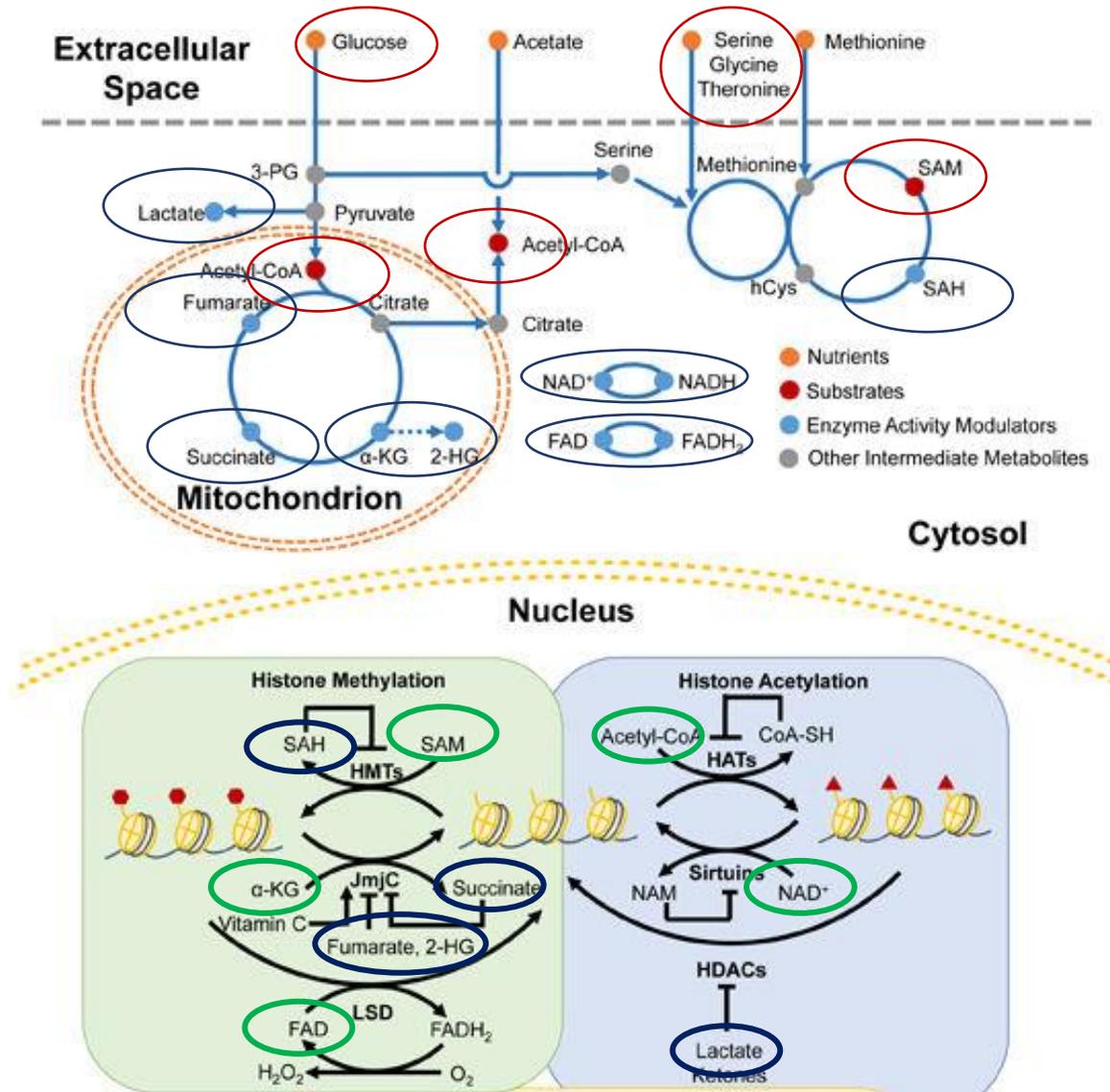
Histonas demetilases (HDMTs) fazem a remoção dos grupos metil das histonas;



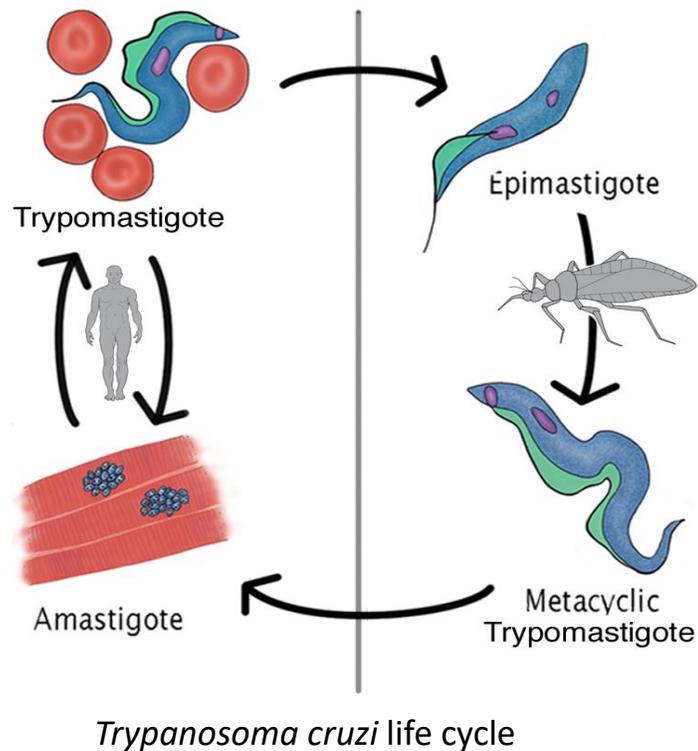
Modificadores da cromatina



Os Modificadores da cromatina e o metabolismo



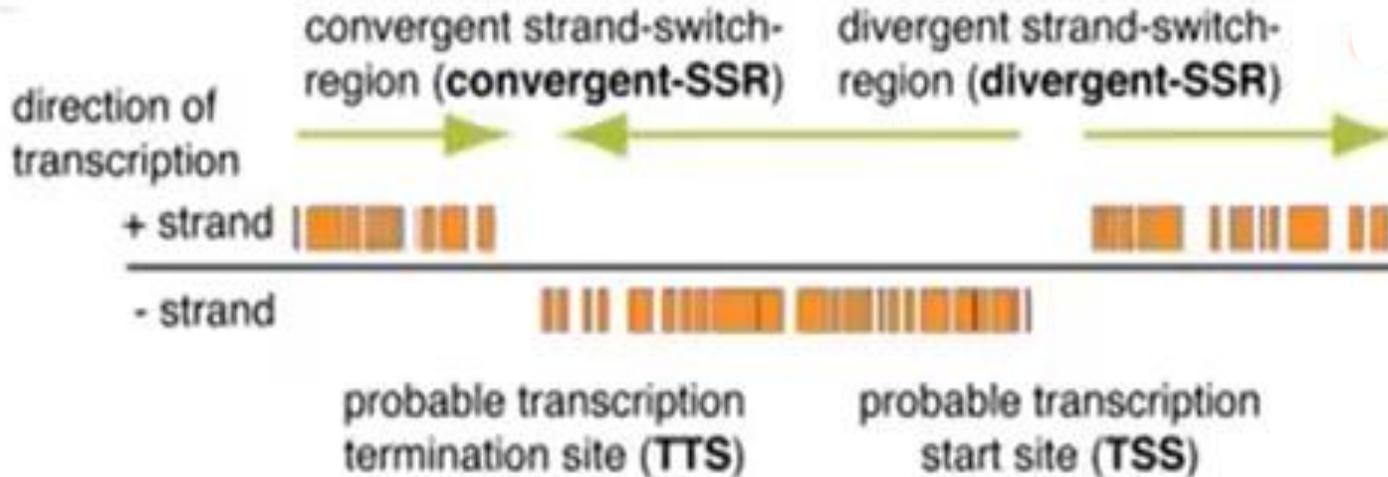
Explorando a epigenética em *Trypanosoma cruzi*



- Flexibilidade metabólica que permite a sobrevivência em ambientes distintos - hospedeiros diferentes;
- Habilidade de reprogramar as funções celulares, alterar os parâmetros metabólicos e manter uma memória dessa reprogramação;
- Modulam o ciclo celular em função das condições nutricionais do ambiente.

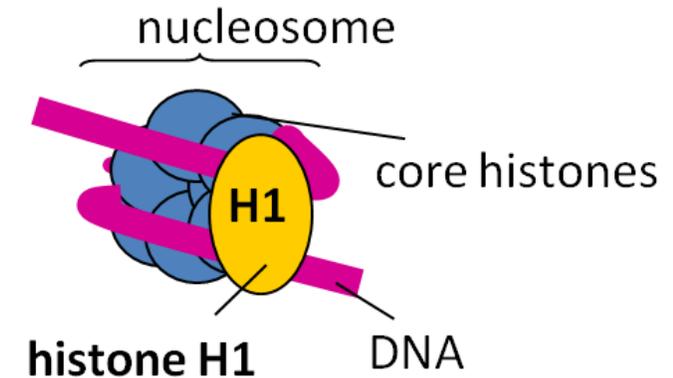
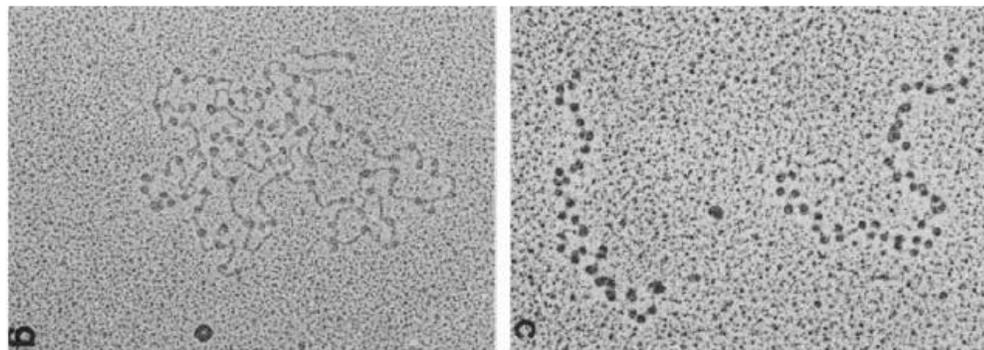
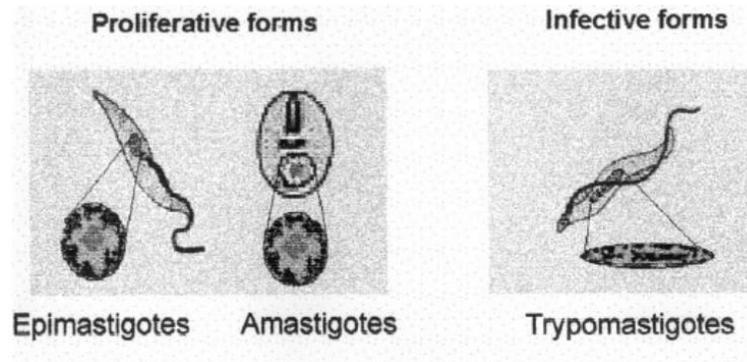
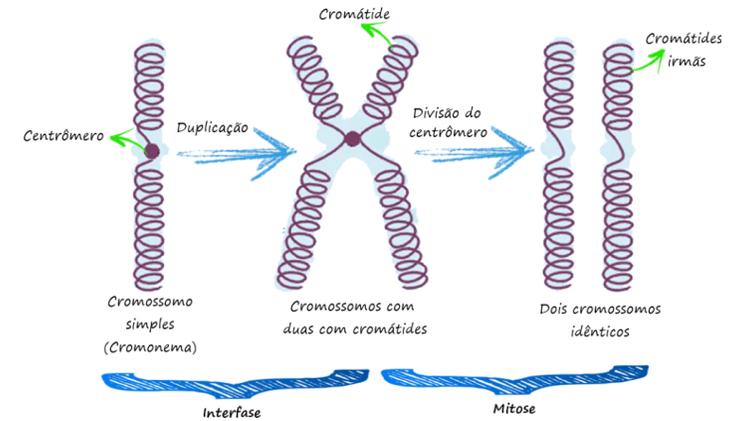
Transcrição em *T. cruzi*

- 🧬 Genes transcritos e arranjados em unidades de **transcrição policistrônica** (ou seja, diferentes mensagens em uma mesma unidade de transcrição) precedidos de grandes regiões de início de transcrição (TSS);
- 🧬 Regulação da expressão gênica ocorre principalmente a nível pós-transcricional;



Explorando a epigenética em *T. cruzi*

- ❶ A cromatina é organizada em filamentos de nucleossomo;
- ❷ A histona H1 não contém o domínio globular.
- ❸ Não há uma condensação dos cromossomos durante a mitose.

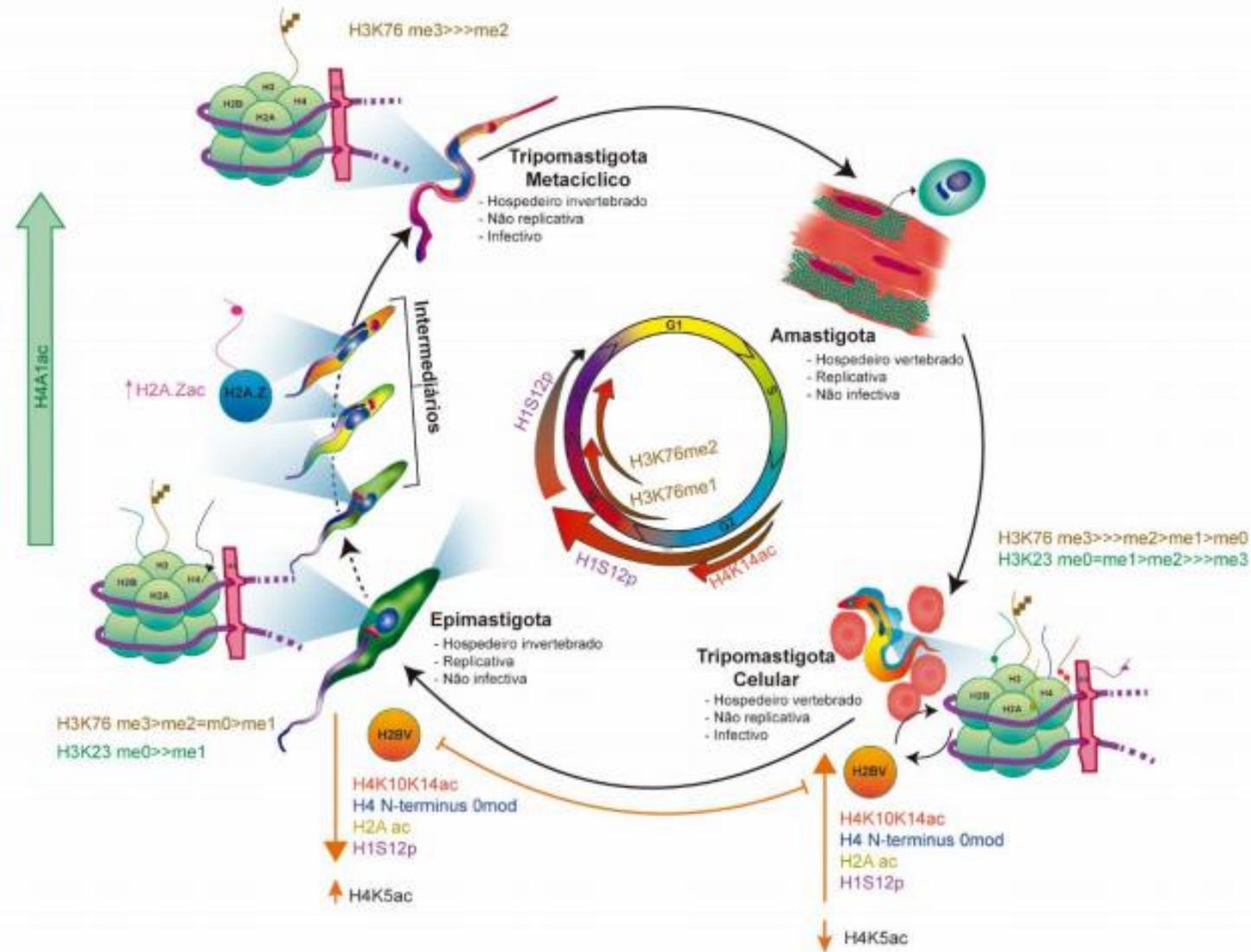


Explorando a epigenética em *T. cruzi*

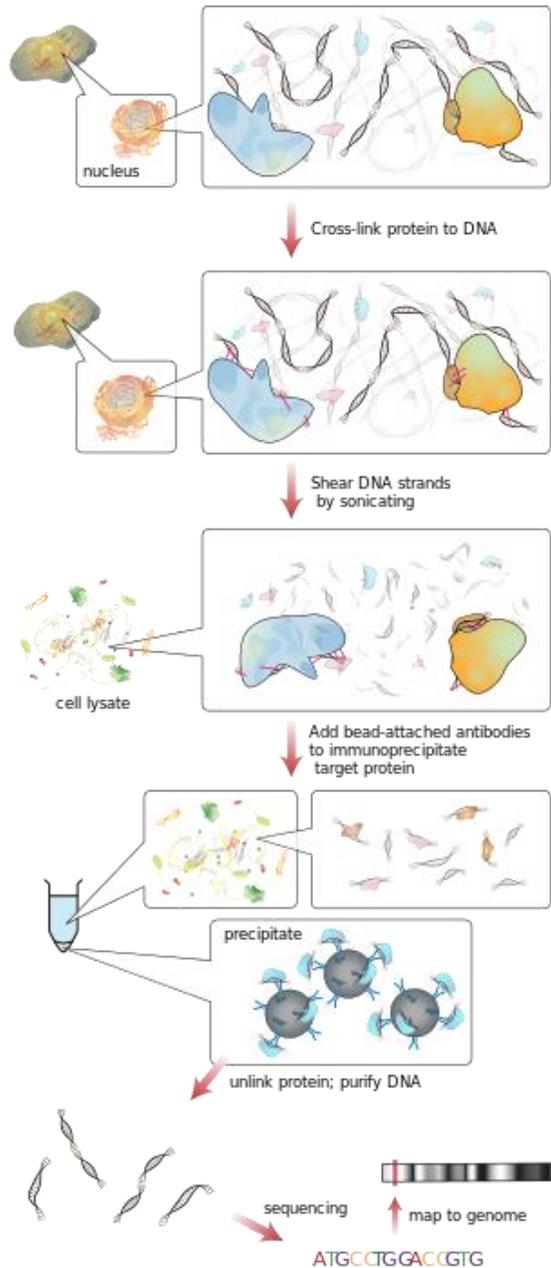
🌀 A sequência de histonas de *Trityps* são menos conservadas em relação a eucariotos superiores...

🌀 Mas isso não impede que estes parasitas apresentem as mesmas marcas epigenéticas...

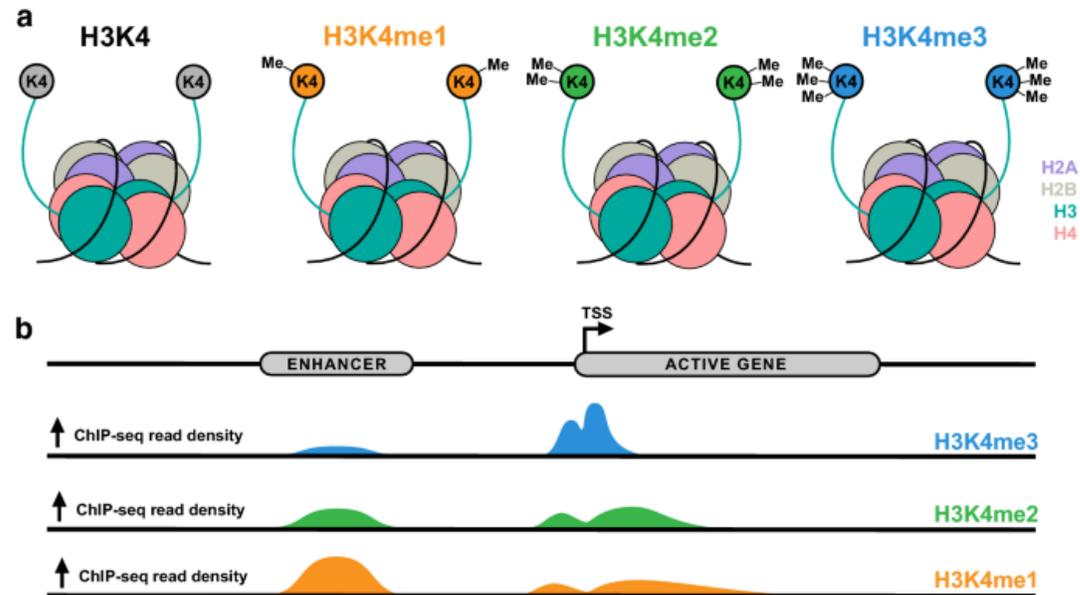
🌀 E também possuem marcas epigenéticas exclusivas!



Imunoprecipitação de Cromatina (CHIP)



- Fatores de transcrição e DNA
- Melhor anticorpo/ Melhor protocolo
- Número significativo de célula



Imunoprecipitação de Cromatina (CHIP)

[Genes Dev.](#) 2009 May 1; 23(9): 1063–1076.

doi: [10.1101/gad.1790409](https://doi.org/10.1101/gad.1790409)

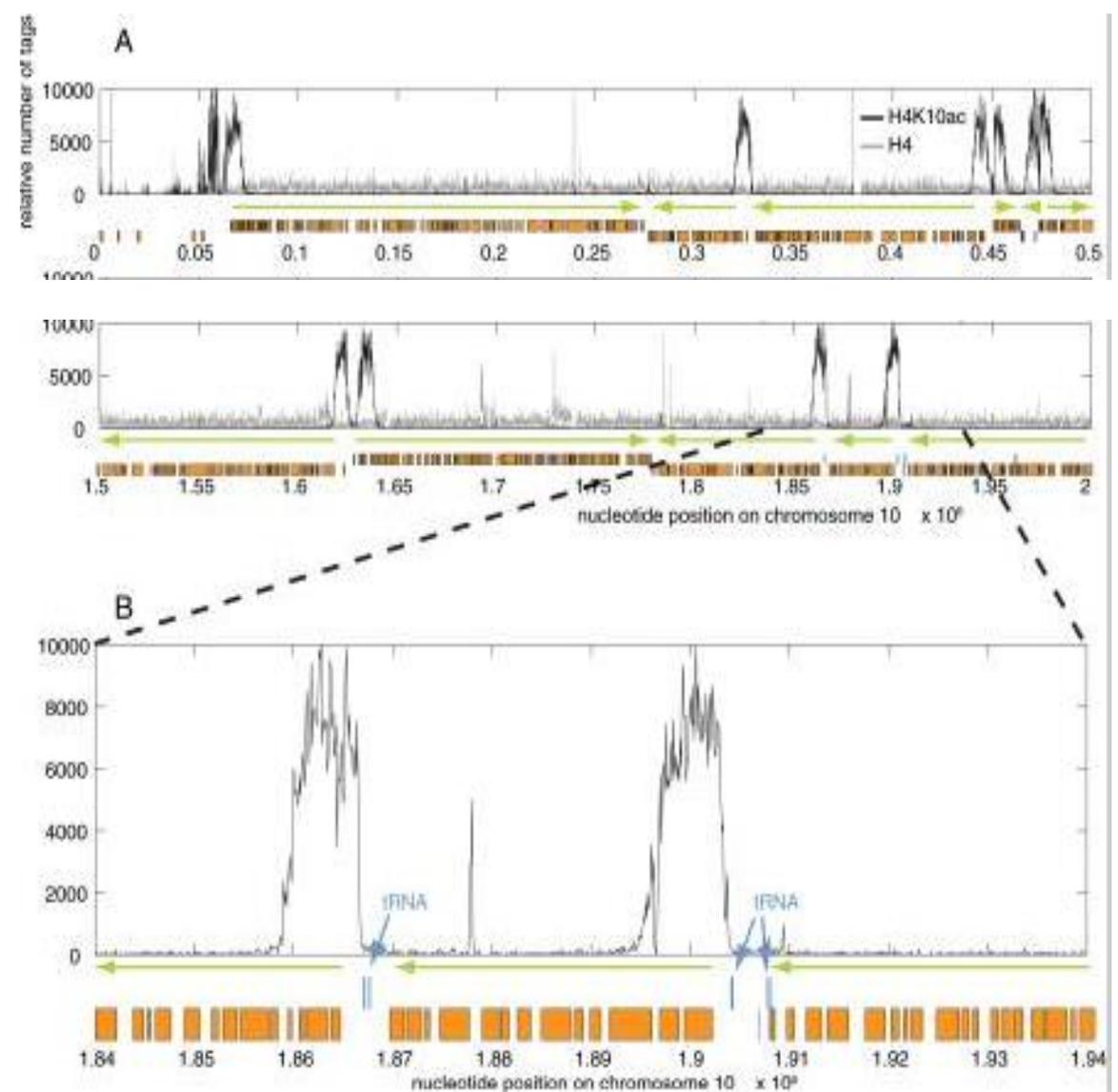
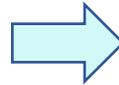
PMCID: PMC2682952

PMID: [19369410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19369410/)

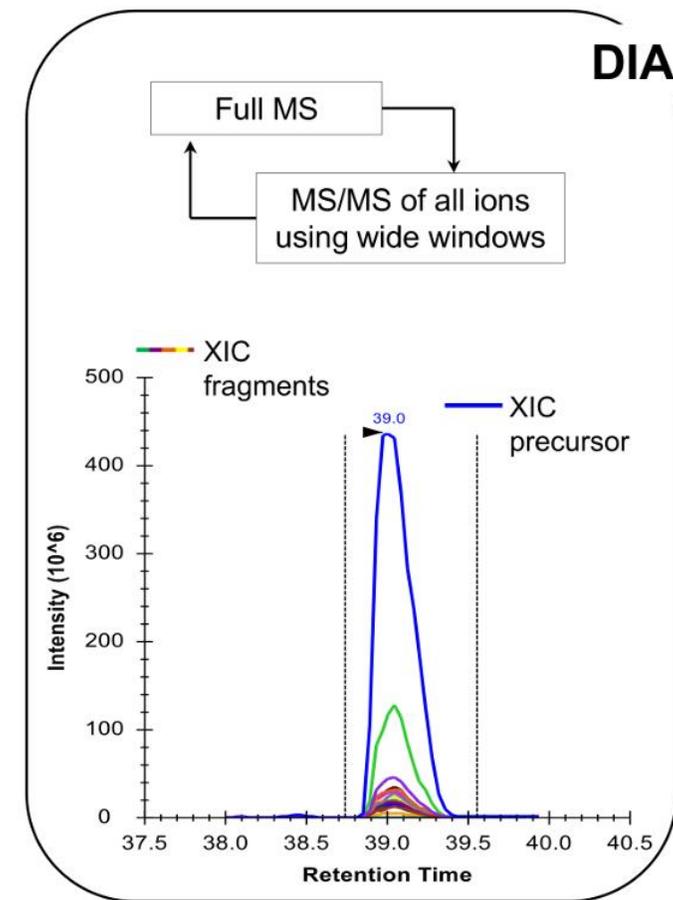
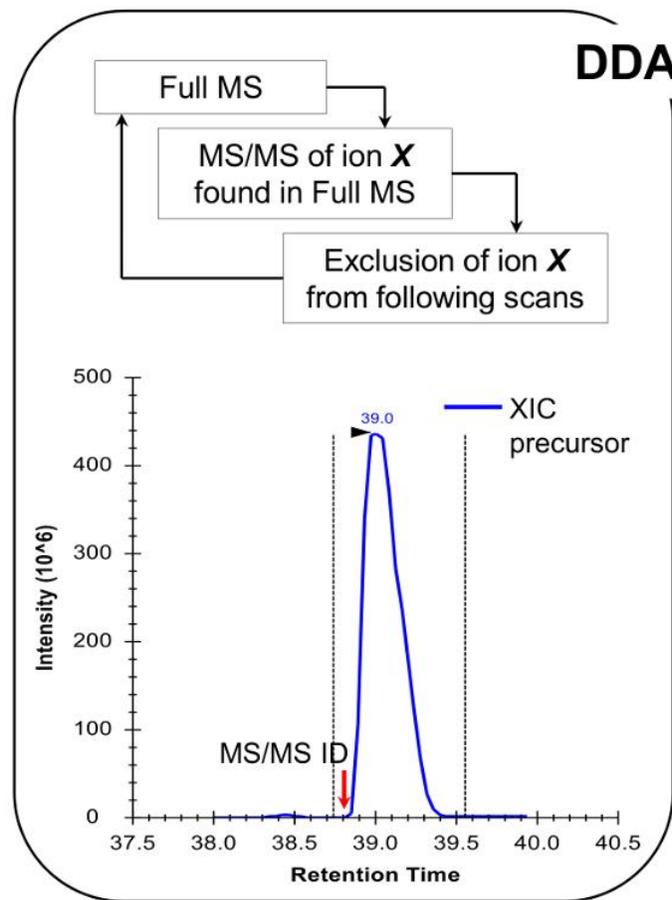
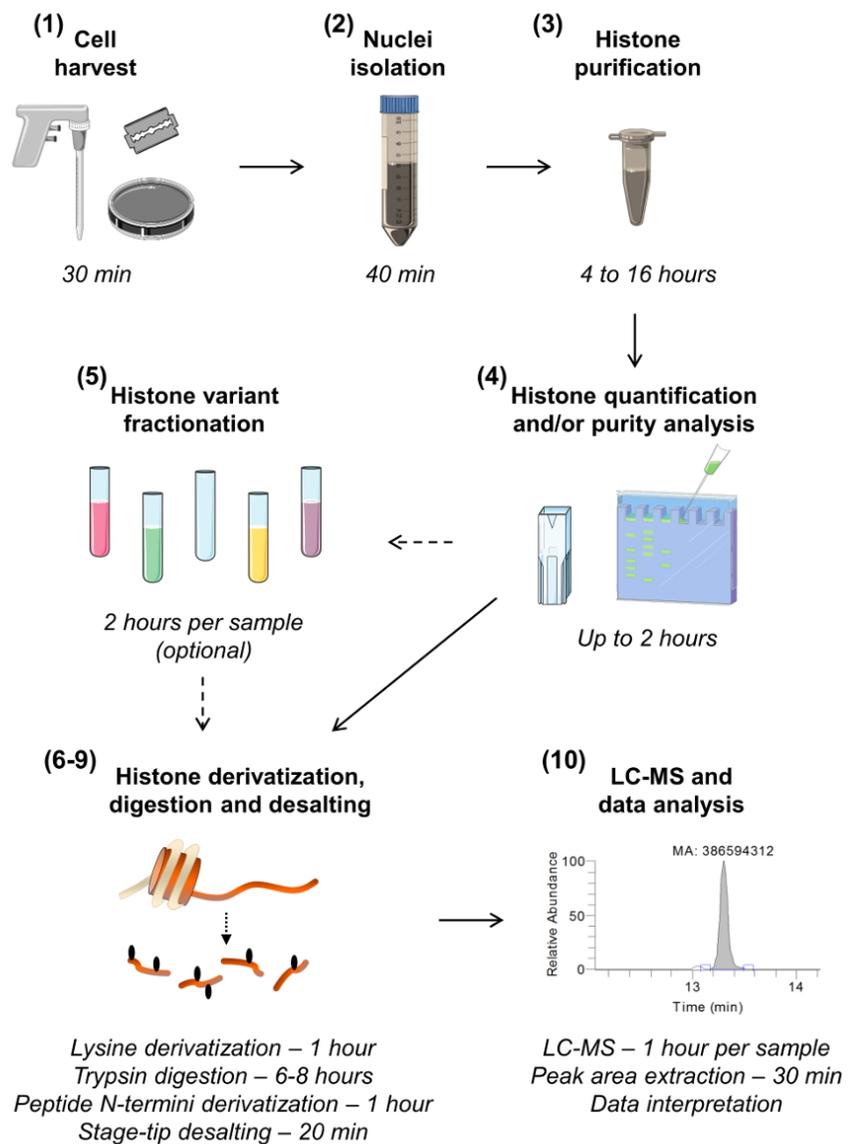
Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*

[T. Nicolai Siegel](#)¹, [Doeke R. Hekstra](#)^{2,6}, [Louise E. Kemp](#)^{1,6}, [Luisa M. Figueiredo](#)¹, [Joanna E. Lowell](#)^{1,7},
[David Fenyo](#)³, [Xuning Wang](#)⁴, [Scott Dewell](#)⁵ and [George A.M. Cross](#)^{1,8}

Aumento de acetilação de H4K10 em TSSs



Espectrometria de Massas



Mol Cell Proteomics. 2017 Jan; 16(1): 23–38.

PMCID: PMC5217780

Published online 2016 Nov 16. doi: [10.1074/mcp.M116.061200](https://doi.org/10.1074/mcp.M116.061200)

PMID: [27852749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27852749/)

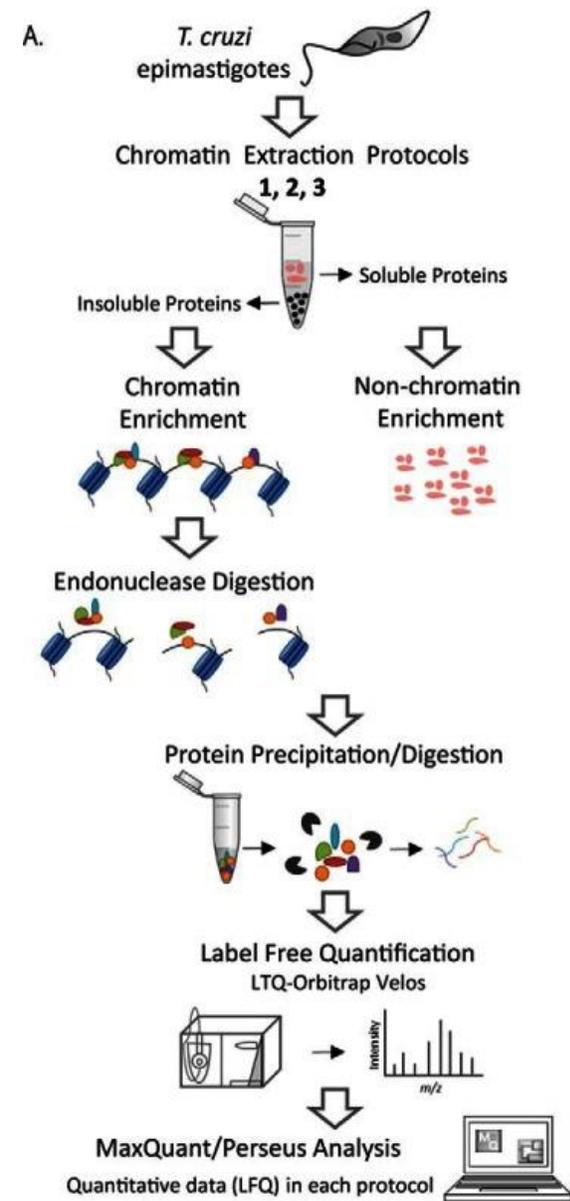
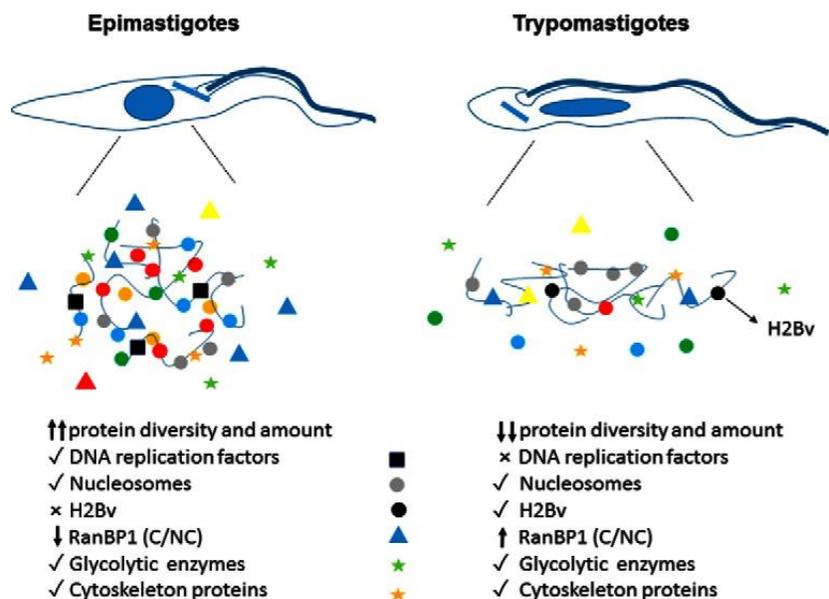
Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi**

S

Teresa Cristina Leandro de Jesus,^{‡§} Simone Guedes Calderano,^{‡¶} Francisca Nathalia de Luna Vitorino,[‡]

Ricardo Pariona Llanos,[‡] Mariana de Camargo Lopes,[‡] Christiane Bezerra de Araújo,[‡]

Otávio Henrique Thiemann,[§] Marcelo da Silva Reis,[‡] Maria Carolina Elias,[‡] and Julia Pinheiro Chagas da Cunha^{‡¶}



Espectrometria de Massas



Improvements on the quantitative analysis of *Trypanosoma cruzi* histone post translational modifications: Study of changes in epigenetic marks through the parasite's metacyclogenesis and life cycle

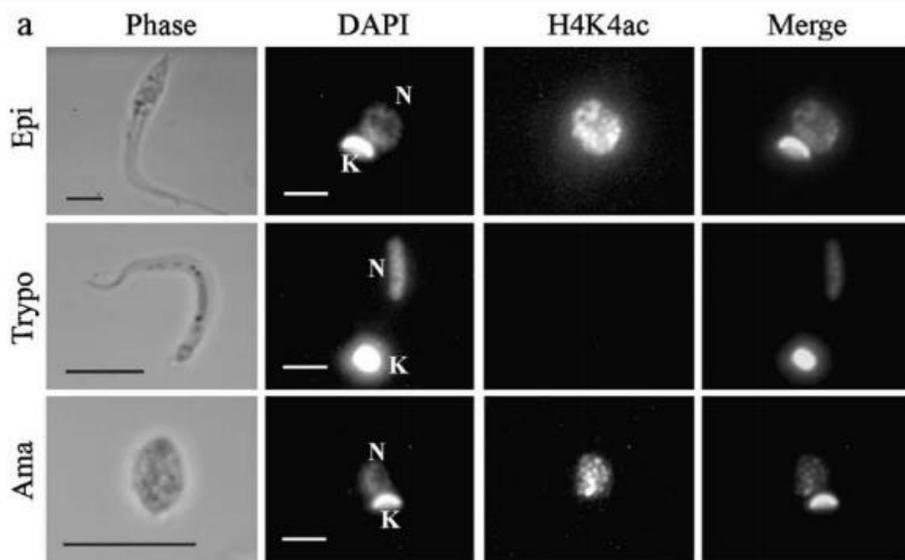
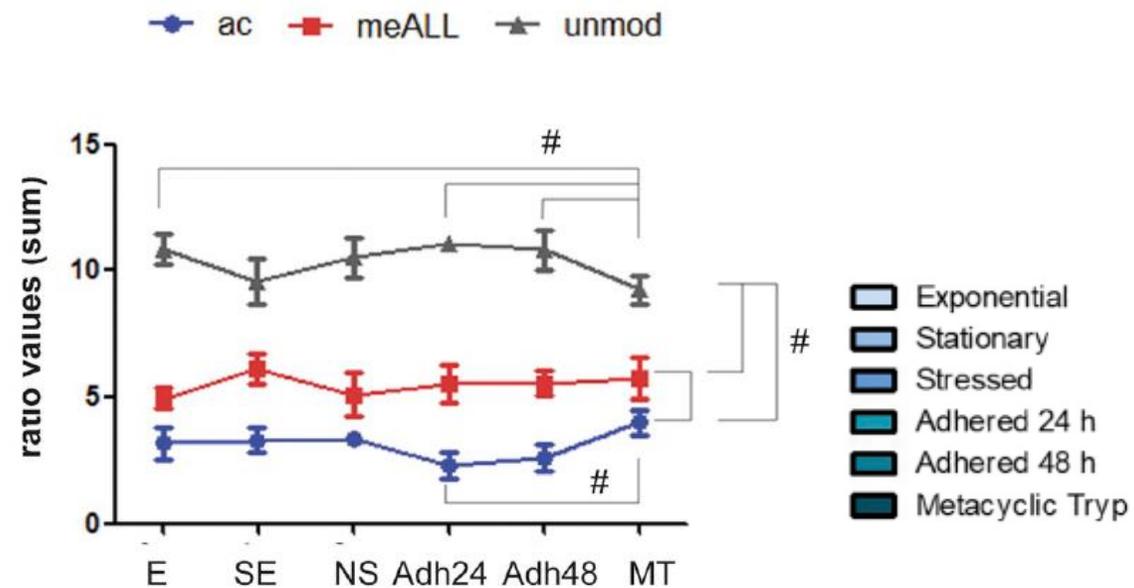
Loyze P de Lima^{a,b}, Saloe Bispo Poubel^{a,b,d}, Zuo-Fei Yuan^c, Juliana Nunes Rosón^{a,b}, Francisca Nathalia de Luna Vitorino^{a,b}, Fabiola Barbieri Holetz^d, Benjamin A. Garcia^c, Julia Pinheiro Chagas da Cunha^{a,b,*}

^a Laboratório de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

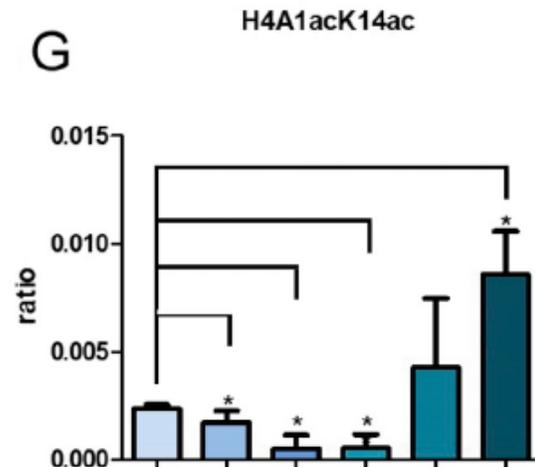
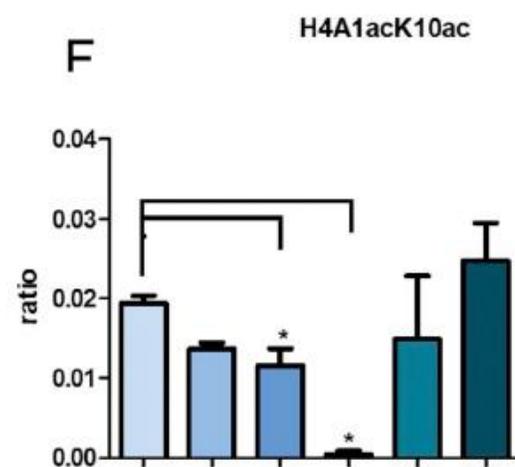
^b Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^c Epigenetics Institute, Department of Biochemistry and Biophysics, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

^d Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Alcayr Munhoz Mader, 3775. CIC, Curitiba, PR 81350-010, Brazil

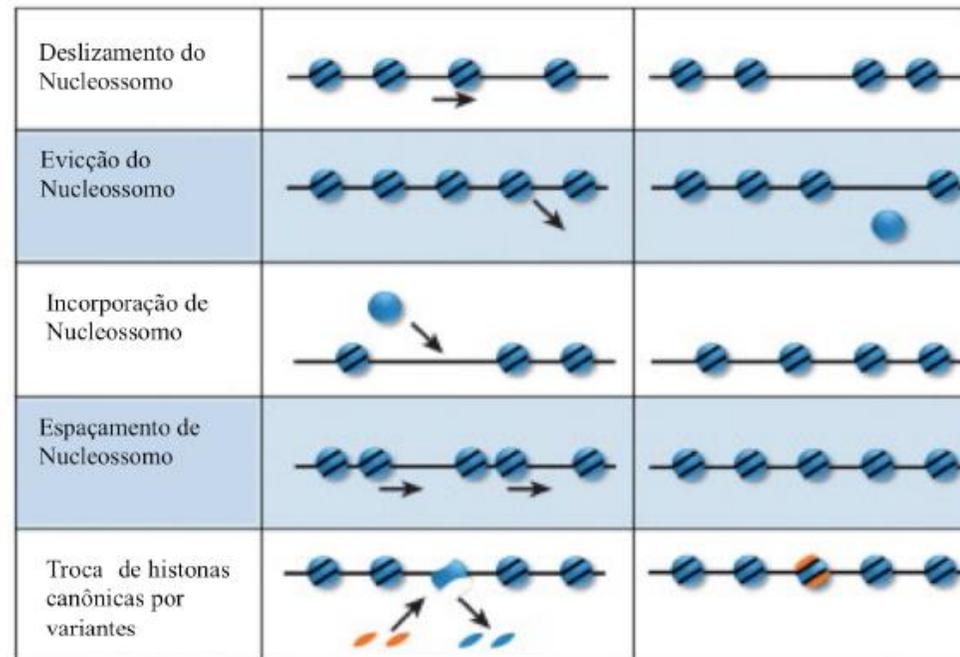


Nardelli, 2009



Acessibilidade da cromatina: uma janela para o genoma

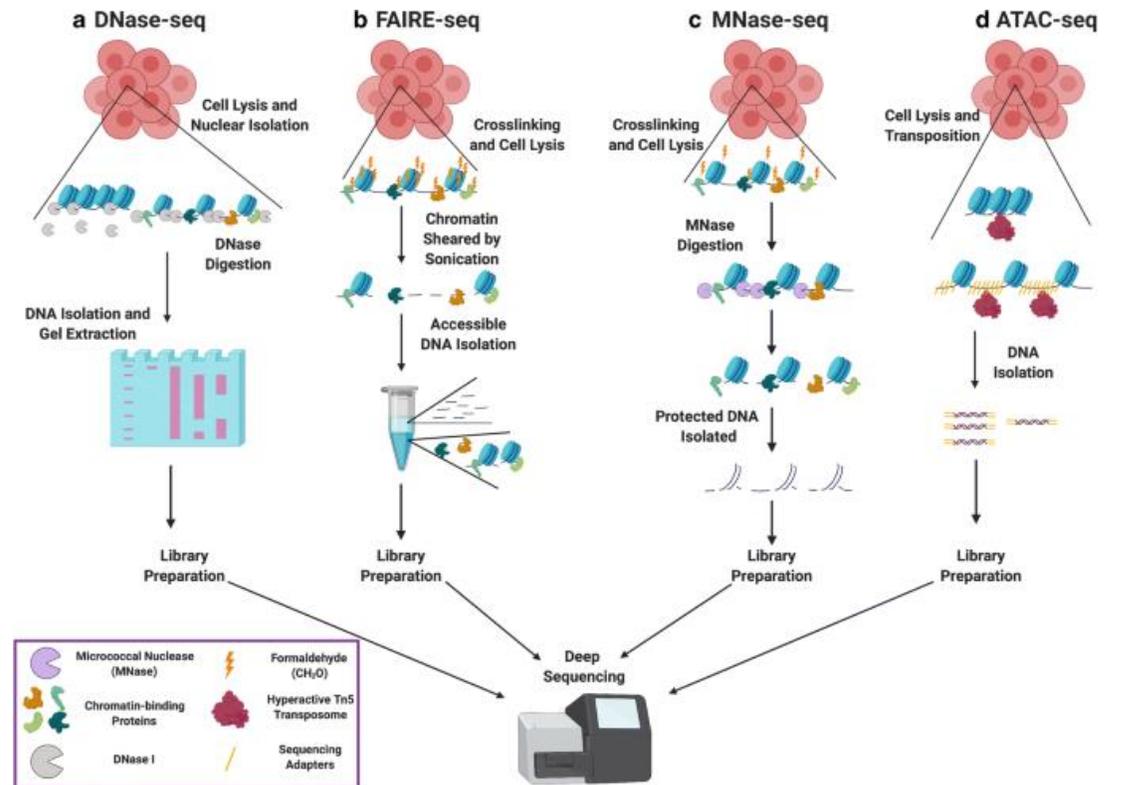
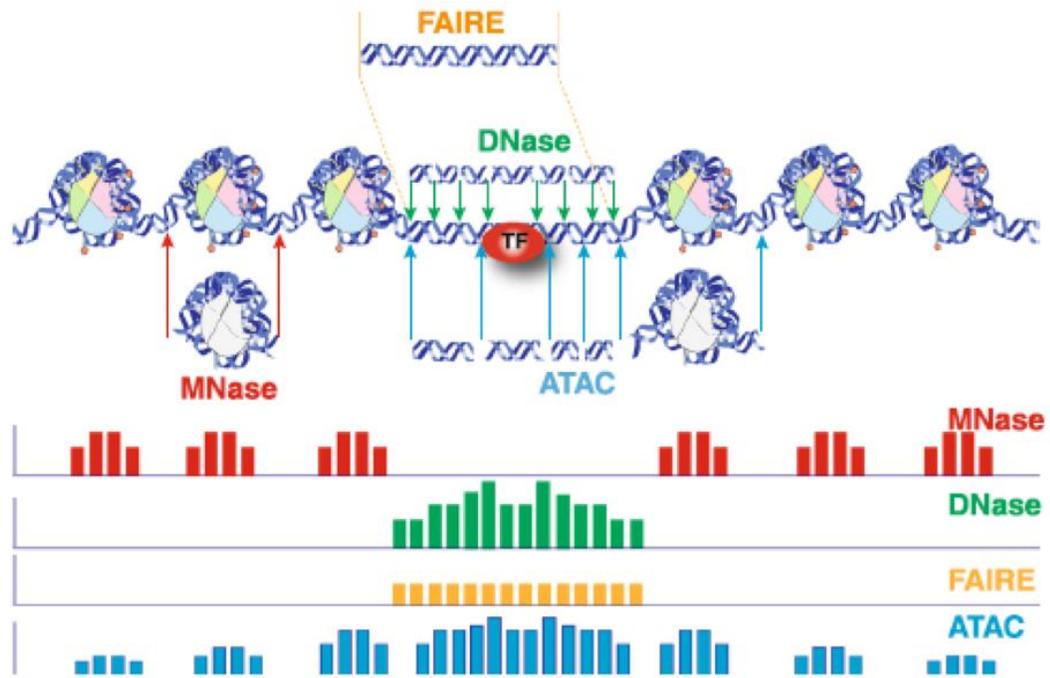
- 🌀 O **posicionamento dos nucleossomos** modifica a disponibilidade de locais de ligação para fatores de transcrição afetando a transcrição, reparo e replicação do DNA;
- 🌀 Ativação transcricional coincide com a perturbação do nucleossomos;
- 🌀 Regulação transcricional requer o reposicionamento do nucleossomos.



- 🌀 As regiões abertas ou acessíveis do genoma são, portanto, consideradas como as posições primárias para os elementos reguladores .

Posicionamento de Nucleossomos

- Mensuram diretamente o efeito das modificações da estrutura da cromatina na transcrição do gene;
- Não requerem anticorpos ou marcadores de epítipo;
- Dnase-seq, FAIRE-seq e ATAC-seq são métodos diretos
- Mnase → método indireto

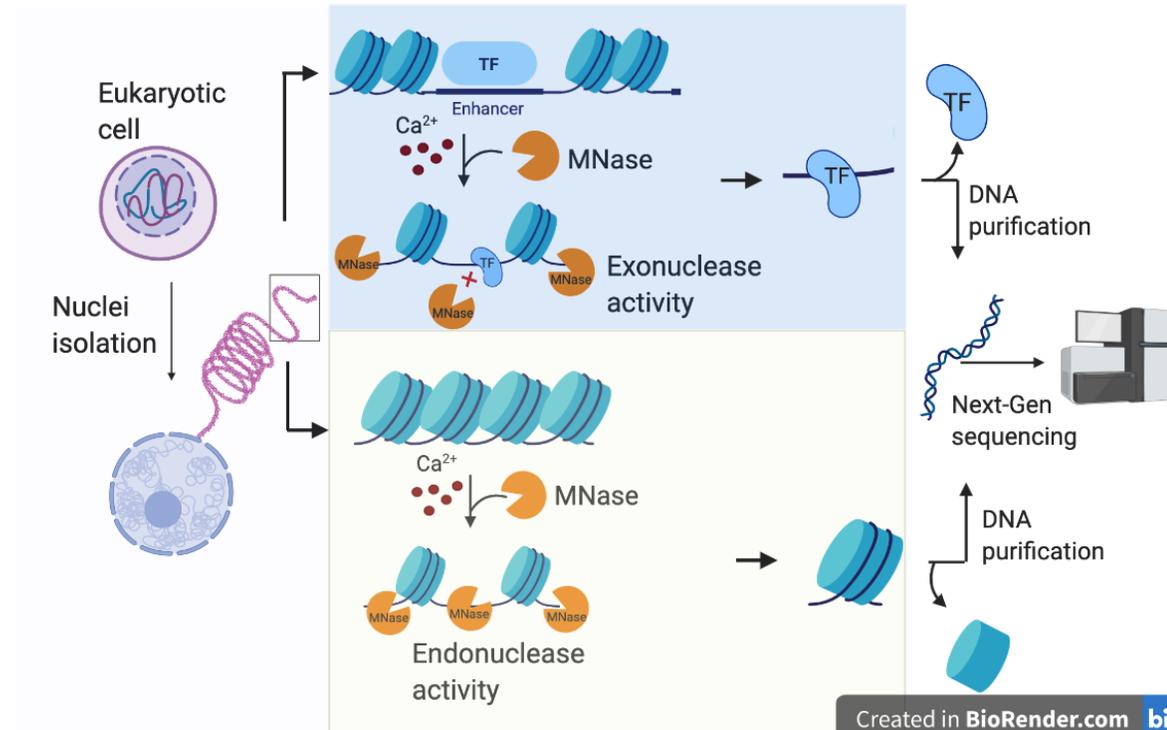


Mnase-seq

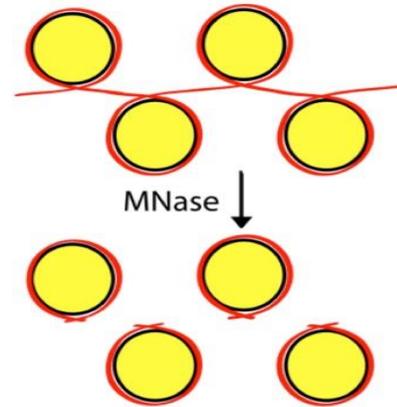
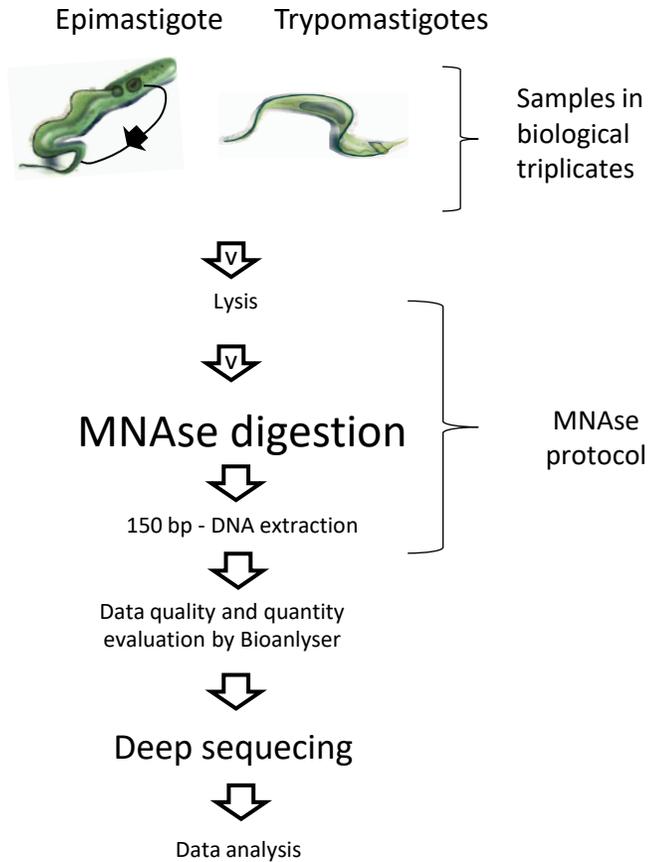
MNase-seq - Micrococcal Nuclease

 Baseia-se no uso da endo - exonuclease microcócica não específica da bactéria *Staphylococcus aureus* que se liga e cliva regiões de DNA não ligadas à proteína na cromatina

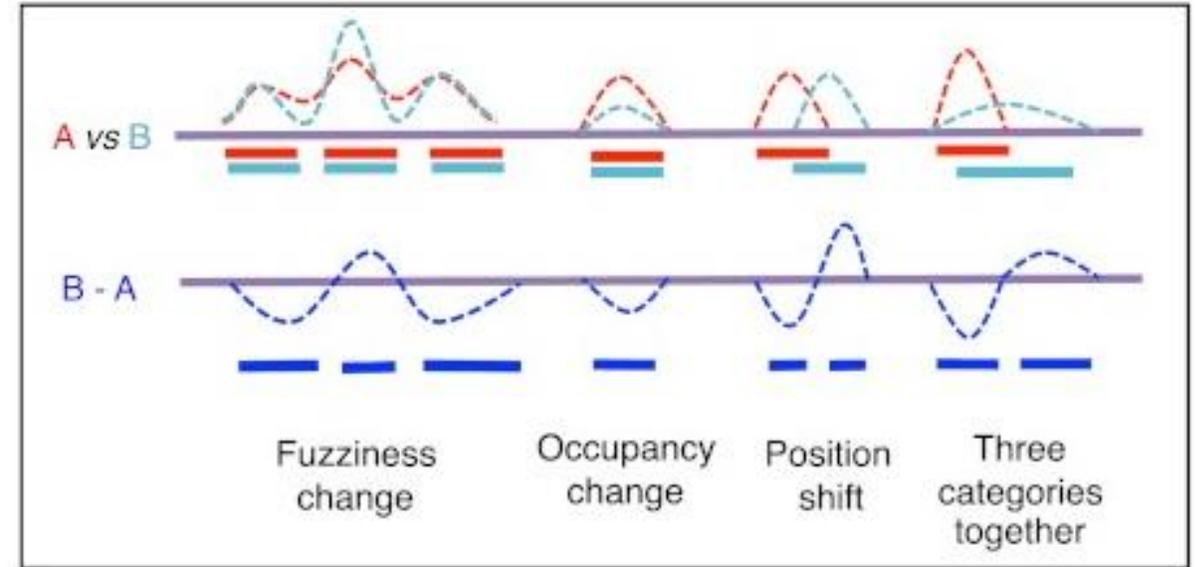
 Mensura a ocupancia e o posicionamento dos nucleossomos e dos fatores de transcrição, avaliando de forma indireta regiões de acessibilidade da cromatina



Nucleosome positioning (MNase-seq analysis)



E Classification of dynamic nucleosomes

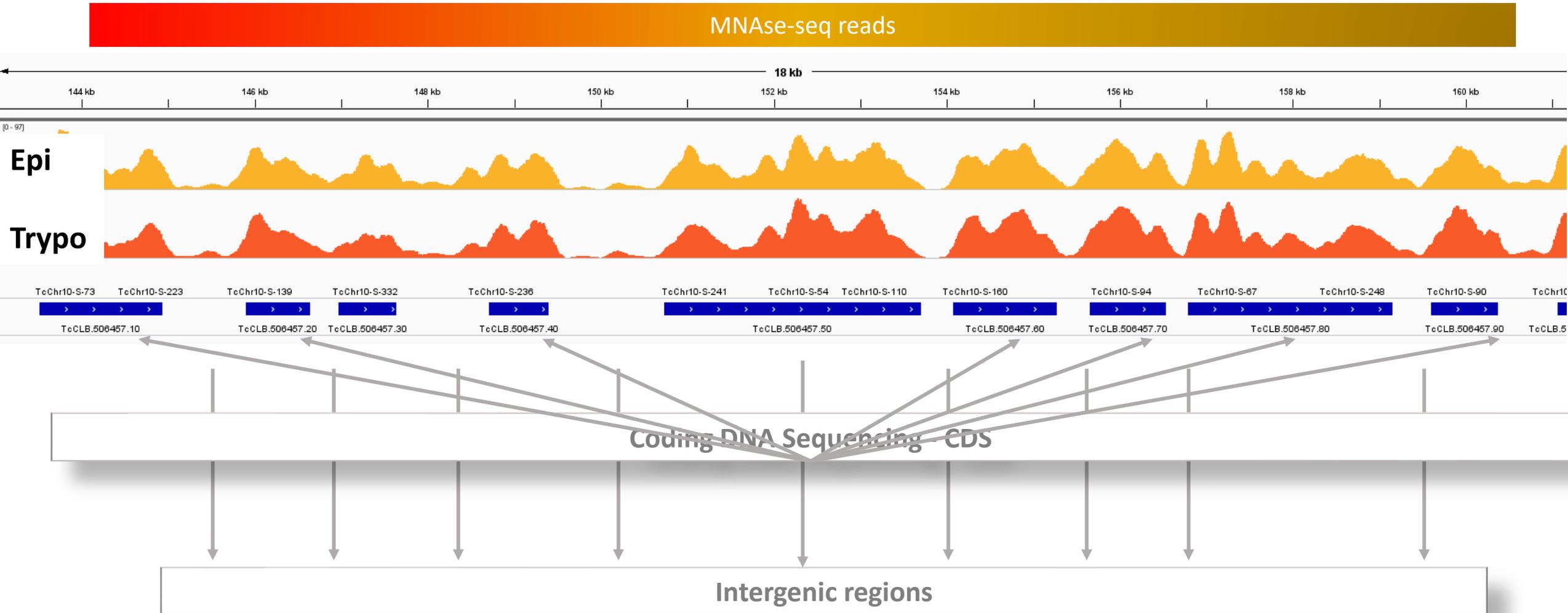


Cristiane Araujo Carolina Elias Saloe Bispo Alex Ranieri David Pires



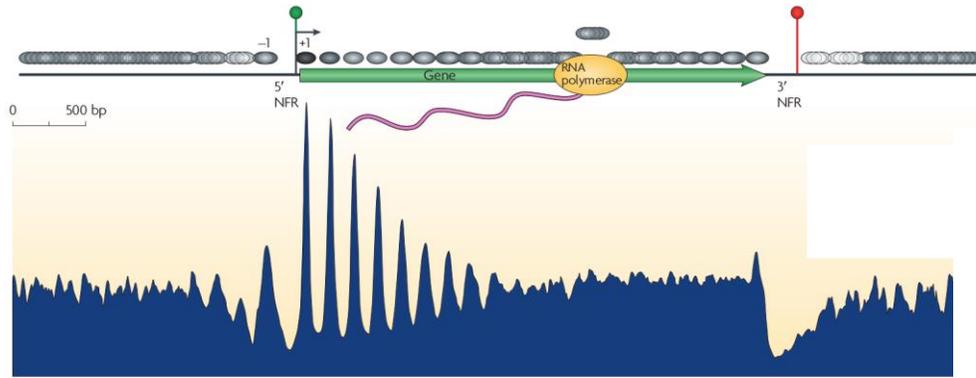
Mnase-seq

A inspeção visual dos dados MNase-seq indica uma arquitetura de cromatina conservada entre epimastigotas e tripomastigotas

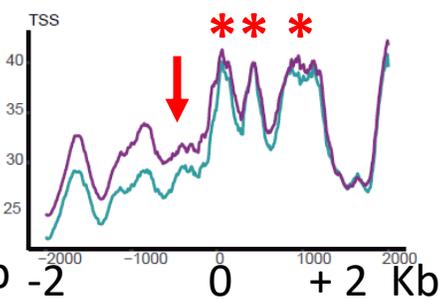
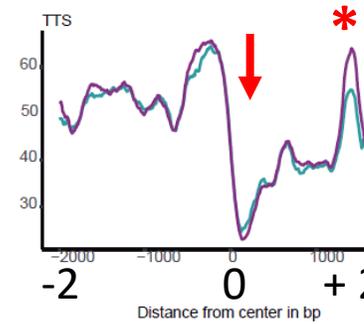
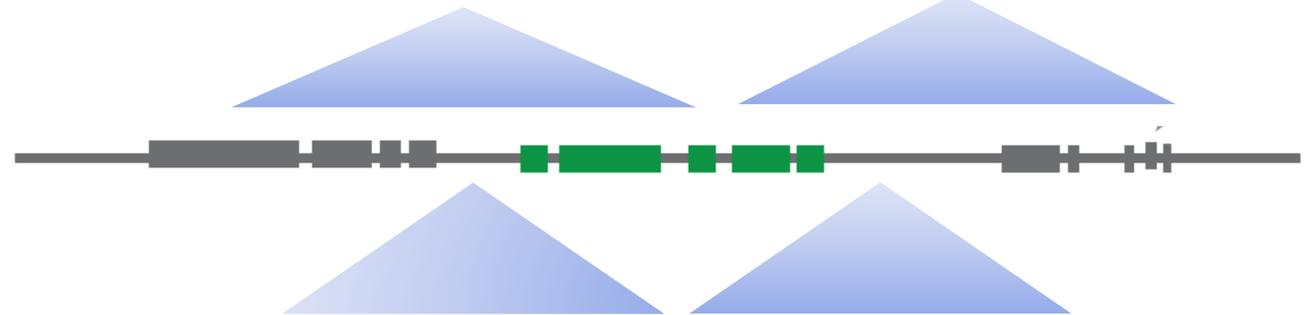
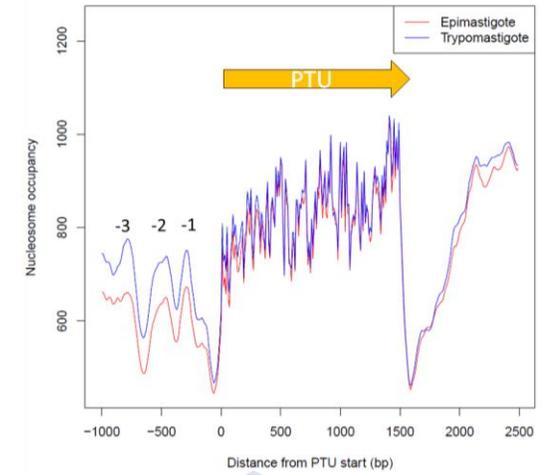
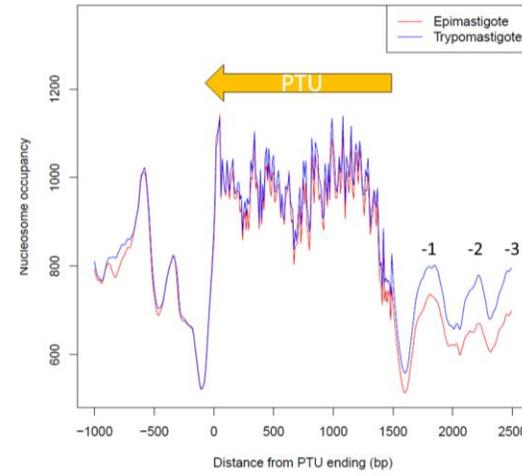


Mnase-seq

Nucleosome landscape in model cells



Cizhong Jiang and B. Franklin Pugh, Nature Reviews Genetics



Epimastigotes
Trypomastigotes

Distance (bp)

Nucleosome landscape at polycistronic region



LabTryps – Prof. Dr. Ariel Silber
LCC - Dra. Maria Carolina Elias
Dra Júlia Cunha

Obrigada!

E-mail:
ana.menezes@esib.butantan.gov.br