

Análise do perfil transcricional e translacional dos neurônios Agrp

Gabriel Baldissera¹, Delva P. Leão^{1,3}, Marcelo Rigon Zimmer^{1,2}, Diogo Onofre Gomes de Souza¹ e Marcelo O. Dietrich^{1,2,3}

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Unidade de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³Departamento de Medicina Comparativa, Yale University

Introdução

- Os neurônios Agouti-related peptide (Agrp) se localizam no núcleo arqueado do hipotálamo.
- Neurônios Agrp são importantes na regulação da ingestão alimentar e balanço energético.
- Os padrões de expressão gênica do neurônios Agrp frente a mudanças metabólicas, especialmente jejum, ainda não são bem compreendidos.
- Com a técnica single cell RNA-Seq (scRNA-Seq) é possível isolar as células de um tecido complexo e sequenciar o conjunto de RNAs mensageiros de cada célula (transcriptoma).
- Utilizando animais Ribo-Tag é possível isolar o conjunto de RNAm engajados em tradução. Com o sequenciamento destes RNAm por meio de RNA-Seq é possível identificar os transcritos que são traduzidos (translatoma).
- O objetivo deste trabalho é analisar e comparar o transcriptoma e translatoma de neurônios Agrp frente a um cenário de jejum alimentar.

Material e métodos

• **Transcriptoma:** Os dados de scRNA-seq foram obtidos do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). Foram analisados os diferentes grupos de neurônios Agrp e a expressão de seus genes em relação ao jejum alimentar.

• **Translatoma:** Transcritos engajados na tradução foram obtidos por meio de imunoprecipitação. Foram utilizados animais Ribo-Tag, cruzados com animais Agrp-Cre, com marcação de hemaglutinina (HA) no gene ribossomal *Rpl22*. Esses animais permitem especificamente a imunoprecipitação de ribossomos marcados dos neurônios Agrp. Tais ribossomos foram isolados e os RNAs a eles ligados foram purificados para RNA-Seq (translatoma). Analisou-se a expressão diferencial jejum vs dieta *ad libitum*.

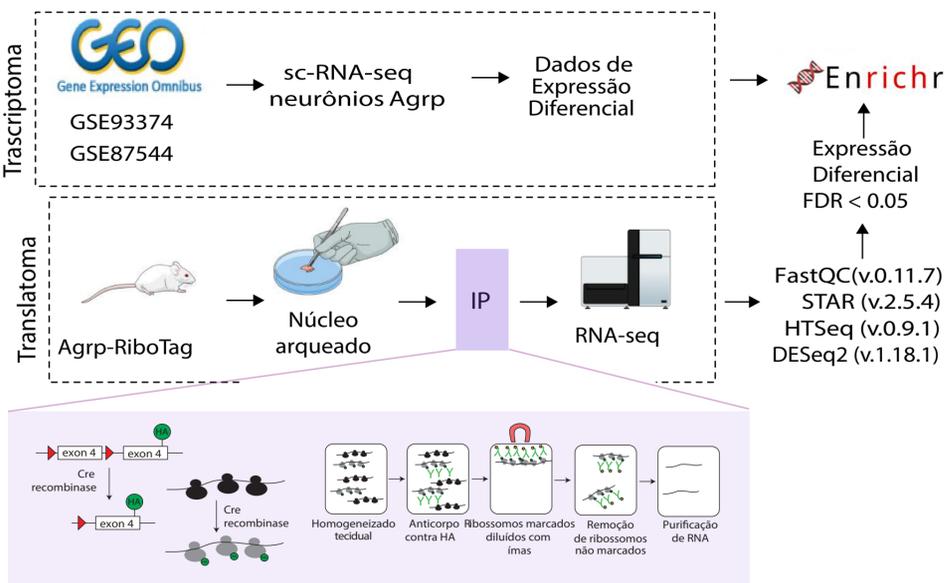


Figura 1: Métodos e coleta de dados

Resultados

- Utilizando os dados de scRNA-seq obtidos do GEO, identificamos três grupos de neurônios Agrp que foram reunidos e utilizados nas nossas análises.
- Utilizando os resultados da análise de expressão diferencial entre células de animais submetidos a jejum ou a dieta *ad libitum*, identificamos um total de 11.513 genes diferencialmente expressos (DE) pelos neurônios Agrp, para uma taxa de correção para falsos positivos (FDR) < 0.05.
- Neste conjunto de 11.513 genes DE, consideramos superexpressos aqueles com log2 Fold Change (logFC) > 1 (106 genes) e subexpressos aqueles com logFC < -1 (99 genes). Para o enriquecimento funcional dos mesmos utilizamos a ferramenta online EnrichR (Figura 2).

Transcriptoma

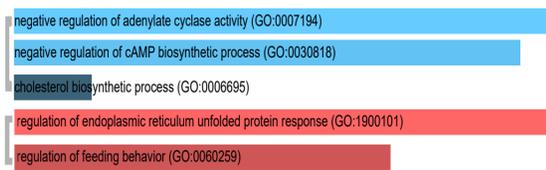


Figura 2: Gráfico adaptado da ferramenta EnrichR demonstrando os principais processos associados aos genes superexpressos (em azul) e subexpressos (em vermelho) do transcriptoma. Os processos estão ordenados dos menores aos maiores valores de p ($p < 0.05$).

• O processamento dos dados brutos de RNA-seq dos animais Ribo-Tag foi realizado com sucesso. As amostras possuem reads com alta qualidade (Phred quality score > 30) (Figura 3) e uma taxa média de reads unicamente mapeados de 78% (mínimo de 61,56% e máximo de 83,52%).

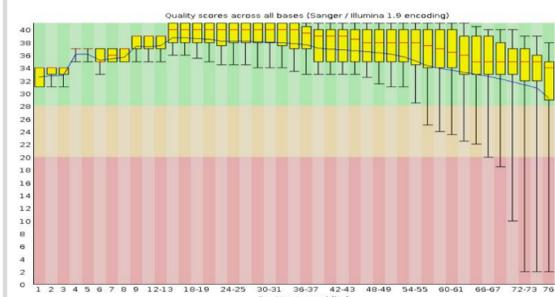


Figura 3: Gráfico com os valores de qualidade dos reads. No eixo x estão descritas as posições das bases ao longo dos reads e no eixo y os valores de qualidade na escala Phred Quality Score. O gráfico demonstra que a maioria das sequências possuem alta qualidade.

• A análise de expressão diferencial entre jejum de 16 horas e dieta *ad libitum* resultou em 350 genes DE, quando considerando FDR < 0.05. Destes, 93 genes possuem logFC > 1 e 35 genes possuem logFC < -1 (Figura 4).

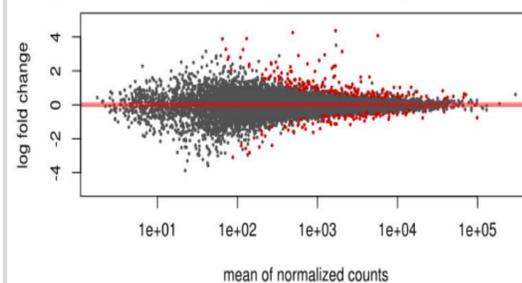


Figura 4: Gráfico de dispersão dos genes identificados no translatoma. O eixo x representa a expressão gênica média e o eixo y representa a magnitude de mudança da expressão gênica através dos valores de log2 Fold Change. Cada ponto representa um gene. Pontos em vermelho representam genes com expressão alterada de forma significativa (FDR < 0.05) e pontos em cinza representam genes sem mudanças significativas na expressão. A maioria dos genes apresenta uma alteração contida no intervalo de -2 a +2.

• A seguir, realizamos análise de enriquecimento funcional dos genes super e subexpressos do translatoma. Estes genes foram associados a diferentes processos biológicos (Figura 5).

Translatoma

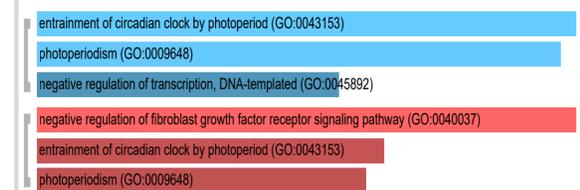


Figura 5: Gráfico adaptado da ferramenta EnrichR demonstrando os principais processos associados aos genes superexpressos (em azul) e subexpressos (em vermelho) do translatoma. Os processos estão ordenados dos menores aos maiores valores de p ($p < 0.05$).

• Comparamos os genes alterados de forma significativa (FDR < 0.05 e logFC > 1 ou logFC < -1) no transcriptoma (n = 205 genes) e translatoma (n = 128 genes) e identificamos 12 genes compartilhados nestes conjuntos (Figura 6).

Transcriptoma Translatoma

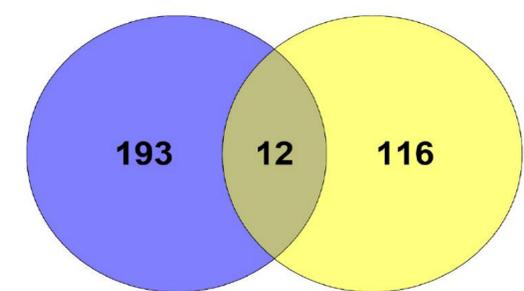


Figura 6: Diagrama de Venn indicando quantidade de genes compartilhados entre o transcriptoma (em azul) e translatoma (em amarelo). Para ambos conjuntos, foram considerados genes com FDR < 0.05 e logFC > 1 ou logFC < -1.

• A análise de enriquecimento funcional indicou que os 116 genes exclusivos do translatoma estão associados a processos similares aos identificados no enriquecimento funcional do translatoma completo (Figura 5).

• Os 193 genes exclusivos do transcriptoma estão associados a processos envolvidos com o metabolismo e regulação da esterificação de colesterol e de esteróides. Similar ao observado nos genes subexpressos do transcriptoma completo (Figura 2).

Discussão

• Comparando Transcriptoma vs Translatoma, ambos em condição de jejum alimentar, surpreendeu-nos o baixo número de genes compartilhados. Este número pode ter razões biológicas ou metodológicas associadas à técnica de single cell. A análise a partir dos dados já processados e publicados (grupos do transcriptoma) gerou informações interessantes para uma abordagem inicial, mas não suficientes para esclarecer a relação Translatoma x Transcriptoma.

Conclusão e Perspectivas

- Existe uma alteração significativa da expressão gênica em nível transcricional e translacional em Agrp em uma situação de jejum alimentar.
- Decidimos reanalisar os dados de sc-RNA-Seq com uma pipeline otimizada e com maior padronização entre os estudos.

