

PROVA 2 – GABARITO/ESPELHO

DATA: ____/____/____

NOME: _____

NOTA: ____/100

Leia o texto abaixo e responda as questões.

ATAC-Seq Identifies Chromatin Landscapes Linked to the Regulation of Oxidative Stress in the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*

by **Sabrina Jenull**[†], **Michael Tscherner**[†], **Theresia Mair** and **Karl Kuchler**^{*}

Medical University of Vienna, Center for Medical Biochemistry, Max Perutz Labs Vienna, Campus Vienna Biocenter, Dr. Bohr-Gasse 9/2, A-1030 Vienna, Austria

- I. Human fungal pathogens respond to host immune defense through numerous mechanisms, including chromatin-mediated adaptive gene expression. For example, immune defense or environmental changes can trigger pathogen responses through extracellular sensing, intracellular signal transduction, and transcriptional reprogramming. Transcriptional changes require a tight interplay of chromatin states and transcription factors, as the swift adaptation to environmental changes is often paramount for a successful lifestyle or immune evasion.
- II. For instance, pathogens encounter a number of extreme stress conditions during the course of an infection. These include limitations in nutrient availability and the cytotoxic attack by the host immune system. The opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* is an extraordinary example of how a pathogen can occupy multiple host niches to persist and survive. *C. albicans* lives as a harmless commensal in the majority of humans, colonizing mucosal surfaces and epithelial barriers, especially the intestinal tract.
- III. However, severe immunodeficiency or a dysregulation of the host microbiota turns *C. albicans* into an invasive pathogen that can infect virtually any tissue or organ in the human body. In the last decade, numerous efforts have been made to better understand fungal pathogenicity mechanisms, including the transcriptional regulation of environmental adaptation and virulence factors, such as the switch between different cellular morphologies.
- IV. Given the pivotal interplay of chromatin modifications and transcription control, it is not surprising that several *C. albicans* chromatin-modifying factors play important roles in fungal virulence. For instance, the functions of the histone acetyl transferases (HATs) Gcn5, Hat1, and Rtt109 are crucial for morphogenesis and virulence. Likewise, the histone deacetylase

(HDAC) complex Set3C controls transcriptional kinetics during the morphological transition from yeast growth to filamentous hyphal growth. Remarkably, genetic ablation of *SET3* abrogates fungal virulence.

- V. Hence, attacking chromatin modifiers provides a new option for antifungal drug development. This requires immediate attention in clinical settings, given the rapid emergence of antifungal drug resistance in *Candida* spp. such as *C. glabrata* or *C. auris*. However, a better understanding of the interplay between chromatin architecture in the pathogen and transcriptional reprogramming during host interaction would further aid the discovery of new antifungals targeting chromatin function.
- VI. Several methods including chromatin immunoprecipitation (ChIP) and micrococcal nuclease (MNase) digestion of chromatin coupled with next-generation sequencing (ChIP-seq and MNase-seq, respectively) or DNase-seq have been employed to analyze chromatin accessibility and nucleosome positioning to reveal regulatory mechanisms. Recently, the assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq) emerged to probe for native chromatin states, which includes accessibility as well as nucleosome positioning. ATAC-seq employs a hyperactive Tn5 transposase loaded with sequencing adapters, which are inserted into accessible chromatin sites, causing fragmentation, and tagging of chromatin DNA referred to as tagmentation. This happens preferably at genomic regions with open, accessible chromatin since transposition events into condensed chromatin are less likely. Due to its technical simplicity and the low sample input requirements, ATAC-seq has been widely applied for chromatin profiling in various cell types, tissues, and even single cells. Moreover, it has proved to be a useful tool for identifying sequence motifs decorated by transcriptional regulators and for predicting gene transcription.
- VII. Here, we aimed to adapt the original ATAC-seq protocol for the human fungal pathogen *C. albicans*. We developed a modified protocol and bioinformatics workflow that enables the sensitive detection of changes in the global chromatin landscapes in response to environmental stress. We have chosen oxidative stress as environmental cue because it triggers genome-wide changes in gene expression and because it closely mimics the oxidative immune defense fungal pathogens face during host invasion.
- VIII. Moreover, transcriptomics data for *C. albicans* challenged with hydrogen peroxide (H_2O_2) and genome-wide binding data of the oxidative stress transcriptional regulator are available, which we combined with the present ATAC-seq data for *C. albicans*. With this approach, we demonstrate that H_2O_2 -treatment of fungal cells increases chromatin accessibility in upstream regions of genes associated with the oxidative response, and we show that those genes tend to be transcriptionally upregulated.
- IX. Moreover, signatures of accessible chromatin regions enable the prediction of putative novel regulators of stress signaling that are not yet linked to transcriptional control. In addition, genomic regions with an elevated ATAC-seq signal are enriched in binding sites for the key regulator, demonstrating the potential for de novo motif discovery of regulatory factors. In summary, we show the versatility of ATAC-seq chromatin profiling in *C. albicans*, especially when combined with complementary next-generation sequencing data such as RNA-seq. This approach uncovers

dynamic and complex regulatory mechanisms during environmental adaptation of pathogens.

- X. Additionally, a weak enrichment for di-nucleosomal peaks was detected. Again, ATAC-seq libraries from gDNA did not reveal nucleosomal presence. Instead, the majority of PES read fragments were below 150 bp, which was consistent with the fragment length distribution of Tn5-generated DNA sequencing libraries. Notably, the number of mapped reads was evenly distributed among the *C. albicans* chromosomes, thus reflecting total chromosome sizes and suggesting no chromosomal bias. Inspection of ATAC-seq reads aligned to the *C. albicans* genome further revealed a distinct read coverage profile of accessible chromatin regions in nuclear chromatin purified from H₂O₂-treated (H₂O₂) and non-treated (YPD) cells, which was not apparent in gDNA libraries.
- XI. In conclusion, we here present an integrative workflow for ATAC-seq in the human fungal pathogen *C. albicans*. ATAC-seq offers a new robust tool to capture temporal changes in chromatin landscapes that are tightly connected to transcript abundance during fungal adaptation to stress. In addition, novel regulators that are not subject to transcriptional control at the time of sample collection might be identified based on chromatin accessibility signatures. This might aid in capturing a broader picture of highly dynamic cellular adaptations where sample drawing is limited. Finally, the combination of ATAC-seq with additional datasets has the potential to predict yet-unknown regulatory sequences and transcription factor binding sites that dictate transcriptional reprogramming and, thus, may be crucial to fungal survival upon stress encounter.

(Extracted and adapted from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/182/htm>)

As questões de 1 a 5 são de múltipla escolha. Para cada questão será aceita apenas uma resposta. (Cada questão vale 6, totalizando 30 pontos de 100)

1) Segundo o parágrafo I, está correto afirmar:

- a) **Patógenos fúngicos humanos respondem à defesa imune do hospedeiro por meio de vários mecanismos.**
- b) Patógenos humanos de fungos podem diminuir a defesa do hospedeiro por meio de vários mecanismos.
- c) Patógenos fúngicos humanos aumentam a defesa imune do hospedeiro por meio de alguns mecanismos.
- d) Patógenos fúngicos humanos tendem a responder em defesa do hospedeiro por meio de certos mecanismos.
- e) Patógenos fúngicos humanos estão relacionados à defesa do hospedeiro por meio de um certo número de mecanismos.

2) Indique a única afirmação contida no parágrafo II:

- a) Os patógenos não encontram condições extremas de estresse durante uma infecção.
- b) Os patógenos encontram poucas condições estressantes extremas durante o curso de uma infecção.
- c) **Os patógenos encontram várias condições extremas de estresse durante o curso de uma infecção.**
- d) Os patógenos se expõem a condições extremas de estresse durante as infecções.
- e) Os patógenos não se expõem a condições estressantes durante o curso de uma infecção.

3) De acordo com o parágrafo III, está correto afirmar:

- a) A imunodeficiência severa ou uma desregulação da microbiota do hospedeiro vem da incidência de um patógeno *C. albicans* pouco invasivo, mas que pode infectar qualquer tecido humano.
- b) **A imunodeficiência grave ou uma desregulação da microbiota do hospedeiro transforma *C. albicans* em um patógeno invasivo que pode infectar virtualmente qualquer tecido ou órgão do corpo humano.**
- c) A imunodeficiência severa ou uma regulamentação da microbiota do hospedeiro converte *C. albicans* em patógeno evasivo que pode infectar tecidos e órgãos humanos.
- d) A imunodeficiência grave ou uma falta de regulamentação da microbiota hospedeira pode transformar *C. albicans* em um patógeno invasivo que infecta virtualmente todos os tecidos ou órgãos do corpo humano.
- e) A imunodeficiência severa, aliada a uma desregulação da microbiota hospedeira, converte *C. albicans* em um patógeno evasivo que infecta virtualmente qualquer tecido ou órgão do corpo humano.

4) O parágrafo IV afirma que:

- a) Poucos fatores podem modificar a cromatina de *C. albicans* e desempenhar papéis importantes na virulência fúngica.
- b) Alguns fatores modificadores da cromatina de *C. albicans* desempenham papéis importantes na virulência fúngica.
- c) Apenas os fatores modificadores da cromatina *C. albicans* desempenham papéis importantes na virulência fúngica.

- d) Diversos fatores que modificam a cromatina *C. albicans* não desempenham papéis de importância na virulência fúngica.
- e) **Vários fatores modificadores da cromatina *C. albicans* desempenham papéis importantes na virulência fúngica.**

5) De acordo com o parágrafo V:

- a) Ainda que se ataque os modificadores da cromatina, é difícil fornecer uma nova opção para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.
- b) **Atacar os modificadores da cromatina fornece uma nova opção para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.**
- c) O ataque dos modificadores da cromatina fornece uma nova opção para o desenvolvimento de drogas fúngicas.
- d) Mesmo que os modificadores da cromatina forneçam uma nova opção para o desenvolvimento de drogas antifúngicas, é preciso que haja um ataque às mesmas.
- e) O ataque aos modificadores da cromatina não fornece uma nova opção para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.

Responda as questões a seguir em língua portuguesa. (Cada questão vale 8, totalizando 40 pontos de 100)

- 6) Segundo o parágrafo VI, para que o ATAC-seq (*the assay for transposase-accessible chromatin using sequencing*) surgiu?

To probe for native chromatin states, which includes accessibility as well as nucleosome positioning.

(Como sonda para estados de cromatina nativa, que inclui acessibilidade bem como posicionamento de nucleossomos.)

- 7) Qual foi o objetivo do estudo exposto no parágrafo VII?

We aimed to adapt the original ATAC-seq protocol for the human fungal pathogen *C. albicans*.

(Teve como objetivo adaptar o protocolo original do ATAC-seq ao patógeno fúngico humano *C. albicans*.)

- 8) O que foi demonstrado nesta abordagem, de acordo com o parágrafo VIII?

We demonstrate that H₂O₂-treatment of fungal cells increases chromatin accessibility in upstream regions of genes associated with the oxidative response.

(Demonstrou-se que o tratamento com H2O2 de células fúngicas aumenta a acessibilidade à cromatina em regiões a montante de genes associados à resposta oxidativa.)

9) Segundo os autores, o que ficou, em suma, demonstrado pela abordagem tomada (parágrafo IX)?

In summary, we show the versatility of ATAC-seq chromatin profiling in C. albicans, especially when combined with complementary next-generation sequencing data such as RNA-seq.

(Em suma, mostramos a versatilidade do perfil de cromatina ATAC-seq em C. albicans, especialmente quando combinado com dados de sequenciamento de próxima geração complementares, como RNA-seq.)

10) De acordo com o parágrafo X, o que a inspeção de leituras do ATAC-seq alinhadas ao genoma de *C. albicans* revelou?

A distinct read coverage profile of accessible chromatin regions in nuclear chromatin purified from H2O2-treated (H2O2) and non-treated (YPD) cells, which was not apparent in gDNA libraries.

(Um perfil de cobertura de leitura diferente de regiões de cromatina acessíveis na cromatina nuclear purificada a partir de células tratadas com H2O2 e não tratadas, que não era aparente em literaturas de gDNA.)

Tradução –

Converta para o português a passagem a seguir extraída do texto em questão (total de 30 pontos de 100):

In conclusion, we here present an integrative workflow for ATAC-seq in the human fungal pathogen C. albicans. ATAC-seq offers a new robust tool to capture temporal changes in chromatin landscapes that are tightly connected to transcript abundance during fungal adaptation to stress. In addition, novel regulators that are not subject to transcriptional control at the time of sample collection might be identified based on chromatin accessibility signatures. This might aid in capturing a broader picture of highly dynamic cellular adaptations where sample drawing is limited. Finally, the combination of ATAC-seq with additional datasets has the potential to predict yet-unknown regulatory sequences and transcription factor binding sites that dictate transcriptional reprogramming and, thus, may be crucial to fungal survival upon stress encounter.

(Em conclusão, apresentamos aqui um fluxo de trabalho integrativo para ATAC-seq no fungo patógeno humano C. albicans. ATAC-seq oferece uma nova ferramenta robusta para capturar mudanças temporais em paisagens de cromatina que estão estreitamente conectadas à abundância de transcritos durante a adaptação de fungos ao estresse. Além disso, novos reguladores que não estão sujeitos ao controle da transcrição no momento da coleta da amostra podem ser identificados com base nas assinaturas de acessibilidade da cromatina. Isso pode ajudar na captura de uma imagem mais ampla de adaptações celulares altamente dinâmicas, onde o desenho da amostra é limitado. Finalmente, a combinação de ATAC-seq com conjuntos de dados adicionais tem o potencial de prever sequências regulatórias ainda desconhecidas e locais de ligação de fator de transcrição que ditam a reprogramação transcricional e, portanto, podem ser cruciais para a sobrevivência do fungo após o encontro de estresse.