

Tutorial – Introdução a anotação e comparação de genomas

Tiago Mendes – Doutorando em Bionformática

Hoje iremos trabalhar com dois programas free desenvolvidos pelo Sanger institute: Artemis e ACT. Artemis foi desenvolvido com a finalidade de permitir a visualização gráfica de um genoma, bem como uma ferramenta de anotação que permite visualização, edição e análise de sequências gênicas em suas seis janelas de leitura. ACT é um programa que permite comparação de genomas.

Ao longo do tutorial existem 7 exercícios (**digitadas em vermelho**) que deverão ser enviados individualmente para o email: mendesfarmacia@gmail.com até domingo (20/10/2013) as 23:59 .

Como os dois programas são escritos em Java, para instalação do Artemis e do ACT é necessário a instalação previa do Java (já realizada nas máquinas do laboratório) com instruções que podem ser obtidas em: <http://java.com/en/download/manual.jsp>

Obtenção dos arquivos:

- 1- Abra o terminal (Aplicativos → Acessórios → Terminal)
- 2- Entre no diretório Documentos (cd Documentos)
- 3- Crie a pasta artemis (mkdir artemis)
- 4- Entre na página: <http://pinguim.fmrp.usp.br/anotacao/>
- 5- Faça Download dos arquivos e salve na pasta artemis criada:
 - a. organismo1.fasta
 - b. organismo2.embl
 - c. organismo3.embl
 - d. org1.vs.org2.formatado
 - e. org1.vs.org3.formatado
- 6- Entre na pasta artemis (cd artemis)

- 7- Digite 'ls -l' e confira se os cinco arquivos do item 5 estão presente no diretório artemis.

Instalação Artemis e ACT em Linux:

- 1- Entre no site do [Artemis](http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/) (http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/) e clique na aba Download
- 2- Em FTP Download clique Artemis for Unix
- 3- Salve o arquivo artemis.tar.gz no diretório Documentos
- 4- Abra o terminal e entre no diretório Documentos (cd Documentos)
- 5- Extraí o arquivo (tar -vzxf artemis_linux.tar.gz)

Instalação do Artemis e ACT em Windows:

- 1- Entre no site do [Artemis](http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/) (http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/) e clique na aba Download
- 2- Em FTP Download clique Artemis for Windows
- 3- Salve o arquivo artemis.jar no Desktop
- 4- Clique duas vezes no arquivo artemis.jar
- 5- Clique em Browser e selecione o diretório Documentos

Anotação manual de genes codificadores de proteínas

1. Para executar o programa Artemis digite: ./art e aperte enter
2. Clique em Browse e selecione o diretório artemis
3. Clique em 'Options' e seleccione '1 - Standard'
4. Clique em File → Open... → Abra o arquivo 'organismo1.fasta'
5. Uma vez aberto o arquivo, procure uma ORF (Open Read Frame) e com o mouse selecione um trecho dessa ORF. Obs: Não selecione nenhum tracinho referente a um stop códon, selecione de preferência o meio da ORF;

Exercício 1: Quais as características de uma CDS (sequência codificante para uma proteína completa)?

6. Clique em Create → Feature From Base Range. Na janela que apareceu clique em 'Apply' e OK;
7. Clique no retângulo azul criado e clique em 'Edit' → Extend Selected Features → To Previous Stop Códon. A sequência deve crescer para a esquerda (até um stop códon);
8. Clique novamente no mesmo retângulo azul e vá em 'Edit' → 'Extend selected feature' → 'To next stop códon and fix'/. Pronto, agora seu gene termina em um stop códon, mas será que o começo está correto?
9. Clique novamente no mesmo retângulo azul e clique em Edit → Trim Selected Features → To Next Met). A sequência vai ser corrigida para começar em uma metionina. Agora sim! Seu gene tem metionina inicial e stop códon, 'pode' codificar algo...
10. Feito isso, procure outras 3 ORFs disponível e repita do passo 4 ao 9;
11. Uma vez criado genes, clique em 'Select' → 'All CDS features'
12. Clique em 'Edit' → 'Automatically create genes name'
 - a. 'Enter the start character...': coloque o nome Gene_
 - b. 'start count at', coloque: 1
 - c. 'increment number by', coloque: 1
 - d. 'enter a qualifier name to use', coloque: locus_tag
 - e. 'number of digits...', coloque: 2
 - f. 'append "c", clique em No. Pronto, os genes estão nomeados!!!

Exercício 2: Para identificarmos qual possível proteína cada CDS codifica, será utilizado BLAST (alinhamento local contra um banco de dados). Qual programa seria mais indicado para esta identificação: Blastn (utilizando a sequência gênica) ou Blastp (utilizando a sequência da proteína predita)? Justifique.

13. Clique no primeiro gene, vá em 'View' → 'Aminoacid of selection as fasta' → copie a sequência que aparecer em formato .fasta e faça uma busca por similaridade no BLASTp no site do NCBI;
14. Anote o resultado, para isso, selecione o gene de onde veio a sequência e aperte a tecla E (Edit/Selected Features in Editor). Vai aparecer uma janela, nessa janela que serão anotadas todas as informações sobre o gene;
15. Na janela aberta, clique na setinha preta do campo 'Add Qualifier' e adicione os campos product; curation e similarity. Em cada escolha, clique em Add Qualifier e confira se o campo foi criado dentro da janela;
16. Com o resultado do BLASTp feito , preencha os campos acima adicionando;
 - a. Curation: o nome do anotador
 - b. Product: o nome do produto codificado pelo gene, de acordo com o BLASTp;
 - c. Similarity: campo mais importante. Preencher da seguinte maneira – Similar to (organismo que deu maior similaridade); nome do produto da maior similaridade; tamanho dessa proteína em aminoácidos; e-value: valor de e encontrada nessa maior similaridade; % de similaridade entre as duas proteínas (% id) in (número de aminoácidos encontrados na similaridade) (exemplo no slide!!!);
 - d. Clique em 'Apply' e 'Ok'
17. Feito isso, vá nos outros genes e repita do passo 13 ao 19;

18. Salve o arquivo com o nome de organismo1.embl no diretório artemis clicando em File → Save An Entry As → EMBL Format → organismo1.fasta
19. Pronto, curadoria realizada com sucesso!!! Agora vocês já podem anotar um genoma de verdade, com todos seus elementos! ☺
20. Feche o programa, abra o arquivo .embl gerado (more organismo1.embl) e analise sua estrutura.

Exercício 3: Qual os produtos gênicos prováveis para os seguintes genes:

- a) Gene_01:
- b) Gene_02:
- c) Gene_03:
- d) Gene_04:

Observação do cromossomo 1 de Trypanosoma brucei anotado

- 1- Clique no link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>
- 2- Clique em Prozoan → Trypanosoma brucei (Build 1.1) → clique no cromossomo 1
- 3- Clique em Download/View Sequence/Evidence
- 4- Clique em Save to Disk
- 5- Clique em Send → File → Mude o formato para GenBank (full) → create file → download
- 6- Mova o arquivo para o diretório artemis (mv .././Download/sequence.gb .) – o ponto final é muito importante!!
- 7- Abra o artemis (./art)
- 8- Clique em 'Options' e seleccione '4 – Mold, Protozoan,...
- 9- Clique em File → Open... → Abra o arquivo 'sequence.gb'
- 10- Se aparecer a mensagem – there are warnings while reading – view now? à Clicar em 'No'

Exercício 4: Copie e descreva a característica de três estruturas anotadas neste cromossomo.

Comparação de três genomas com ACT

Para rodar o ACT precisa-se de pelo menos 3 arquivos. Dois arquivos com as seqüências a serem comparadas que podem ser anotadas (formato anotado do Genbank, por exemplo) ou não (fasta) e um arquivo de comparação entre as duas seqüências. Nós já temos os arquivos das seqüências (organismo1.embl, organismo2.embl e organismo3.embl) e para gerar os arquivos comparativo foi utilizado o programa tblastx (org1.vs.org2.formatado e org1.vs.org3.formatado).

Exercício 5: Como tblastx faz alinhamento entre duas seqüências?

O arquivo comparativo deve possuir os seguintes campos:

Col.12: score

Col.3: % identidade

Col.7: Query start

Col.8: Query end

Col.1: Query sequence name

Col.9: Subject start

Col.10: Subject end

Col.2: Subject sequence name

1. Abrir o programa ACT digitando ./act e apertando enter
2. Clicar em file → Open e complementar os campos com as seguintes informações:

Sequence file 1: organismo2.embl

Comparison file 1: org1.vs.org2.formatado

Sequence file 2: organismo1.embl

3. Clicar em “More files...”

Comparison file 2: org1.vs.org3.formatado

Sequence file 3: organismo3.embl

4. Clicar em 'Apply'

5. Comparar as CDS e regiões não codificadoras nos três genomas (linhas vermelhas match sem inversão, linhas azuis match com inversão).

Exercício 6: Conceitue sintenia gênica e como é esperado a sintenia entre dois organismos filogeneticamente próximos e mais afastados?

Exercício 7: Comparando o genoma do Organismo2 e o Organismo3, existe diferença entre o quantidade de genes? Quais genes estão ausentes ou duplicados entre estes organismos? Há alguma inversão ou alteração na sintenia gênica?