

XU Congresso
Fluminense
de Iniciação
Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de
Iniciação
Científica
da UENF

20^o

Circuito de
Iniciação
Científica do
IFFluminense

16^a

Jornada de
Iniciação
Científica
da UFF



UIII Congresso
Fluminense de
Pós-Graduação

23^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UENF

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
do IFFluminense

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UFF

Mutagênese do gene PRKAG2 em zigotos murinos

Mariana Barreto Martins¹, Luciene Paschoal Braga Dias², Janaína Barcelos Porto Ferreira², Isabella de Moura Folhadella Pires², Glauber Monteiro Dias¹

A cardiomiopatia de depósito de glicogênio é uma doença hereditária autossômica dominante, resultante de mutações no gene PRKAG2 que codifica a subunidade gama 2 da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de glicogênio nos cardiomiócitos, hipertrofia e pré-excitação ventricular, podendo causar morte súbita. Uma nova mutação missense no gene PRKAG2 (p.His401Gln) foi relatada em uma família brasileira, com manifestação de hipertrofia ventricular grave de início precoce, pré-excitação ventricular e morte súbita. O referido trabalho busca realizar mutagênese dirigida do gene PRKAG2 em zigotos murinos por meio da técnica de CRISPR/Cas9 para estudo da variante c.1203C>A (p.His401Gln) e de novas mutações no gene PRKAG2. Oito fêmeas (4 do grupo I e 4 do grupo II) da linhagem C57Bl6 foram superovuladas através da injeção via intraperitoneal de dois hormônios gonadotrópicos e acasaladas com machos férteis. Todas as 8 fêmeas apresentaram tampão vaginal, foram eutanasiadas e os ovidutos foram coletados para obtenção dos zigotos. Para a substituição pontual de nucleotídeo, foram utilizados além da enzima Cas9, o sgRNA e o DNA doador, contendo a sequência modificada. Estes componentes foram microinjetados no pró-núcleo dos zigotos. Foram utilizadas duas condições experimentais: (1) Cas9 (100 ng/μl), sgRNA (50 ng/μl) e DNA doador (100 ng/μl), (2) Cas9 (50 ng/μl), sgRNA (20 ng/μl) e DNA doador (40 ng/μl). No grupo I, 25 embriões foram microinjetados com a condição 1, 25 com a condição 2 e 25 com tampão Tris-EDTA (TE, controle). No grupo II, 34 embriões foram microinjetados com a condição 1 e seis com TE. Os zigotos foram cultivados até o estágio de 2 células, e então implantados na tuba uterina de fêmeas adultas que serviram como barrigas-de-aluguel. No grupo I, treze embriões (controle) foram implantados na tuba uterina da receptora 01, treze embriões da condição 1 na receptora 02 e treze embriões da condição 2 na receptora 03. Seis animais nasceram da receptora 03. No grupo II, catorze embriões foram implantados na receptora 01, dezesseis na receptora 02 e três embriões (controle) na receptora 03. Sete animais nasceram da fêmea receptora 02. Após 21 dias do nascimento, amostras de DNA genômico foram obtidas da cauda do camundongo para confirmação da mutagênese. A região alvo da mutagênese foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciada, revelando que nestas condições experimentais a sequência de interesse não foi inserida no genoma de nenhum animal. Concluímos que novas condições experimentais serão necessárias para realizar a edição do genoma mediada por CRISPR/Cas9.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF

Eixo temático: Ciências Biológicas

Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20^o

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16^a

Jornada de Iniciação Científica da UFF



U III Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23^a

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8^a

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8^a

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Mutagenesis of the PRKAG2 gene in murine zygotes

Mariana Barreto Martins¹, Luciene Paschoal Braga Dias², Janaína Barcelos Porto Ferreira², Isabella de Moura Folhadella Pires², Glauber Monteiro Dias¹

Glycogen storage cardiomyopathy is an autosomal dominant hereditary disease resulting from mutations in the PRKAG2 gene that encodes the gamma-2 subunit of AMP-activated protein kinase (AMPK). This disease is characterized by the accumulation of glycogen in cardiomyocytes, hypertrophy and ventricular pre-excitation, which can cause sudden death. A new missense mutation in the PRKAG2 gene (p.His401Gln) was reported in a Brazilian family, with manifestation of early-onset severe ventricular hypertrophy, ventricular pre-excitation and sudden death. This work seeks to perform directed mutagenesis of the PRKAG2 gene in murine zygotes using the CRISPR/Cas9 technique to study the c.1203C>A variant (p.His401Gln) and new mutations in the PRKAG2 gene. Eight females (4 from group I and 4 from group II) of the C57Bl6 lineage were superovulated by intraperitoneal injection of two gonadotropic hormones and mated with fertile males. All 8 females had a vaginal plug, were euthanized and the oviducts were collected to obtain the zygotes. For punctual nucleotide substitution, in addition to the Cas9 enzyme, sgRNA and donor DNA containing the modified sequence were used. These components were microinjected into the pronucleus of the zygotes. Two experimental conditions were used: (1) Cas9 (100 ng/μl), sgRNA (50 ng/μl) and donor DNA (100 ng/μl), (2) Cas9 (50 ng/μl), sgRNA (20 ng/μl) μl) and donor DNA (40 ng/μl). In group I, 25 embryos were microinjected with condition 1, 25 with condition 2 and 25 with Tris-EDTA buffer (TE, control). In group II, 34 embryos were microinjected with condition 1 and six with TE. Zygotes were grown to the 2-cell stage, and then implanted into the fallopian tubes of adult females who served as surrogates. In group I, thirteen embryos (control) were implanted in the uterine tube of recipient 01, thirteen embryos from condition 1 in recipient 02 and thirteen embryos from condition 2 in recipient 03. Six animals were born from recipient 03. In group II, fourteen embryos were implanted in recipient 01, sixteen in recipient 02 and three embryos (control) in recipient 03. Seven animals were born from recipient female 02. After 21 days of birth, genomic DNA samples were obtained from the mouse tail to confirm mutagenesis. The mutagenesis target region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced, revealing that under these experimental conditions the sequence of interest was not inserted into the genome of any animal. We conclude that new experimental conditions will be required to perform CRISPR/Cas9-mediated genome editing.

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

