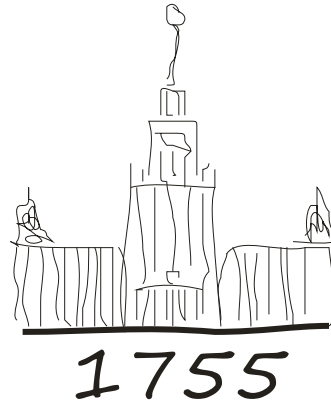


Редактирование генома: теория и практика

21 ноября 2023

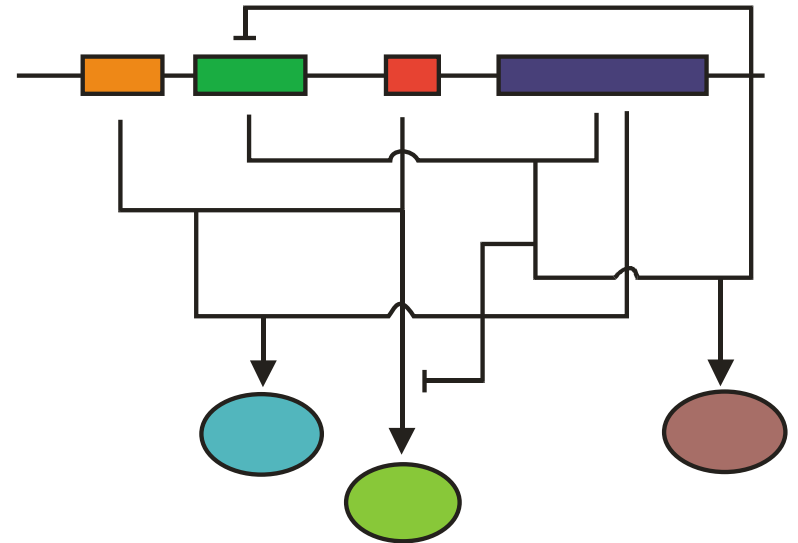


Редактирование генома мышей:

от исследования функции неизученных генов до
персонализированной медицины

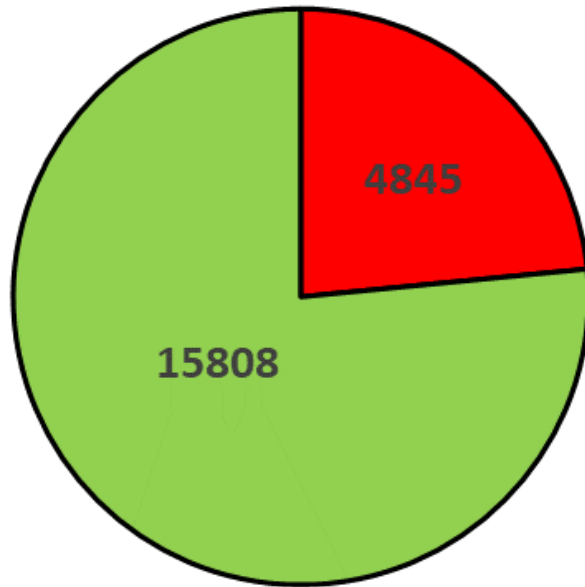
Петр Сергиев

Мы с Вами
молекулярные машины, функционирование
которых определяется генами



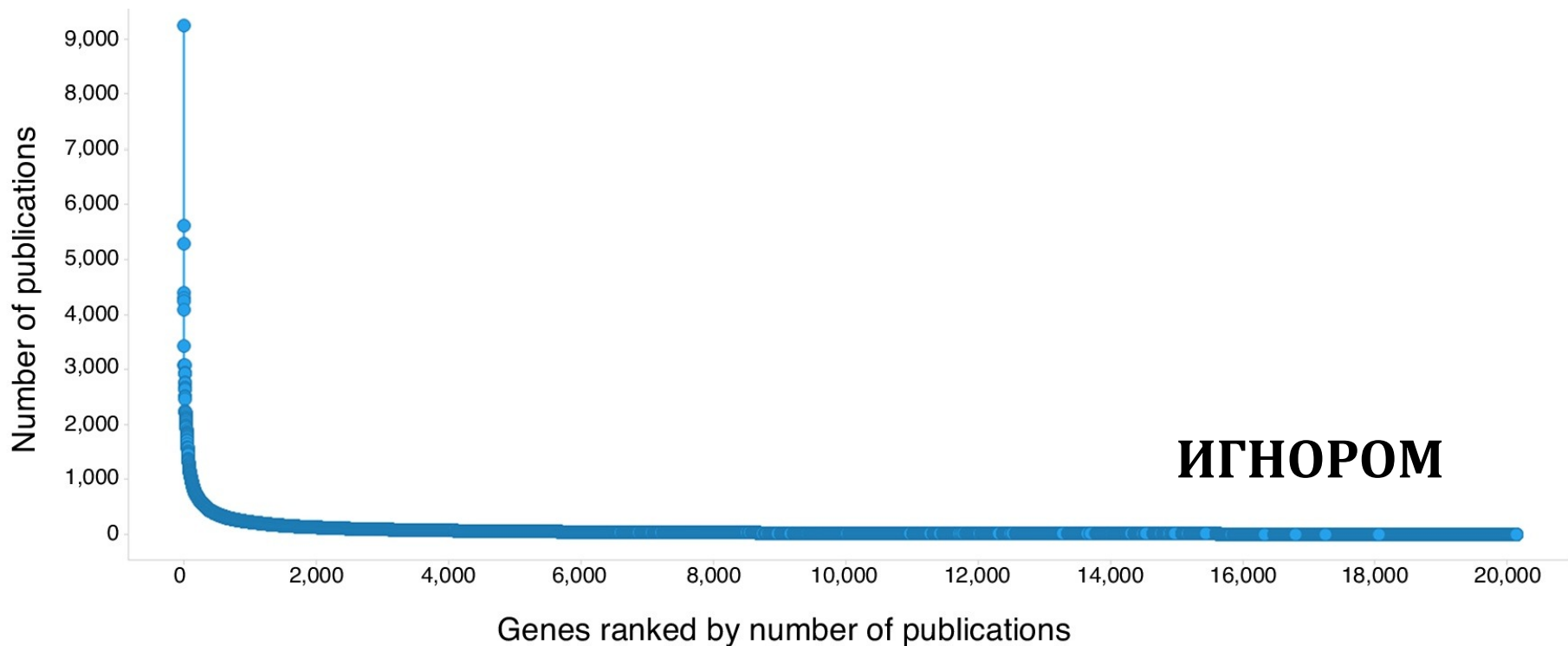
Генетически обусловленные заболевания

Около четверти генов человека может содержать мутации с паталогическим фенотипом (omim.org)

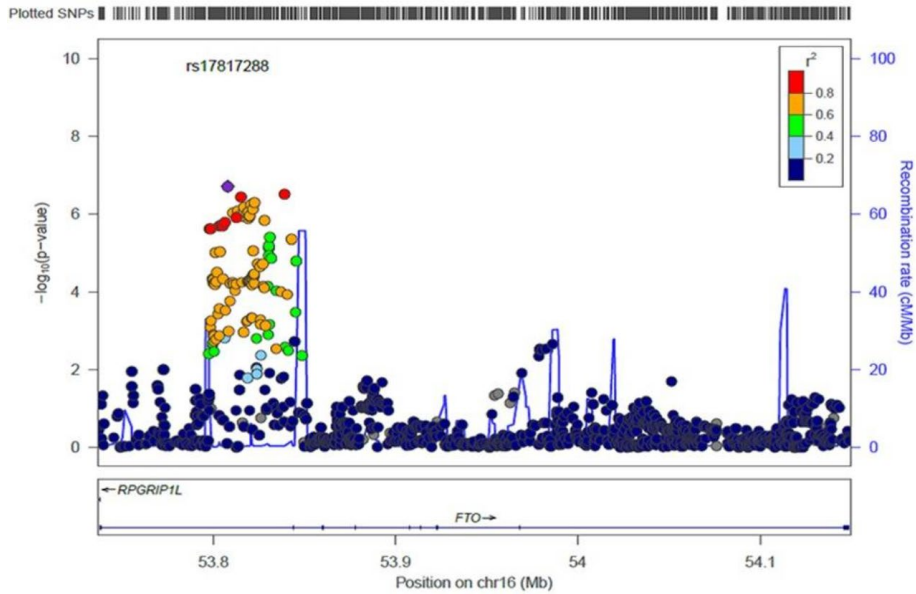


Множество генов плохо изучены

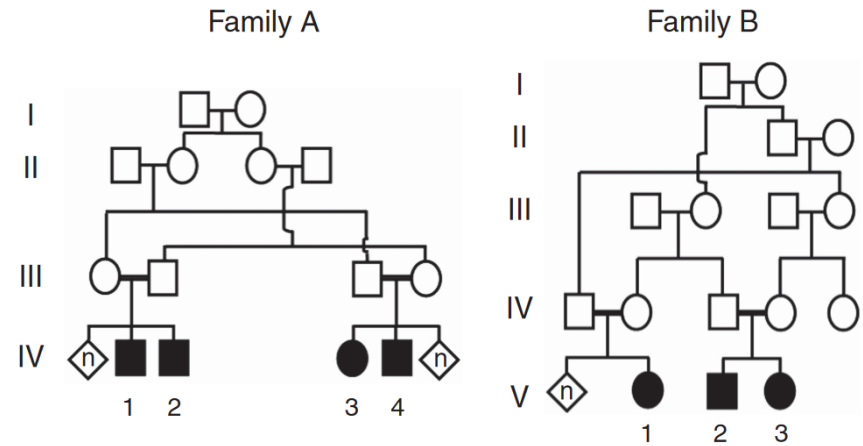
Для более 600 генов нет ни одного исследования



Откуда мы знаем, что конкретные мутации имеют паталогические последствия?



GWAS



анализ семей

Модели на мышах



>2 000 линий Charles river
>9 000 линий EUCOMM
>100 00 статей

Есть что-то пока не моделированное?

Прямые контакты с медицинскими генетиками



МБФ РНИМУ
им. Н.И. Пирогова



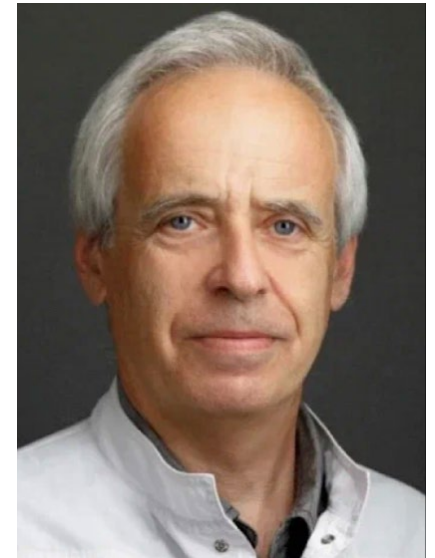
ФИЦ
БИОТЕХНОЛОГИИ
РАН



Имянитов Е.Н.

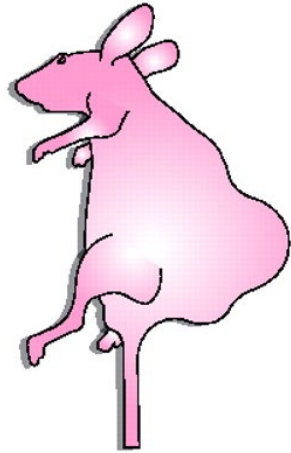


Прохорчук Е.Б.



Тюльпаков А.Н.

Модели онкологических заболеваний на мышах



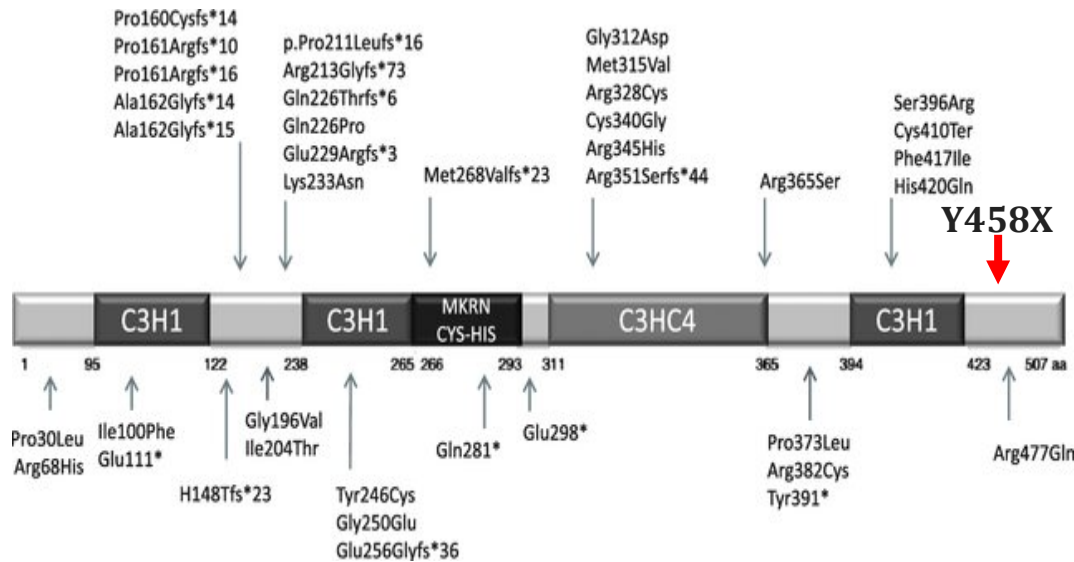
XRCC2
CHEK2
GPRC5A
BLM
NBS1



сотрудничество с
Е.Н. Имянитовым

Yurova, M.N., et al. The Effect of Inactivating Heterozygous Mutation in NBS1 Gene on DNA Damage and Repair Markers and Apoptosis Markers in Mice. Bull Exp Biol Med 175, 234-238 (2023).

Новая мутация гена Mkrn3



сотрудничество с
А.Н. Тюльпаковым

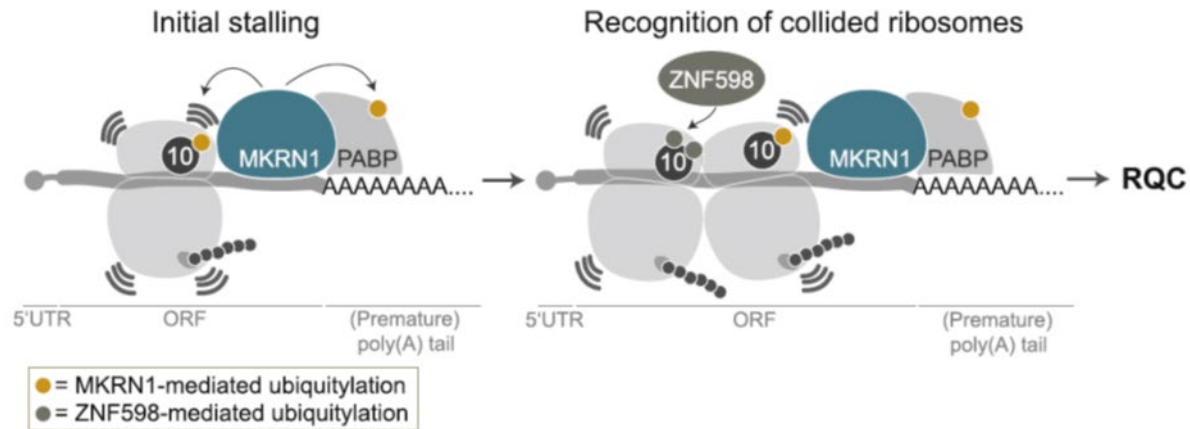
С.Н. 4 года

избыточная масса тела, повышенный аппетит, отставание в
психомоторном развитии, эмоциональную лабильность
Симптомы, похожие на синдром Прадера-Вилли

Маколин

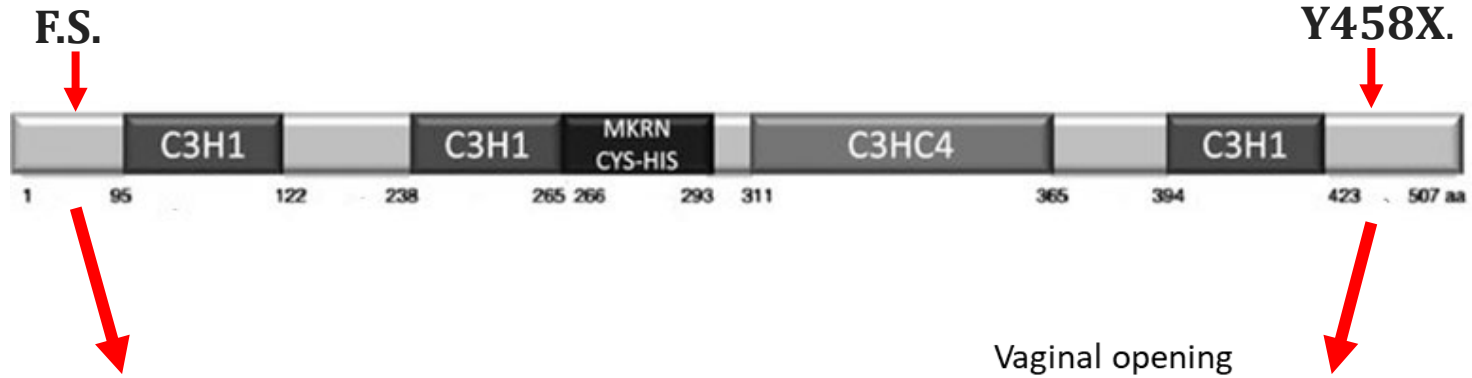
Необычное семейство белков, РНК-связывающих
убиквитин-лигаз

Мкрн1 узнает рибосомы, дошедшие до полиА

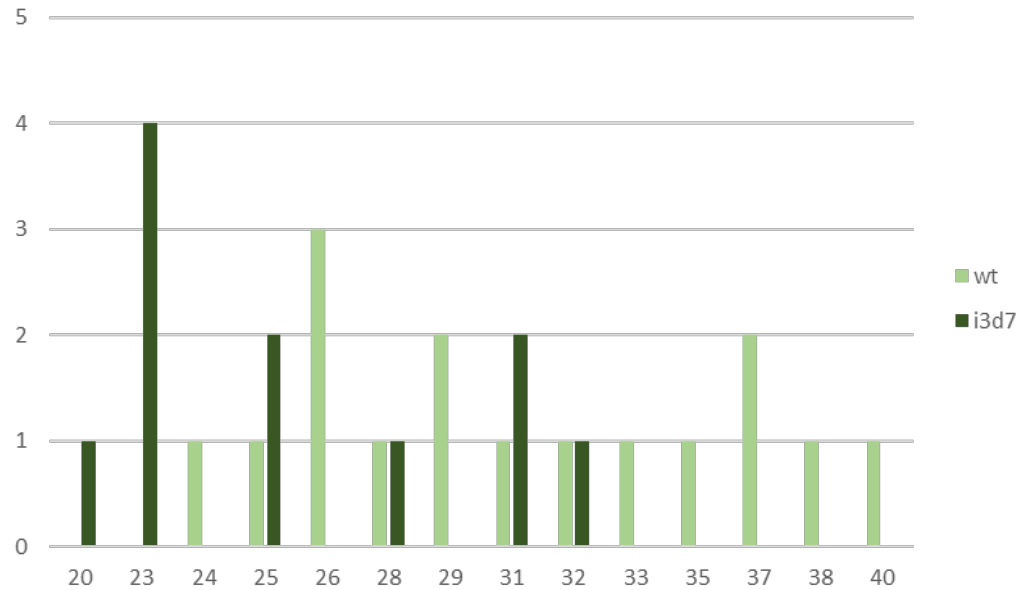


Mkrn3 подавляет половое созревание

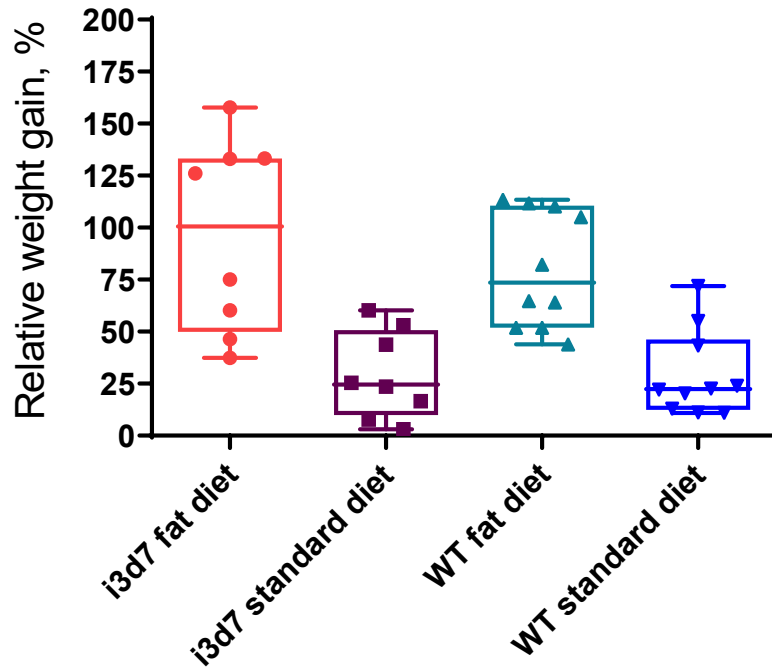
Модели укороченного Mkrn3 и полный инактивации



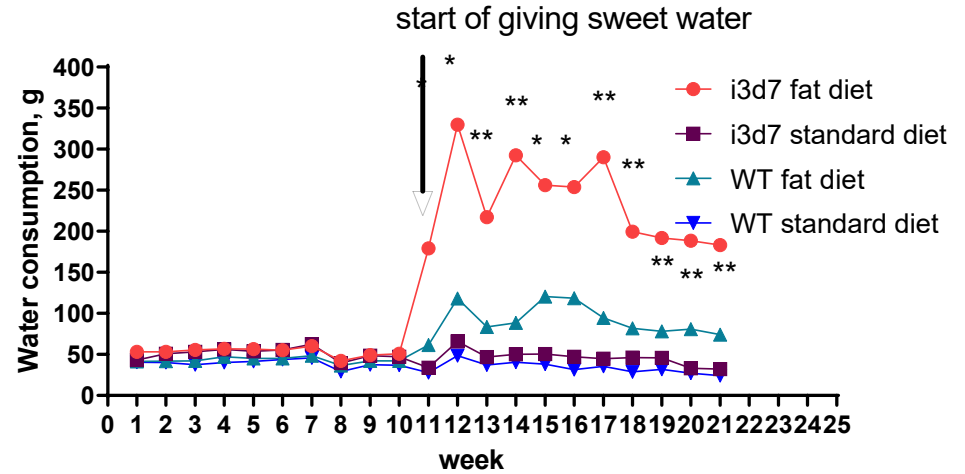
???



Модель укороченного Mkrn3



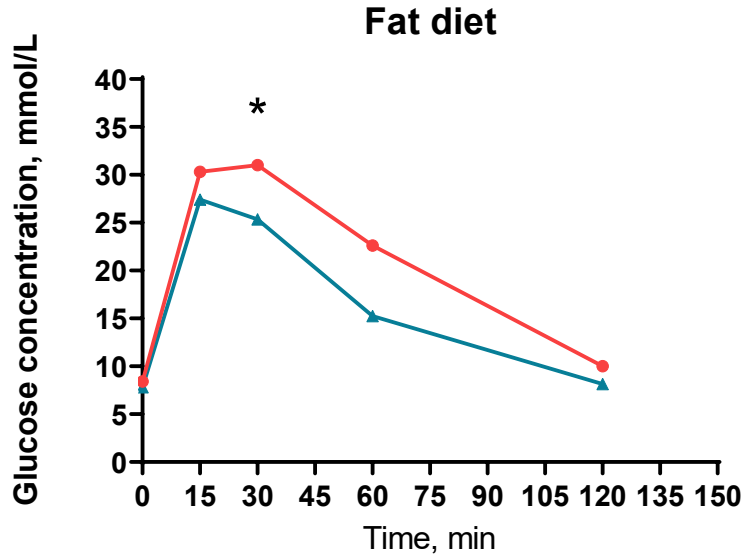
Water consumption



Первые результаты были разочаровывающие

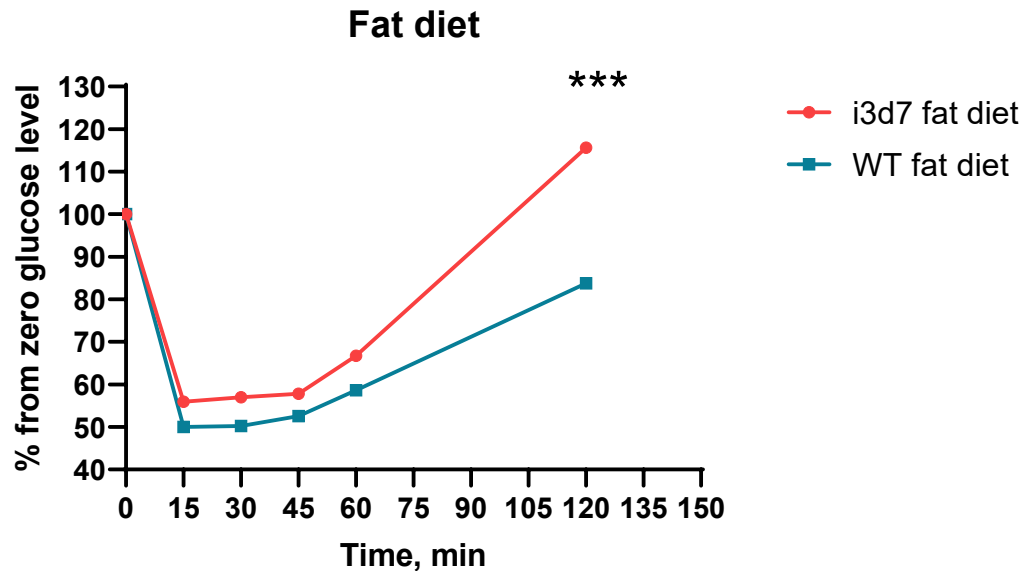
Модель укороченного Mkrn3

Правда удалось увидеть признаки диабета 2 типа



Инъекция
инсулина

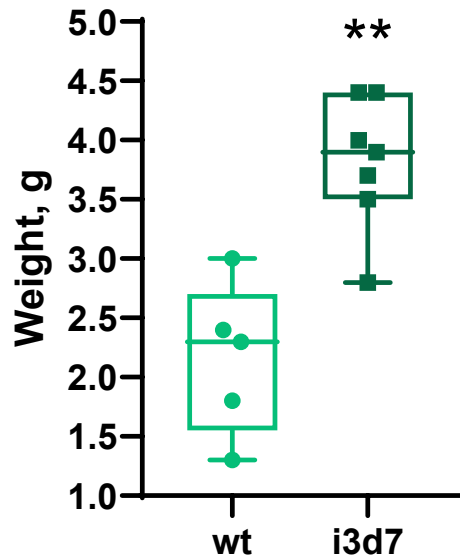
Инъекция
ГЛЮКОЗЫ



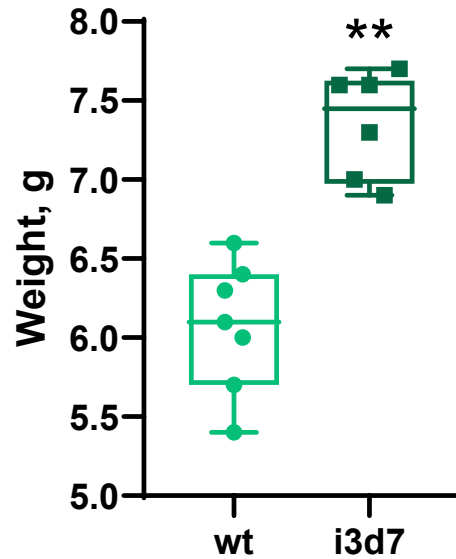
Модель укороченного Mkrn3

Хорошо было вспомнить, что Mkrn3 экспрессируется до полового созревания

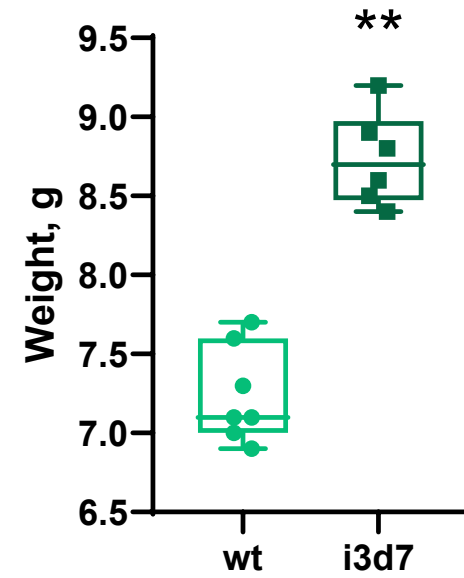
5th day since birth



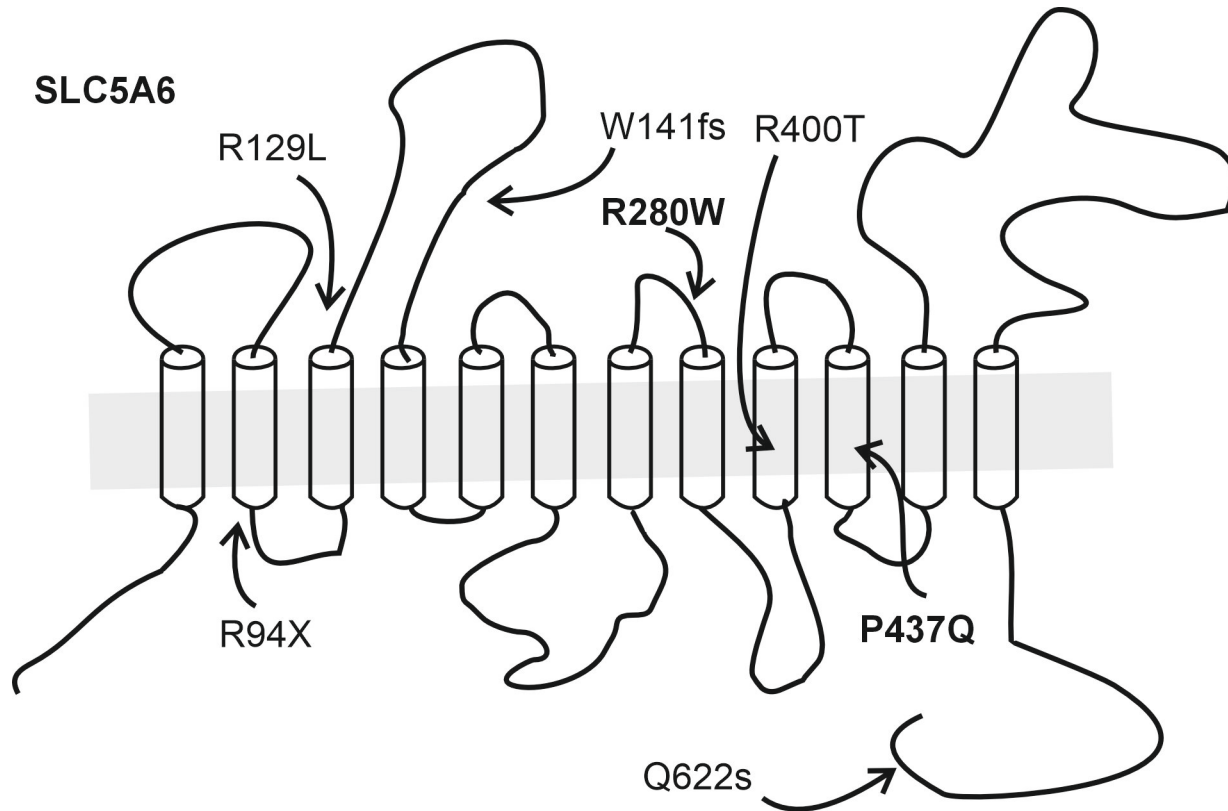
10th day since birth



15th day since birth



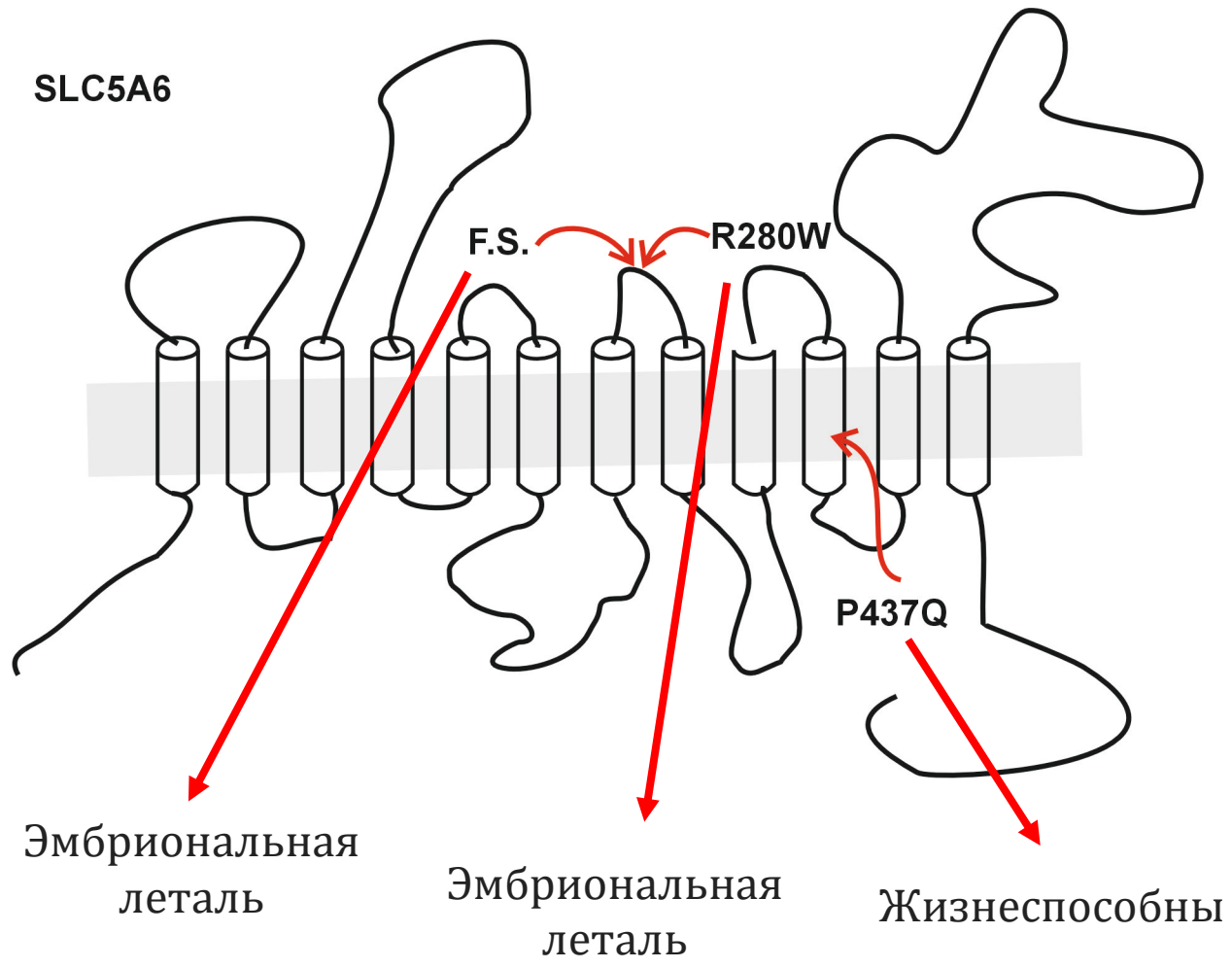
Новые мутации SLC5A6, мультивитаминного транспортера



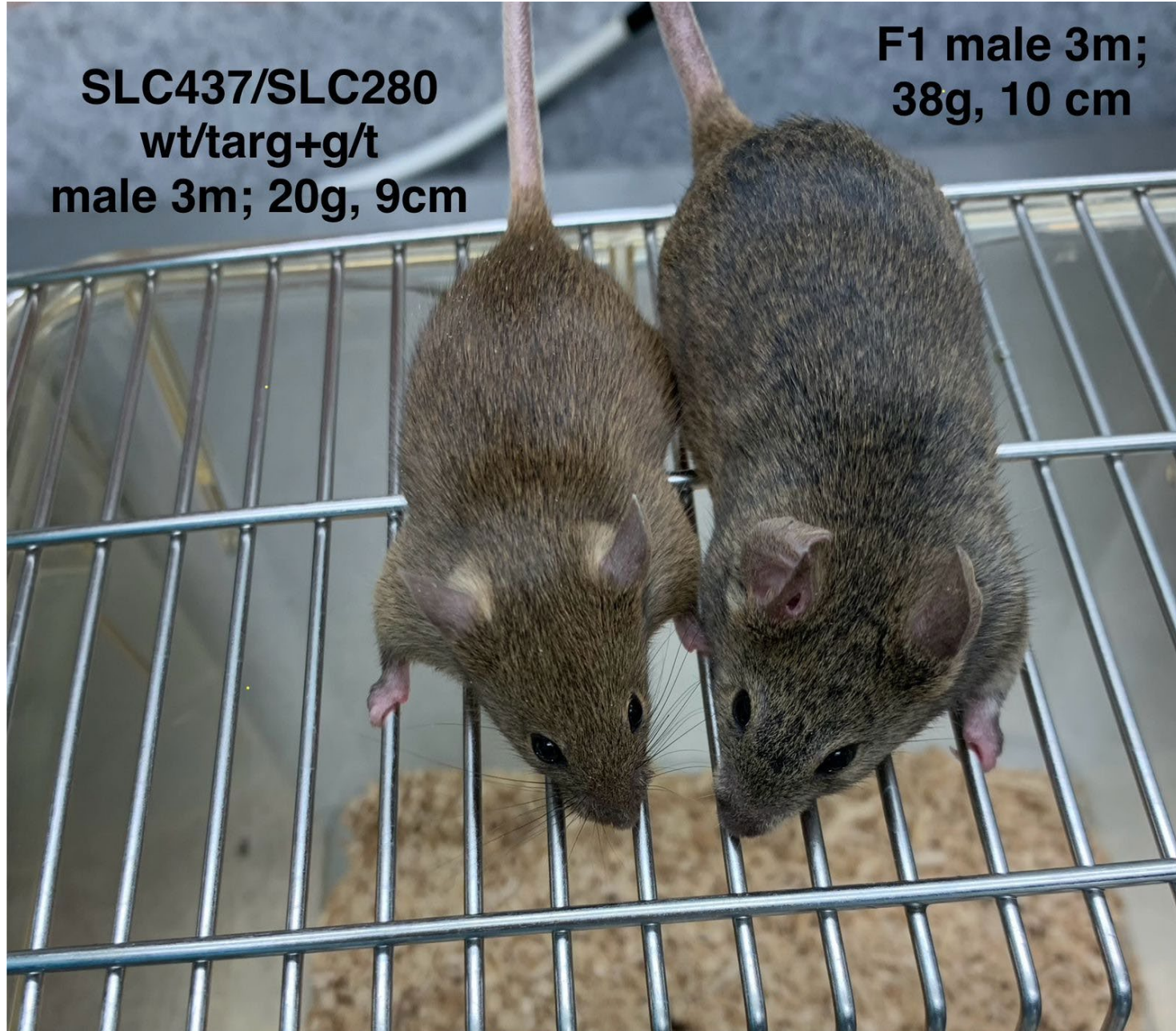
сотрудничество с
Е.Б. Прохорчуком

Девочка С., задержка в психомоторном развитии и рвота до 5 раз в сутки, повышение уровня С5ОН-ацилкарнитина, смерть в возрасте 3 лет. У старшей сестры, умершей в возрасте 2,5 лет, отмечались сходные клинические проявления.

Мышиные модели мутаций SLC5A6



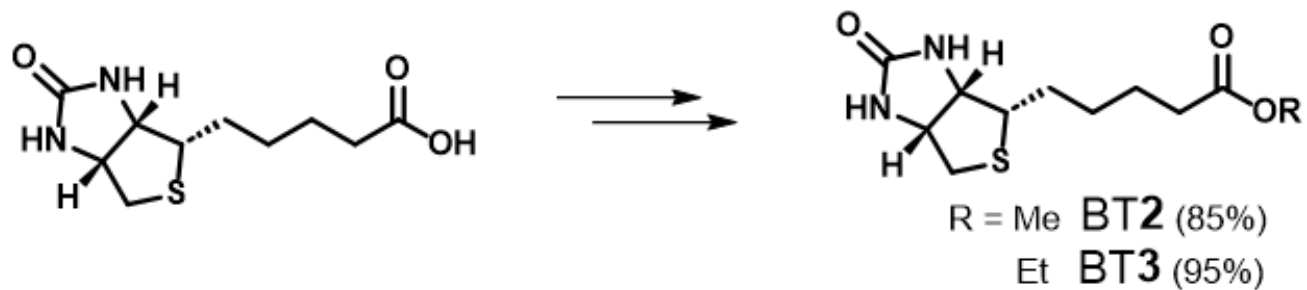
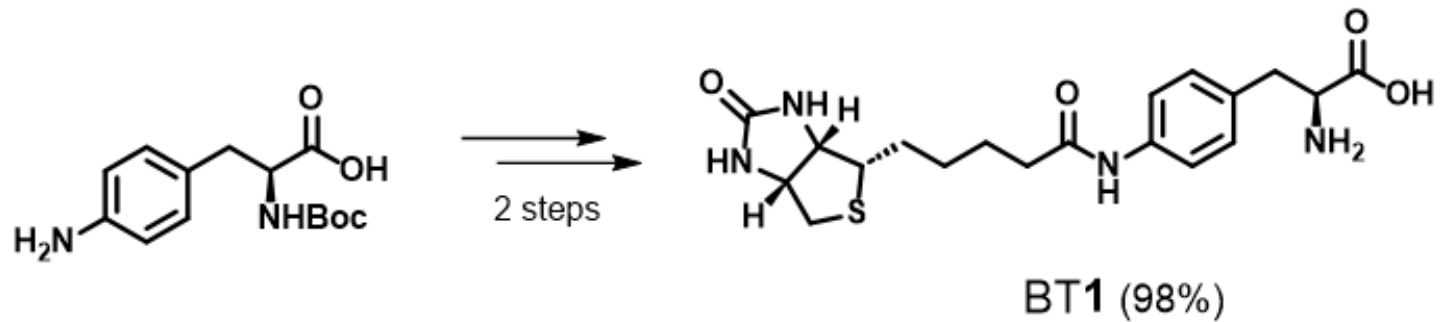
Персонализированная модель пациента



**SLC437/SLC280
wt/targ+g/t
male 3m; 20g, 9cm**

**F1 male 3m;
38g, 10 cm**

Разработка потенциальных лекарств



Мутации гена NSUN7 приводят к мужскому бесплодию

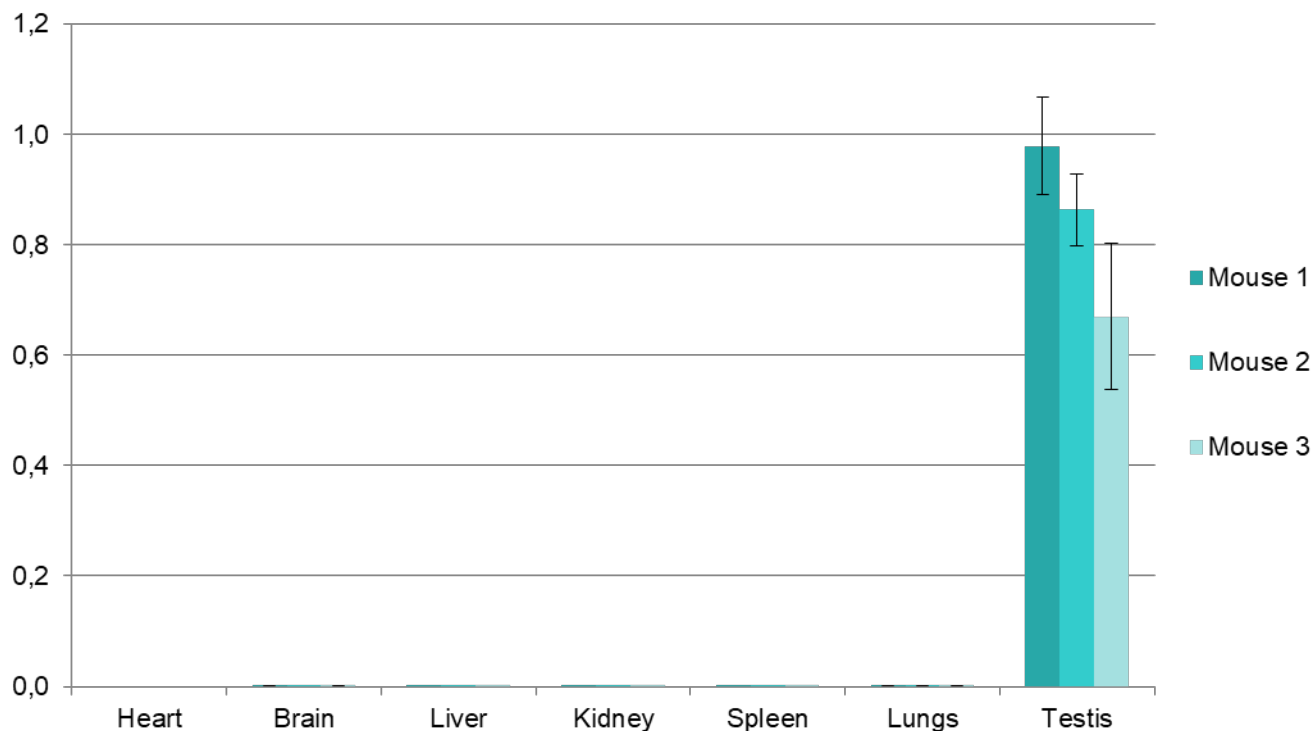
The Nsun7 (A11337)-deletion mutation, causes reduction of its protein rate and associated with sperm motility defect in infertile men

[Nahid Khosronezhad](#), [Abasalt Hosseinzadeh Colagar](#)  & [Seyed Mohsen Mortazavi](#)

[Journal of Assisted Reproduction and Genetics](#) **32**, 807–815 (2015) | [Cite this article](#)

РНК-(цитозин С5)-метилтрансфераза NSUN7 синтезируется исключительно в семенниках

Относительный уровень мРНК *Nsun7*



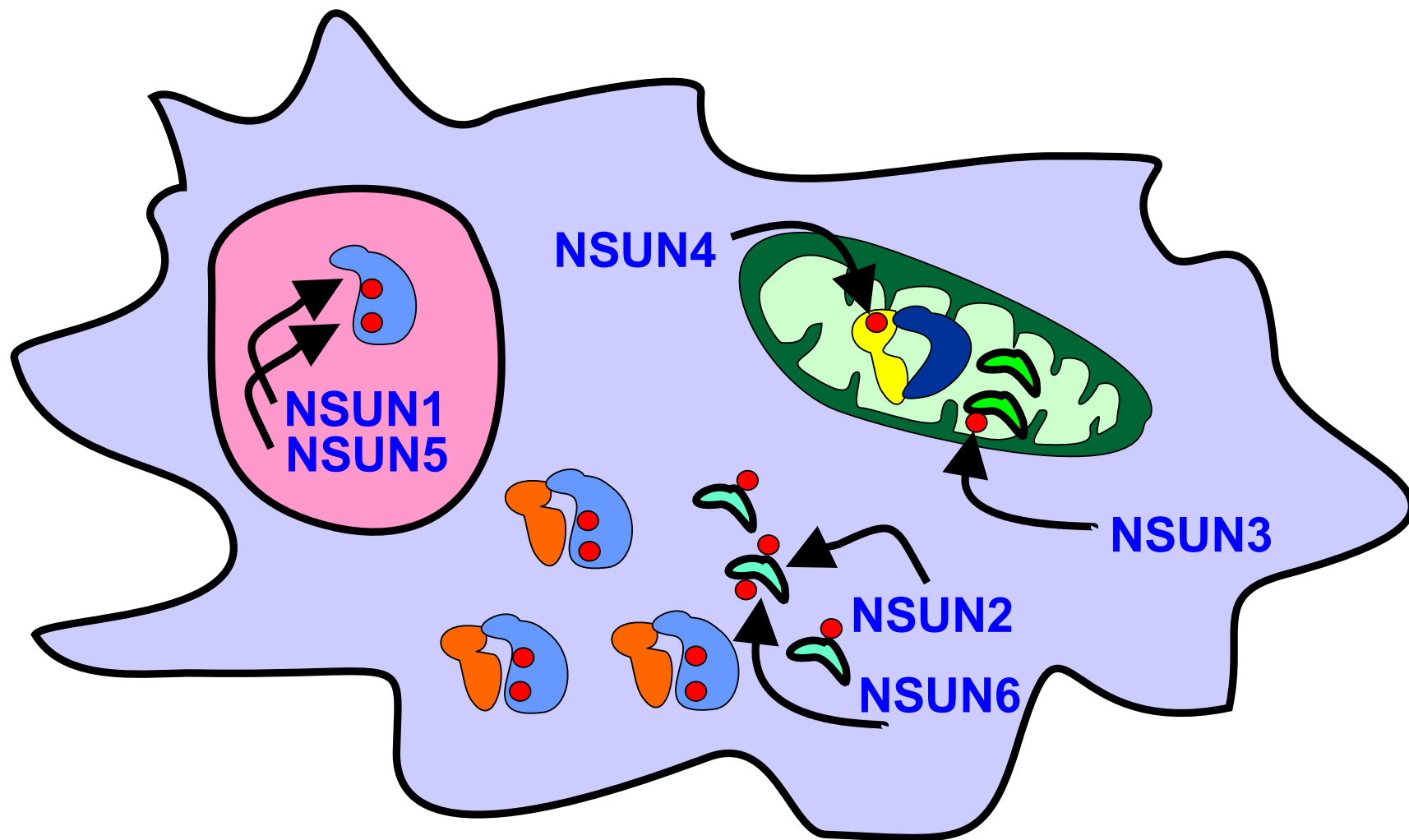
Е. Гусева



сотрудничество с
Е.Б. Прохорчуком

Количественный ОТ ПЦР анализ экспрессии гена *nsun7* по отношению к *gapdh*

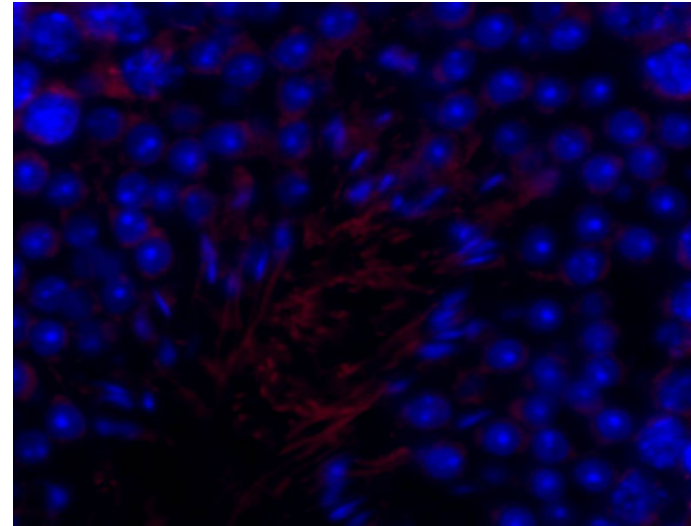
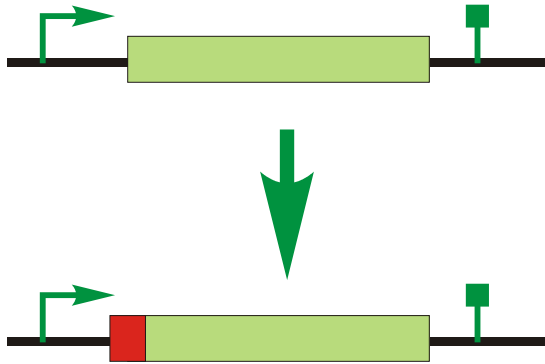
NSUN7 принадлежит к семейству РНК метилтрансфераз, модифицирующих рРНК и тРНК



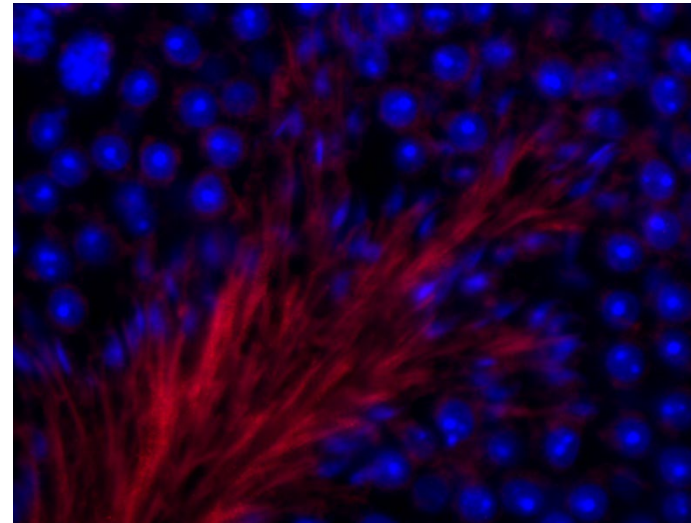
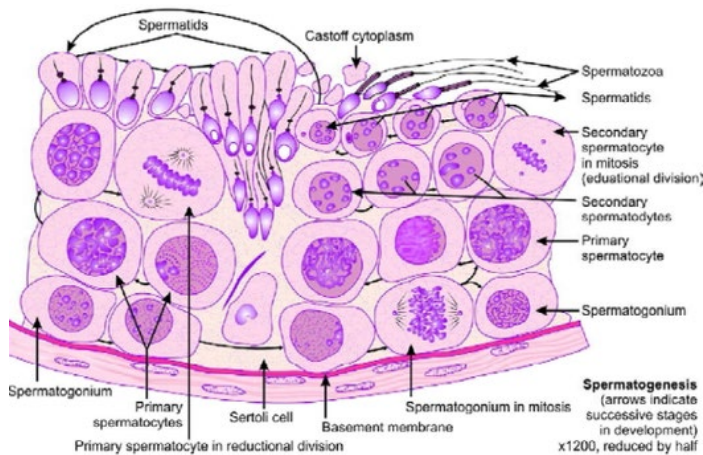
NSUN7 присутствует в удлинненных сперматидах

WT

Вставка HA довеска в ген *nsun7*



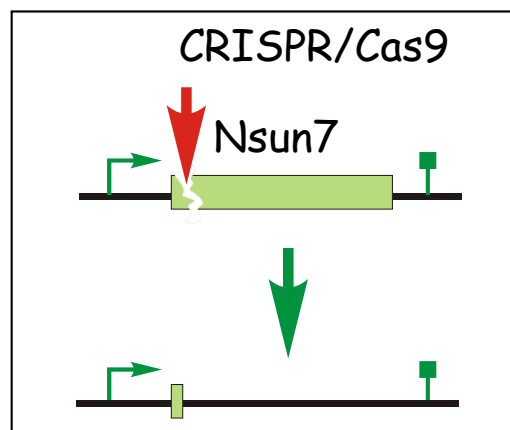
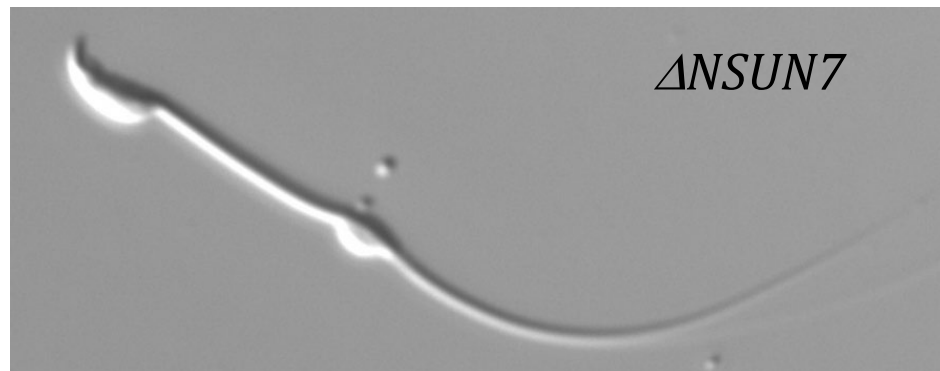
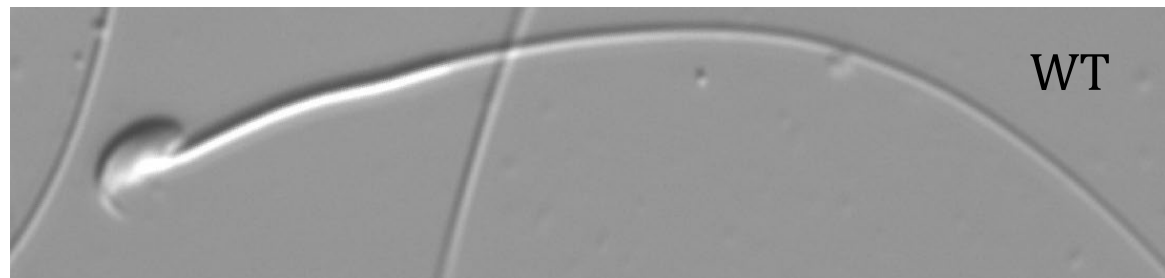
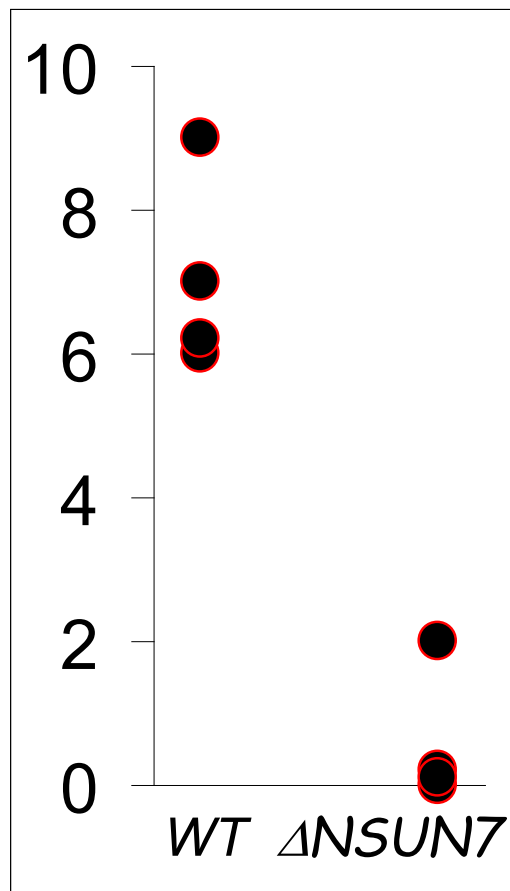
HA-NSUN7



Фенотипические проявления инактивации NSUN7

снижается фертильность

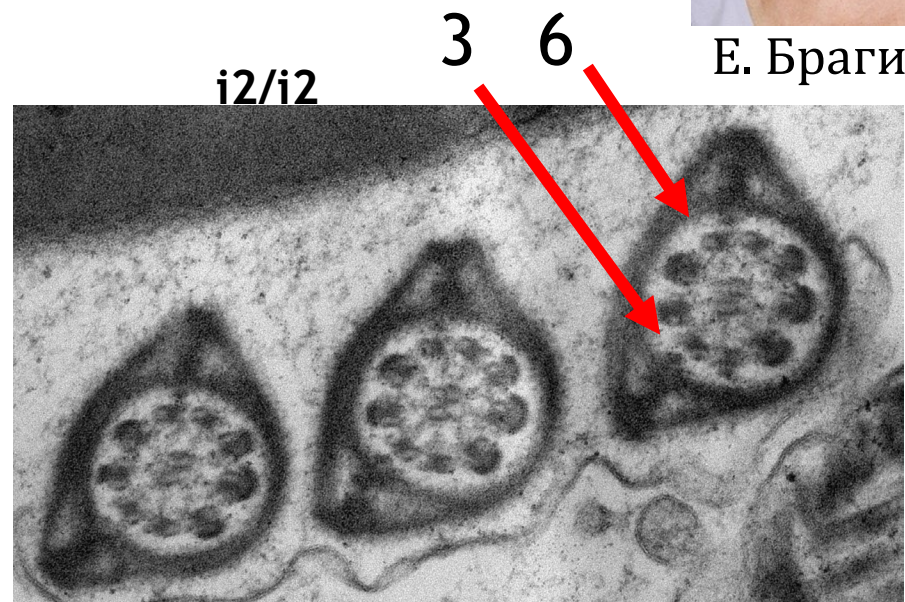
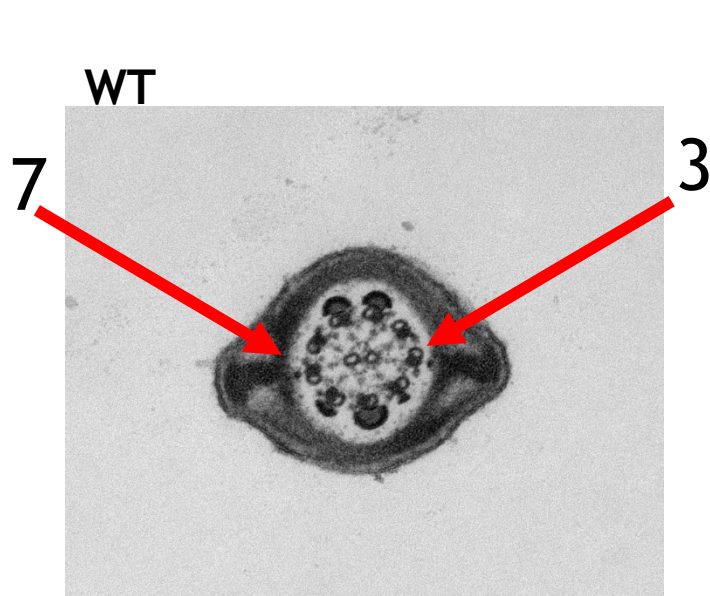
изменяется морфология сперматозоидов



Инактивация NSUN7 приводит к изменению расположения продольных колонн



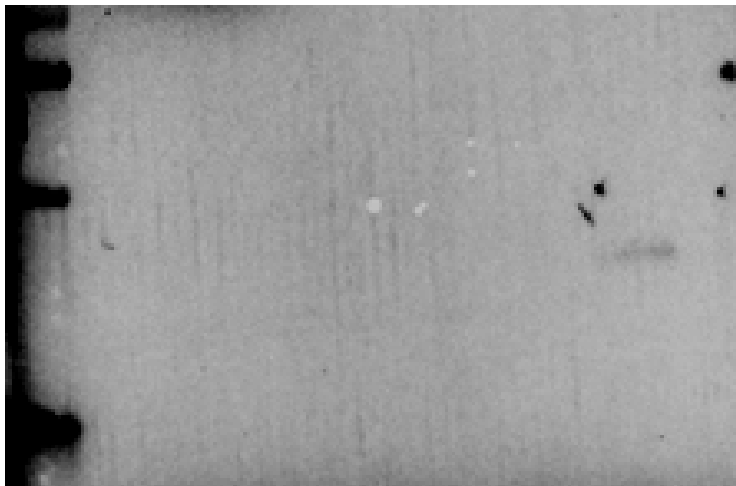
Е. Брагина



Mouse	3-7	2-7	2-6	3-8	2-8	2-5	3-6	4-7	1-3	4-6	1-7	1-8	5-7	1-3-6	2-4-8
WT 1	23	3													
WT 2	58	7		2				2							
Nsun7 ^{-/-} 1	8	4		10	19	1	20	9							
Nsun7 ^{-/-} 2	12	1	3	4	30	4	96	9	6	3	1	2	2	4	1

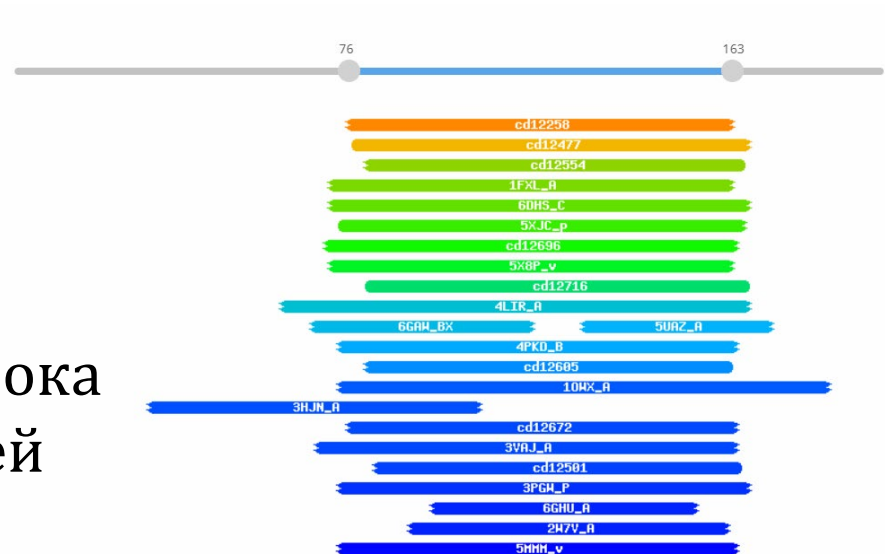
С помощью иммунопреципитации HA-NSUN7 из экстрактов семенников мыши обнаружен белок - партнер

экстракт элюат
WT HA WT HA



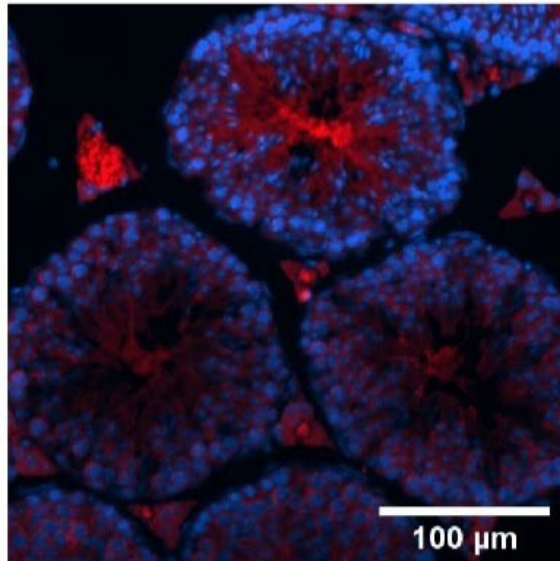
C19orf81

C19orf81 – РНК
связывающий белок с пока
неизвестной функцией

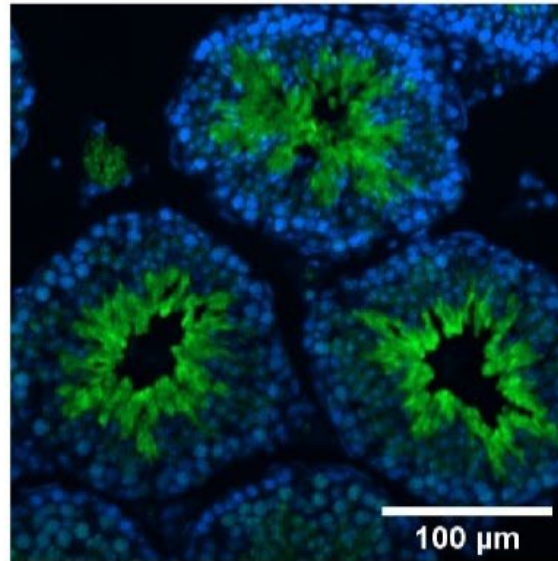


Локализация NSUN7 и C19ORF81 в семенниках

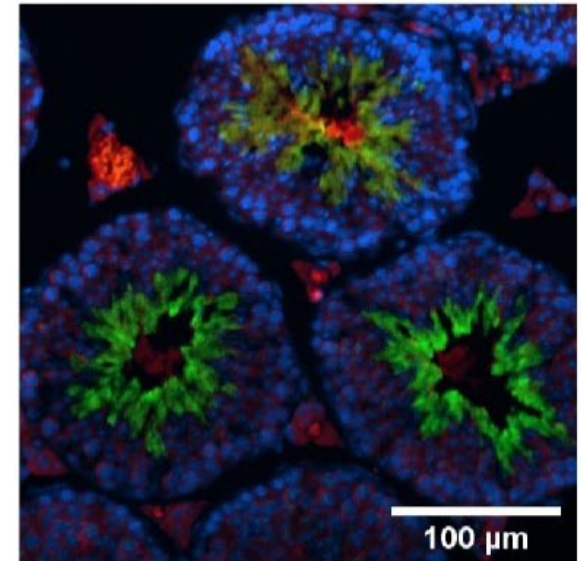
анти-НА



анти-c19orf81

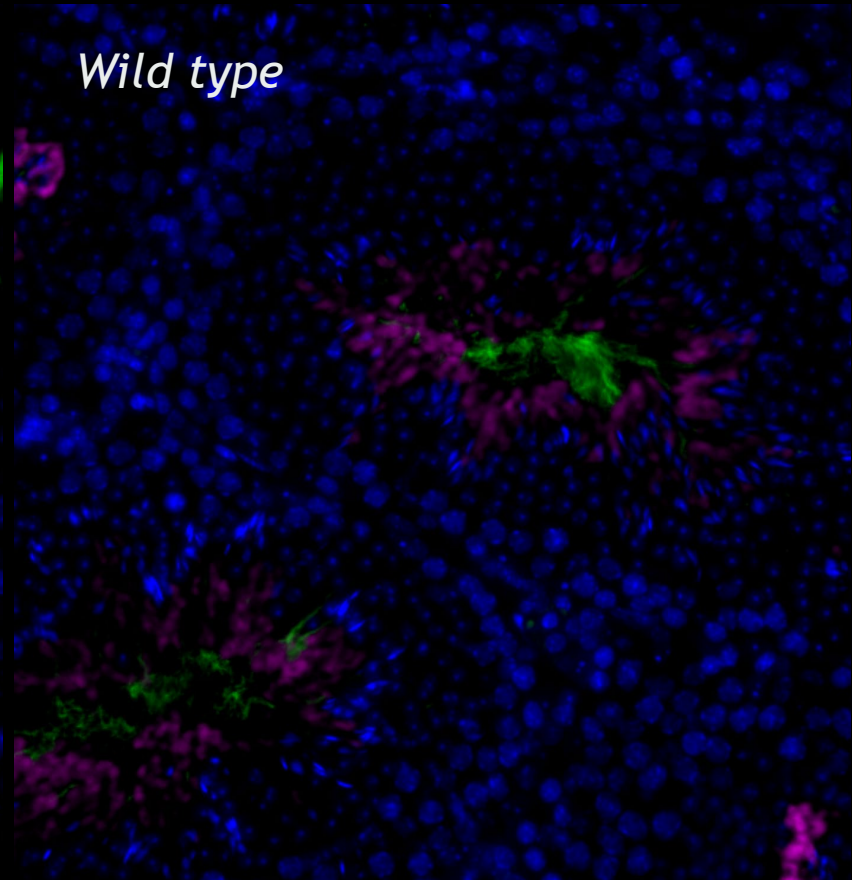
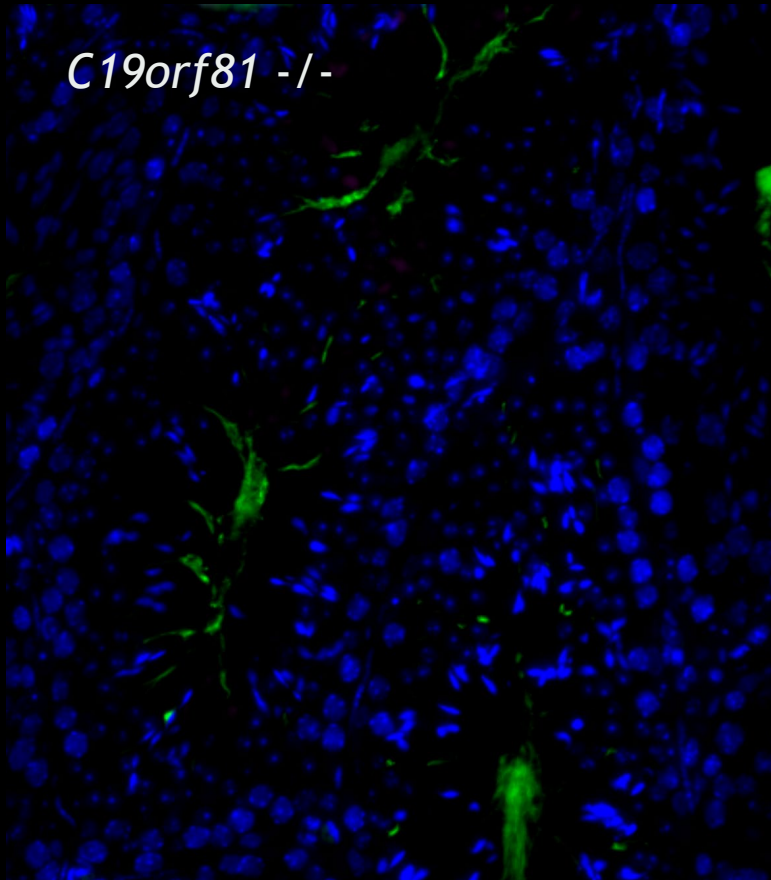


анти-НА + анти-c19orf81



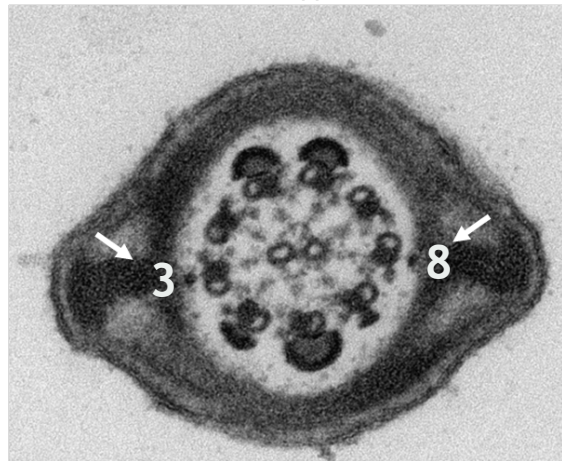
Нокаут C19orf81

- Nucleus
- Ac- α -Tubulin
- C19ORF81

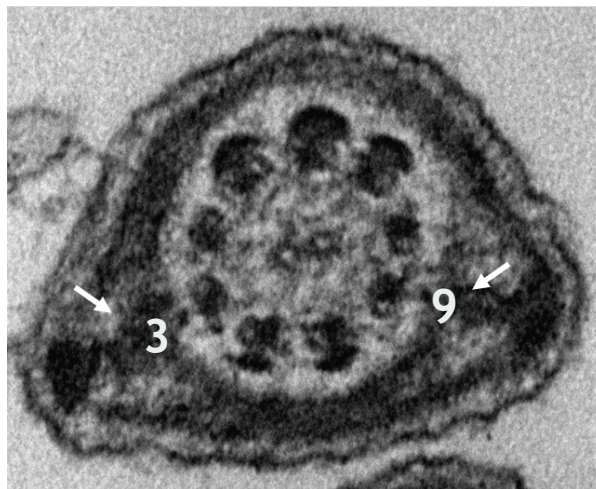


Нарушение структуры сперматозоидов одинаково для инактивации Nsun7 и C19orf81

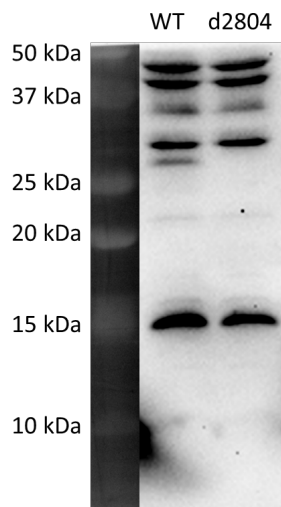
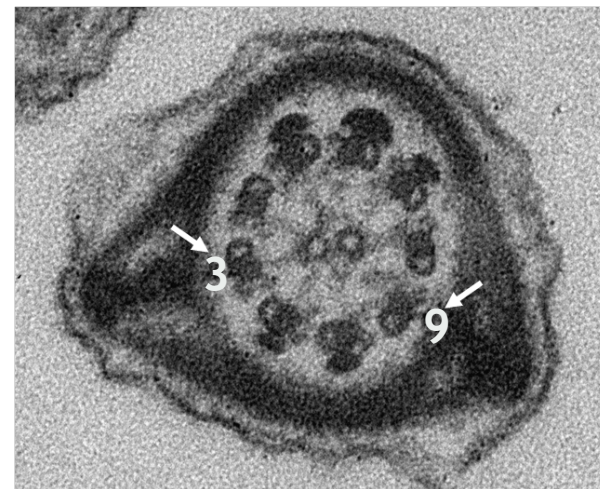
Wild type



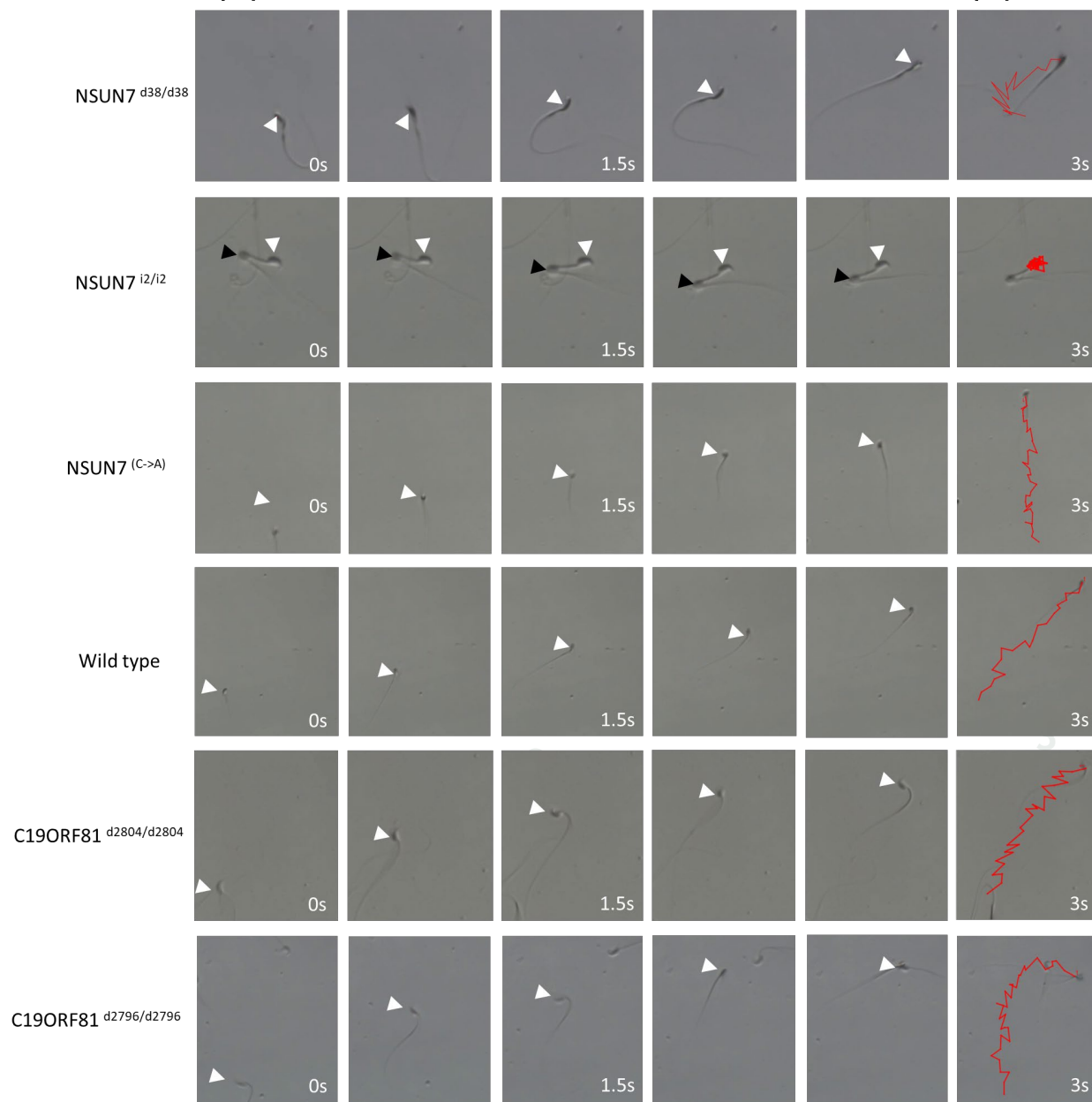
C19orf81 -/-



Nsun7 -/-

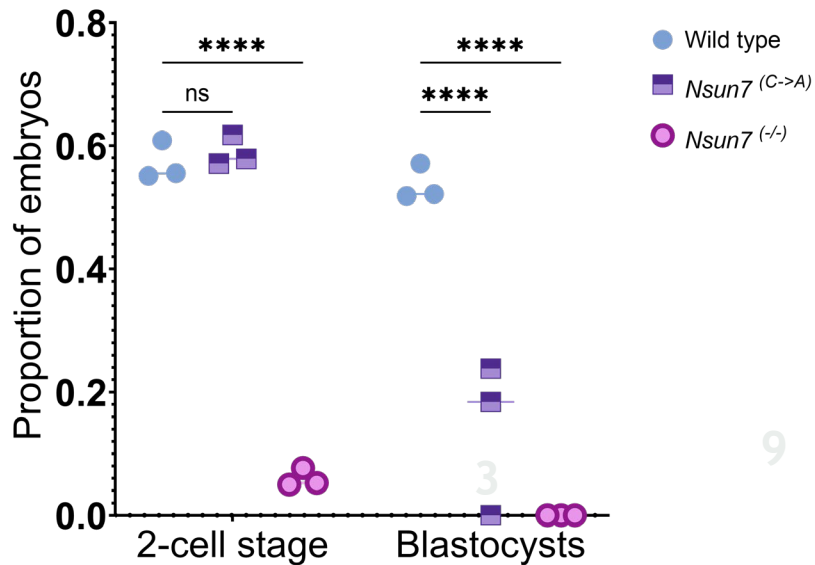


Нокауты Nsun7 и C19orf81 влияют на подвижность сперматозоидов и способность к оплодотворению

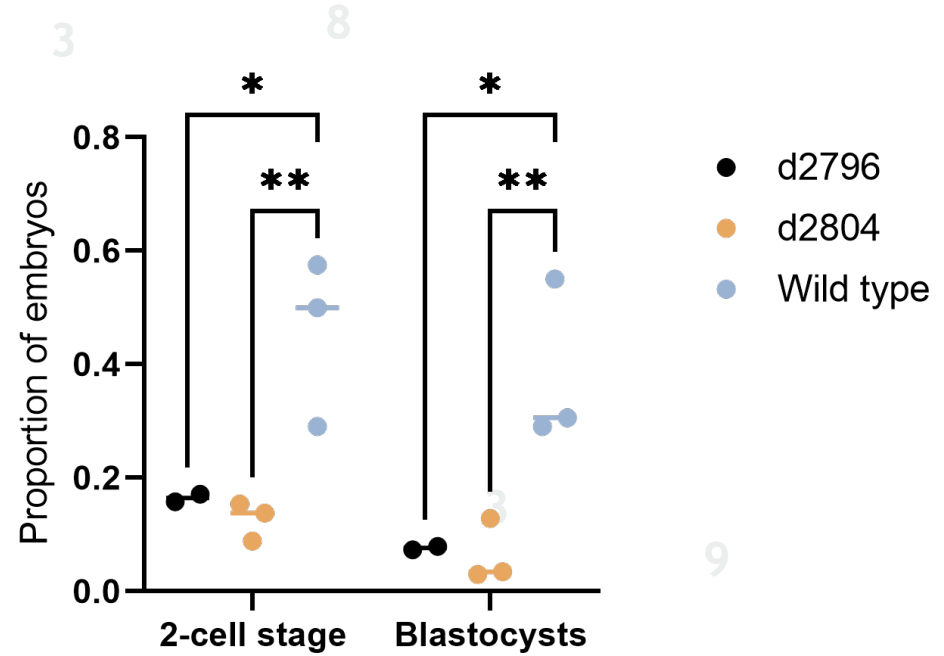


Нокауты *Nsun7* и *C19orf81* влияют на подвижность сперматозоидов и способность к оплодотворению

Nsun7

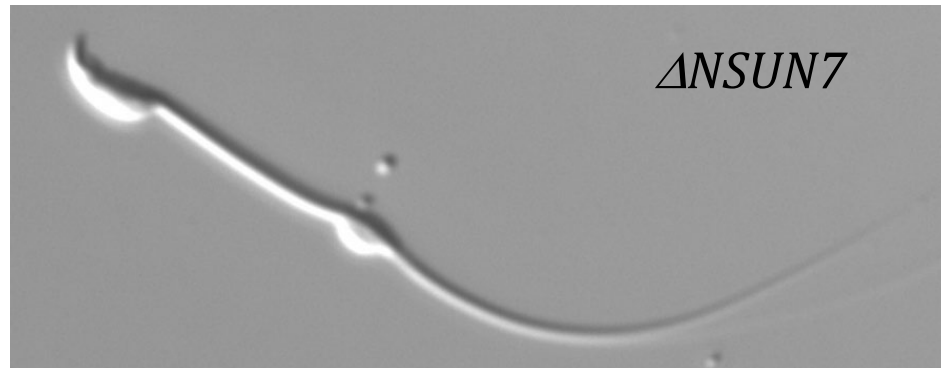


C19orf81

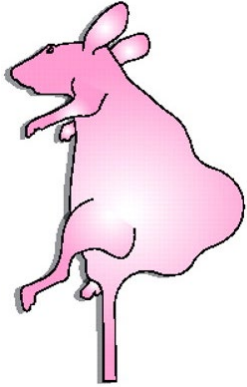


Работа продолжается...

Ищем, какую же РНК модифицирует NSUN7?
И почему это влияет на хвосты сперматозоидов?



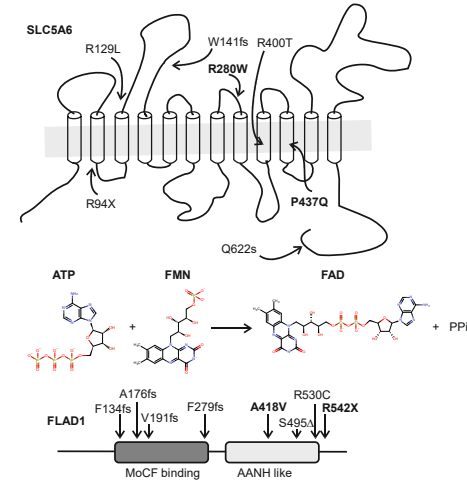
Итог



Мышьиные модели онкологических заболеваний (совместно с Е.Н. Имянитовым):

XRCC2
CHEK2
GPRC5A
BLM
NBS1

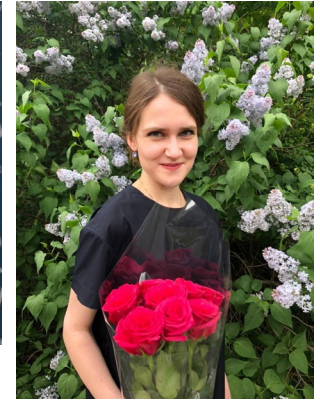
Мышьиные модели нарушения метаболизма (совместно с Е.Б. Прохорчуком, А.Н. Тюльпаковым):
SLC5A6, FLAD1, MKRN3



Пермяков О.А. Аверина О.А.



Руденко А.Ю.



Емельянова М.А.



Е. Брагина



Имянитов Е.Н.
Прохорчук Е.Б.
Тюльпаков А.Н.



Гусева Е.А.