

Влияние мутаций гена миостатина на мясную продуктивность животных

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».
Боровск, Калужская обл., РФ

Жукова Ольга Борисовна

**VII Международная научная конференция
«СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АГРАРНОЙ НАУКИ»**

октябрь 2022 г.

Республика Крым, г. Симферополь

Современные достижения в области технологий секвенирования и генотипирования позволили разработать новые методы отбора продуктивных сельскохозяйственных животных, основанные на **полиморфизме ключевых генов, ассоциированных с мясной продуктивностью**. Связь обнаруженных полиморфизмов с ростовыми признаками имеет огромное значение для создания новых пород и селекционных линий высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

Использование методов **marker-assisted selection** (маркер-ассоциированной - **MAS**) и геномной селекции позволяет повысить точность оценки и прогнозирования продуктивных качеств животных.

Маркеры селекции:

1. **Полиморфизм отдельных белков** (ферментов, факторов крови и др.). Первое поколение маркеров, используемых для генетических исследований животных. Относится в основном к кодирующей части гена экспрессируемых молекул.
2. **Полиморфизм ДНК-маркеров**. Позволяет отличить гомозиготный генотип от гетерозиготного. ДНК маркеры определяются независимо от возраста, это могут быть как *структурные гены* с относительно низким генетическим полиморфизмом и высоким эволюционным консерватизмом, кодирующие определенные белки, так и фрагменты повторяющейся ДНК (*микросателлиты*)

Генетический полиморфизм свойственен как **структурным генам**, так и **некодирующим нуклеотидным последовательностям**.

Точечные мутации гена (single nucleotide polymorphism - **SNP**) в отличие от микросателлитов, имеют низкий уровень мутаций на поколение. Постоянно развивающиеся молекулярные технологии увеличивают автоматизацию и уменьшают стоимость выявления SNP.

Точечные мутации в **кодирующей последовательности** могут изменять аминокислотную последовательность белка и приводить к появлению новых функциональных вариантов с метаболической эффективностью, отличающейся от исходного, вплоть до потери активности:

- мутации в **экзонах** способны изменить структуру белка.

Мутации в **регуляторных областях** могут изменять интенсивность и характер экспрессии гена:

- в **промоторной и терминирующей области** - изменение транскрипционной активности;
- вблизи **сайтов сплайсинга** - влияние на сплайсинг мРНК и структуру белка.

Гены, связанные с мясной продуктивностью овец

Ген	Белок	Эффект
GH	гормон роста	Сверхэкспрессия гена GH приводит к ускоренному росту и развитию животного
CAPN1	Кальпаин (комплекс протеолитических и цитолитических Белков).	Рост мышц и мясо с нежной текстурой после убоя
CAST	Кальпастатин (специфический ингибитор кальций-зависимых протеаз)	В его функции включают рост, истощение и снижение массы, происходящие после забоя.
CLPG	callipyge –callipygemuscle hypertrophy gen	Мышечная гипертрофия в области таза и задних конечностей
MSTN	миостатин	Угнетение функции приводит к росту мышц и уменьшению отложению жира

Миостатин – фактор роста и дифференцировки 8 (Growth Differentiation factor – 8, **GDF-8**) относится к семейству ростовых факторов (transforming growth factor β family, TGF- β).

Ген **MSTN** был идентифицирован в 1997 году. У полученных GDF-8 КО мышей было примерно в два раза больше мышц, чем у нормальных.

Миостатин ограничивает гипертрофированный рост мышечной массы. При дегенеративных заболеваниях, травмах и других патологиях мышечной системы, служит потенциальной мишенью для терапевтического воздействия.



* McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997 May 1;387(6628):83-90.

Полиморфизм гена миостатина (MSTN)

Инактивирующие мутации гена миостатина приводят к увеличению скелетных мышц (в виде гипертрофии и гиперплазии мышечных волокон). Мутации найдены у крупного рогатого скота, овец, собак, человека, во многих случаях связаны с увеличением мышечной массы.

Гиперэкспрессия гена миостатина у трансгенных мышей приводит к снижению мышечной массы.

Миостатин оказывает отрицательное действие на рост мышечной ткани и формирование костной массы, углеводный обмен, способствует адипогенезу. Ген миостатина – перспективный объект для поиска полиморфизмов, влияющих на рост и развитие сельскохозяйственных животных, что может найти применение в разведении и животноводстве.

Gene: MSTN ENSOARG00000016285

Description	myostatin [Source: NCBI gene (formerly Entrezgene); Acc: 443449.9]
Gene Synonyms	GDF-8, GDF8
Location	Chromosome 2: 118,144,443-118,149,433 forward strand. Chr_v3 1:CM001583.1
About this gene	This gene has 1 transcript (splice variant) and is associated with 1 phenotype .
Transcripts	Hide transcript table

Show/hide columns (1 hidden)						
Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	UniProt Match	Flags
ENSOART00000017734.1	MSTN-201	1128	375aa	Protein coding	Q18830 & Q19BJ5	Ensembl Canonical

Зрелый белок Миостатин состоит из двух субъединиц (каждая - из 109 аминокислотных остатков). Белок синтезируется в неактивной форме – препромиостатин (375 аминокислот). Чтобы активировать белок, **протеаза** расщепляет NH₂-концевую часть.

Отмечены однонуклеотидные замены, желтым выделены миссенс-мутации, приводящие к замене аминокислоты в белке

Основные мутации в гене миостатина, обнаруженные у ряда пород КРС*

Mutation name	Change at gene level	Change at protein level	Breed	Reference
nt821	Deletion of 11 bp at nucleotide position 821	Truncated protein due to a premature STOP codon in the bioactive C-terminal domain	Belgian Blue, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturiana de Valles, Rubia Gallega	Dunner et al., 1997; Grobet et al., 1997, 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997; Allais et al., 2010
C313Y	G→A transition at nucleotide position 938	Substitution of a highly conserved cysteine involved in an intramolecular disulfide bridge in the bioactive C-terminal domain, by a tyrosine	Piedmontese, Gasconne	McPherron and Lee, 1997; Libor, 2008
nt419 (del7 - ins10)	Insertion/deletion at nucleotide position 419	truncated protein due to a premature STOP codon in the N-terminal latency-associated peptide	Maine-Anjou	Grobet et al., 1998
Q204X	C→T Transition at nucleotide position 610	Truncated protein due to a premature STOP codon in the N-terminal latency-associated peptide	Charolais, Limousin	Allais et al., 2010
E226X	G→T Transversion at nucleotide position 676	Truncated protein due to a premature STOP codon in the N-terminal latency-associated peptide	Maine-Anjou	Grobet et al., 1998
E291X	G→T Transversion at nucleotide position 874	Truncated protein due to a premature STOP codon in the bioactive C-terminal domain	Marchigiana	Cappuccio et al., 1998; Marchitelli et al., 2003
T-371 > A-371G-805 > C-805	T→A Transversion at nucleotide position -371; G→C transversion at nucleotide position -805	Promoter	Marchigiana, Chianina, Romagnola, Piedmontese, Holstein Friesian, Italian Red Pied, Brown Swiss, Belgian Blue, Limousine	Crisà et al., 2003
G-7828 > C-7828	G→C Transversion at position -7828	5'-Flanking region	Holstein-Friesian	Sadkowsky et al., 2008
T3811 > G3811	Intronic mutation	An abnormal transcript with a premature termination codon	Blonde d'Aquitaine	Bouyer et al., 2014

* Bongioni S, Valentini A, Chillemi G. Structural and Dynamic Characterization of the C313Y Mutation in Myostatin Dimeric Protein, Responsible for the "Double Muscle" Phenotype in Piedmontese Cattle. *Front Genet.* 2016 Feb 11;7:14.6.00014.

Крупный рогатый скот с «двойной» мускулатурой.

Примеры мутаций гена миостатина.

Делеция в 3-м экзоне (11 нуклеотидов): сдвиг рамки считывания устраняет практически всю часть активного зрелого белка, дополнительный стоп-кодон.

Бельгийская голубая порода



Миссенс-мутация в экзоне 3. При замене цистеина тирозином (C313Y) в мономере зрелого белка теряется дисульфидная связь 313–374, белок неактивен.

Пьемонтская порода





Крупный рогатый скот.
Примеры мутаций гена миостатина.

*Замена G/C в положении -7828,
5' регуляторная область.*
Голштино-фризский КРС,
известны как самые
высокопродуктивные молочные
животные



Замена T/G (3811) в интроне.
Образование транскрипта с
преждевременным стоп-
кодоном.

Белая аквитанская порода

Полиморфизмы в гене миостатина, обнаруженные у коз

Полиморфизмы, приводящие к удвоению мускулатуры у КРС, в популяциях **коз** не обнаружены.

Индель ТТТТА, найденный в 5'UTR гена MSTN козы - уникальная мутация вида. У коз с генотипом AA (-/-) в возрасте 4 месяца массу и размер тела выше

Замена 368A>C в 1 экзоне:

замена лизина на треонин в 49 позиции белка.

У мясных бурских и бейкервальских коз доминирует генотип AA.

Лучшие ростовые качества - у гетерозигот по обоим признакам.

Бурские козы - одна из лучших мясных пород коз. Адаптированы к широкому спектру климатических условий. Производят в среднем 2 кг молока в день (7-9% жира). Вес при рождении 2,4 кг, при отъеме - 35 кг, вес взрослых козлов - 115 кг.



Полиморфизмы гена миостатина у овец

Обнаружено более 70 SNP. Большинство расположено в некодирующих областях: во фланкирующих регионах - 30 SNP, в интронах - 38, в экзонах – 7. Большая часть мутаций не влияет на активность белка.



Миссенс-мутации.

Экзон 1: 101G>A (замена глутамина на глицин),
106A>G (замена лизина на глутамин).

Экзон 3: 971C>T (замена в 324 позиции белка треонина на изолейцин).

Нонсенс-мутация: 985C>T (замена триплета САА (глицин) на ТАА (стоп-кодон) в позиции белка 329). Укороченный белок. Обнаружен у *советского мериноса*.



Делеция в 3-м экзоне (с.960delG): сдвиг рамки считывания, преждевременное образованию стоп-кодона, сокращение длины кодируемого пептида. Гомозиготные животные имеют меньшую массу тела и меньший среднесуточный прирост массы тела, однако более высокую убойную массу туши.

Норвежская белая порода (Norwegian White)

Полиморфизмы гена миостатина у овец

Замена в 3'-UTR 1232G>A способствует развитию мышечной гипертрофии путем микро РНК-опосредованного ингибирования трансляции гена (создает таргетный сайт для микроРНК mir1 и mir206).

Аллель А связан с увеличением мышечной массы, числа мышечных волокон, развитием мышечной гипертрофии и уменьшением жировых отложений.



Австралийский Тексель



Баран породы Шароле



Белый суффолк

Ингибирование действия миостатина

Способность миостатина ограничивать рост мышечной массы делает его потенциальной мишенью для продуктивного животноводства: животные, испытывающие недостаток миостатина или активности его действия в результате естественных мутаций, имеют значительно большую мышечную массу, чем обычные животные.

Способы ингибирования действия миостатина:

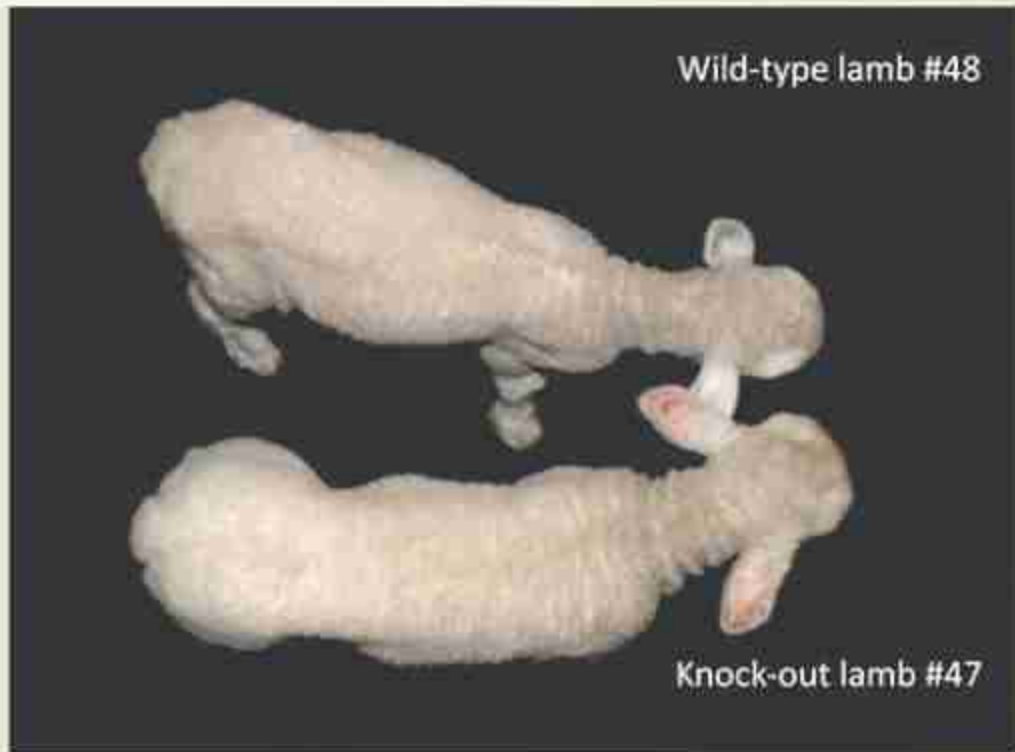
- ✓ **системное введение антител против миостатина или его рецептора ActRIIB**
- ✓ **иммунизация животных синтетическими миостатином или ActRIIB с целью выработки собственных антител против эндогенных миостатина или ActRIIB ;**
- ✓ **сверхэкспрессия или введение связывающихся с активным зрелым миостатином ингибиторов: пропептида миостатина, растворимого рецептора (sActRIIB), фоллистатина ;**
- ✓ **Использование РНК-интерференции и анти-олигонуклеотидов против миостатина или ActRIIB**
- ✓ **Получение животных с нокаутом гена миостатина – выведение новых пород животных с использованием современных методов биотехнологии (геномное редактирование)**

Пример1: Получение овец с нокаутом гена миостатина (технология CRISPR/Cas9, микроинъекции в зиготы)

Мишень: экзон 1 гена миостатина

Компоненты системы CRISPR/Cas9 для микроинъекции:
5 ng/ μ l of sgRNA and 20ng/ μ l of Cas9 mRNA.

1. После МИ зиготы 53 бластоцисты были перенесены в 29 самок-реципиенток.
2. Получили 65,5% (19/29) беременных овцематок и 41,5% (22/53) новорожденных.
3. Из 22 родившихся ягнят у десяти были обнаружены индели в гене MSTN. У восьми были обнаружены мутации в обоих аллелях, и пять из них были гомозиготными по инделям, генерирующим сбой рамки считывания с преждевременным образованием стоп-кодона.



Ягнята через 30 дней после рождения: дикий тип - №48 (8,75 кг), гомозиготный КО - №47 (11,15 кг)

Crispo M. et al. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. PLoS One. 2015 Aug 25;10(8):e0136690. doi: 10.1371/journal.pone.0136690

Пример 2: Получение коз с нокаутом гена миостатина (технология CRISPR/Cas9, микроинъекции в зиготы)

Мишень: экзон 3 MSTN, цистеин-содержащие последовательности
Компоненты системы CRISPR/Cas9 для микроинъекции:
10 ng/μl of **sgRNAs**, 40 ng/μl of **Cas9 mRNA**.

Показатели роста ГМ и WT козлят

	0	20th day	60th day	36th day	120th day	210th day	Gain (kg)/day
MSTN KO	3.25 ± 0.94	7.09 ± 1.30	13.07 ± 2.22	9.63 ± 2.06	20.31 ± 3.48	31.21 ± 4.09	0.13
WT	3.36 ± 0.48	7.60 ± 1.25	13.69 ± 1.65	10.46 ± 1.07	17.35 ± 1.91	25.09 ± 2.33*	0.11

1. После МИ зиготы были перенесены 7 реципиенткам
2. От 7 коз получили 7 козлят.
3. Из 7 козлят:
2 - MSTN^{-/-},
4 - MSTN^{+/-}

Козлята через 100 дней после рождения. Слева MSTN^{-/-}, справа - WT



Тушки MSTN^{-/-} и WT-козлят.

He Z, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats. Biosci Rep. 2018 Nov 13;38(6):BSR20180742.

Использование технологий геномного редактирования, например, **CRISPR/Cas9** в сочетании с методом **микроинъекции зигот**, позволило зарубежным исследователям в короткие сроки получить коз, кроликов, овец, свиней с нокаутированным геном миостатина и повышенной мышечной массой, что может быть перспективным в создании новых высокопродуктивных пород сельскохозяйственных животных.

Целью проведенного нами эксперимента было **получение козлят с нокаутированным гена миостатина** с использованием CRISPR/Cas9 технологии в плазмидной форме.

С помощью специальных программ в кодирующем зрелый белок 3-м экзоне гена выбрали три последовательности-мишени с высоким рейтингом. Были получены плазмиды, экспрессирующие направляющие РНК и эндонуклеазу Cas9.

Была разработана система анализа, позволяющая методом ПААГ-электрофореза коротких ПЦР-ампликонов (70-100 п.н.) обнаружить делеции размером в несколько нуклеотидов.

В результате трансплантации микроинъектированных эмбрионов козам-реципиентам от двух из них были получены пять живых козлят. Проведенный предварительный анализ **не обнаружил** делеций в гене миостатина.

Эффективность CRISPR/Cas9 зависит от формы ее компонентов: предпочтительно использование белка (или мРНК) Cas9 вместе с направляющими РНК. Мы использовали менее эффективный плазмидный вариант (pX330, Addgene) CRISPR/Cas9.

Однако полученный нами опыт позволяет надеяться на успешный результат при планировании следующих экспериментов.

Спасибо за внимание!

