

Полиморфизм гена миостатина и его влияние на продуктивность животных. CRISPR/Cas9 как способ модификации гена MSTN

*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 О.Б.

XVII научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2022 -

**ФГБУН «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Достижения в области технологий секвенирования и генотипирования позволили разработать новые методы отбора мясных животных.

Интенсивно изучаются полиморфизмы ключевых генов, ассоциированных с мясной продуктивностью. Секвенирование генома КРС и других животных дает возможность установить связь новых полиморфизмов с ростовыми признаками.

Применение молекулярных маркеров в практической селекции обозначается термином **marker-assisted selection (MAS)**. Основным принципом MAS заключается в использовании для создания новых пород и селекционных линий тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак .

С показателями развития мышечной массы (мясной продуктивности) могут быть ассоциированы замены, расположенные в :

- **экзонах** и изменяющие структуру кодируемого пептида. Эти полиморфизмы сказываются на ингибирующей способности миостатина, и в дальнейшем на интенсивности мышечного роста.
- **промоторной области** гена, и изменяющие его транскрипционную активность;
- вблизи **сайтов сплайсинга**, поскольку могут повлиять на сплайсинг мРНК и структуру белка.

Крупный рогатый скот с «двойной» мускулатурой

Ген MSTN у *бельгийской голубой* породы содержит 11-нуклеотидную делецию в экзоне 3: сдвиг рамки считывания устраняет практически всю часть активного зрелого белка. Гомозиготы.

Ген MSTN у *пьемонтского* КРС содержит миссенс-мутацию в экзоне 3. Мутация С313У (замена Cys на Tyr) устраняет дисульфидную связь 313–374 в мономере зрелого белка: белок неактивен. Гомозиготы. Эти породы КРС часто называют "двумышечные", но общее увеличение всех мышц составляет не более 40%.

У КРС еще несколько пород имеют подобные мутации в гене MSTN и демонстрируют наследственную мышечную гиперплазию (КРС с двойной мускулатурой): Шароле, Лимузенская, Форд, Голштино-фризская, Ангусская, Маркизская, Мэн-Анжуйская, Blond-Аквитанская, Партенезская, Гасконская, Астурианская-де-лос-Вальес и Рубиа Гальега



Бык бельгийской голубой породы



Бык пьемонтской породы

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 disulfite 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	Sadkowski et al., 2008
T3811 > G3811	Intronic mutation	An abnormal transcript with a premature termination codon	Blonde d'Aquitaine	Bouyer et al., 2014

* Bongiorno 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.

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. Генотипы AA (-/-), BB (+/+), AB заметно влияют на массу и размер тела в раннем возрасте коз.

Идентифицированы несколько SNP гена MSTN: **Замена 368A>C** в 1 экзоне приводит к замене лизина на треонин в 49 позиции белка. Генотип AA доминирует у мясных бурских и бейкервальских коз. 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.



Мутация с потерей активности миостатина у **уиппетов**: делеция двух пар оснований в 3-м экзоне, в области цистеина.

(А) Уиппеты – гончая порода, выведенная для собачьих бегов.

(Б) Гомозиготное состояние MSTN KO. Гетерозиготы, с меньшей мышечной массой, обладают большей мышечной силой и широко представлены среди лучших гончих.

(А)



(Б)



У **овец** обнаружено 75 SNP. Большинство расположено в некодирующих областях гена. Во фланкирующих областях гена MSTN выявлено 30 SNP, в интронах - 38 SNP, в экзонах – 7.



Баран породы тексель: рост в холке до 87 см, вес до 160 кг.

Миссенс-мутации.

Экзон 1: полиморфизм 101G>A - замене Glu на Gly, 106A>G – замена Lys на Glu.

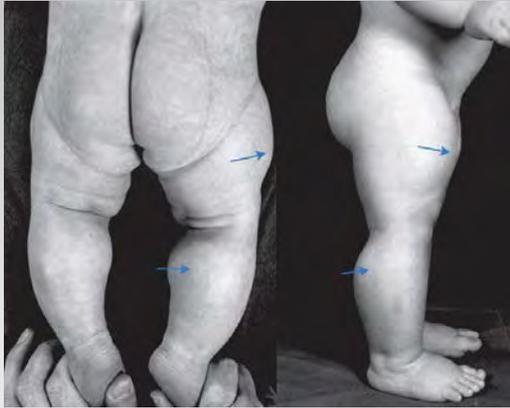
Экзон 3: SNP 971C>T - замена в позиции 324 Thr на Ile.

Нонсенс-мутация: 985C>T - замена CAA (Gly) на TAA в позиции белка 329.

У породы **тексель**: в 3'-UTR замена 1232G>A (99% встречаемости) 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.

Полиморфизмы и мутации в гене миостатина у человека



В гене миостатина у малыша нашли замену G/A в начале первого интрона, которая нарушает сплайсинг РНК и приводит к образованию неактивного белка. Гомозиготен. Мама – гетерозигота.

Schuelke M, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med. 2004 Jun 24;350(26):2682-8.



Полиморфизм Lys(K)153 Arg(R) в экзоне 2 гена миостатина влияет на фенотипы скелетных мышц. Изучение связи полиморфизма у спортсменов с мышечной гипертрофией показало:

генотипы KR и RR* статистически значимо связаны с силовыми способностями спортсменов и их мышечной массой при выполнении физических тренировок силовой направленности.

R-аллель благоприятен для таких видов спорта, как бодибилдинг, пауэрлифтинг, тяжелая атлетика, армрестлинг, гиревой спорт, толкание ядра, бобслей и некоторые другие виды.

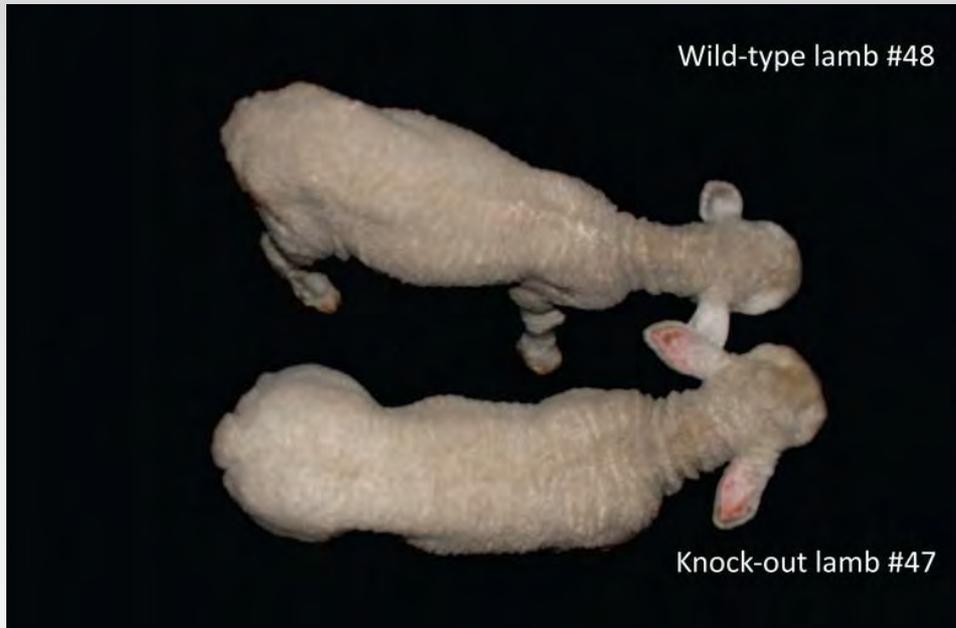
**Низкая встречаемость аллеля R: частота мутантных гомозигот (RR) ниже 1% среди обычного населения,*

Aksenov, M. (2021). Метаанализ ассоциации полиморфизма гена mstn rs1805086 с силовыми показателями спортсменов. Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 13. 303-335.

Генно-модифицированные животные. Овцы и козы.

1. Мировой опыт:

Получение MSTN KO овец с использованием CRISPR/Cas9 и микроинъекции в зиготы



Ягнята через 30 дней после рождения: дикий тип - №48 (8,750 кг), гомозиготный КО - №47 (11,150 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

Мишень: экзон 1 миостатина (GGCTGTGTAATGCATGCTTG), .
Плаزمида: pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9
МИ: 5 ng/μl of **sgRNA** and 20ng/μl 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-кодонов.

2. Мировой опыт:

Получение MSTN ГМ коз с использованием CRISPR/Cas9 и микроинъекции в зиготы

Мишень: экзон 3 MSTN, цистеин-содержащие последовательности

Плазмиды: pYSY-T7-MSTN-gRNA1 and pYSY-T7-MSTN-gRNA2; pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 .

МИ: **sgRNAs** (10 ng/ μ l), **Cas9 mRNA** (40 ng/ μ l).

1. После МИ зиготы были перенесены 7 реципиенткам
2. От 7 коз получили 7 козлят.
3. Из 7 козлят: 2 MSTN^{-/-} , 4 - MSTN^{+/-}-MSTN (85,7% ГМ),

Показатели роста ГМ и WT козлят

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

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



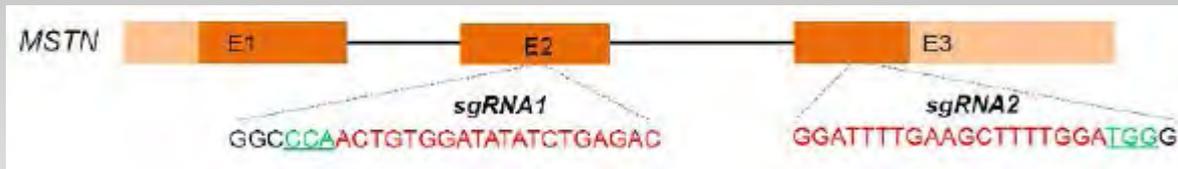
He Z, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscled phenotype in goats. *Biosci Rep.* 2018 Nov 13;38(6):BSR20180742.



Тушки MSTN^{-/-} и WT-КОЗЛЯТ.

3. Мировой опыт:

Получение MSTN и FGF5* ГМ коз с использованием CRISPR/Cas9 и микроинъекции в зиготы



ГМ козлята через 30 дней после рождения

Мишень: экзоны 2,3 MSTN

Плаزمида: pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 .

МИ: **sgRNA –MSTN**, **sgRNA –FGF5** и **Cas9 mRNA**.

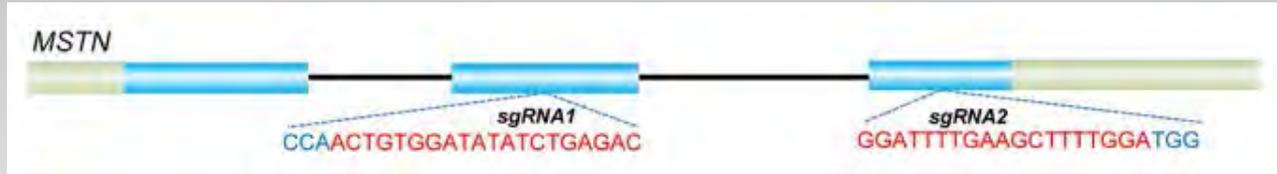
1. После МИ зиготы 416 (48.25%) бластоцисты были перенесены в 137 самок-реципиентов.
2. Получили 46,7% (64/137) беременных коз и 41,5% (22/53) новорожденных.
3. Из 98 козлят: ГМ MSTN - 15 (15,3%), ГМ FGF5 -21 младенца (21,4%). У 10 (10,2%) козлят были ГМ обоих генов.

Wang, X. et al. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 5, 13878; doi: 10.1038/srep13878 (2015)..

* FGF5 - фактор роста фибробластов 5, сигнальный белок, секретируемый во время цикла роста волос (шерсти), ингибирует их рост. Рассматривается как ген, лежащий в основе фенотипа длинношерстности у мышей

4. Мировой опыт:

Получение MSTN, ASIP* и VCO2** ГМ овец с использованием CRISPR/Cas9 и микроинъекции в зиготы



Показатели роста ГМ и WT ягнят

Growth parameter	Mutant ^a (n=10; mean)	Control (n=10; mean)	P value
Birth weight (kg)	4.28 ± 0.29	3.48 ± 0.24	0.047
BW at D30 (kg)	9.86 ± 0.74	7.64 ± 0.75	0.049
Weaning weight (D60) (kg)	15.67 ± 1.33	12.72 ± 1.00	0.093
BW at D90 (kg)	20.60 ± 1.44	17.51 ± 0.93	0.088
BW at D120 (kg)	25.26 ± 1.94	21.63 ± 0.71	0.103
BW at D150 (kg)	29.19 ± 1.97	24.90 ± 0.82	0.047
BW at D180 (kg)	34.42 ± 2.37	26.43 ± 0.86	0.004
BW at D210 (kg)	38.76 ± 2.73	30.53 ± 0.80	0.004
BW at D240 (kg)	44.35 ± 3.14	34.03 ± 1.14	0.001
ADG (g) (0-240 d)	166.95 ± 12.83	127.31 ± 4.88	0.001

Wang X. et al. Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci Rep.*, 2016, no.6: 32271.

Мишень: экзоны 2,3 MSTN

Плаزمида: pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9

МИ: **sgRNA** (5 ng/μ для каждого гена) и **Cas9 mRNA** (20 ng/μL).

1. После МИ зиготы 578 из 588 бластоцист были перенесены в 82 реципиентки.
2. У четырех реципиенток 5 плодов абортрованы. От 30 получено 50 ягнят (в том числе 7 мертворожденных), 6 умерли сразу после рождения, осталось 36 живых ягнят.
3. Из 36 живых ягнят: ГМ MSTN - 10 (27,8%), ГМ MSTN + ACIP + VCO2 - 2 (5,6%).

*Ген ASIP (сигнальный белок агути) отвечает за окраску шерсти у овец.

** Ген VCO2 – ген бета-каротинооксигеназы. Мутация в нем связана с желтым цветом жира у овец: болезнь желтого жира или панникулит приводит к метаболическим заболеваниям

Спасибо за внимание!

