

Молекулярно-генетические и иммунологические способы коррекции уровня миостатина и его влияния на 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*

Колоскова Е. М., Езерский В.А.

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

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

Изучение полиморфизма генов, влияющих на росто-весовые признаки многих видов высших позвоночных, показало большое количество генетических маркеров продуктивности и потенциальную полезность их применения в животноводстве. На основе полученных знаний создание ГМ животных с новыми полезными признаками – актуально как для фундаментальных исследований, так и прикладных целей.

Миостатин – миокин, 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 А. McPherron с соавт. * (США) в 1997 году. У полученных GDF-8 КО мышей было примерно в два раза больше мышц, чем у нормальных.

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

Выявлена корреляция между высоким уровнем миостатина и дистрофическими изменениями скелетной мускулатуры.

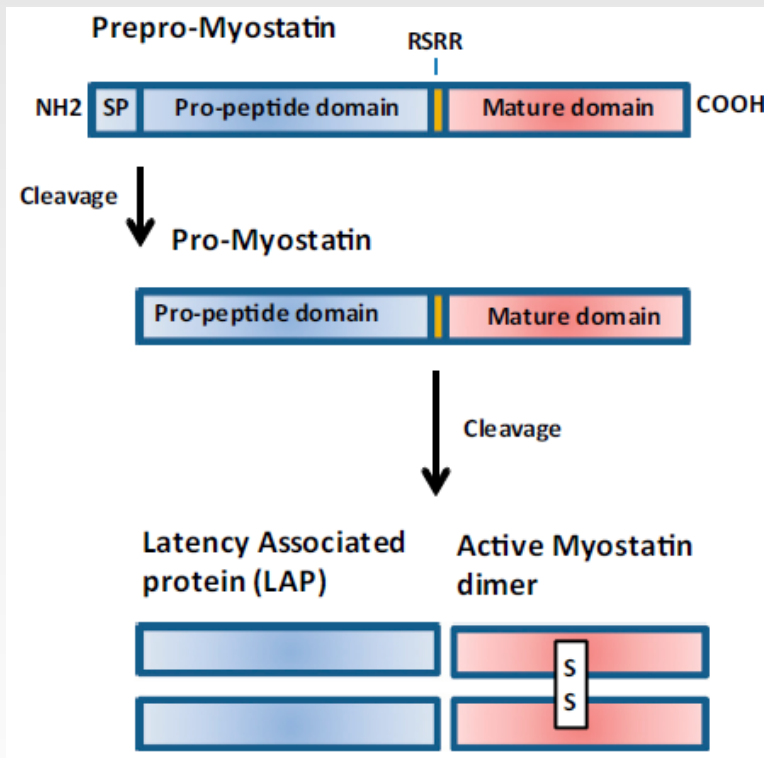


** McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature. 1997 May 1;387(6628):83-90.*

Белок миостатин. Структура, свойства, механизм действия

Миостатин вырабатывается в скелетных мышцах как белок-предшественник (**препропептид**, 375 ак), который расщепляется на N-концевой **пропептид** (243 ак) и C-концевой **зрелый белок** (109 ак).

В функциональном состоянии состоит из двух C-концевых мономеров (ак 267-375), связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339. Каждый мономер содержит четыре цистиновых узла (дисульфидные связи между остатками 272-282; 281-340; 309-372; и 313-374).



Препропептид (сигнальный пептид (SP) + пропептид + домен зрелого белка) расщепляется для удаления SP.

При гидролизе RSRR высвобождается пропептид (LAP, 42 кДа) и активный пептид (12 кДа).

Активный пептид димеризуется с образованием активного димера MSTN(24 Кда).

Пропептид нековалентно связывает димер , образуя комплекс и блокируя действие MSTN.

BMP-1, металлопротеиназа, расщепляет неактивный комплекс, высвобождая активный MSTN.

Зрелый миостатин секретируется в межклеточную среду, поступает в плазму крови, где его основная часть находится в комплексе с пропептидом, фоллистатином и фоллистатин родственными белками

Механизм действия (Smad-путь)

Миогенез (процесс формирования скелетных мышц) - многоступенчатый биологический процесс, управляемый многими регуляторными факторами, такими как белки семейства box 3 и 7, миогенные регуляторные факторы (myogenin, MyoD, Myf5 и MRF4/6) и др. Основная мишень миостатина – **миобласты** (однойдерные клетки, способные делиться или дифференцироваться и сливаться в длинные многоядерные мышечные волокна, составляющие основу сократительных структур скелетных мышц). Миостатин ограничивает пролиферацию миобластов, тормозит их дифференцировку.

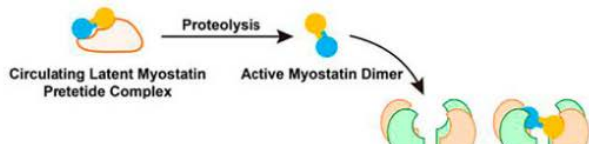
Миостатин (как активин и ингибин из семейства TGF β) связывается с активиновыми рецепторами **ActRIIB** и ActRIIA (трансмембранные серин/треонин киназы). После этого активируются рецепторы **ALK4** (activin Receptor-Like Kinase 4) или **ALK5**.

Активный рецепторный комплекс фосфорилирует и активируют цитозольные белки **Smad2*** и **Smad3**. Комплекс Smad2/3 связывается с **Smad4** и транслоцируется в ядро. При взаимодействии с ДНК и факторами транскрипции происходит избирательная активация экспрессии генов, участвующих в апоптозе, задержке клеточного цикла в стадии G1 .

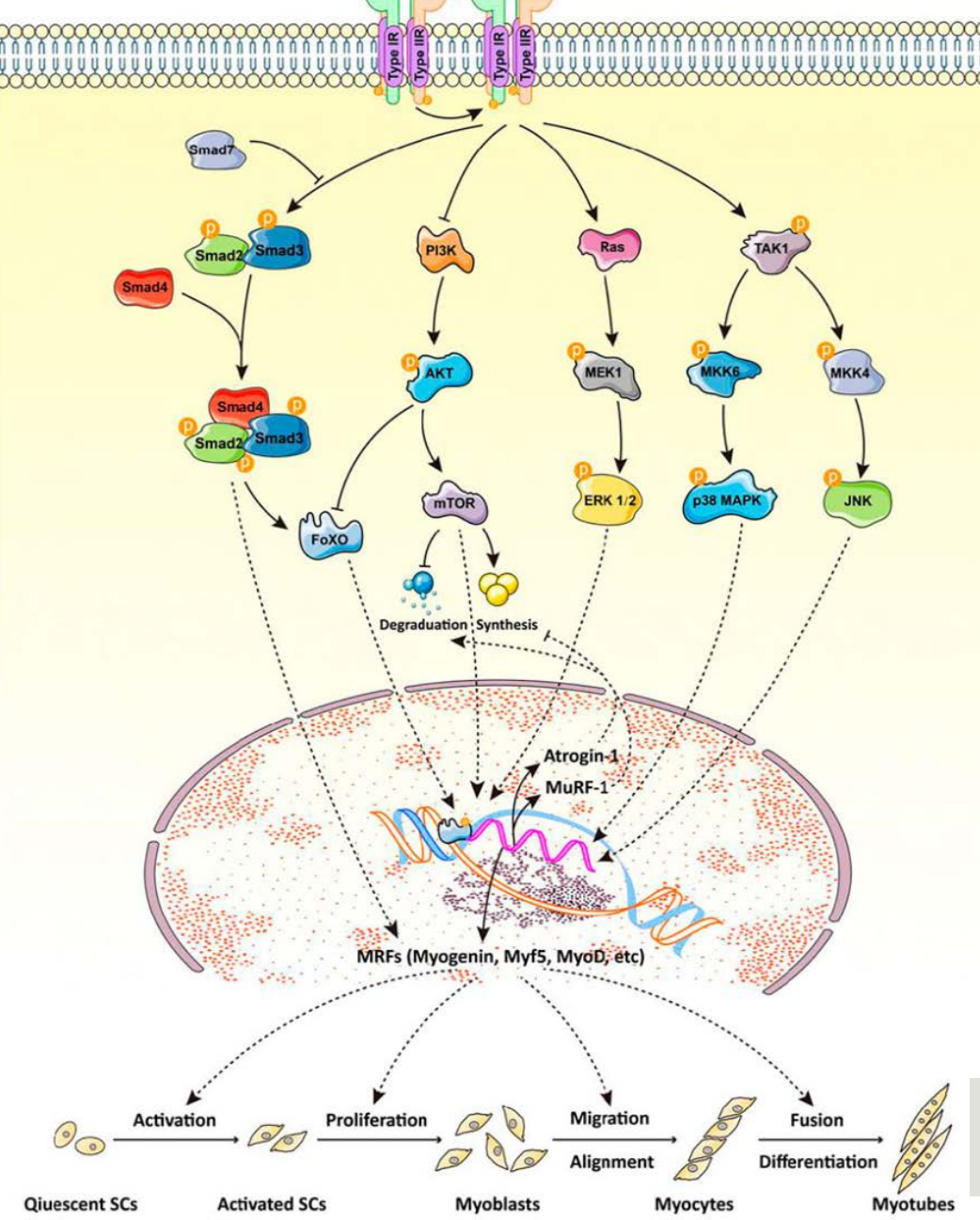
Нефосфорилированные белки Smad2 и Smad3 не могут переходить в ядро и активировать транскрипцию: без миостатина гены-мишени не будут экспрессироваться.

Прерывание сигнального пути миостатина ингибирует активацию Smad2/3: Smad4 становится участником сигнальном пути **BMP** (белка морфогенеза костной ткани и его рецептора), что способствует росту мышечной ткани и противодействует эффектам, вызываемым миостатином.

**Smad - семейство белков-преобразователей сигналов для рецепторов суперсемейства TGF- β , критически важных для регуляции развития и роста клеток.*



Сигнальный путь миостатина и его гены-мишени. Миогенез.



Димер миостатина связывается с ActRIIB, затем с ALK4/5 с образованием комплекса.

1. Классический путь регуляции - Smad.
2. Неклассические пути:
PI3K/Akt/mTOR;
MAPK - сигнальные пути (ERKs, JNKs и p38MAPK)

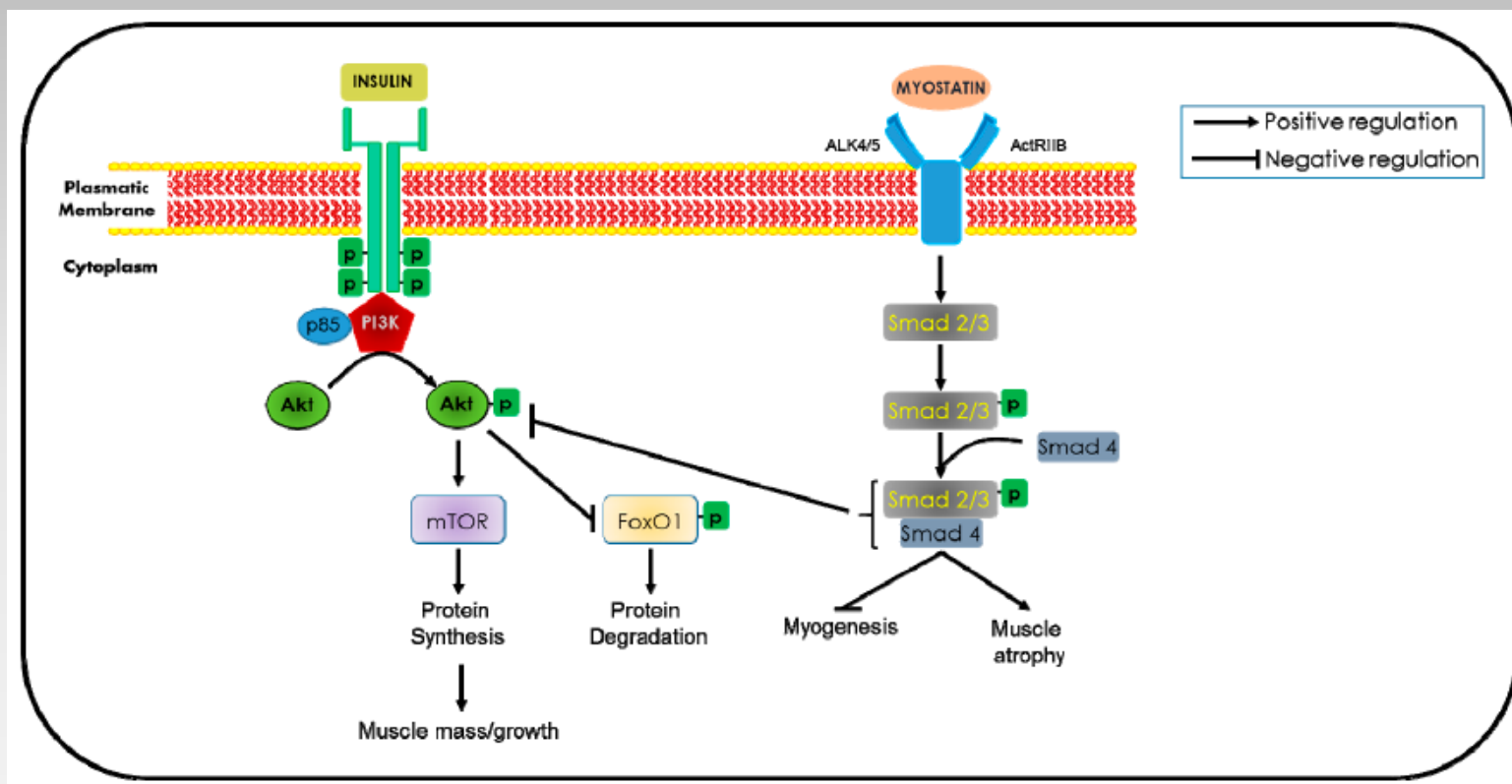
Все эти пути опосредуют транскрипцию миогенных регуляторных факторов (миогенина, Myf5, MyoD), MuRF-1 и атрогина-1 для регуляции миогенной дифференцировки и качества скелетных мышц.

Участники процесса:

ActRIIB: активинотипные рецепторные киназы II-B;
ALK4/5: активинотипная рецептор-подобная киназа 4/5;
R-Smad: Smad, регулируемый рецептором;
PI3K: фосфоинозитид-3-киназа;
Akt: протеинкиназа B;
mTOR: мишень рапамицина для млекопитающих;
MAPK: активируемый митогеном протеинкиназа;
ERK: внеклеточная сигнально-регулируемая киназа;
JNK: c-Jun N-концевая киназа;
Myf5: миогенный фактор 5;
MyoD: белок определения миобластов 1;
MuRF-1: мышечный RING-finger белок-1.

Chen M-M, et al. (2021) Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:785712.

Сигнальный путь миостатина при саркопении.



Анаболический сигнальный путь. Инсулин положительно регулирует мышечную массу по сигнальному пути **PI3K/AKT/mTOR**, характерному для большинства клеток (отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток, метаболизм).

Катаболический сигнальный путь. Миостатин по сигнальному пути **Smad2/3/4** приводит к атрофии мышц. Комплекс Smad 2/3/4 подавляет активность Akt (протеинкиназа B). Akt блокирует ядерную транслокацию FOXO1, ингибируя деградацию белка.

FOXO1 –фактор транскрипции, активирует транскрипцию генов ингибиторов клеточного цикла

Ингибирование действия миостатина

Способность миостатина ограничивать рост мышечной массы делает его потенциальной мишенью для терапевтического воздействия при дегенеративных заболеваниях, травмах и других патологиях мышечной системы, для применения в спортивной медицине и спорте, в продуктивном животноводстве. Практически сразу после открытия начались исследования препаратов, способных подавить действие миостатина.

Животные, испытывающие недостаток миостатина или получающие вещества, блокирующие его активность, имеют значительно большую мышечную массу, чем контрольные.

При блокировании действия миостатина происходит не только увеличение мышечной массы, но и повышение силовых характеристик скелетных мышц.

Доклинические исследования ингибирования миостатина на животных моделях

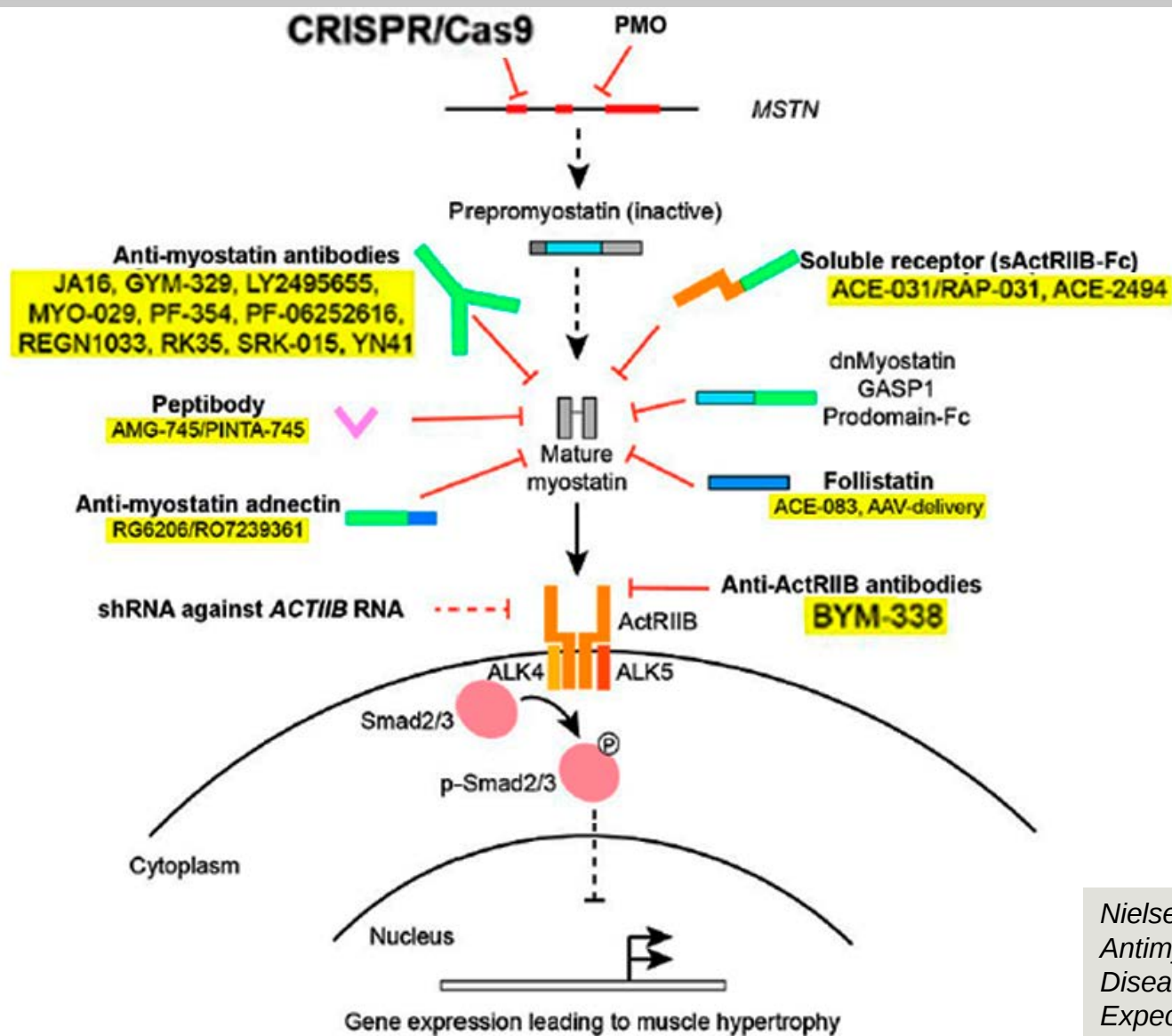
Возможности и потенциал регуляции мышечного роста изучают на животных моделях мышечной дистрофии, атрофии и мышечной регенерации.

Ингибирование действия миостатина используют для изучения различных физиологических процессов, включая метаболизм костной ткани, энергетический метаболизм, выживание при онкологии.

Основные подходы к ингибированию активности миостатина *in vivo*:

- ✓ **системное введение антител против миостатина;**
- ✓ **сверхэкспрессия или введение пропептида миостатина;**
- ✓ **системное введение рецептора ActRIIB;**
- ✓ **введение антител, направленных против ActRIIB;**
- ✓ **сверхэкспрессия или введение фоллистатина;**
- ✓ **опосредованная печенью сверхэкспрессия растворимого рецептора (sActRIIB), доминантно-негативного миостатина (dnMSTN) или пропептида;**
- ✓ **РНК-интерференция и анти-олигонуклеотиды против миостатина или ActRIIB**
- ✓ **Редактирование гена миостатина, опосредованное AAV-Cas9.**
- ✓ **трансгенные модели, нокаут**

Различные подходы, используемые для ингибирования действия миостатина.



Методы инактивации действия миостатина, применяемые в клинических испытаниях выделены желтыми блоками.

Внутриклеточный сигнальный путь Smad2/3 от взаимодействия миостатина с рецептором ActRIIB приводит к изменению транскрипции генов мышечных регуляторных факторов

Nielsen, T.L.; Vissing, J.; Krag, T.O. Antimyostatin Treatment in Health and Disease: The Story of Great Expectations and Limited Success. *Cells* **2021**, *10*, 533.

Препараты, подавляющие действие миостатина (Примеры)

Антитела к миостатину

1. Моноклональные антитела **JA16** против миостатина у мышей моделей мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) показали меньше дегенеративных признаков у диафрагмы и скелетных мышц по сравнению с контрольной группой. В модели мышечной дистрофии пояса конечностей (LGMD) были аналогичные результаты с увеличением мышечной массы. Раннее начало лечения способствовало положительному эффекту.
2. Моноклональные антитела **mRK-35** (Pfizer) показали положительный эффект у мышей МДД. Лечение мышинной и крысиной моделей бокового амиотрофического склероза (БАС) препаратом RK35 улучшило силу захвата по сравнению с плацебо-контролем, но не отсрочило начало заболевания и не продлило выживаемость ни одной из моделей.
3. Моноклональные антитела Stamulumab (**MYO-029**). Фармацевтическая компания Wyeth Pharmaceuticals (Pfizer) 2002 год. Данные клинических испытаний были опубликованы в 2008 году. Биологические и функциональные эффекты не были обнаружены. Концентрация MYO-029, необходимая для 50% улучшения мышечной массы обезьян, была примерно в 20 раз выше по сравнению с эквивалентным ответом у мышей, что указывает на значительный сдвиг эффективности среди видов

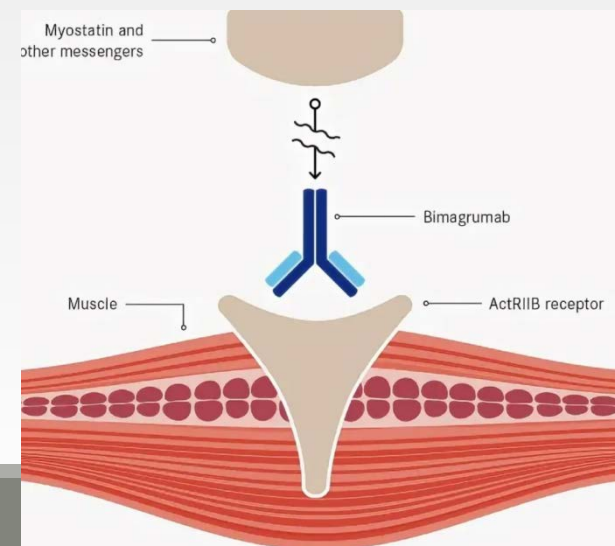
4. Моноклональные антитела **GYM329** для связывания и очистки миостатина из системы кровообращения позволили увеличить мышечную массу у трех моделей мышей и обезьян. В отличие от других антител к антимиостатину, GYM329 не связывал GDF-11. У старых животных, где другие способы ингибирования миостатина были неудачны, GYM329 оказался более эффективным

*Компания **Roche**: начало в 2022 году программы клинических исследований лечения спинальной мышечной атрофии (СМА): в комбинации с рисдипламом будет применяться GYM329.*

5. В исследовании мышечной атрофии, вызванной микрогравитацией при содержании мышей на Международной космической станции, лечение антителами **YN41** в течение 6 недель привело к увеличению мышечной массы.

Антитела к рецепторам миостатина.

1. Бимагромаб (BYM338) - рекомбинантное моноклональное антитело человека, конкурентно связывается с ActRII с большей аффинностью, чем его природные лиганды (миостатин, активин А и GDF-11 - отрицательные регуляторы роста скелетных мышц). Разработано компанией [Novartis](https://www.novartis.com) для лечения патологической мышечной потери и слабости (2013 г).



Спасибо за внимание!

