

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vztah bodových mutací v genu MSTN a slabosti končetin u
selat**

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Hrazdírová

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Zadinová, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vztah bodových mutací genu *MSTN* a slabosti končetin selat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Kateřině Zadinové, Ph.D., za trpělivost při vypracování této bakalářské práce a veškerou pomoc i v této těžké době. Dále bych ráda poděkovala celé své rodině za podporu a pomoc.

Vztah bodových mutací v genu *MSTN* a slabosti končetin u selat

Souhrn

Bakalářská práce popisuje gen *myostatin*, působení jeho SNP mutací u prasat, skotu, ovcí, koní, králíků a drůbeže, zejména však u prasat. Zaměřila jsem se především na vliv na užitkové vlastnosti, intramuskulární tuk a v neposlední řadě slabost končetin. V literární rešerši pojednává o nejdůležitějších molekulárně genetických metodách a genetických markerech, které jsou důležité pro studium a pochopení funkce genu *myostatin*.

V roce 1997 byla poprvé popsána lokalizace genu *myostatin* (*MSTN*) u skotu. Díky této lokalizaci byly pomocí experimentů na myších objeveny mutace, které způsobují fenotypy DBM (double muscling). Práce shrnuje metody, které identifikovali mutace genu *MSTN* způsobující slabost končetin u selat, vlivy tohoto syndromu na přirozenou selekci v chovu prasat. Dále se práce zaměřuje na způsob dědičnosti syndromu slabosti končetin u selat, kde se pomocí několika metod zjistilo, že syndrom slabosti končetin je záležitostí recesivní dědičnosti, jelikož se nachází pouze u homozygotních jedinců.

V této práci zmiňuji doposud nejrozšířenější studii tohoto genu, která použila pro svůj výzkum několik genetických analýz ve vztahu k syndromu slabosti končetin, podílu svalových tkání a velikostí vnitřních orgánů. Dále popisuje možnosti selekce zaměřené na SNP genu *MSTN* a zjištění příčinných kandidátních mutací a typu dědičnosti. Pro rozšíření SNP a jejich vlivu v dalších populacích prasat doporučuji provést další podrobné analýzy.

Klíčová slova: sele, myostatin, slabost končetin, genetické vady selat

Relationship of SNP's in MSTN gene and leg weakness in piglets

Summary

The Bachelor thesis describes *the myostatin* gene, the action of its SNP mutations in pigs, cattle, sheep, horses, rabbits and poultry, but particularly in pigs. I focused mainly on the effect on utility properties, intramuscular fat and last but not least limb weakness. In the literary research, he discusses the most important molecular genetic methods and genetic markers that are important for studying and understanding the function of *the myostatin* gene.

Localisation of *the myostatin* gene (*MSTN*) in cattle was first described in 1997. Thanks to this localisation, mutations that cause phenotypes of DBM (double muscling) were discovered by experiments in mice. The work summarizes methods that identified mutations in *the MSTN* gene causing limb weakness in piglets, effects of this syndrome on natural selection in pig breeding. Furthermore, the work focuses on the way limb weakness syndrome is inherited in piglets, where several methods have found that limb weakness syndrome is a matter of recessive inheritance as it is only found in homozygous individuals.

In this thesis, I mention the most widely studied study of this gene to date, which used several genetic analyses in relation to limb weakness syndrome, muscle tissue proportion and internal organ sizes for its research. It also describes the possibilities of selection aimed at the SNP gene *MSTN* and the identification of causal candidate mutations and type of inheritance. To extend the SNP and their influence in other pig populations, I recommend further detailed analyses.

Keywords: piglet, myostatin, weakness in piglets, genetics piglet's defect

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1. Myostatin	9
3.1.1. MSTN u prasat	10
3.1.1.1. MSTN u prasat a JUT.....	11
3.1.1.2. MSTN u prasat a vnitřní orgány	12
3.2. Dvojité muskulární fenotypy	14
3.2.1. Mutace genu MSTN u skotu	15
3.2.1.1. Plemena skotu s dvojitým osvalením	15
3.2.2. Mutace genu MSTN u ovcí.....	17
3.2.2.1. Plemena ovcí s dvojitým osvalením.....	17
3.2.3. Mutace genu MSTN u koní, králíků a drůbeže	19
3.3. Molekulární genetik	19
3.3.1. Genetické markery	20
3.3.1.1. Kandidátní geny	20
3.3.1.1.1. Nové plemeno prasat suhuai.....	21
3.3.1.2. Polymorfismus.....	22
3.3.1.3. SNP	22
3.3.2. Molekulární genetické metody.....	23
3.3.2.1. Izolace DNA	23
3.3.2.2. Gelová elektroforéza	23
3.3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
3.3.2.4. RFLP	24
3.4. Jedna ze zásadních studií slabosti končetin u prasat	24
3.4.1. Zvířata	24
3.4.1.1. Homozygotní mapování recesivní mutace	25
3.4.1.2. Histologická analýza	25
3.4.2. Výsledky	26
4. Závěr	28
5. Literatura	29

1. Úvod

Vepřové maso je jedním z nejdůležitějších zdrojů bílkovin ve stravě člověka. Spotřeba vepřového masa dosahuje v některých státech až 45 kg a více na osobu za 1 rok. Prasata a člověk mají poměrně velkou shodu a homologii ve fyziologii, patologii a genomice, tudíž prasata využíváme i jako modely onemocnění. Studie mechanismů růstu a vývoje kosterního svalstva u prasat mohou zajistit lepší kvalitu vepřového masa, vyšší jatečnou výtěžnost a zároveň přispět i k biomedicínskému výzkumu.

Myostatin (MSTN) je jedním z klíčových faktorů, který reguluje myogenezi. Kosterní myogeneze je složitý proces, který zahrnuje proliferaci buněk, migraci, diferenciaci, fúzi za vzniku myotubů a nakonec vznik svalových tkání během embryonální fáze, ve které se kosterní myogeneze hlavně vyskytuje, dále regeneraci a opravu svalů v postnatálním růstu jedince.

Prenatální vývoj kosterního svalstva přímo ovlivňuje růst svalstva a kvalitu masa v postnatální fázi (Li 2019). MSTN negativně ovlivňuje ukládání svalové hmoty a nefunkční mutace genu *MSTN* u různých živočišných druhů, které vedly k dramatické hypermuskularitě, která vzniká svalovou hypertrofií, ale také má vliv na růst vnitřních orgánů. Hypermuskularita, u nás známa jako dvojité osvalení, které především sledujeme u skotu (belgické modré), ovšem můžeme pozorovat hypermuskularitu i u lidské populace. Selata se dvěma kopiemi této mutující alely trpí syndromem kulhání a zpravidla nepřežijí do 40 kg živé hmotnosti (Matika, 2020). Slabost nohou je hlavní příčinou kulhání a má velice negativní dopad na životní podmínky zvířat, hospodářský dopad na produkci masa, která ovlivňuje ekonomickou stránku, protože selata s tímto postižením většinou nepřežijí. V heterozygotní formě byla mutace genu *MSTN* spojena s významným nárůstem svalové hmoty a snížením tukové tkáně, kde intramuskulární tuk patří mezi nejdůležitější parametry určující kvalitu vepřového masa. (Matika 2018).

2. Cíl práce

Cílem práce je popsat vztah bodových mutací v genu *MSTN* a slabosti končetin u selat.

3. Literární rešerše

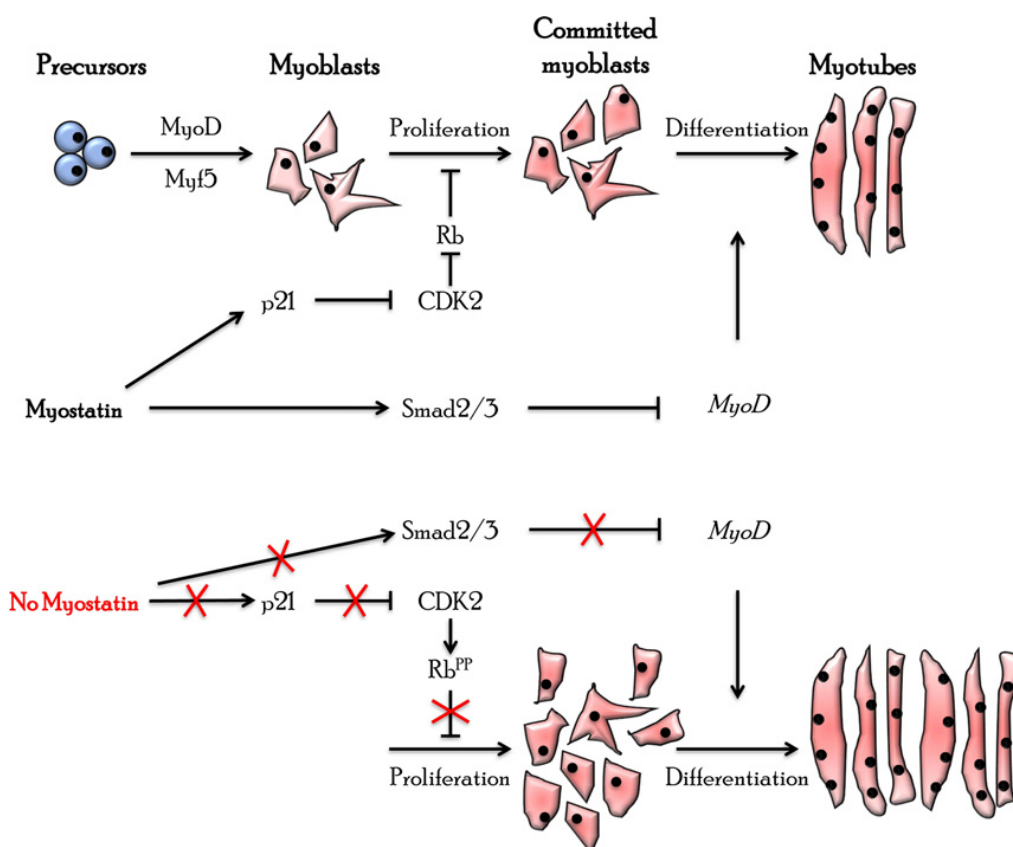
Chov prasat hraje důležitou roli v živočišné výrobě, v níž má své nezastupitelné místo. Primárním produktem je vepřové maso, které pokrývá potřebu kvalitní živočišné bílkoviny ve výživě. V posledních letech se chovatelé zaměřují především na rychlost růstu, ukládání svalů a výnosu libové svaloviny masa, což vede ke snížení kvality masa a ukládání tuku. Obsah intramuskulárního tuku (IVC - intramuscular fat content) je klíčovým ukazatelem systému hodnocení kvality masa. Chovatelé prasat, zejména v Číně se snaží IVC opět navýšit, ačkoli je tento znak vysoce dědivý, cesta k navýšení IVC je obtížná (Wang 2019). Na vývoji svaloviny se podílí mnoho biologických cest a regulačních faktorů, zejména myostatin (MSTN), avšak mutace genu *MSTN* není možné zcela odstranit, protože by mohlo dojít k narušení Hardy - Weinbergovy rovnováhy.

3.1. Myostatin

Myostatin (MSTN) je známý jako růstový a diferenciální faktor 8, začleněný mezi skupinu TGF- β a působí jako negativní regulátor ukládání kosterní svaloviny. MSTN je inhibitor proliferace buněk kosterního svalstva, který působí během embryonálního vývoje, po narození vede ke konečnému stanovení velikosti kosterního svalstva (Grade, 2019). Zvířata s deficitem MSTN vykazují nárůst kosterní svaloviny známé jako "dvojitě osvalení" (double muscling - DBM), tyto mutace byly popsány u mnoha druhů zvířat včetně psů, ovcí, skotu, prasat, ale i u jednoho člověka. Myostatin je exprimován především v kosterním svalstvu. Během evoluce byl gen *MSTN* vysoce konzervován a zahrnuje tři exony a dva introny, *MSTN* exponuje kód pro latentní protein 375 - *aminokyseliny AA*, který prochází posttranslační modifikací s cílem stát se aktivní. Aktivace MSTN receptoru inhibuje aktivita Akt (proteinkináza B), což je hlavní determinant syntézy svalových proteinů a proliferace buněk. Zvětšení velikosti svalových vláken je proces, který se nazývá hypertrofie a je řízen z velké části aktivitou Akt. Myogenní diferenciace je vysoce organizovaný program, který generuje zralé kosterní svalstvo. Svalové prekurzory, které vznikají během embryogeneze se diferencují na myoblasty. Účinek MSTN během proliferace a diferenciace myoblastů (obr. č. 1) (Aiello 2019).

MyoD je důležitým regulátorem exprese MSTN během myogeneze. Protein retinoblastu (Rb) v nízkém fosforylovaném stavu inhibuje buněčné dělení. Aktivita Rb je oslabena v důsledku hyperfosforylace kinázovým účinkem CKD2. Aktivita CKD2 je však inhibována p21, který je indukován působením MSTN. Myostatin aktivuje signalizaci Smad2/3, která inhibuje expresi MyoD, jenž je potřebný pro diferenciaci myoblastů. Při absenci MSTN není aktivita CKD2 inhibována, přičemž dochází k inaktivaci Rb, což vede ke zvýšené proliferaci myoblastů. Současně exprese MyoD již není inhibována signálními cestami Smad2/3, což umožní podpořit diferenciaci mimopočetných myoblastů (Aiello 2018).

Kromě funkce formování kosterního svalstva ovlivňuje myostatin také homeostázu svalové tkáně po narození. MSTN vyvolává regulační účinky v mnoha dalších tkáních, buňkách a je exprimován i ve vnitřních orgánech, proto studie mohou dokázat, že MSTN reguluje i vnitřní orgány (Luo 2019).



Obrázek č. 1 Schéma účinku během proliferace a diferenciaci myoblastů (Aiello 2019).

3.1.1. *MSTN* u prasat

U prasat byli zatím identifikované tři SNP v genu *MSTN*: *T>A*, *G>A* a *C>T* u promotoru intronu 1 a exonu 3. Pouze jedna mutace *MSTN* (*g.383T>A*) byla spojena s vyšším průměrným přírůstkem v období od 60 do 100 kg, kterou vykazovalo plemeno yorkshire. Polymorfismus *g.879T>A* se objevuje pouze u prasat čínského plemene meishan, tato prasata byla generována pomocí technologie nukleázových zinkových prstů ve spojení s přenosem jádra somatických buněk, toto výsledné potomstvo vykazovalo pozoruhodné genotypy DBM, protože normální jedinci plemene meishan mají téměř nulový nárůst svalových vláken. U plemene pietrain byl identifikován polymorfismus *g.447A>G*, který je spojen s expresí prasečím *MSTN* a vyskytuje se na vazebném faktoru 3, který zvyšuje myocyty (MEF3) na negativním vlákně DNA a mutace zaručuje vazebné místo MEF3, což způsobuje svalovou

hypertrofii. Studie dokázali, že přirozeně vyskytující se genetické varianty *MSTN* u prasat nemají významnou souvislost se svalovými genotypy (Aiello 2018).

Table 5 Polymorphisms of the *myostatin* gene in pig.

Breed	Polymorphisms		Reference
	Position	Mutation	
Belgian Pietrain	g.435	G>A	Stinckens <i>et al.</i> (2008)
	g.447	A>G	
	g.879	T>A	
Chinese Meishan	g.879	T>A	Qian <i>et al.</i> (2015)
Yorkshire pig	g.383	T>A	Jiang <i>et al.</i> (2002)

Tabulka č. 1. genetické varianty u prasat (Aiello 2018)

3.1.1.1. *MSTN* u prasat a JUT

Vyšší průměrný denní přírůstek, podíl libového masa a nižší obsah tuku jatečně upravených těl (JUT) prasat zvyšují prodejní zisky živočišných výrobců (Tu 2014) a patří mezi nejdůležitější strategie v chovu prasat (Kang 2017). Integrace molekulárních a kvantitativních genetických strategií poskytuje účinnou metodu pro zlepšení některých důležitých produkčních vlastností. Pro zlepšení růstu a parametrů JUT je nutné odhalit více kandidátních genů a genetických markerů pro použití v MAS (marker assisted selection), aby se zvýšila pravděpodobnost těchto parametrů (Tu 2014).

Zralá forma myostatínu vzniká štěpením N-terminálního propeptidu v místě tetrapeptidu (RSSR). Po dokončení štěpení vstupuje myostatin s propeptidem do krevního oběhu jako latentní komplex. Jakmile se *MSTN* uvolní z propeptidu, může se vázat na extracelulární antivinový receptor typu IIB (actRIIB). ACTRIIB poté aktivuje fosforylaci Smad2/Smad3 kinázou 4 anktivinového receptoru, nebo kinázou 5 aktivinového receptoru. Fosforylovaný Smad2/Smad3 se přemístí do jádra, aby působil jako transkripční faktor. Nakonec *MSNT* inhibuje proliferaci a diferenciaci myoblastů (Tu 2014).

Mnoho studií potvrdilo, že jeden z polymorfismů v oblasti promotéru *MSTN* je spojen s hladinou exprese genu *MSTN* a hypermuskularitou u plemene pietrain, která byla zjištěna až u 20% jedinců. Studie pracovali s různými metodami, mezi něž patří například úprava genomu s přenosem jader somatických buněk (SCNT), které úspěšně vygenerovala 18 homozygótních kanců, kteří byli tzv. *MSTN-KO* (knokautovaný *MSTN*), což znamená, že k transkripci prasečího fetálního fibroblastu (PFF) byl vytvořen a následně použit transkripční

aktivátorový pár efektové nukleázy (TALEN) zaměřený na exon 1 prasečího genu *MSTN*. Studie získala buněčnou linii, která se skládá z delece 2bp v jedné alele a delece 4bp v druhé alele. Při molekulárních testech se zjistilo, že tato mutace genu *MSTN* byla funkční a kanci vykazovali svalovou hypertrofií a nadměrné přerůstání kosterního svalstva, následkem byl duplikovaný fenotyp dvojitého osvalení a kanečci uhynuli do 4 dnů po narození (Kang 2017).

3.1.1.2. *MSTN* u prasat a vnitřní orgány

Zvířata s mutacemi genu *MSTN* vykazují kromě svalové hypertrofiie a redukce tukových tkání také morfologické změny vnitřních orgánů. *Myostatin* reguluje různé typy tkání buněk a u prasat je především exprimován v přední hypofýze. Doposud studie zkoumala srdce, játra, slezinu, plíce a jazyk u selat *MSTN* $-/-$ a *MSTN* $+/-$ a selaty divokého typu prasat (*WT*) (Luo 2019).

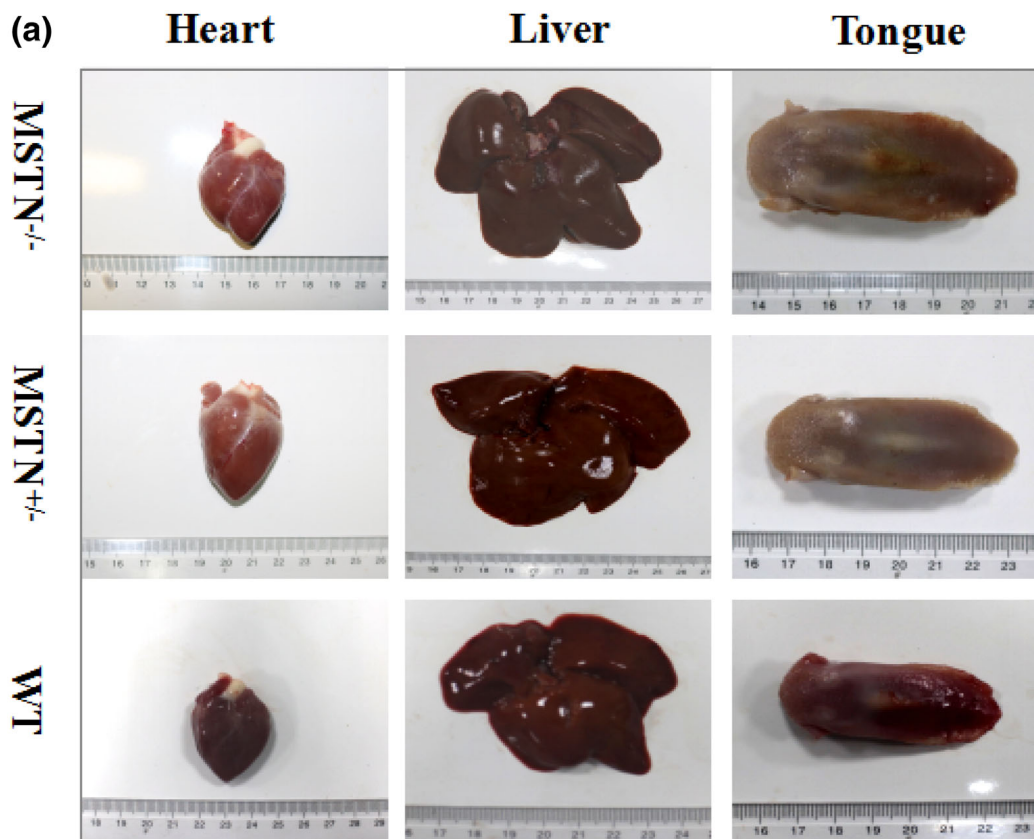
WT	TTCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGA	
<i>MSTN</i> $^{-/-}$	TTCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTG--AACAGCTCCTAACATTAGCAAAGA	2 bp del
	TTCAAATCCTCAGTAAACTTCGCC----AACAGCTCCTAACATTAGCAAAGA	4 bp del
<i>MSTN</i> $^{+/-}$	TTCAAATCCTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGA	
	TTCAAATCCTCAGTAAACTTCGCC----ACAGCTCCTAACATTAGCAAAGA	5 bp del

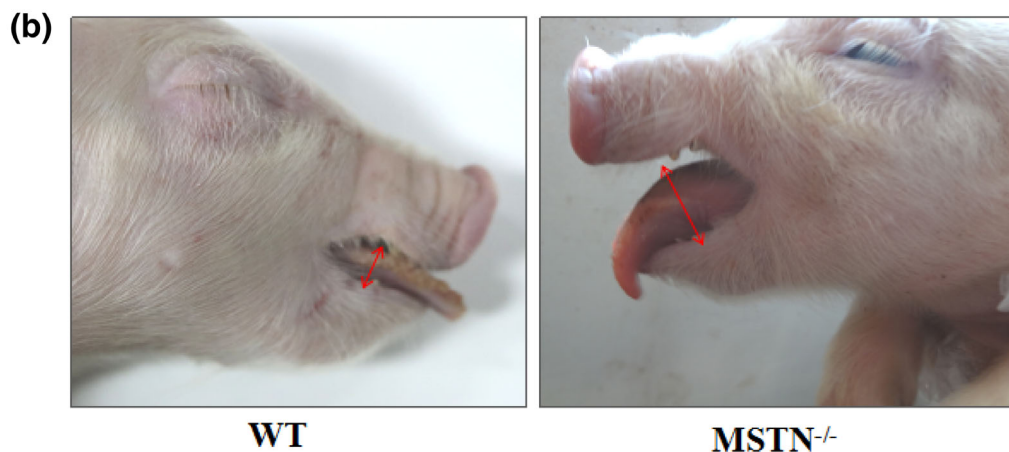
Tabulka č. 2 sekvencí mutace genu *MSTN* v jednotlivých typech selat (Luo 2019).

Metodou SNCT bylo vyprodukováno celkem 23 samců od čtyř prasnic. 13 samců bylo *MSTN* $+/-$ a 10 samců *MSTN* $-/-$ (viz. tabulka č. 3). Jazyk byl výrazně větší u selat *MSTN* $-/-$ než u selat *MSTN* $+/-$ a *WT* ve stáří 2 dnů, avšak velikosti jiných orgánů se tolik nelišily (obrázek č. 2). Hmotnosti se lišily u selat *MSTN* $-/-$ oproti *MSTN* $+/-$ a *WT*. Srdce bylo lehčí u selat *MSTN* $-/-$ než u dvou dalších typů selat, játra u *MSTN* $+/-$ nejtěžší, u selat *MSTN* $-/-$ byla játra nejlehčí. Hmotnost plic a žaludku byla u selat *MSTN* $-/-$ lehčí než u *WT*. Jazyk byl u selat *MSTN* $-/-$ nejtěžší, hmotnost sleziny a ledvin se nijak nelišila (Luo 2019).

Table 2. Generation of MSTN ^{-/-} and MSTN ^{+/-} piglets by somatic cell nuclear transfer				
Donor cell	Recipient	No. of embryos transferred	No. of piglets born alive	Birth weight of piglets (kg, mean ± SEM)
MSTN ^{-/-}	S1	235	6	0.94 ± 0.07
	S2	260	4	1.22 ± 0.25
MSTN ^{+/-}	S3	206	5	1.16 ± 0.15
	S4	258	8	1.55 ± 0.21

Tabulka č. 3 počty embryí a počet narozených selat pomocí SCNT (Luo 2019).





Obrázek č. 2. porovnání orgánů jednotlivých typů selat (Luo, 2019).

Snížením hmotnosti plic u DBM zvířat může negativně ovlivnit respirační funkce a zvýšit výskyt respiračních onemocnění. Menší srdce snižuje srdeční činnost a spolu s menšími plicemi kapacitu i rezervu kyslíku. Zvířata s DBM vykazují snížené systolické a diastolické hodnoty a mají predispozice k alveolární hypoxii a hypoxemii. Při namáhavější aktivitě se zvířata rychleji vyčerpají a následkem může být smrt. Menší žaludek a játra mohou ovlivnit příjem potravy, protože bylo odhaleno, že zvířata s DBM přijímají výrazně nižší objem krmiva, proto je důležité, aby byla zvířatům s DBM poskytována pozornost při krmení a zároveň je nutné zajistit vhodné chovné techniky a způsob chovu (Luo 2019).

3.2. Dvojité muskulární fenotypy

Hypertrofie je zvětšení svalů na hrubé anatomické úrovni, které vykazují příslušníci velkých savců. V mnoha případech dochází ke zvětšení svalů výhradně v prenatálním období svalovou hyperplazií bez postnatální hypertrofie. Svaly s větší povrchové plochu bývají nejvíce zvětšené, hlubší svaly mají tendenci být zmenšeny v porovnání s normálním svalem. Velká hospodářská zvířata, zejména skot, mají vysoký výnos pro jatečně upravená těla, což se shoduje se sníženou hmotností vnitřních orgánů. Tato zvířata jsou náchylná k respiračním onemocněním, kulhání, horku a stresu. Hypertrofie také může ovlivnit reprodukci, kde ve většině případů dochází ke ztížení porodům, právě kvůli DBM, protože potomci mají větší porodní hmotnost.

3.2.1. Mutace genu *MSTN* u skotu

Svalová hypertrofie u belgického modrého skotu byla poprvé popsána v 80. letech, bylo prokázáno, že DBM se dědí jako jeden hlavní autozomální lokus, který je ovlivněn několika dalšími lokusy. Ztráta funkce mutace *MSTN* u belgického modrého skotu se nachází na 2. chromozomu, studie také objevily chybnou mutaci v exonu 3. Bylo identifikováno zhruba 20 různých genetických variant. Některé varianty vyvolají svalovou hypertrofií inaktivací genu. Variantní alely a neaktivní *MSTN* souvisí s rychlostí růstu a oblíbenými rysy jatečně upravených těl (JUT), tyto polymorfismy se používají ke zvýšení kvality a množství masa. Z pohledu produkce masa je to vynikající vlastnost, protože zvířata produkují více masa, které je libovější a jemnější, avšak díky sníženému tuku a vyššímu podílu svalové hmoty dochází k citlivosti. Problémy spojené s dystokií (problémový porod) jsou často pozorované u DBM, protože před narozením se projevuje hyperplazie, která vede k většímu počtu telat.

Homozygotní zvířata s DBM vykazují větší výskyt dystokie, než u zvířat heterozygotních. Pro snížení těchto problémů a snížení mortality telat je vhodné zvážit křížení homozygotů s heterozygoty. Souhrn genetických variant viz. tabulka č. 4. (Aiello 2018)

3.2.1.1. Plemena skotu s dvojitým osvalením

Plemeno, u kterého byla hypertrofie analyzována nejrozsáhleji, je plemeno belgické modré. Studie odhalily delece *11bp* (gen *821 - 831del11*) v otevřeném čtecím rámci belgické modré *MSTN* alely, která má na svědomí ztrátu tří aminokyselin (275, 276 a 277) a posun recesivní AA 274, který vede k zastavení kodonu po recesivní AA 287. Velikost svalových vláken belgického modrého je menší než u ostatních plemen, obsahuje méně kolagenu a pojivové tkáně. Obsah tuku v JUT je výrazně nižší než u normálních zvířat, zejména intramuskulární tuk (IFC) je ovlivněn fenotypem DBM se silnou redukcí podkožních a vnitřních tukových tkání. Výsledky mnoha studií dokázaly, že *MSTN* se podílí nejen na myogenezi, ale také na adipogenezi. Delece a inhibice *MSTN* vede ke zvýšení svalové hmoty a zároveň ke snížení tukové tkáně. Zkřížení belgického modrého s ostatními plemeny, vykazuje zjevný účinek i u heterozygotů.

Stejná mutace byla zjištěna také u španělského plemene skotu asturiana de los valles. U plemene piemontese je genotyp BDM dědičné onemocnění spojené se substitucí *c. 938>A* ve třetím exonu. Tato mutace mění funkci *MSTN*, což narušuje disulfidový most, který je nezbytný pro správnou konformaci proteinu. U tohoto plemene je DBM sledováno u více než 96% populace, ovšem variabilita svalové hmoty je vždy přítomna. Studie dokázaly, že fenotyp BDM, částečně recesivní znak, způsobuje velké účinky na konformaci JUT bez negativního vlivu na otelení ve srovnání se zvířaty bez kopií mutované alely.

U plemene marchigiana jsou také pozorovány tyto mutace, ovšem ty jsou způsobené v exonu 3 *g.847G>T* v *MSTN*. V tomto plemeni genotypy *MSTN* poskytují tři různé fenotypy.

Homozygótní jedinci s genotypem *G/G* vykazují normální genotyp, jedinci s genotypem *T/T* se projevují jako DBM se svým malým tělem a jsou vystavení riziku kostních defektů a vážným problémům s přežitím v důsledku makroglozie, hypoplazie srdce, plic a dalších orgánů. Jedinci s heterozygótním genotypem *G/T* vykazují svalnaté a velké tělo, bez jakékoli výše uvedené vady, maso vyazuje lepší kvalitu, proto se využívají v křížení (Aiello 2018).

Table 1 Polymorphisms of the *myostatin* gene in cattle.

Breed	Polymorphisms		Reference
	Position	Mutation	
Asturiana de los Valles	c.821	del11	Grobet <i>et al.</i> (1997)
Belgian Blue	c.821	del11	McPherron & Lee (1997)
Blonde d'Aquitaine	c.821 g.3811	del11 T>G	Kambadur <i>et al.</i> (1997) Bouyer <i>et al.</i> (2014)
Charolaise	c.610	C>T	Kambadur <i>et al.</i> (1997)
Gasconne	c.938	G>A	Kambadur <i>et al.</i> (1997), Dunner <i>et al.</i> (2003)
Limousine	c.821	del11	Kambadur <i>et al.</i> (1997)
	c.610	C>T	Cappuccio <i>et al.</i> (1998)
	g.433	C>A	Sellick <i>et al.</i> (2007)
Maine-Anjou	c.419	del-7-ins10	McPherron & Lee (1997)
	c.676	G>T	Grobet <i>et al.</i> (1997)
Marchigiana	g.874	G>T	Cappuccio <i>et al.</i> (1998)
Nellore	g.76	A>T	Grisolia <i>et al.</i> (2009)
	g.111	G>T	
	g.267	A>G	
	g.374	del16	
	g.414	C>T	
	g.420	T>G	
	g.433	A>T	
	g.445	A>T	
	g.527	T>A	
	g.641	G>A	
	g.694	G>A	
	g.840	A>G	
	g.951	T>G	
	g.1083	C>T	
Parthenoise	c.821	del11	Kambadur <i>et al.</i> (1997)
Piedmontese	c.938	G>A	Kambadur <i>et al.</i> (1997)
Rubia Gallega	c.821	del11	Kambadur <i>et al.</i> (1997)

Tabulka č. 4 Souhrn dalších genetických variant u skotu (Aiello 2018)

3.2.2. Mutace genu *MSTN* u ovcí

Gen *MSTN* se nachází u ovcí na konci dlouhého ramene druhého lokusu *2q32* druhého chromozomu. Bylo zjištěno 77 *MSTN* SNP u různých plemen ovcí a většina SNP se nachází v nekódovaných oblastech genu. Výjimkou je delece *1bp* v norských bílých ovcích a *1bp* inzerce v ovcích rommey. Souhrn genetických variant u ovcí jsou uvedeny v tabulce č. 5 (Aiello 2018).

3.2.2.1. Plemena ovcí s dvojitým osvalením

Texel, toto belgické plemeno vykazuje zvětšení svalových vláken, proto lze říci, že mají hypertrofii, avšak analýza genu *MSTN* neodhalila žádné nukleové rozdíly v oblastech kódování mezi DBM a normálními zvířaty. To naznačuje, že genetické variace nacházející se mimo oblasti kódování hrají důležitější roli v regulaci vývoje svalů, narozdíl od skotu, kde byly nalezeny ztráty v rámci kódovacích exonů (Aiello, 2018). Kvantitativní analýza pokusů u ovcí zjistila, že u plemene texel se vyskytuje varianta *g.6723G>A* v *30-UTR*, což je nepřeložená oblast *MSTN* na druhém chromozomu, jež má vliv na svalovou hmotu. Vytváří se místo pro *miR1* a *miR206*, mikroRNA, které jsou exprimovány v kosterním svalstvu (Aiello 2018).

Fenotyp DBM u norských bílých ovcí byl popsán jako nadměrný vývoj svalové hmoty, zejména na zadních končetinách. U tohoto plemene byla nalezena stejná mutace jako u ovce texel, ale s méně hlubokým účinkem (Aiello 2018).

Table 2 Polymorphisms on *Myostatin* gene in sheep.

Breed	Polymorphisms		Reference
	Position	Mutation	
Texel	g.6723	G>A	Kijas <i>et al.</i> (2007)
	g.391	G>T	
	g.2449	C>G	
	g.2379	C>T	
	g.1405	A>T	
	g.1402	G>A	
	g.1214	C>T	
	g.1129	C>T	
	g.41	A>C	
	g.39	T>C	
	g.474	C>T	
	g.613	T>C	
	g.616	G>A	
	g.619	T>C	
	g.622	T>C	
	g.632	G>T	
	g.696	C>T	
	g.3135	C>T	
	g.4036	A>C	
g.4044	C>T		
Norwegian	c.960	del1	Wang <i>et al.</i> (2016)
White Sheep	c.2360	G>A	
New Zealand Romney	c.101	G>A	Kijas <i>et al.</i> (2007), Wang <i>et al.</i> (2016)
	c.-959	C>T	
	c.-784	A>G	
	c.373+18	A>G	
	c.373+563	A>G	
	c.373+607	G>A	
	c.374-654	T>C	
	c.374-54	T>C	
	c.748-54	A>G	
	c.*83	A>G	
	c.*455	C>A	
	c.*709	insA	
	c.*123A	T>G	
	c.-2449	G>C	
c.-2379	T>C		
Charollais	c.*123A		Kijas <i>et al.</i> (2007)
White Suffolk	c.*123A		Kijas <i>et al.</i> (2007)
Poll Dorset	c.*123A		Kijas <i>et al.</i> (2007)
Lincoln	c.*123A		Kijas <i>et al.</i> (2007)
Indian sheep	c.539	T>G	Pothuraju <i>et al.</i> (2015)
	c.821	T>A	
Stavropol Merino	c.373 + 396	T>C	Trukhachev <i>et al.</i> (2018)
	c.374-362	A>T	
	c.374-16	delT	
	c.747 + 185	C>A	
	c.748-194	C>A	
c.782_783	insT		

Tabulka č. 5 souhrn genetických variant u ovcí (Aiello 2018).

3.2.3. Mutace genu *MSTN* u koní, králíků a drůbeže

Mutace genu *MSTN* byly identifikovány u koní se závodním genotypem, který ovlivňuje jejich závodní výkonnost a proporce svalových vláken. Bylo sekvenováno celkem 16 plemen koní a bylo odhaleno sedm SNP: dva přechody (polymorfismy) v promotorové oblasti 646 (*GQ183900:g.26T>C*), který byl polymorfní u šesti plemen s vyšší frekvencí alely *g.26C*, a 156 (*GQ183900:g.156T>C*), který byl zjištěn u jedenácti plemen například u plemene hafling, nebo norik v homozygotním stavu. Dalších pět SNP bylo identifikováno v intronech (čtyři byly lokalizované v intronu 1 a jeden v intronu 1). Jeden z polymorfismů na intronu 1 (*g2115A>G*) je spojen se schopností sprintu u závodních koní, kterým se doposud věnují čínské studie a zatím odhalily 6 různých SNP v *MSTN*, především zjistili, že se jedná o substituce. Nedávné studie prokázaly, že americké plemeno koně quater horse vykazuje inzerci genu *MSTN* a ovlivňuje proporce svalových vláken (Aiello 2018).

U králíků byla zkoumána variabilita polymorfismů *MSTN* na znaky produkce. Byly objeveny čtyři SNP pomocí metody sekvenování genomu u 14 plemen s různou konformací a svalovou hmotou. Jednalo se o vzácný SNP v exonu 1 (*c.108C>T*), SNP v exonu 2 (*c.713T>A*) a SNP v 30-UTR (*c.194A>G*). Korelační analýza ukázala, že SNP byl spojen se zvýšením hmotnosti jater a JUT (Aiello 2018).

U drůbeže se gen *MSTN* podobně jako u savců skládá ze tří exonů (373, 374 bp a 1567 bp) a dvou intronů. Ukázalo se, že u drůbeže *MSTN* reguluje nejen vývoj kosterního svalstva, ale také se podílí na metabolismu a dispozici tukové tkáně. Čínská studie Ye et al. (2007) studovala souvislost *MSTN* polymorfismů s úmrtností, růstem, konverzí krmiva, ultrazvukovou hloubkou prsu, procentuální hmotností prsu, JUT, defekty nohou a hladinou kyslíku v krvi. Výsledek odhalil 14 SNP. Jako hlavní funkce *MSTN* je regulace růstu kosterního svalstva, SNP *g.4842T>G* je spojen se změnou aminokyseliny v *MSTN* a mohl by být zodpovědný za variability v tělesné hmotnosti. Dále byly zkoumány i kachny, kde tři různé SNP výrazně ovlivňovali především tloušťku prsního svalu a svalovou hmotu na nohou (Aiello 2018).

3.3. Molekulární genetika

Nejdynamičtěji rozvíjejícím se vědním oborem o živé přírodě současně je a v nejbližší době ještě bude je molekulární biologie. Její propojení s genetikou přináší kromě mnoha nových teoretických poznatků také přímé praktické aplikace v biotechnologiích, v lidské a veterinární medicíně, fytopatologii a ve šlechtění zvířat a rostlin. Molekulární genetiku lze

rozdělit na tři navzájem se doplňující oblasti: genové inženýrství, DNA diagnostika a polymorfismus, mapování genomu. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA) jsou makromolekuly, které obsahují genetickou informaci. (Hovorková, 2019) Nukleové kyseliny jsou nositeli genetické informace, ale samy o sobě nejsou schopny množení. Základními stavebními kameny jsou mononukleotidy, složené z cukru pektózy, fosfátu a z dusíkatých bází. Nosnou kostrou nukleových kyselin jsou polynukleotidové řetězce, kde se střídají cukry s fosfátem (Hruban & Majzlík, 2002).

3.3.1. Genetické markery

Genetické markery jsou velice důležité pro analýzu genomu a umožňují zadržování dědičných rysů se základními genovými variacemi. Během posledních let se rozvinula technologie a zároveň i dvě formy genetických markerů: jednoduché sekvenční opakování (SSRs - Simple Sequence Repeats) a jednonukleotidové polymorfismy (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms). Jedná se o rychlé a levné identifikování v DNA a mohou se široce využívat v genetice. Používají se například k detekci alel spojených s onemocněním, mapováním homogenity, sekvenováním genomu nebo k určení genetické diverzity populace.

Velmi pozitivní rozvoj se uplatňuje v chovu hospodářských zvířat a v šlechtění pomocí selekce podporované markery (MAS). MAS je metoda závislá na molekulárních markerech a umožňuje chovatelům výběr rodičovských genotypů, zároveň odstraňuje vazbovou zátěž a výběr vlastností, které jsou těžce zjistitelné z fenotypu. MAS umožňuje chovatelům dosáhnout požadovaných cílů určitých vlastností, může dojít ke zvýšení či snížení frekvencí alel, popřípadě její úplné odstranění (Duran et. al 2009).

3.3.1.1. Kandidátní geny

Analogie mezi genomy prasat a jiných savců, především člověka, se využívá už téměř 20 let k předvídaní umístění genů a k rozeznání kandidátních genů pro důležité znaky u prasat. První případ, kdy byl tento postup úspěšně použit, byla identifikace genu *RYS1* na *Sus Strofa Chromosome 6* (chromozóm SSC6) (Hovorová 2019).

Kandidátní geny pro gen *MSTN* u prasat se soustředí především dvěma směry: prvním z nich je slabost nohou a druhým směrem je obsah intramuskulárního tuku a svalové tkáně. Slabost nohou u selat je hlavní příčinou kulhání, které má zásadní dopad na životní podmínky zvířat a dále na hospodářské problémy s produkcí prasat. Studie odhalila vysoký výskyt syndromu slabosti nohou u komerčních bílých linií prasat, kde byl použit postup založený na výpočtu rozptylů k posouzení genetického základu onemocnění. K posouzení genetických parametrů a způsobu dědičnosti tohoto syndromu byly použity analýzy různých složek. Mapování homozygoty bylo použito k identifikaci oblastí spojených se syndromem slabosti

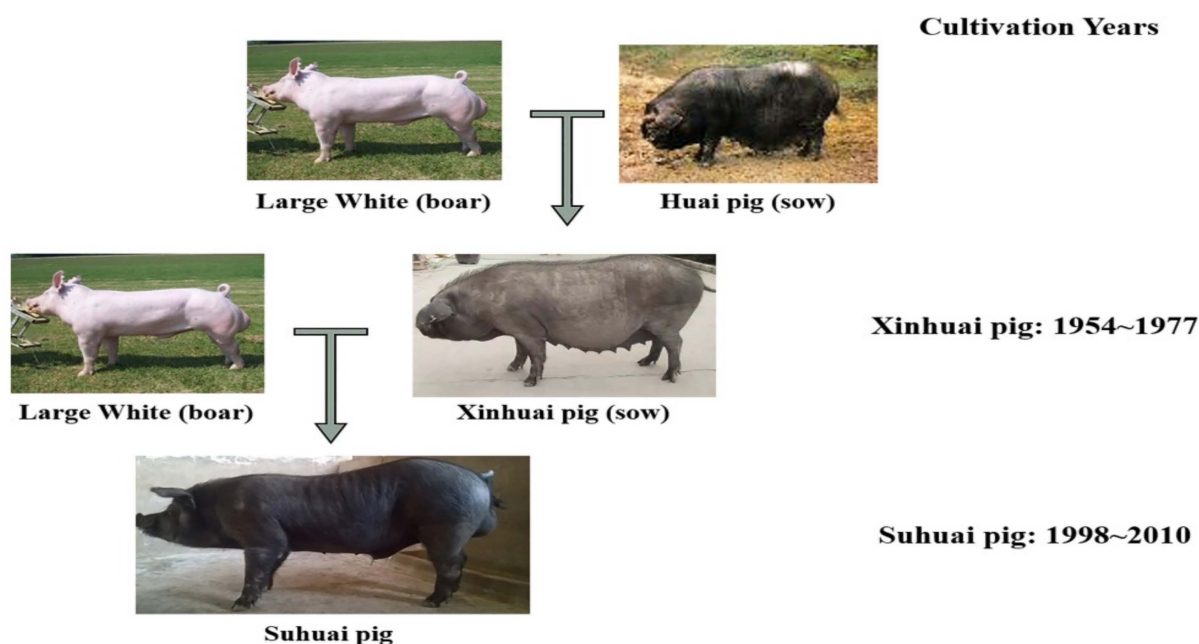
nohou na *SSC15*, po kterých bylo použito resekvenování celého genomu postižených a kontrolních zvířat k identifikaci kandidátské příčinné mutace, která má za následek předčasné zastavení kodonu v exonu 3 prasečího *MSTN* lokusu. Tato kandidátní mutace v *MSTN* byla při narození v Hardy - Weinbergově rovnováze, ale u zvířat se hmotností 110 kg se výrazně zkrátila (Matika 2018). V heterozygótní formě byla mutace *MSTN* spojena se zvýšením svalové hloubky tkání a zároveň snížením obsahu tuku, což vysvětluje 31%, respektive 18% genetické variace. *MSTN* ablace u prasat je spojena s problémy přežitím a kulháním selat, ačkoli je tato mutace škodlivá, protože většina selat nepřežije do 40 kg živé hmotnosti, byla zachována kvůli selekci pro zvýšení podílu svaloviny, která se taktéž spojuje s heterozygoty. Studie prokázaly, že u prasat nedochází k narušení mutací *MSTN* navzdory intenzivní selekci pro růst svaloviny a jejich poměrně vysoké frekvenci u jiných druhů (Matika 2019).

Obsah intramuskulárního tuku (IFC) je klíčovým ukazatelem systému hodnocení kvality masa a souvisí s chutí, šťavnatostí, jemností a schopností udržet vodu masa. Mezi hlavní složky IFC patří fosfolipidy a triglyceridy, jejichž zvýšení přispívá ke zvýšení IFC. IFC se může zlepšovat dvěma chovatelskými metodami: marker - assisted selection (MAS) a genom selection (GS), avšak metoda GS klade vysoké finanční náklady, které většina chovatelů není schopna pokrýt. Tak se metoda MAS stává atraktivnějším přístupem pro zlepšení IFC. Studie odhalily několik (dosud konkrétně 12) kandidátních genů a kauzálních mutací pro IFC, například *FABP3* (*rs1110770079*), *LIPE* (*rs328830166*), *IGF1* (*rs322131043*), *IGF1* (*rs341412920*), *IGF2* (*g.3072G>A*), *LEP* (*rs45431504*), *LEPR* (*rs45435518*), *MC4R* (*rs81219178*), *PHKG1* (*rs697732005*), *RETN* (*rs327132149*), *RYR1* (*rs344435545*), *SCD* (*rs80912566*) a *UBE3C* (*rs81329544*). Fenotypová korelace mezi tloušťkou hřbetního sádla (BF) a IFC je střední a pozitivní. Zvýšení IFC je zároveň pozitivní pro BF. Zvýšená BF by mohla vést ke snížení procentuálního podílu libového masa, což negativně ovlivňuje výtěžnost libového masa. Proto je nutné najít SNP, které by mohly zvýšit IFC a naopak nezvyšovat BF (Wang 2019).

3.3.1.1.1. Nové plemeno prasat suhuai

Prase suhuai je nové plemeno libového typu, které bylo získáno po 12 letech křížení a obsahuje 25% čínských prasat huai a 75% velkých bílých prasat (obrázek 2.). Prasata tohoto plemene jsou distribuována ve více než 20 provinciích v Číně a existuje více než 10 000 prasnic tohoto plemene, které produkují přes 12 000 tun vepřového masa ročně. Podíl libového masa v JUT tvoří zhruba 57% a průměrný denní přírůstek je 660 g od 30 do 90 kg. Prase huai má vysokou kvalitu masa a vysokou toleranci píce, také relativně vysoký IFV. Velké bílé prase je komerční plemeno, které je známo pro své libové JUT a rychlý růst, avšak vykazuje nižší schopnost ukládání tuku. Prase suhuai má vysokou krmnou toleranci od prasete huai a vysoký podíl svaloviny v JUT a rychlý růst od prasete large white. IFV je ovlivněno mnoha faktory: dědičnost, výživa, welfare a způsob krmení. Vzhledem k vysoké dědičnosti IFV se spekuluje, že odchylka IFV u prasat suhuai je způsobena jen genetickými

faktory, proto je prase suhuai vhodným genetickým materiálem pro identifikaci genetických markerů pro IFV (Wang 2019).



Obrázek č. 3 proces šlechtění nového plemene prasat suhuai (Wang 2019).

3.3.1.2. Polymorfismus

Polymorfismus je definován jako rozdíl v DNA sekvenci mezi jednotlivci, skupinami nebo populacemi, které zahrnují SNP (jednonukleové polymorfismy). Opakování sekvence, inserce, delece a rekombinace genů, vznikají následkem náhodných procesů během embryogeneze či virové infekce. Změny DNA se označují jako mutace, v případě změn polymorfismů hovoříme o variantách. Polymorfismy můžeme rozdělit do tří skupin: tandemové, repetice a bodové polymorfismy. Detekce se provádí pomocí různých molekulárně genetických metod jako jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), restriční délka fragmentů polymorfismů (RFLP), sekvenováním celého genomu (Hovorková 2019).

3.3.1.3. SNP

SNP (jednonukleové polymorfismy) jsou nejrozšířenějším zdrojem polymorfismů v genetice. Jedná se o změny v jedné bázi mezi dvěma jedinci v definované oblasti. Dělíme je do tří následujících kategorií: bodová mutace pouze mezi purinovými nebo piridinovými

bázemi (C/T nebo G/A), transverze, inserce a delece. SNP jsou stabilní a nemění se z generace na generaci, mohou ovlivnit až 22% fenotypové variability (Hovorková 2019).

3.3.2.. Molekulární genetické metody

3.2.2.1. Izolace DNA

Izolovat DNA je teoreticky možné z jakékoli tkáně, která obsahuje buňky s jádrem. Ve většině případů izolujeme DNA, která je přítomna v nitrobuněčném obsahu. Pokud se ve vzorku nachází více druhů buněk je možné buňky separovat, například centrifugací (Schmidtová 2012). V praxi se běžně používá krev nebo čerstvé, mražené či jinak izolované tkáně. Pro každý vzorek i typ tkáně je postup jasně daný, u všech metod jsou základní kroky v procesu izolace DNA, jimiž jsou: lýza buněk, odstranění bílkovin a buněčných zbytků, umístění DNA do roztoku (Hovorková 2019).

3.3.2.2. Gelová elektroforéza

Tato metoda patří mezi nejúčinnější způsoby separace fragmentů DNA různých velikostí. Metoda je založena na pohybu záporně nabitých molekul DNA, jejíž elektrické pole směřuje k anodě. Nejčastěji se provádí na nosiči (gelu, který se získává z mořských řas rodu *Gelidium*), který je tvořen systémem polymorfních molekul s póry, jimiž se molekuly DNA pohybují různou rychlostí v závislosti na délce (kratší řetězce se pohybují rychleji, než dlouhé řetězce) (Schmidtová 2012). Gel se připraví o koncentraci 0,5 - 2 % dle velikosti fragmentů DNA. Do jamek se nanese DNA, v jamkách se nachází již pár *TAE*. Fosfátové řetězce DNA, obsahují záporně nabitě molekuly, které migrují ke kladně nabitě anodě, při čemž dochází k oddělení (Hovorová 2019).

3.3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) umožňuje velmi rychlé zmnožení určité DNA sekvence (genu). Zmnožený DNA segment se v této metodě nevkládá do žádného vektoru ani hostitelské buňky. PCR je bezbuněčný postup, ve kterém se využívá účinek DNA polymerázy, která připojuje jednotlivé nukleotidy na zvolený úsek, který chceme amplifikovat. Začátek syntézy řetězce začíná od primeru, jež je připojen na denaturované vlákno DNA. Délka syntetizovaného segmentu je dána druhým průměrem na kompletním vlákně. Metoda PCR probíhá ve třech fázích střídáním teploty:

1. fáze je rozvlhnutí DNA, denaturace krátkým ohřátím nad 95 °C.

2. fáze je připojení primářů, krátké snížení teploty na 40 - 50 °C, průměry se vodíkovými můstky napojí na komplementární úseky DNA.

3. Syntéza komplementárního úseku vymezeného průměry, zvýšení teploty na 70 °C. Po této fázi se postup vrací k 1. fázi.

Tyto cykly se mohou opakovat, protože PCR směsi jsou v nadbytku, při častějším opakování získáme více klonů DNA (Hruban & Majzlík, 2002).

3.3.2.4. RFLP

Restriction fragment length polymorphism - polymorfismus délky restričních fragmentů je metoda určená k získávání nejčastěji používaných DNA markerů. Pomocí restričních enzymů, které dokáží rozpoznat sekvence v DNA a katalyzovat endonukleolytické štěpení, získají se fragmenty definovaných délek, které můžeme zobrazit pomocí elektroforézy. Během evoluce došlo ke změnám buď bodovými mutacemi, inzercí nebo delecí. Novější metoda je RFLP-PCR, která kombinuje PCR a RFLP, výhodou této metody je menší náročnost, možnosti využití méně koncentrované DNA a lepší určení místa mutace (Hovorková 2019).

3.4. Jedna ze zásadních studií slabosti končetin u prasat

Prozatím jediná studie zabývající se touto problematikou. Vzhledem k její aktuálnosti a jedičnénosti ji zde věnuji samostatnou kapitolu.

3.4.1. Zvířata

Od roku 2007 do roku 2010 bylo shromážděno 19006 selat, během těchto let byl u selat zjištěn syndrom slabosti končetin. V roce 2011 byl odebrán vzorek DNA u dalších 119 selat a v roce 2012 u 486 selat ze stejné populace, z nichž vykazovalo 384 selat hmotnostní a jatečně upravené fenotypy. Slabost nohou je u zvířat byla u vizuálně posouzena jako normální nebo ovlivněná (0/1). Vada končetin je charakterizována tím, že sele není schopno narovnat nohy a stát, nejvíce je patrná u předních nohou, sele není schopno sát mateřské mléko, proto tyto problémy u selat většinou končí smrtí hladem, nebo zalehnutím prasnici. Tam, kde výsledek vedl ke špatným životním podmínkám selete, bylo mládě v souladu s etickým prohlášením utraceno. (Matika 2019).

3.4.1.1. Homozygotní mapování recesivní mutace

Deset postižených zvířat z různých vrhů a 10 kontrolních vzorků bylo genotypováno pomocí čipu Illumina PorcineSNP60 SNP. Zachovány byly pouze SNP, které byly zmapovány do známých pozic na autozomálních chromozomech a nebyly heterozygótní. Zbývalo 38570 segregáčních autozomálních SNP pro použití v homozygotním mapování. Oblasti homozygotní byly posuzovány podle sladění s referenční sekvencí Sscrofa 11 (Matika 2019).

3.4.1.2. Histologická analýza

Vzorky bicepsu byly odebrány z jednoho selete *MSTN* knockoutovaného homozygotů (*TT*) a jednoho selete heterozygotního (*TG*) a byly fixovány do 10 % neutrálního formalinu. Po 24 hodinách fixace byly tkáně zpracovány na parafínových blokách a odebralo se 4 μm části a byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Jeden snímek byl pořízen u obou zvířat v oblasti, kde se myofibrily rozdělovaly příčně. Pro analýzu obrazu byly snímky načteny do systému FIJI a krev z každého snímku byla odstraněna. Poté následovaly dvě binární funkce pro vyplnění otvorů a odvodnění, výsledný vzorek byl měřen pomocí analyzátoru, který analyzuje částice menší než 5 μm^2 . Velikost myofibrilů byla porovnávána mezi oběma vzorky pomocí Mann - Whitneyho testu k posouzení hypertrofie. Pro pozouzení hyperplazie byl celkový počet myofibrilů vyjádřen jako počet myofibrilů na 100 μm^2 . V tabulce č. 6 jsou výsledky porovnání mezi *TG* a *TT*. (Matika 2019)

Genotype	Period of measurement		
	Birth	up to 40Kg	At 110Kg
GG	293	259	169
TG	162	126	90
TT	25	1	0
Total	480	386	259
p	0.78	0.83	0.83
q	0.22	0.17	0.17
χ^2	0.18	12.51	11.45
α	0.0193	-0.1800	-0.2103

Tabulka č. 6 porovnání výsledků histologické analýzy (Matika, 2019).

3.4.2. Výsledky

Cílem této studie či pokusu bylo zjistit způsob dědičnosti syndromu slabosti končetin, kde se mutace genu *MSTN* nachází a co způsobuje. Dále odhalit kandidátní variantu této mutace, rozdíly mezi různými fenotypy.

Syndrom slabosti končetin prasat byl identifikovaný v komerční linii velkých bílých prasat, kde vykazoval střední až vysokou dědivost. Komplexní Bayesova segregáčnická analýza odhalila, že se jedná o recesivní dědičnost tohoto syndromu. Mapování homozygoty zjistilo, že segment 8,3 Mbp na chromozomu 15 SSC15 je oblast, která obsahuje příčinnou variantu mutace. Obsahuje 55 SNP, které byly homozygotní u postižených zvířat, avšak mohlo dojít i k pochybení u jednoho zvířete, které bylo zdravé a mělo oblast, kde se vyskytuje příčinná varianta. Syndrom slabosti nohou není sám o sobě smrtelný, ale v konkrétních podmínkách chovu byl vysilující a postižená zvířata buď byla zalehnuta prasnicí a nebo nedokázala přijmout mateřské mléko od prasnice. Funkční kandidátní varianta byla objevena díky sekvenování celého genomu, kde se zjistilo předčasné zastavení kodonu v exonu 3 *MSTN*, které má za následek nahrazení kodonu kyselinou glutamovou stop kordonem v exonu 3 na pozici 274 (*c.820G>T*). Mutace je se nachází v oblasti, která je vysoce konzervovaná a předpokládá se, že výsledkem je zkrácení proteinu. Tato varianta (*c.820G>T*) byla při HWE výrazně narušena v období od 40 kg do 110 kg, protože došlo k úhynu homozygotů, kteří byli zmutováni Tato změna je kvantitativním důkazem selektivního vymizení homozygotních genotypů narozdíl (úmrtnost homozygotů byla náhodná s ohledem na genotyp *MSTN*) od

vymizení v důsledku selekce proti alele samotné. Knockoutovaný *MSTN* byl dříve popsán, a je spojován se špatným zdravotním stavem a úmrtností, což odpovídá pozorování syndromu slabosti nohou a neschopnosti vstát a sát současnými studii (Matika, 2019).

Již více než 20 let se chovatelé zajímají o studie genu *MSTN*, objevení ztrátové mutace *MSTN* u skotu, která způsobuje svalovou hypertrofii (DBM). U prasat mutace *MSTN* způsobuje zvětšení svalové hmoty a snížení tukové tkáně. Souvislost mutace *MSTN* C.820G>T s užitkovými vlastnosti prasat byla hodnocena na 384 prasatech, která dokončila test užitkové výkonnosti, vzhledem k úbytku homozygotně zmutovaných jedinců byl účinek vlivem mutace *MSTN* c.820G>T spojen pouze s heterozygotními a divokými zvířaty. Heterozygotní zvířata měla zhruba o 5 mm větší svalovou hloubku tkáně a o 2 mm zmenšenou výšku hřbetního sádla ve srovnání s divokými homozygotními zvířaty. Histologická analýza ukázala zvětšení myofibrilů u homozygotních selat (*TT*) oproti heterozygotním selatům, což naznačuje pouze hypertrofii. Počet myofibrilů se u homozygotních a divokých typů selat neliší, tudíž hyperplazii analýza vylučuje (Matika, 2019).

Mutace *MSTN* jsou v chovech zachovány díky selekci pro zvýšený růst libové svaloviny spojený s produkcí masa, zejména u DBM skotu. U prasat byla prokázána spojitost polymorfismů v genu *MSTN* a produkčními znaky. U velkých bílých prasat studie odhalily SNP na chromozomu 15 *SSC15*, kde se vyskytuje příčinná varianta (exon 3). U velkých bílých prasat tato selekce prospívala díky kladnému podílu svaloviny a nižšímu obsahu tukových tkání, proto je mutace *MSTN* g.820G>T v linii udržována s mírnou frekvencí i přes její škodlivý vliv na úmrtnost selat. Tomuto příkladu se říká tzv. vyrovnávací selekce, která vysvětluje udržování škodlivých alel u skotu a prasat, a proč nebyla v posledních desetiletích hlášena žádná mutace genu *MSTN* (Matika 2018).

4. Závěr

V této literární rešerši jsem se zabývala genem *MSTN*, který ovlivňuje spoustu vlastností, především podíl svalové hmoty. Na svalovinu klade většina chovatelů důraz, díky vzrůstající poptávce po libovém mase. *MSTN* způsobuje syndrom dvojitého osvalení, jenž má na svědomí proces hypertrofie, což je zvětšení tkání. Bylo dokázáno, že *MSTN* nezpůsobuje hyperplazii (znásobení počtu buněk). Mutace genu *MSTN* má i nepříjemné dopady na chovatelské i ekonomické stránky chovu, selata se mohou narodit se syndromem slabosti svaloviny, který většina selat nepřezije, protože nejsou schopna sát mateřské mléko. Dále může dojít k vyčerpání organismu a sele umírá, smrt mu může neúmyslně způsobit i prasnice zalehnutím. Díky výše popsané studii bych mutaci genu *MSTN* neeliminovala pomocí selekce, protože by došlo k narušení Hardy - Weinbergovy rovnováhy, proto je důležité zajistit i náhodné připařování populace. Navíc dosud neznáme případné další vazby s jinými mutacemi v *MSTN* nebo i v jiných genech. Myostatin ovlivňuje i velikosti vnitřních orgánů, což může mít nežádoucí následky. Zvířata mohou trpět vadami srdce, ledvin, jater, a především plicními vadami. V těchto podmínkách je důležité zajistit vhodné krmení a techniku chovu. O myostatinu toho doposud moc nevíme, proto by se měl nadále tento gen studovat a analyzovat, abychom popřípadě mohli v budoucnu vyloučit syndromy slabosti končetin a chovatelské ztráty způsobené genem *MSTN* a jeho nežádoucími SNP. U ostatních hospodářských zvířat nebyl tento gen zkoumán podrobněji, víme pouze jen to, že u zvířat způsobuje DBM, u skotu i ztížené porody kvůli větší velikosti telat. Což klade větší důraz na pozornost chovatelů, protože v těchto případech dochází často k císařským řezům. U koní se tento gen selektuje na výkonnost, například u anglických plnokrevníků. U amerického plemene quater horse byl tento gen zaznamenán jako DMB. Žádná jiná vada u ostatních hospodářských zvířat nebyla doposud zaznamenána.

5. Literatura

- Aiello D., Patel K., Lasagna E., 2018. The myostatin gene: an overview of mechanism of action and its relevance to livestock animal. *Animal Genetics*. 505-519.
- Duran Ch, Appleby N, Edwards D, Batley J. 2009. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. *Current Bioinformatics* 4:16-27.
- Grade, C. V., Mantovani, C. S., Alvares, L.E. 2019. Myostatin gene promoter: structure, conservation and importance as a target for muscle modulation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 10:32.
- Hovorková I., 2019. Frekvence vybraných polymorfismů asociovaných s hladinou kančího pachu u čistokrevných populací prasat [BSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Hruban V., Majzlík I., 2002. *Obecná genetika*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 978-80-213-0600-4.
- Jandová M., 2008. *Genové technologie* [BSc. Thesis]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.
- Janochová J., 2009. *Izolace DNA: Výťažnost a kvalita* [BSc. Thesis]. Masarykova univerzita, Brno.
- Li X., Xie S., Qian L., Cai Ch., Bi H., Cui W., 2020. Identification of genes related to skeletal muscle growth and development by integrated analysis of transcriptome and proteome in myostatin-edited Meishan pigs. *Journal of Proteomics* 213, 103628.
- Liu D, Xu Q, Zang L, Liang S, Wu Y, Wei S, 2011. Identification and genetic effect of haplotypes in the promoter region of porcine myostatin gene. *Anim Genet*. 42:6–14.
- Luo Z., Luo Q., Xuan M., Han S., Wang J., Guo Q., Choe Y., Jin S., Kang J., Yin X., 2019. Comparison of internal organs between myostatin mutant and wild-type of piglets. *J Sci Food Agric*, 99:6788-6795.
- Matika, O., Robledo, D., Pong-Wong, R., Bishop, S.C., Riggio, V., Finlayson, H., Lowe, N. R., Hoste, A.E., Walling, G. A., del-Pozo, J., Archibald, A., Woolliams, J.A., Houston, R.D. 2019. Balancing selection at a premature stop mutation in the myostatin gene underlies a recessive leg weakness syndrome in pigs. *PLoS Genet*15(1): e1007759

Matika O., Robledo D., Pong-Wong R., Woolliams J., Bishop S., Riggio V., Hoste A., Walling GA., Archibald A., Houston R., 2018. A premature stop mutation in the porcine myostatin gene is a candidate causative variant for a recessive leg weakness syndrome and affect muscle depth. *Proceeding of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 11.297.

Schmidtová A., 2012. Popis genetického založení dvojitého osvalení a jeho významu u psů [BSc. Thesis]. Mendelova univerzita v Brně, Brno.

Tu P-A, Lo L-L, Chen Y-C, Hsu C-C, Shiau J-W, Lin E-C, 2011. Polymorphisms in the promoter region of myostatin gene are associated with carcass traits in pigs. *J Anim Breed Genet.* 131:116–22.

Wang B., Li P., Zhou W., Gao Ch., Liu H., Li H., Niu P., Zhang Z., Li Q., Zhou J., Huang R., 2019. Association of Twelve Candidate Gene Polymorphisms with the Intramuscular Fat Content and Average Backfat Thickness of Chinese Suhuai Pigs. *Animals*, 9, 858.