



*Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria*  
*Facoltà di Agraria*  
*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Forestali ed Ambientali*

Tesi di Dottorato di Ricerca in  
*“Produzioni Zootecniche nel Bacino del Mediterraneo”*  
XXI Ciclo

Studio del gene della  $\beta$ -lattoglobulina  
in razze ovine e caprine autoctone siciliane  
(S.S.D. AGR/17)

Coordinatore del Dottorato  
*Prof. Pietro Micari*

Dottoranda  
*Dott.ssa Maria Teresa Sardina*

Docente Guida  
*Prof. Baldassare Portolano*

Anno Accademico 2007 - 2008

# *CAPITOLO I*

## Introduzione Generale

## *Le proteine del latte*

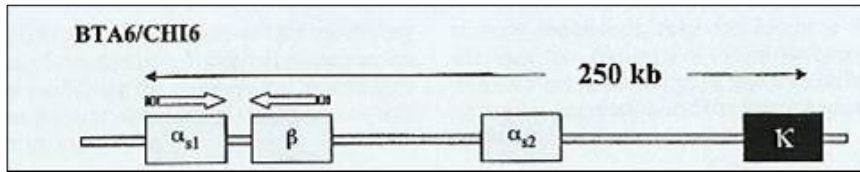
Nelle specie caprina, ovina e bovina, la frazione proteica del latte è costituita per circa l'80% da caseine. Del rimanente 20%, invece, fanno parte diversi tipi di proteine che vengono raggruppate sotto il nome di sieroproteine. Questi due gruppi di proteine sono distinguibili in base al loro comportamento chimico: le caseine precipitano a pH 4,6 a 20°C o in presenza di caglio, mentre le sieroproteine rimangono disciolte nel siero, dopo la precipitazione delle caseine stesse.

Le principali caseine presenti nel latte dei ruminanti sono l' $\alpha$ 1, la  $\beta$ , l' $\alpha$ 2 e la  $\kappa$ -caseina, sono organizzate in submicelle, assemblate in micelle attraverso interazioni con fosfato di calcio e possono, a loro volta, essere distinte in calcio sensibili ( $\alpha$ 1,  $\beta$ ,  $\alpha$ 2) e calcio insensibili ( $\kappa$ ).

Le sieroproteine hanno un profilo aminoacidico più completo rispetto alle caseine. Le sieroproteine più note sono l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina, che rappresentano una fonte di aminoacidi ramificati e hanno un elevato valore biologico. Nel siero sono anche presenti immunoglobuline, che derivano direttamente dal plasma sanguigno e svolgono un'importante funzione immunitaria.

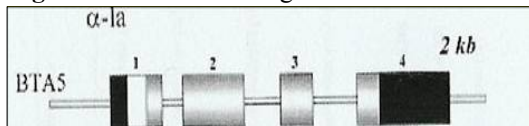
Dal punto di vista molecolare, queste 6 principali frazioni proteiche sono sintetizzate da 6 diversi geni strutturali. Le quattro caseine  $\alpha$ 1,  $\beta$ ,  $\alpha$ 2 e  $\kappa$  sono codificate, in questo ordine, da quattro geni autosomici strettamente associati in un *cluster* che interessa un frammento di DNA di circa 250 kb e sono state mappate sul cromosoma 6 nelle specie bovina, ovina e caprina (Threadgill e coll., 1990; Hayes e coll., 1993a; Rijnkels e coll., 1997) (Figura 1.1).

**Figura 1.1:** Cluster caseinico bovino mappato sul cromosoma 6 (BTA6)

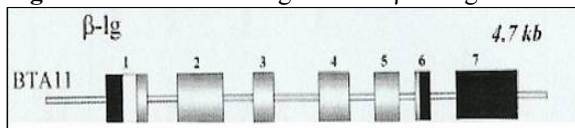


L' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina sono codificate da geni indipendenti sia tra loro che da quelli che codificano per le caseine. Nei bovini e nei caprini, l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina (Figura 1.2 e 1.3) sono state mappate, rispettivamente, sui cromosomi 5 e 11; negli ovini, invece, è stata mappata solo la  $\beta$ -lattoglobulina sul cromosoma 3 (Hayes e coll., 1993b).

**Figura 1.2:** Struttura del gene della  $\alpha$ -lattoalbumina bovina mappata sul cromosoma 5 (BTA5)



**Figura 1.3:** Struttura del gene della  $\beta$ -lattoglobulina bovina mappata sul cromosoma 11 (BTA11)



Le conoscenze sulla struttura e sull'organizzazione dei geni delle proteine del latte, ottenute grazie all'applicazione delle tecniche di biologia molecolare, hanno dato un nuovo impulso allo studio dei polimorfismi e alla ricerca degli effetti che le varianti proteiche potrebbero avere sulle caratteristiche quanti-qualitative della produzione di latte.

La base molecolare dei polimorfismi presenti nelle proteine del latte può dipendere da diversi fattori, quali la variabilità genetica, una diversa sequenza aminoacidica dovuta a mutazioni nella sequenza nucleotidica, modificazioni post-trascrizionali e post-traduzionali.

Alcune tecniche, oltre a caratterizzare le mutazioni a livello proteico, hanno condotto all'individuazione di nuovi polimorfismi presenti non soltanto nelle regioni codificanti ma anche in porzioni "regolatrici" del gene, le quali non influiscono sulla

sequenza di aminoacidi della proteina, ma sono indispensabili per la funzionalità dei geni stessi (Mercier e coll., 1993ab; Groenen e coll., 1994; Rosen e coll., 1999).

### *Funzione del gene della $\beta$ -lattoglobulina*

La  $\beta$ -lattoglobulina è, in termini quantitativi, la maggiore sieroproteina presente nel latte dei ruminanti. È stata anche ritrovata nel latte di una grande varietà di specie di mammiferi tra cui i gatti (Halliday e coll., 1991), i cani e i delfini (Pervaiz e coll., 1986), fatta eccezione per gli uomini (Brignon e coll., 1985; Monti e coll., 1989), i roditori e i lagomorfi (Hambling e coll., 1992; Pérez e coll., 1995). È una proteina globulare, appartenente alla famiglia delle lipocaline, piccole proteine che presentano diverse caratteristiche, tra cui la capacità di legarsi a molecole idrofobe (Flower, 1996). Sebbene le lipocaline siano state principalmente classificate come proteine di trasporto, sono implicate in molti processi biologici, come il trasporto del retinolo e dei feromoni, la sintesi enzimatica di prostaglandine, la risposta immunitaria e l'omeostasi cellulare (Flower, 1996).

L'esatto ruolo fisiologico della  $\beta$ -lattoglobulina è tutt'oggi sconosciuto, sebbene siano state fatte alcune ipotesi in merito (Sawyer e coll., 2000). La notevole resistenza alle proteasi gastriche, sia *in vivo* che *in vitro*, suggerisce che la funzione primaria della  $\beta$ -lattoglobulina non sia nutritiva, infatti rimane praticamente intatta dopo la digestione nello stomaco (Reddy e coll., 1988). Essendo una lipocalina, si pensa che abbia un ruolo nel trasporto del retinolo e degli acidi grassi, anche se la sua generale affinità con queste molecole idrofobe non permette di attribuirle un ruolo specifico (Puyol e coll., 1991; Pérez et coll., 1995).

Altre possibili funzioni potrebbero essere il trasferimento di immunità passiva dalle madri alle progenie (Ouwehand e coll., 1997) e la fonte di peptidi attivi simili a quelli prodotti dalle caseine (Mullally e coll., 1997).

### *Struttura del gene della $\beta$ -lattoglobulina*

I primi studi molecolari sulla  $\beta$ -lattoglobulina hanno interessato la struttura dell'RNA messaggero (mRNA o *messenger RNA*) codificante per questa proteina. Il cDNA (*complementary DNA*), ottenuto dall'mRNA tramite retrotrascrizione, è stato sequenziato nella specie bovina da Alexander e coll. nel 1989, in quella ovina da Gaye e coll. nel 1986, e in quella caprina da Folch e coll. nel 1993. I risultati ottenuti da questi studi hanno dimostrato che la sequenza codificante è altamente conservata nelle tre specie e, paragonando le sequenze aminoacidiche, è stata riscontrata una omologia superiore al 95%.

La proteina è costituita da 180 aminoacidi, compresi 18 aminoacidi del peptide segnale per gli ovini e i caprini e 16 aminoacidi per i bovini; i restanti aminoacidi costituiscono la proteina matura.

Studi successivi hanno portato all'ottenimento della sequenza completa del gene della  $\beta$ -lattoglobulina sia per i bovini (GenBank Acc. no Z48305), che per gli ovini (GenBank Acc. no X12817; Ali e coll., 1988; Harris e coll., 1988) e i caprini (GenBank Acc. no Z33881; Folch e coll., 1994).

Il gene della  $\beta$ -lattoglobulina, ha un'organizzazione strutturale altamente conservata nelle tre specie e risulta costituito fondamentalmente da 7 esoni e 6 introni. Gli esoni e gli introni presentano lunghezza variabile, l'esone più piccolo è il 6, costituito da 42 bp nelle tre specie, mentre il più grande è l'esone 7, che presenta 178 bp, 180 bp e 183 bp, rispettivamente, per i caprini, gli ovini e i bovini. L'unità di trascrizione del

gene ha lunghezza simile nelle tre specie: 4729 bp nei bovini, 4662 bp negli ovini e 4698 bp nei caprini. Notevoli differenze, invece, si riscontrano nella lunghezza della regione *promoter* del gene stesso, che presenta 2765 bp, 4204 bp e 2148 bp, rispettivamente, per bovini, ovini (GenBank Acc. no X68105) e caprini.

La regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina contiene numerosi fattori di trascrizione specifici della ghiandola mammaria. Alcuni di questi fattori, identificati per la prima volta nella  $\beta$ -lattoglobulina ovina, sono stati riscontrati all'interno della regione *promoter* di altri geni appartenenti a diverse specie, come per esempio, l' $\alpha$ s1, la  $\beta$  e l' $\alpha$ s2-caseina, l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina nel bovino, l' $\alpha$ -lattoalbumina nell'uomo, l' $\alpha$ , la  $\beta$  e la  $\gamma$ -caseina nel ratto e il WAP (*Whey Acidic Protein*) nel topo (Watson e coll., 1991).

### ***Polimorfismi al locus della $\beta$ -lattoglobulina nelle diverse specie***

#### ***$\beta$ -lattoglobulina bovina***

La prima lattoproteina in cui sono stati riscontrati polimorfismi è stata la  $\beta$ -lattoglobulina bovina e la scoperta è dovuta ad Aschaffenburg e Drewry nel 1955.

Da allora, 11 diverse varianti (A-J) sono state caratterizzate per la  $\beta$ -lattoglobulina bovina a livello di DNA (Godovac-Zimmermann e coll., 1990, 1996). Le varianti genetiche più comuni in *Bos taurus* e *Bos indicus* sono A e B, che differiscono per la sostituzione di 2 aminoacidi in posizione 64 e 118. La variante B è considerata la variante ancestrale in base alla sequenza e ai criteri di frequenza nelle diverse razze (Ng-Kwai Hang e coll., 1992).

Nei bovini, A e B sono le varianti associate ad effetti quantitativi sulla composizione del latte e alle caratteristiche di caseificazione (Ng-Kwai-Hang e coll., 1992). È stato dimostrato che la variante B è associata ad un più alto contenuto in caseine e in

grasso e, quindi, ad una più elevata resa in formaggio (Lundén e coll., 1997). Il latte proveniente da animali con genotipo AA mostra un contenuto più elevato in sieroproteine e proteine totali rispetto a quello di animali con genotipo AB e BB (Ng-Kwai-Hang, 1998). Un livello più alto di espressione dell'allele A è stato descritto negli animali eterozigoti AB, dove la quantità di  $\beta$ -lattoglobulina nel latte ha mostrato una proporzione del 60% vs 40% rispettivamente per le forme alleliche A e B (Graml e coll., 1989; Lum e coll., 1997). Questa differente espressione è stata attribuita a mutazioni allelo-specifiche nel sito di legame del fattore di trascrizione AP-2 (*Activator Protein-2*) che si trova all'interno della regione *promoter* del gene (Lum e coll., 1997; Folch e coll., 1999).

### ***$\beta$ -lattoglobulina ovina***

Per la  $\beta$ -lattoglobulina ovina, le varianti alleliche note sono A, B e C. Le varianti A e B sono le più comuni e sono presenti in tutte le razze, mentre la variante C è stata trovata solo nelle razze tipo Merino (Erhardt, 1989; Recio e coll., 1995; Prinzenberg e coll., 1999). La variante B differisce dalla variante A per una singola sostituzione aminoacidica (King, 1969) in posizione 20 (Tirosina/Istidina-Tyr/His), mentre la variante C differisce dalla A per una sostituzione aminoacidica (Erhardt, 1989) in posizione 148 (Arginina/Glutammina-Arg/Glu).

Alcuni studi hanno mostrato che in razze ovine quali l'Altamurana (Dario e coll., 2005), la Barbaresca Siciliana e la Massese (Chiofalo e coll., 1987; Rampilli e coll., 1997), la variante A presenta una frequenza più elevata rispetto alla variante B che, di contro, ha mostrato frequenze più elevate in razze quali la Valle del Belice (Giaccone e coll., 2000) e la Pag (Cubrik-Curik e coll., 2002).

Numerosi sono gli studi riguardanti l'effetto dei polimorfismi della  $\beta$ -lattoglobulina ovina sui caratteri produttivi e sulle caratteristiche di caseificazione, ma i risultati



sono ancora contrastanti. Alcuni autori riportano l'effetto positivo della variante B sulla produzione e sulla qualità del latte nonché sul contenuto in sieroproteine (Caroli e coll., 1995; Fraghì e coll., 1996; Giaccone e coll., 2000; Dario e coll., 2005); altri riportano l'effetto positivo della variante A sul contenuto in grasso e proteine e sulle caratteristiche enzimatiche (Garzon e coll., 1992; Lopez-Galvez e coll., 1993; Gutiérrez-Gil e coll., 2001) ed infine c'è chi afferma di non aver incontrato né effetti diretti di associazione tra i genotipi a questo locus e i caratteri produttivi (Pietrolà e coll., 2000), né differenze nella composizione chimica e nelle proprietà enzimatiche del latte (Recio e coll., 1995, 1997).

### ***β-lattoglobulina caprina***

Nonostante il gene della β-lattoglobulina caprina sia stato interamente sequenziato da Folch e coll. nel 1994, a livello di DNA, non si sono ancora riscontrate varianti che producano cambi aminoacidici in questa proteina, che viene pertanto considerata monomorfica per questa specie.

Alcuni studi riportano variazioni nel contenuto in β-lattoglobulina del latte di capre di razza Girgentana, ottenuti tramite HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), con valori oscillanti tra il 43% e il 63% delle sieroproteine totali (Chianese e coll., 2000).

Fino ad oggi, al gene della β-lattoglobulina caprina, sono stati trovati in totale 17 polimorfismi: 9 nella regione *promoter* e 8 negli esoni del gene (Pena e coll., 2000; Yahyaoui e coll., 2000; Graziano e coll., 2003; Ballester e coll., 2005).

I polimorfismi riscontrati negli esoni del gene sono SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*): 5 sono stati trovati nella regione codificante in corrispondenza degli esoni 1, 2 e 3, ma non portano a cambi aminoacidici essendo sostituzioni

sinonime; le altre 2 mutazioni sono state trovate nella regione non codificante dell'esone 6 e nella regione 3'-UTR (3'-*UnTranslated Region*, esone 7).

Le mutazioni trovate nella regione *promoter* sono 8 SNPs e una delezione/inserzione. Questi polimorfismi potrebbero essere quelli maggiormente responsabili dei differenti livelli di espressione del gene, dati i numerosi fattori di trascrizione che normalmente si ritrovano in questa regione (Folch e coll., 1994).

Notevole attenzione va rivolta ai risultati ottenuti da Graziano e coll. nel 2003 e da Ballester e coll. nel 2005, per la regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nella razza caprina Girgentana. Tramite protocollo PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), Graziano e coll. (2003) hanno evidenziato la presenza delle mutazioni in posizione -341 (T/C) e -60 (C/T) della regione *promoter* del gene in questa razza, ma non hanno riscontrato il polimorfismo in posizione -64 (G/A) che è stato trovato da Ballester e coll. (2005) come "unico" della razza Girgentana. Il mancato ritrovamento, da parte di Graziano e coll. (2003), della mutazione in posizione -64 (G/A) potrebbe essere dovuto all'impossibilità di individuare questo polimorfismo col protocollo PCR-RFLP utilizzato. Ballester e coll. (2005), d'altro canto, non hanno riscontrato il polimorfismo in posizione -60 (C/T) ma ciò potrebbe essere correlato all'esiguo numero di campioni utilizzati per l'analisi.

Entrambi i polimorfismi, -64 G/A e -60 C/T, sono localizzati nel sito di legame *consensus* del fattore di trascrizione AP-2 (Wingender e coll., 1996), quindi potrebbero essere dei buon candidati per spiegare le differenze riscontrabili nel contenuto in  $\beta$ -lattoglobulina.

Tre polimorfismi riscontrati da Ballester e coll. nel 2005, in posizione -134 (G/T), -118 (C/T) e -114 (delezione/inserzione) potrebbero essere presi in considerazione in

quanto localizzati, così come i precedenti, all'interno di un sito di legame del fattore di trascrizione AP-2 e quindi, anche essi possibilmente collegati alla diversa espressione genica di questa proteina (Wingender e coll., 1996).

La presente tesi ha avuto come scopi:

- la caratterizzazione, a livello fenotipico, tramite isoelettrofocalizzazione (IEF), dei polimorfismi al locus della  $\beta$ -lattoglobulina in ovini di razza Valle del Belice;
- la caratterizzazione, a livello molecolare, tramite PCR-RFLP, di due SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) presenti all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina in caprini di razza Girgentana;
- l'analisi dell'intera regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina, a livello molecolare, e la ricerca di fattori di trascrizione all'interno della stessa in ovini e caprini autoctoni siciliani.

## *CAPITOLO 2*

### Primo Contributo Sperimentale

*Caratterizzazione dei polimorfismi genetici al locus della  $\beta$ -  
lattoglobulina in ovini di razza Valle del Belice*

## *Introduzione*

Le più note sieroproteine, presenti nel latte dei ruminanti, sono l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina, che costituiscono circa il 20% delle proteine totali del latte. In termini quantitativi, la  $\beta$ -lattoglobulina è la sieroproteina maggiormente presente ed è stata ritrovata nel latte di molte specie di mammiferi, fatta eccezione per gli uomini (Brignon e coll., 1985; Monti e coll., 1989), i roditori e i lagomorfi (Hambling e coll., 1992; Pérez e coll., 1995).

Dal punto di vista molecolare, la  $\beta$ -lattoglobulina ovina è stata mappata sul cromosoma 3 (Hayes e coll., 1993b). Il gene risulta costituito da 7 esoni e 6 introni e la proteina che ne deriva è formata da 180 aminoacidi.

Le varianti alleliche più comuni sono la A e la B, presenti in tutte le razze, mentre la variante C è stata riscontrata solo nelle razze tipo Merino (Erhardt, 1989; Recio e coll., 1995; Prinzenberg e coll., 1999). Le tre varianti differiscono per singoli cambi aminoacidici, l'allele B differisce da A per una sostituzione Tirosina/Istidina in posizione 20 (Kolde, 1983), mentre l'allele C differisce da A per una sostituzione Arginina/Glutamina in posizione 148 (Erhardt, 1989).

Alcuni studi hanno messo in evidenza una più elevata frequenza dell'allele A rispetto a B in alcune razze come l'Altamura (Dario e coll., 2005), la Barbaresca Siciliana e la Massese (Chiofalo e coll., 1987; Rampilli e coll., 1997); l'allele B, invece, è risultato più frequente in razze quali la Valle del Belice (Giaccone e coll., 2000) e la Pag (Cubrik-Curik e coll., 2002).

I risultati, riguardanti l'effetto dei polimorfismi al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina ovina sui caratteri produttivi e sulle caratteristiche di caseificazione, sono stati spesso contrastanti. Per alcuni autori (Caroli e coll., 1995; Fraghì e coll., 1996; Giaccone e

coll., 2000; Dario e coll., 2005), l'allele B ha un effetto positivo sulla produzione, sulla qualità del latte e sul contenuto in sieroproteine; altri riportano l'effetto positivo dell'allele A sul contenuto in grasso e proteine e sulle caratteristiche enzimatiche (Garzon e coll., 1992; Lopez-Galvez e coll., 1993; Gutiérrez-Gil e coll., 2001). Infine, alcuni autori (Pietrolà e coll., 2000; Recio e coll., 1995, 1997) non hanno riscontrato effetti diretti di associazione tra genotipi e caratteri produttivi, né differenze nella composizione chimica e nelle proprietà enzimatiche del latte.

### *Scopo del lavoro*

Lo scopo del presente lavoro è stato la caratterizzazione, a livello fenotipico, tramite isoelettrofocalizzazione (IEF), dei polimorfismi al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina in ovini di razza Valle del Belice.

### *Materiale e Metodi*

L'indagine è stata condotta su 427 campioni individuali di latte ovino di pecore di razza Valle del Belice. I campioni sono stati prelevati in occasione di controlli funzionali in quattro allevamenti siti nella provincia di Agrigento, nelle zone di S. Margherita di Belice, Montevago e Menfi. In particolare, 87 campioni provenivano dall'azienda Alagna, 120 dall'azienda Augello, 117 dall'azienda Bavetta e 103 dall'azienda Giampaolo.

Il protocollo di analisi sperimentale ha previsto l'utilizzo della tecnica di isoelettrofocalizzazione (IEF), un metodo elettroforetico separativo che sfrutta la diversa mobilità delle molecole cariche sottoposte ad un campo elettrico e che permette la separazione e la visualizzazione dei diversi alleli, presenti ad un determinato *locus*, mediante punto isoelettrico (pI).

L'isoelettrofocalizzazione, eseguita secondo il metodo Erhard e coll. (1998) con alcune modifiche, prevede diverse fasi:

➤ *Preparazione dei campioni tramite estrazione del siero*

L'analisi è stata eseguita su campioni di siero estratti da latte individuale intero.

All'interno di una *Eppendorf* sterile sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di latte intero e 4  $\mu$ l di caglio diluito, ottenuto addizionando a 80  $\mu$ l di caglio commerciale liquido acqua distillata fino ad un volume di 5 ml.

I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti, in stufa ventilata e, successivamente, sono stati centrifugati a velocità massima per 10 minuti in modo da far precipitare le caseine.

50  $\mu$ l di siero sono stati trasferiti in una nuova *Eppendorf* sterile e sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di diluente (in rapporto 1:4), costituito da urea 8M e  $\beta$ -mercaptoetanolo (per 30 campioni la miscela era costituita da 6 ml di urea 8M e 162  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo).

➤ *Preparazione del gel di screening*

Il gel elettroforetico utilizzato era costituito da una soluzione al 40% di acrilamide e bis-acrilamide in rapporto 29:1, ed è stato ottenuto grazie alla copolimerizzazione di questi 2 monomeri in presenza di un catalizzatore, quale l'ammonio persolfato (APS), e di un attivatore, quale il TEMED.

Il gel è stato preparato sciogliendo 4,8 g di urea in 4 ml di acqua distillata, il tutto all'interno di un *becker* posto su un agitatore riscaldante. A completa dissoluzione dell'urea in acqua, a questa miscela sono stati aggiunti 1,25 ml di acrilamide/bis-acrilamide (soluzione al 40%, rapporto 29:1), una miscela di anfoliti variabile a seconda del latte utilizzato, 1 ml di APS e 15  $\mu$ l di TEMED.

Per ottenere un *range* di pH compreso tra 2,5 e 6, alla soluzione sono stati aggiunti i seguenti anfoliti Pharmalyte (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW):

240  $\mu$ l di Pharmalyte pH 2,5-5;

230  $\mu$ l di Pharmalyte pH 4,2-4,9;

230  $\mu$ l di Pharmalyte pH 5-6.

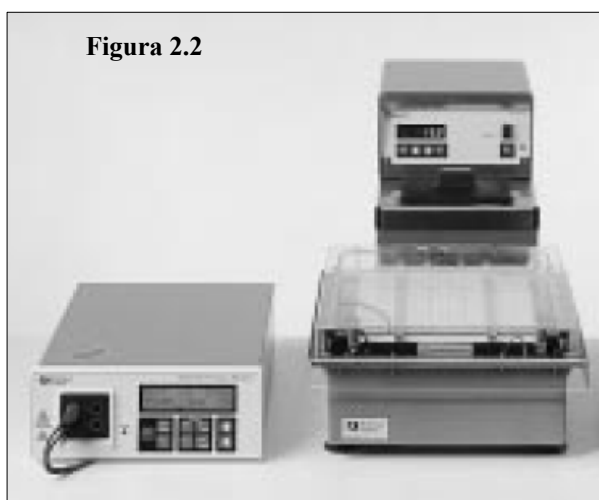
Il gel (Figura 2.1) è stato ottenuto versando la soluzione tra 2 *film* di poliestere, uno dei quali funge da stampo



(con dimensioni 260x125x0,3 mm) e l'altro da supporto (GelBond PAG film, GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW), e lasciando polimerizzare il tutto per circa un'ora alla luce.

➤ *Fase di precorsa*

L'elettroforesi avviene tramite l'utilizzo del sistema Multiphor II (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW) (Figura 2.2) costituito da una piastra elettroforetica orizzontale, dalla centralina termostatica MultiTemp III (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW) e da una centralina elettrica.



Il gel è stato posizionato sulla piastra elettroforetica e alle sue estremità sono state applicate strisce di carta Whatman n°17 lunghe circa 260 mm, imbevute una di



soluzione anodica, per costituire l'anodo (+) e l'altra di soluzione catodica, per costituire il catodo (-).

La soluzione anodica conteneva 0,3 ml di acido acetico, 1,25 ml di glicerolo e acqua distillata fino ad un volume di 25 ml.

La soluzione catodica, invece, conteneva 0,912 g di lisina monoidrata, 1,25 ml di glicerolo e acqua distillata fino ad un volume di 25 ml.

Una volta posizionati le strisce, in corrispondenza degli elettrodi, è stata avviata la precorsa con i seguenti parametri:

- alimentazione di 3000V, 20mA, 30W
- durata: 180V/h
- temperatura della piastra elettroforetica: 12 °C

➤ *Fase di corsa*

Finita la precorsa, sul gel sono state applicate, a circa 0,5 cm dalla striscia anodica, delle cartine Whatman n°1 delle dimensioni di circa 0,5x1 cm, ognuna delle quali è stata imbibita con 8 µl di campione.

Dopo aver caricato i campioni sulle apposite cartine, è stata avviata la corsa con i seguenti parametri:

- alimentazione di 3000V, 20mA, 30W
- durata: 3000V/h
- temperatura della piastra elettroforetica: 12 °C

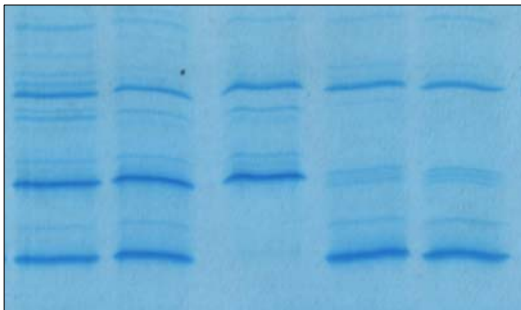
➤ *Fase di fissazione e colorazione*

Finita la corsa, il gel è stato immerso, per 10 minuti, in una vaschetta contenente acido tricloro acetico al 15%, posta su un agitatore, in modo da permettere la fissazione dei campioni al gel.

Il gel è stato successivamente immerso, per 10 minuti, in una vaschetta contenente una soluzione colorante costituita da 1 g di Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 100 ml di acido acetico, 500 ml di etanolo e acqua distillata fino ad un volume di 1 l.

Infine il gel è stato decolorato, per rendere il tracciato visibile (Figura 2.3), con una soluzione costituita da 100 ml di acido acetico, 300 ml di etanolo e acqua distillata fino ad un volume di 1 l.

**Figura 2.3:** Tracciato elettroforetico di sieri ovini



Una volta finita la fase di decolorazione, il gel è stato lavato con acqua distillata e posto ad asciugare sotto cappa.

### *Analisi statistiche*

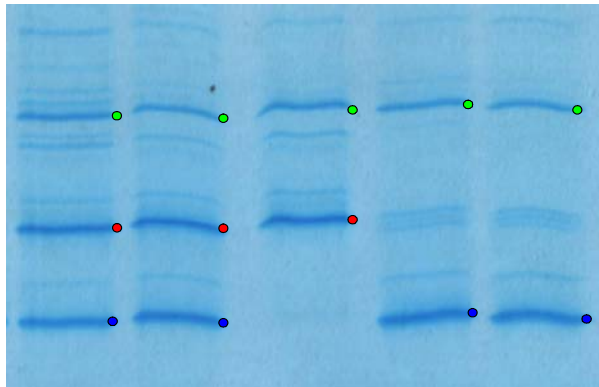
Le frequenze alleliche al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina nella razza ovina Valle del Belice, i genotipi osservati ed attesi sono stati valutati tramite l'utilizzo del software Genepop v4.0 (Raymond e Rousset, 1995).

### *Risultati e discussione*

La metodica utilizzata ha permesso di distinguere chiaramente, a livello del siero, sia l' $\alpha$ -lattoalbumina che la  $\beta$ -lattoglobulina ovina.

L' $\alpha$ -lattoalbumina (LALBA) è risultata monomorfica e presenta una sola banda nel tracciato elettroforetico (Figura 2.4). Per la  $\beta$ -lattoglobulina (BLG), sono chiaramente distinguibili le bande relative agli alleli A e B (Figura 2.4).

**Figura 2.4:** Tracciato elettroforetico di campioni individuali di siero di ovini di razza Valle del Belice



• A } Locus BLG  
• B }  
• A } Locus LALBA

L'analisi delle frequenze alleliche, relative ai quattro allevamenti (Tabella 2.1), ha mostrato una più elevata frequenza dell'allele B rispetto all'allele A, con frequenze comprese fra 0,620, nell'azienda Alagna, e 0,775 nell'azienda Augello.

**Tabella 2.1:** Frequenze alleliche al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina nei diversi allevamenti

Allevamento	Allele A	Allele B
<b>Alagna</b> (n=87)	0,380	0,620
<b>Augello</b> (n=120)	0,225	0,775
<b>Bavetta</b> (n=117)	0,316	0,684
<b>Giampaolo</b> (n=103)	0,316	0,684

La Tabella 2.2 mostra le frequenze genotipiche relative ai diversi allevamenti. Il genotipo meno frequente, all'interno dei quattro allevamenti, è risultato AA, il genotipo AB ha presentato una maggiore frequenza negli allevamenti di Alagna e Giampaolo con valori, rispettivamente, di 0,552 e 0,534. Negli allevamenti di

Augello e Bavetta, il genotipo BB è stato riscontrato con maggiore frequenza e con valori pari a 0,566 e 0,470, rispettivamente.

**Tabella 2.2:** Frequenze genotipiche al locus della  $\beta$ -lattoglobulina nei diversi allevamenti

<b>Allevamento</b>	<b>Genotipo AA</b>	<b>Genotipo AB</b>	<b>Genotipo BB</b>
<b>Alagna</b> (n=87)	0,103	0,552	0,345
<b>Augello</b> (n=120)	0,017	0,417	0,566
<b>Bavetta</b> (n=117)	0,103	0,427	0,470
<b>Giampaolo</b> (n=103)	0,049	0,534	0,417

Le Tabelle 2.3 e 2.4 mostrano, al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina, il confronto tra i genotipi osservati ed attesi, il *P-value* e l'errore standard (S.E.) ottenuti nei quattro allevamenti oggetto di studio.

Considerando i valori del test del  $\chi^2$ , gli allevamenti di Alagna e Bavetta sono risultati in equilibrio Hardy-Weinberg (rispettivamente  $\chi^2$  pari a 2,4 e 0,023;  $p \leq 0,05$ ; 1 grado di libertà) ed il risultato è stato confermato anche dai *P-values* (*P-value*  $> 0,05$ ) con valori di 0,1723 e 1, rispettivamente. Gli allevamenti di Augello e Giampaolo non sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg ( $\chi^2$  pari a 4,39 e 5,53;  $p \leq 0,05$ ; 1 grado di libertà; *P-values* pari a 0,0376 e 0,0219, rispettivamente).

**Tabella 2.3:** Confronto tra genotipi osservati e attesi al locus della  $\beta$ -lattoglobulina nei quattro allevamenti oggetto di studio.

<b>Allevamento</b>	<b>AA</b>		<b>AB</b>		<b>BB</b>	
	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>
<b>Alagna</b> (n=87)	9	12,399	48	41,202	30	33,399
<b>Augello</b> (n=120)	2	5,987	50	42,025	68	71,987
<b>Bavetta</b> (n=117)	12	11,592	50	50,815	55	54,592
<b>Giampaolo</b> (n=103)	5	10,146	55	44,707	43	48,146

**Tabella 2.4:** Valori di P e dell'errore standard (S.E.) nei quattro allevamenti oggetto di studio.

Allevamento	P-VALUE	S.E.
<b>Alagna</b> (n=87)	0,1723	0,0016
<b>Augello</b> (n=120)	0,0376	0,0006
<b>Bavetta</b> (n=117)	1	0,0000
<b>Giampaolo</b> (n=103)	0,0219	0,0006

Le Tabelle 2.5 e 2.6 mostrano le frequenze alleliche e genotipiche, il confronto tra i genotipi osservati e attesi, il *P-value* e l'errore standard (S.E.) calcolati considerando il totale degli individui.

**Tabella 2.5:** Frequenze alleliche e genotipiche al locus della  $\beta$ -lattoglobulina nel totale degli individui considerati (n=427).

Allele		Genotipo		
A	B	AA	AB	BB
0,303	0,697	0,066	0,475	0,459

**Tabella 2.6:** Genotipi osservati e attesi al locus della  $\beta$ -lattoglobulina, valori di P e dell'errore standard (S.E.) nel totale degli individui considerati (n=427).

Genotipo AA		Genotipo AB		Genotipo BB	
Oss.	Att.	Oss.	Att.	Oss.	Att.
28	39,169	203	180,662	196	207,169
P-Value			S.E.		
0,0111			0,0007		

L'allele B ha mostrato una frequenza più elevata rispetto all'allele A, con un valore di 0,697. Il genotipo più frequente è risultato AB, con una frequenza di poco più elevata rispetto a BB (0,475 vs. 0,459) (Tabella 2.5). Considerando i genotipi osservati e attesi e il valore del test del  $\chi^2$ , che è risultato pari a 6,549 ( $p \leq 0,05$ ; 1 grado di libertà), la "popolazione", costituita da 427 individui, non è risultata in equilibrio Hardy-Weinberg ed il risultato è stato confermato anche dal *P-value* pari a 0,0111. Dal confronto tra i genotipi osservati e attesi, riportati in Tabella 2.6, si può

dedurre che lo scostamento dall'equilibrio Hardy-Weinberg sia dovuto ad un eccesso di individui eterozigoti all'interno del campione oggetto di studio.

### *Conclusioni*

L'IEF rappresenta un metodo economicamente conveniente e particolarmente efficace per il monitoraggio dei polimorfismi lattoproteici. Questa metodica viene utilizzata, quando cambi aminoacidici, all'interno di una proteina, causano variazioni al punto isoelettrico (pI). Al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina ovina, gli alleli A e B differiscono per un singolo cambio aminoacidico che causa una variazione al punto isoelettrico della proteina. L'IEF permette di visualizzare chiaramente i due alleli e di raccogliere informazioni genetiche, relative ad una popolazione, in tempi brevi.

I risultati ottenuti nel presente studio non si sono discostati da quanto finora emerso nei precedenti studi sulla razza ovina Valle del Belice che, come già dimostrato, presenta una maggiore frequenza dell'allele B rispetto l'allele A (Giaccone e coll., 2000).

Ulteriori studi cercheranno di mettere in relazione i polimorfismi al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina con le caratteristiche quanti-qualitative del latte di questa razza.

L'utilizzo di tecniche molecolari più avanzate potrebbe permettere lo studio dei polimorfismi presenti a questo *locus* a livello di DNA, e studi di espressione genica potrebbero essere utilizzati per stabilire se esiste una relazione tra gli alleli presenti a questo *locus*, la produzione di latte e le caratteristiche qualitative.

## *CAPITOLO 3*

### Secondo Contributo Sperimentale

*Caratterizzazione molecolare dei polimorfismi presenti nella regione  
promoter del gene della  $\beta$ -lattoglobulina in caprini di razza*

*Girgentana*

## *Introduzione*

I primi studi molecolari sulla  $\beta$ -lattoglobulina hanno interessato la struttura dell'RNA messaggero (mRNA o *messenger RNA*) codificante per questa proteina. Il cDNA (*complementary DNA*), ottenuto dall'mRNA tramite retrotrascrizione, è stato sequenziato nella specie bovina (Alexander e coll., 1989), ovina (Gaye e coll., 1986) e caprina (Folch e coll., 1993), e i risultati ottenuti hanno dimostrato che la sequenza codificante presenta un'omologia superiore al 95%. Anche l'organizzazione strutturale del gene risulta altamente conservata nelle tre specie, presentando 7 esoni e 6 introni.

Il gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina, interamente sequenziato da Folch e coll. nel 1994 (GeneBank Acc. no Z33881), risulta costituito da 8088 bp e presenta una unità di trascrizione di 4698 bp, una *5'-flanking region* di 2148 bp e una *3'-flanking region* di 1242 bp.

A livello di DNA, alcuni autori (Pena e coll., 2000; Yahyaoui e coll., 2000; Graziano e coll., 2003; Ballester e coll., 2005) hanno riportato la presenza di mutazioni all'interno della regione *promoter* e degli esoni del gene. Le mutazioni trovate all'interno della regione codificante, ed in particolare in corrispondenza degli esoni 1, 2 e 3, sono tutte sostituzioni sinonime che non portano a cambi aminoacidici nella proteina, che viene pertanto considerata monomorfica.

Tramite tecnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), Chianese e coll. (2000) hanno riportato variazioni nel contenuto in  $\beta$ -lattoglobulina caprina, con valori oscillanti tra il 43% e il 63% delle sieroproteine totali.

Notevole attenzione va, quindi, rivolta ai polimorfismi trovati all'interno della regione *promoter* del gene (Graziano e coll., 2003; Ballester e coll., 2005) poiché



potrebbero essere quelli maggiormente responsabili dei differenti livelli di espressione del gene, dati i numerosi fattori di trascrizione che si riscontrano all'interno in questa regione (Folch e coll., 1994).

### *Scopo del lavoro*

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare, a livello molecolare, due SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), presenti all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina in caprini di razza Girgentana.

### *Materiale e Metodi*

L'indagine è stata condotta su 369 campioni individuali di sangue di animali di razza Girgentana. Sono stati presi in considerazione campioni provenienti da aziende situate sul territorio siciliano nelle province di Agrigento, Palermo e Messina ed un gruppo di campioni provenienti dall'Istituto Sperimentale Zootecnico di Roma.

Sono stati analizzati 190 campioni dell'azienda Pietranera (**PN**) (Agrigento), 65 campioni dell'Istituto Sperimentale Zootecnico di Palermo (**ISZ-PA**), 62 campioni dell'azienda Fazio (**FZ**) (Agrigento), 28 campioni dell'azienda Lunetta (**LU**) (Messina) e 24 campioni dell'Istituto Sperimentale Zootecnico di Roma (**ISZ-RO**).

Il protocollo di analisi molecolare è stato sviluppato nelle fasi seguenti:

#### ➤ *Estrazione del DNA genomico*

Da ogni campione individuale è stato estratto il DNA genomico partendo da un quantitativo di 500  $\mu$ l di sangue intero. È stato seguito un protocollo di estrazione standard tramite l'utilizzo del GFX Genomic Blood Purification Kit (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW).

La quantificazione del DNA, in ng/ $\mu$ l, è stata eseguita tramite l'utilizzo del NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Celbio, Italia), uno spettrofotometro

capace di dare, tramite l'assorbimento a varie lunghezze d'onda (230-260-280 nm), una misura esatta della concentrazione e della qualità del DNA, quindi del grado di purezza del campione estratto.

I campioni sono stati infine posti in cella frigorifera a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

➤ *Amplificazione della regione di interesse tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)*

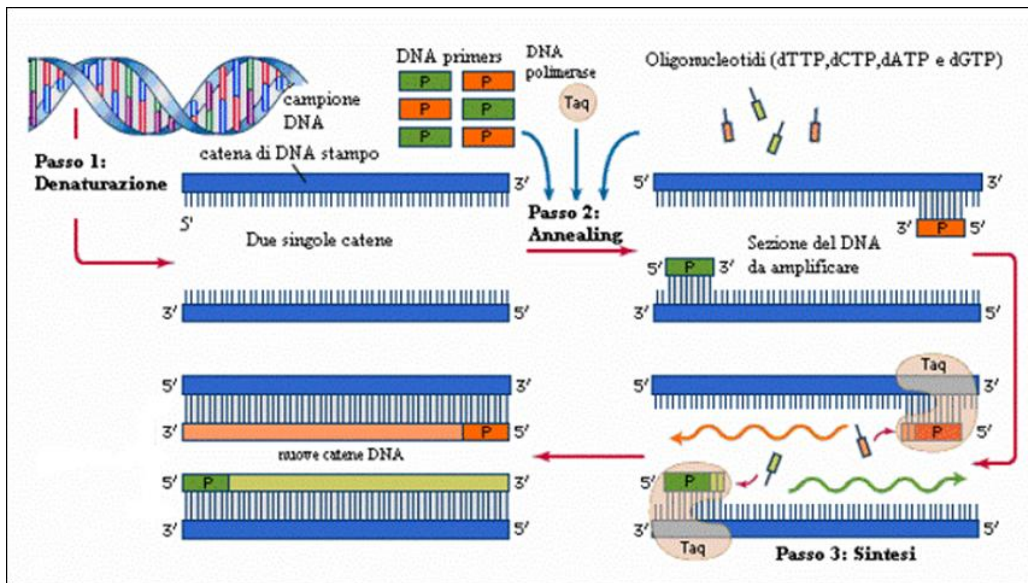
La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione di frammenti di DNA dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. Questa tecnica riproduce, *in vitro*, uno specifico passaggio della riproduzione cellulare ovvero la sintesi di un segmento di DNA a doppia elica partendo da un filamento a singola elica. Questo processo viene svolto da enzimi chiamati DNA polimerasi, in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA.

Per essere eseguita in modo corretto, una PCR ha bisogno di:

- un frammento di DNA da amplificare (anche detto bersaglio);
- dNTP → deossinucleotidi trifosfati, come ATP, CTP, GTP, TTP;
- *primers* → due oligonucleotidi complementari agli estremi del frammento da amplificare;
- Taq DNA polimerasi → una polimerasi estratta da un batterio termofilo (*Thermus aquaticus*), in grado di non denaturarsi ad alte temperature;
- *buffers* → tamponi, contenenti principalmente MgCl<sub>2</sub>, necessari per la reazione di estensione;

La PCR avviene in una serie di cicli composti ognuno da 3 fasi fondamentali: la denaturazione, l'*annealing* o appaiamento e l'estensione (Figura 3.1).

**Figura 3.1:** Rappresentazione delle 3 fasi principali della PCR



La **denaturazione** è la fase in cui il DNA viene sottoposto ad una temperatura compresa tra 94 e 96°C, ciò causa la denaturazione, ovvero la rottura dei legami idrogeno che tengono uniti i due filamenti del DNA.

L'**annealing** o appaiamento è la fase in cui la temperatura di reazione permette ai *primers* di legarsi alle regioni, a loro complementari, presenti sui filamenti di DNA denaturati. La temperatura di questa fase è variabile in funzione della lunghezza dei *primers* e della loro composizione nucleotidica.

L'**estensione** è la fase in cui la Taq DNA polimerasi comincia a sintetizzare la nuova catena di DNA partendo dal singolo filamento ottenuto dalla denaturazione.

Il protocollo utilizzato ha previsto l'amplificazione di un frammento del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina della lunghezza di 709 bp, contenente 588 bp della regione *promoter* e 121 bp dell'esone 1.

Per l'amplificazione del frammento di interesse sono stati utilizzati due *primers*:

*Forward:* **GOAPF3** – 5'-GTC ACT TTC CCG TCC TGG GG-3' (Ballester e coll., 2005)

*Reverse:* **GoatE1R2** – 5'-GCC TTT CAT GGT CTG GGT GAC G-3' (Ballester e coll., 2005)

La PCR è stata eseguita in un volume finale di 20 µl contenenti 1X PCR Master Mix (Fermentas, Burlington, ON, Canada), 10 µM di ogni *primer* e circa 50 ng di DNA genomico. Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con i seguenti parametri (Graziano e coll., 2003):

95°C x 5'

95°C x 15''

63°C x 1'

72°C x 1'30''

10 cicli

95°C x 30''

63°C x 1'

72°C x 1'30''

25 cicli

72°C x 5'

Il prodotto PCR è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1% con *DNA Ladder 1kb* (Fermentas, Burlington, ON, Canada) per verificare l'avvenuta amplificazione del frammento di interesse (Figura 3.2).



**Figura 3.2:** Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% per controllo PCR

**Linea 1:** Frammento amplificato di 709bp

**Linea 2:** Ladder DNA 1kb

➤ *Protocollo PCR-RFLP*

In biologia molecolare, la sigla RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) viene utilizzata per indicare una caratteristica delle molecole del DNA che consente di distinguerle, l'una dall'altra, grazie alle differenti lunghezze delle sequenze di nucleotidi che le compongono. La PCR-RFLP è quindi una tecnica di biologia molecolare che sfrutta tali caratteristiche per mettere a confronto le varie molecole di DNA. Questa tecnica prevede, dopo un'amplificazione iniziale tramite PCR, che il frammento di DNA venga "tagliato" in frammenti di diversa lunghezza mediante enzimi di restrizione. Questi enzimi attuano il "taglio" del DNA solo in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche, specifiche per ogni enzima.

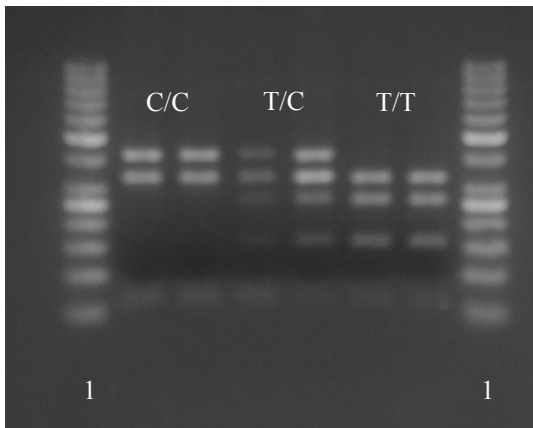
Il protocollo PCR-RFLP, precedentemente utilizzato da Graziano e coll. (2003) su varie razze caprine italiane, ha permesso di analizzare 2 SNPs presenti nella regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina. I siti polimorfici oggetto di studio sono stati la posizione -341, che presenta una transizione T→C, e la posizione -60, che presenta una transizione C→T.

L'enzima di restrizione utilizzato per individuare la transizione T→C in posizione -341 è stato l'FspBI (Fermentas, Burlington, ON, Canada). La reazione di digestione è stata eseguita in un volume finale di 20  $\mu$ l contenenti 5  $\mu$ l di prodotto PCR e 2,5 U (Unità) di enzima. Dopo incubazione a 37°C O/N (*Over/Night*), il risultato della digestione è stato controllato su gel d'agarosio al 2% ed è stato verificato che, il frammento di 709 bp, è stato "tagliato" nel modo seguente (Figura 3.3):

315 bp + 247 bp + 147 bp → T/T

394 bp + 315 bp + 247 bp + 147 bp → T/C

394 bp + 315 bp → C/C



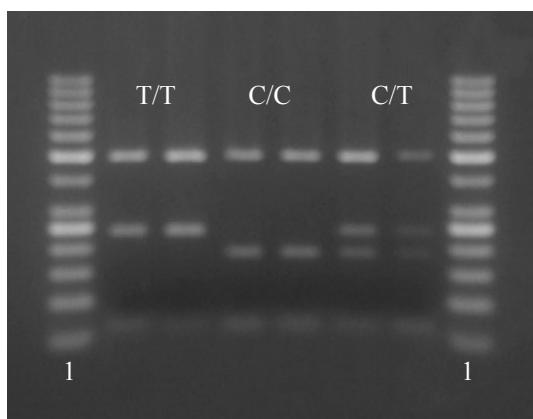
**Figura 3.3:** Elettroforesi su gel d'agarosio al 2% per controllo digestione con enzima di restrizione FspBI  
**Linea 1:** Ladder DNA 50bp

L'enzima di restrizione SmaI (Fermentas, Burlington, ON, Canada) è stato utilizzato per individuare la transizione C→T in posizione -60. La reazione di digestione è stata, anche in questo caso, eseguita in un volume finale di 20 µl contenenti 5 µl di prodotto PCR e 2,5 U (Unità) di enzima. Dopo incubazione a 30°C O/N (*Over/Night*), il risultato della digestione è stato controllato su gel d'agarosio al 2% ed il risultato è stato il seguente (Figura 3.4):

471bp + 180bp + 51bp + 7bp → C/C

471bp + 231bp + 180bp + 51bp + 7bp → C/T

471bp + 231bp + 7bp → T/T



**Figura 3.4:** Elettroforesi su gel d'agarosio al 2% per controllo digestione con enzima di restrizione SmaI  
**Linea 1:** Ladder DNA 50bp

### *Analisi statistiche*

Le frequenze alleliche e genotipiche, relative ai 2 SNPs presenti nella regione *promoter* del gene della β-lattoglobulina della razza caprina Girgentana, sono state valutate tramite l'utilizzo del software Genepop v4.0 (Raymond e Rousset, 1995).

## Risultati e discussione

La tecnica PCR-RFLP ha permesso di individuare rapidamente le mutazioni puntiformi, in posizione -341 (T/C) e -60 (C/T), della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina nella razza Girgentana.

Le tabelle 3.1 e 3.2 mostrano le frequenze alleliche e genotipiche relative alle due mutazioni nei 5 allevamenti presi in esame.

**Tabella 3.1:** Frequenze alleliche relative alle mutazioni -341 T/C e -60 C/T nei diversi allevamenti

<b>Allevamento</b>	<b>-341 T</b>	<b>-341 C</b>
<b>PN</b> (n=190)	0,826	0,174
<b>ISZ-PA</b> (n=65)	0,854	0,146
<b>FZ</b> (n=62)	0,750	0,250
<b>ISZ-RO</b> (n=24)	0,875	0,125
<b>LU</b> (n=28)	0,946	0,054
<b>Allevamento</b>	<b>-60 C</b>	<b>-60 T</b>
<b>PN</b> (n=190)	0,908	0,092
<b>ISZ-PA</b> (n=65)	0,908	0,092
<b>FZ</b> (n=62)	0,895	0,105
<b>ISZ-RO</b> (n=24)	0,792	0,208
<b>LU</b> (n=28)	0,714	0,286

L'analisi delle frequenze alleliche, relative al polimorfismo in posizione -341, ha mostrato la presenza dell'allele mutato -341 C in tutte le aziende, con frequenze comprese tra 0,250 per l'azienda Fazio e 0,054 per l'azienda Lunetta. Per il polimorfismo in posizione -60, la frequenza allelica più alta, relativamente all'allele mutato -60 T, è stata riscontrata nell'azienda Lunetta con valori di 0,286 mentre. Le aziende Pietranera e ISZ-Palermo hanno mostrato la frequenza più bassa con un valore pari a 0,092.

L'analisi delle frequenze genotipiche ha messo in evidenza che, per la posizione -341, l'azienda Fazio presenta la frequenza più elevata sia della mutazione in stato di eterozigosi -341 T/C che in stato di omozigosi -341 C/C con valori, rispettivamente, di 0,40 e 0,05. La stessa mutazione è stata riscontrata, con valori di 0,02, nelle aziende Pietranera e ISZ-Palermo, mentre non è risultata presente nelle aziende ISZ-Roma e Lunetta.

**Tabella 3.2:** Frequenze genotipiche relative alle mutazioni -341 T/C e -60 C/T nei diversi allevamenti

<b>Allevamento</b>	<b>-341 T/T</b>	<b>-341 T/C</b>	<b>-341 C/C</b>
<b>PN</b> (n=190)	0,67	0,31	0,02
<b>ISZ-PA</b> (n=65)	0,72	0,26	0,02
<b>FZ</b> (n=62)	0,55	0,40	0,05
<b>ISZ-RO</b> (n=24)	0,75	0,25	-
<b>LU</b> (n=28)	0,89	0,11	-
<b>Allevamento</b>	<b>-60 C/C</b>	<b>-60 C/T</b>	<b>-60 T/T</b>
<b>PN</b> (n=190)	0,82	0,17	0,01
<b>ISZ-PA</b> (n=65)	0,82	0,18	-
<b>FZ</b> (n=62)	0,79	0,21	-
<b>ISZ-RO</b> (n=24)	0,63	0,33	0,04
<b>LU</b> (n=28)	0,46	0,50	0,04

Per la posizione -60, l'azienda Lunetta ha presentato la frequenza più elevata relativamente alla mutazione in stato di eterozigosi -60 C/T, con un valore di 0,50. La mutazione in stato di omozigosi -60 C/C è stata riscontrata con frequenze pari a 0,04 nelle aziende Lunetta e ISZ-Roma e con una frequenza di 0,01 nell'azienda Pietranera.



Le tabelle 3.3 e 3.4 mostrano il confronto fra i genotipi osservati e attesi, il valore del  $\chi^2$ , il *P-value* e l'errore standard (S.E.), relativi ai due siti polimorfici, ottenuti nei cinque allevamenti oggetto di studio.

**Tabella 3.3:** Confronto tra genotipi osservati e attesi per le posizioni -341 e -60 nei cinque allevamenti

	<b>-341 T/T</b>		<b>-341 T/C</b>		<b>-341 C/C</b>	
<b>Allevamento</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>
<b>PN (n=190)</b>	128	129,660	58	54,681	4	5,660
<b>ISZ-PA (n=65)</b>	47	47,326	17	16,349	1	1,326
<b>FZ (n=62)</b>	34	34,780	25	23,439	3	3,780
<b>ISZ-RO (n=24)</b>	25	25,055	3	2,891	0	0,055
<b>LU (n=28)</b>	18	18,319	6	5,362	0	0,319
	<b>-60 C/C</b>		<b>-60 C/T</b>		<b>-60 T/T</b>	
<b>Allevamento</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>
<b>PN (n=190)</b>	156	156,570	33	31,860	1	1,570
<b>ISZ-PA (n=65)</b>	53	53,512	12	10,977	0	0,512
<b>FZ (n=62)</b>	49	49,634	13	11,732	0	0,634
<b>ISZ-RO (n=24)</b>	13	14,182	14	11,636	1	2,182
<b>LU (n=28)</b>	15	14,957	8	8,085	1	0,957

Per entrambi i siti polimorfici -341 e -60, i genotipi osservati non si discostano molto dai genotipi attesi. Considerando i valori del test del  $\chi^2$  riportati nella Tabella 3.4, le due mutazioni, all'interno di ognuno degli allevamenti, sono risultate in equilibrio Hardy-Weinberg ed il dato è stato confermato dai *P-values* (*P-value* > 0,05).

La Tabella 3.5 mostra le frequenze alleliche e genotipiche ottenute considerando il totale degli individui. Gli alleli mutati -341 C e -60 T hanno mostrato, rispettivamente, frequenze pari a 0,169 e 0,117.

**Tabella 3.4:** Valori del  $\chi^2$ , valori di P e dell'errore standard (S.E.) nei 5 allevamenti considerati

Allevamento	Valore $\chi^2$ (1 d.f.; $p \leq 0,05$ )	P-VALUE (-341 T/C)	S.E.
PN (n=190)	0,709	0,6134	0,0013
ISZ-PA (n=65)	0,108	1	0,0000
FZ (n=62)	0,282	0,7399	0,0007
ISZ-RO (n=24)	0,059	1	0,0000
LU (n=28)	0,400	1	0,0000
Allevamento	Valore $\chi^2$ (1 d.f.; $p \leq 0,05$ )	P-VALUE (-60 C/T)	S.E.
PN (n=190)	0,250	1	0,0000
ISZ-PA (n=65)	0,612	1	0,0000
FZ (n=62)	0,779	1	0,0000
ISZ-RO (n=24)	1,220	1	0,0000
LU (n=28)	0,003	0,3775	0,0011

**Tabella 3.5:** Frequenze alleliche e genotipiche relative alle mutazioni -341 T/C e -60 C/T nel totale degli individui considerati (n=369)

<b>-341 T</b>	<b>-341 C</b>	<b>-341 T/T</b>	<b>-341 T/C</b>	<b>-341 C/C</b>
0,831	0,169	0,68	0,30	0,02
<b>-60 C</b>	<b>-60 T</b>	<b>-60 C/C</b>	<b>-60 C/T</b>	<b>-60 T/T</b>
0,883	0,117	0,77	0,22	0,01

Considerando i genotipi osservati e attesi (Tabella 3.6), per i due siti polimorfici in posizione -341 e -60, il valore del test del  $\chi^2$  è risultato pari a 0,87 e 0,99 (1 d.f.;  $p \leq 0,05$ ), rispettivamente. Le due mutazioni, considerando il totale degli individui, sono risultate in equilibrio Hardy-Weinberg ed il dato è stato confermato anche dai *P-values*  $> 0,05$ .

**Tabella 3.6:** Genotipi osservati e attesi, valori di P e dell'errore standard (S.E.) nel totale degli individui considerati (n=369)

<b>-341 T/T</b>		<b>-341 T/C</b>		<b>-341 C/C</b>	
<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>
252	254,516	109	103,969	8	10,516
<b>P-Value</b>			<b>S.E.</b>		
0,4587			0,0022		
<b>-60 C/C</b>		<b>-60 C/T</b>		<b>-60 T/T</b>	
<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>	<b>Oss.</b>	<b>Att.</b>
286	287,959	80	76,081	3	4,959
<b>P-Value</b>			<b>S.E.</b>		
0,4458			0,0019		

### *Conclusioni*

Il protocollo PCR-RFLP ha permesso di analizzare i polimorfismi in posizione -341 T/C e -60 C/T presenti all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina. I 2 SNPs non hanno mostrato deviazioni significative dall'equilibrio Hardy-Weinberg, dati i valori del test del  $\chi^2$  e i *P-values* riscontrati all'interno della "popolazione" costituita da 369 individui di razza Girgentana.

Gli studi condotti da Graziano e coll. nel 2003, e da Ballester e coll. nel 2005, avevano mostrato la presenza delle suddette mutazioni nella razza caprina Girgentana. Rispetto ai risultati ottenuti da questi autori, la "popolazione" oggetto di studio ha presentato delle frequenze più elevate sia dei genotipi -341 T/C (0,30 vs 0,27) che dei genotipi -60 C/T (0,22 vs 0,06). Va inoltre sottolineata la presenza di genotipi -60 T/T, anche se con frequenze dello 0,01, che non erano stati riscontrati precedentemente.

La regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina contiene numerosi fattori di trascrizione che possono influenzare l'espressione del gene stesso. Le

mutazioni considerate nel presente studio si trovano vicino ai siti di legame di questi fattori. Ulteriori studi saranno comunque necessari per stabilire l'effetto che queste "varianti" potrebbero avere sull'espressione del gene della  $\beta$ -lattoglobulina e sulle caratteristiche quanti-qualitative del latte.

## *CAPITOLO 4*

### Terzo Contributo Sperimentale

*Analisi molecolare della regione promoter del gene della  $\beta$ -  
lattoglobulina e ricerca di fattori di trascrizione, in ovini e caprini  
autoctoni siciliani*

## *Introduzione*

La struttura e l'organizzazione del gene della  $\beta$ -lattoglobulina, nelle specie ovina e caprina, è ormai nota grazie agli studi condotti da numerosi autori (Gaye e coll., 1986; Ali e coll., 1988; Harris e coll., 1988; Folch e coll., 1993; Folch e coll., 1994). Nel corso degli anni, l'applicazione di tecniche di biologia molecolare ha permesso di individuare e studiare i polimorfismi presenti non soltanto nelle regioni codificanti ma anche in porzioni "regolatrici" del gene. Queste regioni, chiamate *promoter*, non influiscono direttamente sulla sequenza di aminoacidi della proteina, ma sono indispensabili per la funzionalità dei geni stessi (Mercier e coll., 1993ab; Groenen e coll., 1994; Rosen e coll., 1999).

La regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina contiene numerosi fattori di trascrizione specifici della ghiandola mammaria. Alcuni di questi fattori, identificati per la prima volta nella  $\beta$ -lattoglobulina ovina (Watson e coll., 1991), sono stati riscontrati sia nella regione *promoter* della  $\beta$ -lattoglobulina caprina (Folch e coll., 1994), sia all'interno della regione *promoter* di altri geni lattoproteici appartenenti a diverse specie, come per esempio, l' $\alpha$ s1, la  $\beta$  e l' $\alpha$ s2-caseina, l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina nel bovino, l' $\alpha$ -lattoalbumina nell'uomo, l' $\alpha$ , la  $\beta$  e la  $\gamma$ -caseina nel ratto e il WAP (*Whey Acidic Protein*) nel topo (Watson e coll., 1991).

I polimorfismi presenti all'interno della regione *promoter* potrebbero essere responsabili di differenti livelli di espressione del gene soprattutto se localizzati all'interno dei siti di legame di fattori di trascrizione.

Notevole attenzione va rivolta ai risultati ottenuti, per la regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina, da Graziano e coll. nel 2003 e da Ballester e coll. nel 2005, che hanno evidenziato la presenza di numerose mutazioni. Un totale di 8 SNPs

e una delezione/inserzione sono stati individuati all'interno della regione *promoter* della  $\beta$ -lattoglobulina in diverse razze caprine. I polimorfismi in posizione -64 (A/G) e -118 (T/C) sono localizzati all'interno di un sito di legame *consensus* del fattore di trascrizione AP-2 (*Activator Protein-2*) (Wingender e coll., 1996) e, quindi, potrebbero essere collegati all'espressione genica della proteina ed alle differenze riscontrabili nel contenuto in  $\beta$ -lattoglobulina del latte.

### *Scopo del lavoro*

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare, a livello molecolare, la regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina, in ovini e caprini autoctoni siciliani, al fine di individuare i polimorfismi, di cercare fattori di trascrizione all'interno della regione *promoter* e di verificare se i polimorfismi eventualmente trovati, ricadano all'interno di siti di legame di questi fattori.

### *Materiale e Metodi*

L'indagine è stata condotta su un totale di 39 campioni individuali di sangue di cui 27 appartenenti alla specie caprina e 12 appartenenti alla specie ovina.

In particolare, per i caprini, sono stati analizzati 10 individui di razza Maltese, 9 di razza Girgentana e 8 di razza Derivata di Siria. Per gli ovini, sono stati analizzati 8 individui di razza Valle del Belice e 4 individui di razza Comisana.

Il protocollo di analisi molecolare è stato sviluppato nelle fasi seguenti:

#### ➤ *Estrazione del DNA genomico*

Da ogni campione individuale è stato estratto il DNA genomico partendo da un quantitativo di 500  $\mu$ l di sangue intero. È stato seguito un protocollo di estrazione standard tramite l'utilizzo del GFX Genomic Blood Purification Kit (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, SW).

La quantificazione del DNA, in ng/ $\mu$ l, è stata eseguita tramite l'utilizzo del NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Celbio, Italia) e i campioni sono stati posti in cella frigorifera a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

➤ *Amplificazione della regione di interesse tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Il protocollo utilizzato ha previsto l'amplificazione dell'intera regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina e ovina.

Per la messa a punto del protocollo PCR, sono state allineate le sequenze relative alle regioni *promoter* nelle due specie, presenti nel database GenBank con i numeri di accesso X69105 per gli ovini e Z33881 per i caprini.

Tra le due sequenze è stata riscontrata un'omologia del 95% ed è stato possibile, quindi, disegnare un set di *primers* comuni alle due specie, da utilizzare sia per la reazione di amplificazione che per la successiva reazione di sequenziamento (Tabella 4.1).

I *primers* BLG-F1 e BLG-R1 sono stati utilizzati per amplificare un frammento della lunghezza di 2255 bp, contenente 2138 bp della regione *promoter* e 117 bp dell'esone 1.

La PCR è stata eseguita in un volume finale di 20  $\mu$ l contenenti 1X PCR Master Mix (Fermentas, Burlington, ON, Canada), 10  $\mu$ M di ogni *primer* e circa 75 ng di DNA genomico. Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) con i seguenti parametri:



95°C x 5'		30 cicli
95°C x 30''		
59°C x 1'		
72°C x 1'		
72°C x 5'		

Il prodotto PCR è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio all'1% con *DNA Ladder 1kb* (Fermentas, Burlington, ON, Canada) per verificare l'avvenuta amplificazione del frammento di interesse.

**Tabella 4.1:** *Primers* utilizzati per amplificare e sequenziare la regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nelle specie ovina e caprina

<b>Primers Forward</b>	<b>Sequenza</b>
BLG-F1	5'-AGG CCA GAG GTG CTT TAT TTC CGT-3'
BLG-F2	5'-TAG TCT CTG CCT CCG TGT TCA CAT-3'
BLG-F3	5'-AAC CTC CAA CCA AGA TGC TGA CCA-3'
BLG-F4	5'-AGG GTC AGG TCA CTT TCC CGT-3'
BLG-F5	5'-AGA AGG CCT CCT ATT GTC CTC GTA GA-3'
<b>Primers Reverse</b>	<b>Sequenza</b>
BLG-R1	5'-TCC ATG GTC TGG GTG ACG ATG ATG-3'
BLG-R2	5'-TTC CCG GAA TCC TAC TTG GCT CAT-3'
BLG-R3	5'-ACC AGC TCC TCC AAA CCA TGT GA-3'
BLG-R4	5'-AGT GAC TAA ACC ACT CAT CAC AGG G-3'
BLG-R5	5'-CAA CAA GGA ACT TCA GGT TGG AAT-3'

➤ *Sequenziamento del frammento di interesse tramite ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer*

Il protocollo della reazione di sequenziamento prevede, innanzitutto, che i singoli prodotti PCR vengano purificati. Per la reazione di purificazione, 5  $\mu$ l di prodotto PCR vengono fatti reagire con 10 U di Esonucleasi I e 1 U di SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Fermentas, Burlington, ON, Canada), utilizzando un termociclatore con un programma che prevede 15 min a 37°C e, successivamente, 15 min a 85°C.

Dopo la purificazione, i prodotti PCR sono stati utilizzati per la reazione di sequenziamento che ha previsto l'uso del BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La reazione di sequenziamento è stata eseguita in un volume finale di 10 µl contenenti 1X Sequencing Buffer, 0,5 µl di BigDye-Cycle Sequencing RR24, 5 µM di ogni singolo *primer* e 1 µl di prodotto PCR purificato.

Per ogni prodotto PCR purificato, la reazione di sequenziamento ha previsto l'utilizzo di tutti i *primers* riportati in Tabella 4.1, utilizzati singolarmente. Il programma del termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) ha previsto i seguenti parametri:

96°C x 1'		25 cicli
96°C x 10''		
50°C x 5''		
60°C x 1'30''		
4°C x ∞		

I frammenti sequenziati sono stati infine precipitati seguendo il protocollo di precipitazione con Etanolo – EDTA – Sodio Acetato riportato all'interno del BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'ultimo passaggio del protocollo prevede che i campioni vengano risospesi in Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA) ed infine posti all'interno dell'ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### ***Analisi statistiche***

L'analisi delle sequenze nucleotidiche è stata effettuata tramite software SeqScape v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le sequenze sono state successivamente allineate con il software Clustal W (Thomson e coll., 1994). I frammenti relativi alla regione *promoter* del gene della β-lattoglobulina, di lunghezza pari a 2138 bp, sono

stati esportati ed utilizzati per la ricerca di siti di legame di fattori di trascrizione tramite l'utilizzo del software TESS (Schug e Overton, 1997).

## *Risultati e discussione*

### ➤ *Identificazione dei polimorfismi nella regione promoter del gene della $\beta$ -lattoglobulina caprina*

La regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina è stata sequenziata in 10 individui di razza Maltese, 9 di razza Girgentana e 8 di razza Derivata di Siria. L'allineamento e l'analisi delle sequenze ha mostrato la presenza di 31 SNPs (Tabella 4.2). Sei di questi SNPs erano stati precedentemente descritti da Ballester e coll. nel 2005 in diverse razze caprine.

Sul totale dei 31 SNPs individuati, 19 SNPs sono stati trovati nella razza Maltese e 14 SNPs sono stati trovati nelle razze Girgentana e Derivata di Siria.

Per la Maltese, 9 dei 19 SNPs trovati, possono essere considerati specifici della razza, 6 SNPs sono in comune con la Derivata di Siria e solo 1 SNP è in comune con la razza Girgentana.

La razza Girgentana ha presentato 7 SNPs specifici, mentre la Derivata di Siria solo 2 SNPs, inoltre le due razze presentano 3 SNPs in comune.

Paragonando le tre razze, dalla Tabella 4.2, è possibile vedere come queste abbiano in comune solo 3 SNPs e precisamente nelle posizioni -642 T/C, -980 G/C e -2041 T/C.

La Maltese e la Derivata di Siria hanno presentato il maggior numero di SNPs in comune.

**Tabella 4.2:** SNPs identificati all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nelle razze caprine Maltese (M), Girgentana (G) e Derivata di Siria (D);

(\*) SNPs identificati da Ballester e coll. nel 2005

	-60 C/T*	-118 C/T*	-134 G/T*	-197 G/A*	-205 C/T	-283 C/T*	-292 G/T	-341 T/C*	-577 G/A	-642 T/C	-725 G/A	-810 G/A	-980 G/C	-1037 C/T	-1239 G/T	-1249 G/A	-1259 G/A	-1514 A/G	-1548 A/G	-1581 C/T	-1606 C/A	-1619 C/T	-1679 G/A	-1703 G/A	-1743 C/T	-1833 A/G	-1849 C/T	-1912 C/T	-1925 G/A	-1945 G/A	-2041 T/C		
Cons	C	C	G	G	C	C	G	T	G	T	G	G	G	C	G	G	G	A	A	C	C	C	G	G	C	A	C	C	G	G	T		
M	-	-	K	-	Y	Y	-	-	-	Y	-	-	S	-	K	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	Y	-	-	-	Y		
M	-	-	K	-	Y	Y	-	-	-	Y	-	-	S	-	K	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	Y	-	-	-	Y		
M	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C		
M	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C		
M	-	-	T	R	-	Y	-	-	-	Y	-	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y		
M	-	-	-	-	-	-	T	-	A	C	-	-	C	-	-	-	-	-	G	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	A	-		
M	-	-	-	-	-	-	K	-	R	Y	-	-	S	-	-	-	-	-	-	Y	-	Y	-	-	-	-	-	R	R	Y	-		
M	-	-	K	-	-	Y	-	-	-	Y	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y		
M	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	
M	-	-	K	R	-	Y	-	-	-	Y	-	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	
G	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	Y	-	-	S	Y	-	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	Y	-	-	-	-	
G	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	Y	-	-	S	Y	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	
G	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	S	Y	-	R	-	R	-	-	-	-	-	A	Y	R	-	-	R	-	-	-	
G	Y	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	S	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	Y	
G	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
G	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
D	Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	K	-	-	Y	-	-	-	Y	-	-	S	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
D	-	-	K	-	-	Y	-	-	-	Y	R	R	S	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	Y	
D	-	-	K	-	-	Y	-	-	-	Y	R	R	S	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	Y	
D	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
D	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y

Sebbene l'origine di queste due razze rimane ancora sconosciuta, questo risultato può essere spiegato basandosi sulla credenza degli allevatori siciliani, secondo cui le caratteristiche morfologiche di queste due razze possono essere attribuite ad un antenato comune. Inoltre, gli studi condotti da Sardina e coll. nel 2004, sul DNA mitocondriale, hanno dimostrato una bassa diversità genetica (0,012) tra le razze Maltese e Derivata di Siria.

➤ *Identificazione dei polimorfismi nella regione promoter del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina*

La regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina è stata sequenziata in 8 individui di razza Valle del Belice e 4 individui di razza Comisana. L'allineamento e l'analisi delle sequenze ha mostrato la presenza di 34 SNPs (Tabella 4.3).

Le due razze hanno presentato 32 SNPs in comune e solo 2 SNPs, in posizione -2024 T/A e -2040 T/G, sono risultati specifici della razza Valle del Belice.

I 6 SNPs presenti nella regione compresa tra la posizione -42 (T/C) e -246 (A/T) sono stati trovati in condizione eterozigote in tutti gli individui di razza Comisana e sono presenti, nella stessa condizione polimorfica, in 3 individui di razza Valle del Belice. Il polimorfismo in posizione -438 C/T sembra essere associato ai 5 SNPs presenti nella regione compresa fra -545 (C/T) e -722 (G/A). Questa possibile associazione è presente in 2 individui di razza Valle del Belice e un individuo di razza Comisana. Dall'esame della Tabella 4.3 è anche possibile vedere una seconda possibile associazione tra gruppi di SNPs. Gli animali, di razza Valle del Belice e Comisana, portatori dei 3 SNPs in condizione eterozigote, nella regione compresa tra -447 (A/C) e -528 (A/G), presentano anche, nella stessa condizione polimorfica, gli SNPs compresi fra la posizione -764 (G/A) e -1981 (A/G).

**Tabella 4.3:** SNPs identificati all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nelle razze ovine Valle del Belice (V) e Comisana (C)

	-42 T/C	-46 T/G	-117 G/A	-134 G/T	-163 T/C	-246 A/T	-438 C/T	-447 A/C	-477 T/C	-528 A/G	-545 C/T	-575 G/A	-654 G/A	-696 T/C	-722 G/A	-764 G/A	-919 A/G	-1230 A/G	-1245 C/T	-1437 G/A	-1448 G/C	-1631 G/A	-1733 A/G	-1770 C/T	-1780 T/G	-1791 T/C	-1815 G/T	-1909 T/G	-1911 C/T	-1913 C/T	-1935 T/C	-1981 A/G	-2024 T/A	-2040 T/G	
Cons	T	T	G	G	T	A	C	A	T	A	C	G	G	T	G	G	A	A	C	G	G	G	A	C	T	T	G	T	C	C	T	A	T	T	
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	Y	K	R	K	Y	W	Y	-	-	-	Y	R	R	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	Y	K	R	K	Y	W	Y	-	-	-	Y	R	R	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
V	Y	K	R	K	Y	W	-	M	Y	R	-	-	-	-	-	R	R	R	Y	R	S	R	R	Y	K	Y	K	K	Y	Y	Y	R	-	-	
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	Y	K	R	K	Y	W	-	M	Y	R	-	-	-	-	-	R	R	R	Y	R	S	R	R	Y	K	Y	K	K	Y	Y	Y	R	-	-	
C	Y	K	R	K	Y	W	Y	-	-	-	Y	R	R	Y	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	Y	K	R	K	Y	W	-	M	Y	R	-	-	-	-	-	R	-	R	Y	R	S	R	R	Y	K	Y	K	K	Y	Y	Y	R	-	-	
C	Y	K	R	K	Y	W	-	M	Y	R	-	-	-	-	-	R	-	R	Y	R	S	R	R	Y	K	Y	K	K	Y	Y	Y	R	-	-	

Può essere considerato singolarmente il polimorfismo in posizione -919 A/G, che è stato trovato in entrambe le razze ma non sembra essere associato a nessuno dei suddetti gruppi di SNPs.

Il risultato ottenuto può essere spiegato considerando che la razza Comisana è presente all'interno dell'albero filogenetico della razza Valle del Belice.

La razza Valle del Belice trae, infatti, la sua origine dall'incrocio tra la razza autoctona Pinzirita, presente in Sicilia nella parte occidentale dell'isola, e altre due razze, la Comisana e la Sarda. In particolare, si ritiene che, in tempi lontani, individui di razza Pinzirita siano stati oggetto di incroci con individui di razza Comisana, il cui insediamento aveva interessato per lo più le zone orientali della Sicilia e che, da questi incroci, si siano ottenuti individui con caratteristiche intermedie, che sono stati poi incrociati con ovini di razza Sarda, giunti in Sicilia durante la dominazione araba (Portolano, 1987).

➤ *Identificazione di siti di legame di fattori di trascrizione all'interno della regione promoter del gene della  $\beta$ -lattoglobulina*

L'analisi delle sequenze della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nelle razze ovine e caprine oggetto di studio, ha portato all'identificazione di numerosi siti di legame di fattori di trascrizione (Tabella 4.4).

Nel 1991, Watson e coll. utilizzarono, per la prima volta, un set di oligonucleotidi, contenenti i siti di riconoscimento di vari fattori di trascrizione, al fine di identificare queste particolari "proteine di legame", all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina. Gli oligonucleotidi, identificati con le sigle StM, A3S ed A1 contenevano il sito *consensus* di un fattore di trascrizione specifico della ghiandola mammaria, chiamato MPBF (*Milk Protein Binding Factor*). All'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina, questo fattore

presentava 3 siti di legame (Watson e coll., 1991). Gli stessi autori hanno identificato la presenza di potenziali siti di legame di MPBFs, nella *5'-flanking region* di numerosi geni lattoproteici appartenenti a diverse specie, come per esempio, l' $\alpha$ 1, la  $\beta$ - e l' $\alpha$ 2-caseina, l' $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina nel bovino, l' $\alpha$ -lattoalbumina nell'uomo, l' $\alpha$ , la  $\beta$  e la  $\gamma$ -caseina nel ratto e il WAP (*Whey Acidic Protein*) nel topo (Watson e coll., 1991). Proprio la presenza di almeno un sito di riconoscimento di questo fattore, nelle regioni *promoter* di geni lattoproteici appartenenti a diverse specie, ne ha suggerito il ruolo come regolatore dell'espressione di questi stessi geni (Watson e coll., 1991; Burdon e coll., 1994).

La Tabella 4.4 mostra i siti di legame dei fattori di trascrizione trovati all'interno della regione *promoter* della  $\beta$ -lattoglobulina nelle nostre razze.

I tre siti di legame del fattore di trascrizione MPBF, descritti da Watson e coll. (1991), sono stati trovati nella regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina in entrambe le specie. Nel sito di legame riconosciuto dall'oligonucleotide StM, all'interno della regione -93/-77, è stata trovata una sola differenza nucleotidica tra le due specie (indicata in Tabella 4.4 da **T** nella sequenza caprina), mentre non sono state riscontrate differenze per gli altri due siti di legame di questo fattore, corrispondenti agli oligonucleotidi A3S ed A1.

Il *Nuclear Factor-I* (NF-I) appartiene ad una famiglia di proteine considerate fattori di trascrizione ubiquitari per molti geni (Shaul e coll., 1986; Jones e coll., 1987; Rossi e coll., 1988). L'NF-I è un fattore indispensabile per la replicazione dei virus (Nagata e coll., 1983) ed alcuni studi ne riportano l'importanza nella regolazione di molti geni (Graves e coll., 1991). In alcuni casi, questi fattori NF-I cooperano con altri fattori di trascrizione ubiquitari o tessuto-specifici che presentano i siti di legame nelle loro immediate vicinanze.

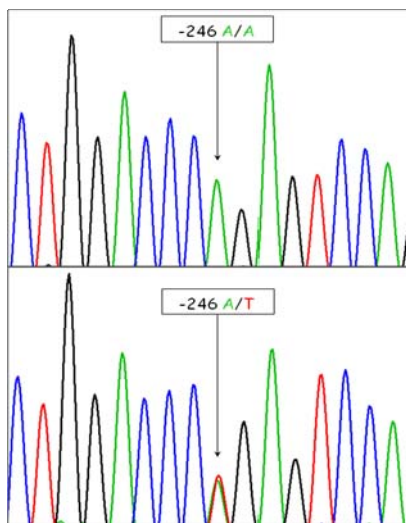


**Tabella 4.4:** Fattori di Trascrizione identificati nella regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina e caprina

Fattori di Trascrizione	Regione <i>promoter</i> $\beta$ -lattoglobulina ovina		Regione <i>promoter</i> $\beta$ -lattoglobulina caprina	
	Posizione	Sequenza	Posizione	Sequenza
MPBF (StM)	-93/-77	GATTCCGGGAACCGCGT	-93/-77	GATTCCGGGAACCTCGT
MPBF (A3S)	-209/-197	TCTACCAGGAACC	-210/-198	TCTACCAGGAACC
MPBF (A1)	-277/-261	TGTTCCCTGGGCACTGGCA	-277/-261	TGTTCCCTGGGCACTGGCA
NF-I (S2)	-159/-146	TGGAAGAAGGCCTG	-159/-146	TGGAAGAAGGCCTG
NF-I (A2)	-253/-240	TGGACCCWGAGTCC	<i>NON PRESENTE</i>	
NF-I (A1)	-271/-258	TGGCACTGGCAGCC	-271/-258	TGGCACTGGCAGCC
NF-I (D2)	-376/-363	TGGAGGAGCTGGTG	-376/-363	TGGAGGAGCTGGTG
NF-I/MPBF	-205/-196	CCAGGAACCG	-206/-197	CYAGGAACCR
MAF	-719/-711	GAGGGAAGT	-719/-711	GAGGGAAGT

I siti di legame per l'NF-I sono stati identificati da Watson e coll. nel 1991, nella regione *promoter* della  $\beta$ -lattoglobulina ovina, grazie all'utilizzo degli oligonucleotidi S2, A2, A1 e D2 che contenevano il sito *consensus* per questo fattore. Nella regione *promoter* delle razze ovine oggetto di studio sono stati individuati tutti e 4 i siti di legame relativi al fattore di trascrizione NF-I riconosciuto dagli oligonucleotidi S2, A2, A1 e D2, e, nella regione -205/-196, è stato individuato il sito di legame comune ad entrambi i fattori NF-I e MPBF.

All'interno della sequenza *consensus* per il fattore di trascrizione NF-I, in posizione -253/-240, è stato trovato uno degli SNPs comuni alle razze Valle del Belice e Comisana ed in particolare il polimorfismo A/T in posizione -246 (indicato con **W** in Tabella 4.4). La Figura 4.1 mostra un esempio di cromatogrammi di due individui con genotipo differente per lo SNP in posizione -246.

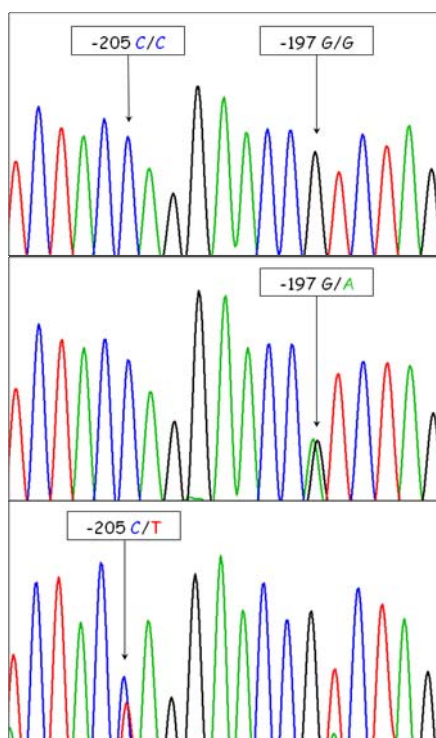


**Figura 4.1:** SNP presente in posizione -246 nelle razze Valle del Belice e Comisana

Nella regione *promoter* delle razze caprine, non si sono riscontrate differenze rispetto alle razze ovine, relativamente ai NF-I riconosciuti dagli oligonucleotidi S2, A1 e D2. L'NF-I in posizione -253/-240 non è stato trovato negli individui analizzati. La perdita di questo fattore è dovuta alla mancanza di una base azotata, nella regione

*promoter*, in corrispondenza della prima metà della sequenza *consensus* di questo fattore (TGGG(CCCAG)AGTCC).

In posizione -206/-197 del *promoter* caprino è stato individuato il sito di legame comune ad entrambi i fattori NF-I e MPBF. All'interno di questa regione sono stati individuati i 2 SNPs -205 C/T e -197 G/A (indicati in Tabella 4.4 con **Y** e **R**, rispettivamente) presenti nelle nostre razze, entrambi gli SNPs sono stati trovati nella Maltese mentre, la Derivata di Siria presenta solo il polimorfismo in posizione -197 G/A. La Figura 4.2 mostra i cromatogrammi relativi ai diversi genotipi riscontrati alle posizioni -205 e -197.



**Figura 4.2:** SNPs presenti in posizione -205 e -197 nelle razze Maltese e Derivata di Siria

All'interno della regione *promoter* di entrambe le specie è stato, infine, trovato il sito di legame di un fattore di trascrizione MAF (*Mammary cell Activating Factor*) che è stato descritto nel topo (MMTV – *Mouse Mammary Tumor Virus*) come un fattore importante per l'attivazione specifica delle cellule della ghiandola mammaria e per

l'espressione dei geni, nella ghiandola stessa, durante la lattazione (Mink e coll., 1992).

### *Conclusioni*

La tecnica del sequenziamento, e la successiva analisi delle sequenze ottenute, ha permesso di individuare numerosi polimorfismi all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina nelle razze ovine e caprine autoctone siciliane.

La presenza di siti di legame per il fattore MPBF, all'interno delle regioni *promoter* dei geni lattoproteici di diverse specie, suggerisce che questo fattore abbia un ruolo importante come regolatore nell'espressione della  $\beta$ -lattoglobulina.

La presenza di cinque siti di legame per il fattore NF-I suggerisce che esista una forma specifica di questo fattore direttamente coinvolta nella regolazione della trascrizione del gene stesso.

La presenza di SNPs all'interno delle regioni *consensus* di questi fattori di trascrizione potrebbe influenzare la capacità di attacco degli stessi e, quindi, il livello trascrizionale del gene della  $\beta$ -lattoglobulina.

I meccanismi che regolano l'espressione dei geni sono molto complessi ed ulteriori studi saranno necessari per capire il possibile effetto che questi SNPs possono avere sui siti di legame dei fattori di trascrizione, la loro relazione con l'espressione del gene e il ruolo funzionale all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina ovina e caprina.

## *CAPITOLO 5*

### Conclusioni

L'applicazione di diverse tecniche di biologia molecolare al gene della  $\beta$ -lattoglobulina, in razze ovine e caprine autoctone siciliane, ha permesso di studiare e di ampliare le conoscenze relative alla struttura del gene stesso.

Gli studi condotti sulla regione *promoter* di questo gene, e l'elevato numero di polimorfismi trovati, hanno messo in evidenza l'elevata variabilità all'interno delle nostre razze ovine e caprine.

Al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina ovina, gli studi condotti nella razza Valle del Belice, hanno mostrato una maggiore frequenza dell'allele B rispetto ad A. Date le opinioni contrastanti sull'effetto che questi due alleli possono avere sulle caratteristiche quanti-qualitative del latte, ulteriori studi saranno necessari per mettere in relazione i polimorfismi presenti con i caratteri produttivi.

Gli studi di espressione genica tramite Real Time PCR, potrebbero essere utilizzati per stabilire quale dei due alleli ha un più alto livello di espressione nei tessuti della ghiandola mammaria ovina e, di conseguenza, si potrebbe stabilire se gli animali portatori di genotipi diversi a questo *locus*, presentano un diverso livello trascrizionale della proteina. La diversa espressione genica potrebbe poi essere messa in relazione alle varie caratteristiche produttive.

Ulteriori studi potrebbero riguardare la regione *promoter* del gene, dato l'elevato numero di SNPs trovati in comune tra le razze Valle del Belice e Comisana. L'analisi di questi SNPs su un più elevato numero di campioni, non soltanto appartenenti a queste due razze ma anche alle altre due razze, Pinzirita e Sarda, che hanno contribuito alla formazione della razza Valle del Belice, potrebbe permettere di identificare un aplotipo unico per razza al gene della  $\beta$ -lattoglobulina da poter possibilmente utilizzare come marcatore genetico.

Al *locus* della  $\beta$ -lattoglobulina caprina, gli studi condotti sulle nostre razze si sono incentrati sulla regione *promoter* del gene. Per il mancato ritrovamento di mutazioni che portano a cambi aminoacidici della proteina, le ragioni di un diverso contenuto nel latte, di questa proteina, vanno quindi ricercate all'interno della regione *promoter*, vista l'importanza nel controllare la funzionalità del gene.

Dato l'elevato numero di SNPs trovati e data la presenza di alcuni di questi polimorfismi all'interno di due o di tutte e tre le razze studiate, ulteriori analisi saranno effettuate proprio per studiare questi SNPs su un più elevato numero di campioni. Si potrebbero ricercare delle combinazioni di SNPs al fine di individuare aplotipi unici per ogni razza, da poter mettere in relazione all'espressione genica a livello della ghiandola mammaria e ad alcune caratteristiche produttive. Una volta trovati i possibili aplotipi, si potrebbero effettuare studi filogenetici al fine di individuare un aplotipo ancestrale unico per ogni razza o comune alle tre razze.

Ulteriori studi saranno condotti per capire l'effetto che alcuni di questi SNPs, identificati nelle nostre razze, possono avere sui siti di legame dei fattori di trascrizione e si studierà anche il ruolo fisiologico che questi fattori possono avere all'interno della regione *promoter* del gene della  $\beta$ -lattoglobulina caprina.

I risultati ottenuti da questi futuri studi potranno essere inseriti all'interno di programmi di salvaguardia della biodiversità e di programmi di selezione delle razze ovine e caprine autoctone siciliane.

## *BIBLIOGRAFIA*



- Alexander L.J., Hayes G., Pearse M.J., Beattie C.W., Stewart A.F., Willis I.M. & Mackinlay A.G. (1989) Complete sequence of the bovine  $\beta$ -lactoglobulin cDNA. *Nucleic Acids Research* **17**, 6739
- Ali S. & Clark A.J. (1988) Characterization of the gene encoding ovine beta-lactoglobulin. Similarity to the genes for retinol binding protein and other secretory proteins. *Journal of Molecular Biology* **199**, 415-426
- Aschaffenburg R. & Drewry J., (1955) Occurrence of different beta-lactoglobulin in cow's milk. *Nature* **176**, 218-219
- Ballester M., Sánchez A. & Folch J.M. (2005) Polymorphisms in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research* **72**, 379-384
- Brignon G., Chtourou A. & Ribadeau-Dumas S. (1985) Does beta-lactoglobulin occur in human milk?. *Journal of Dairy Research* **52**, 249-254
- Burdon T.G., Maitland K.A., Clark A.J., Wallace R. & Watson C.J. (1994) Regulation of the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene by lactogenic hormones is mediated by a transcription factor that binds an interferon- $\gamma$  activation site-related element. *Molecular Endocrinology* **8**, 1528-1536
- Caroli A., Bolla P., Spanu A., Piredda G. & Fraghì A. (1995). Effect of  $\beta$ -lactoglobulin genotype on milk yield in Sardinian sheep. In: *Proceedings 11th Congress ASPA*, 181-182, Udine, Italy
- Chianese L., Portolano B., Troncone E., Pizzolongo F., Ferranti P., Addeo F., Alicata M.L., Pilla F. & Calagna G. (2000) The quality of Girgentana goat milk. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Goats, Tours, France* **2**, 946-949
- Chiofalo L. & Micari P. (1987) Attuali conoscenze sulle varianti delle proteine del latte nelle popolazioni allevate in Sicilia. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*

- **38**, 104-114
- Cubric-Curik V., Feligini M., Lukac-Havranek J., Curik I. & Enne G. (2002) Genetic polymorphism of  $\beta$ -lactoglobulin in native sheep from the Island of Pag. *Food Technology and Biotechnology* **40**, 75-78
- Dario C., Carnicella D. & Bufano G. (2005) Effect of  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on ovine milk composition in Altamura breed. *Archivos de Zootecnia* **54**, 105-108
- Erhardt G. (1989) Evidence of a third allele at the beta-lactoglobulin (beta-Lg) locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics* **20**, 197-204
- Erhardt G., Juszczak J., Panicke L. & Krick-Salek H. (1998). Genetic polymorphism of milk proteins in Polish red cattle: a new genetic variant of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **115**, 63-71
- Flower D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal* **318**, 1-14
- Folch J.M., Coll A. & Sánchez A. (1993) Rapid Communication: Cloning and sequencing of the cDNA encoding goat  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Animal Science* **71**, 2832
- Folch J.M., Coll A. & Sanchez A. (1994) Complete sequence of caprine  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Science* **77**, 3493-3497
- Folch J.M., Dovic P. & Medrano J.F. (1999) Differential expression of bovine  $\beta$ -lactoglobulin A and B promoter variant in transiently transfected HC11 cells. *Journal of Dairy Research* **66**, 537-544

- Fraghì A., Carta A., Pilla F., Sanna S.R. & Piredda G. (1996)  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism in Sarda dairy sheep. In: *47<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, 42, Den Haag, The Netherlands
- Garzon A.I. & Martinez J. (1992)  $\beta$ -Lactoglobulin in Manchega sheep breed: relationship with milk technological indexes in handcraft manufacture of Manchego cheese. *Animal Genetics* **23**, 106
- Gaye P., Hue-Delahaie D., Mercier J.C., Soulier S., Vilotte J.L. & Furet J.P. (1986) Ovine  $\beta$ -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie* **68**, 1097-1107
- Giaccone P., Di Stasio L., Macciotta N.P.P., Portolano B., Todaro M. & Cappio-Borlino A. (2000) Effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on milk-related traits of dairy ewes analysed by a repeated measures design. *Journal of Dairy Research* **67**, 443-448
- Godovac-Zimmermann J., Krause I., Buchberger J., Weiss G. & Klostermeyer H. (1990) Genetic variants of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. A novel wild-type  $\beta$ -lactoglobulin W and its primary sequence. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **371**, 255-260
- Godovac-Zimmermann J., Krause I., Baranyi M., Fischer-Fruhholz S., Juszczak J., Erhardt G., Buchberger J. & Klostermeyer H. (1996) Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine  $\beta$ -lactoglobulin I and J. *Journal of Protein Chemistry* **15**, 743-750
- Graml R.G., Weiss G., Buchberger J. & Pirchner F. (1989) Different rates of synthesis of whey protein and casein by alleles of the  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha_{s1}$ -casein locus in cattle. *Genetics Selection Evolution* **21**, 547-553

- Graves R.A., Tontonoz P., Ross S.R. & Spiegelman B.M. (1991) Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes & Development* **5**, 428-437
- Graziano M., D'Andrea M., Angiolillo A., Lagonigro R. & Pilla F. (2003) A new polymorphism in goat  $\beta$ -lactoglobulin promoter region. *Italian Journal of Animal Science* **2**, 67-70
- Groenen M.A.M. & van der Poel J.J. (1994) Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livestock Production Science* **38**, 61-78
- Gutiérrez-Gil B., Arranz J.J., Othmane M.H., de la Fuente L.F. & San Primitivo F. (2001) Influencia del genotipo de la  $\beta$ -lactoglobulina ovina sobre caracteres cualitativos y rendimiento quesero individual en la raza Churra. *ITEA* **22**, 15-17
- Halliday J.A., Bell K. & Shaw D.C. (1991) The complete amino acid sequence of feline  $\beta$ -lactoglobulin II and partial revision of the equine  $\beta$ -lactoglobulin II sequence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* **1077**, 25-30
- Hambling S.G., McAlpine A. & Sawyer L. (1992)  $\beta$ -lactoglobulin. In: *Advanced Dairy Chemistry – 1. Proteins*, pp. 141-190, ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science, New York, NY
- Harris S., Ali S., Anderson S., Archibald A.L. & Clark A.J. (1988) Complete nucleotide sequence of the genomic ovine  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Nucleic Acids Research* **16**, 10379-10380
- Hayes H., Petit E., Bouniol C. & Popescu P. (1993a) Localization of the  $\alpha$ -S2-casein gene (CASAS2) to the homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes 4 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* **64**, 281-285

- Hayes H. & Petit E. (1993b) Mapping of the  $\beta$ -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes. *Mammalian Genome* **4**, 207-210
- Jones K.A., Kadonaga J.T., Rosenfeld P.J., Kelly T.J. & Tjian R. (1987) A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**, 79-89
- Kolde H.J. & Braunitzer G. (1983). The primary structure of ovine  $\beta$ -lactoglobulin. 2. Discussion and genetic aspects. *Milchwissenschaft* **38**, 70-71
- Lopez-Galvez G., Ramos M., Martin-Alvarez P.J. & Juarez M. (1993) Influence of milk protein polymorphism on cheese producing ability in the milk of Manchega ewes breed. In: *Proceedings of the International Dairy Federation Seminar "Cheese Yield and Factors Affecting its Control"*, 167-173, Cork, Ireland
- Lum L.S., Dove P. & Medrano J.F. (1997) Polymorphisms of bovine  $\beta$ -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *Journal of Dairy Science* **80**, 1389-1397
- Lundén A., Nilsson M. & Janson L. (1997) Marked effect of  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science* **80**, 2996-3005
- Mercier J.C. & Grosclaude F. (1993a) Génétique moléculaire des protéines du lait et de leurs gènes. In: Martinet J & Houdebine L.M., *Biologie de la lactation*, pp. 319-347, eds. INSERM/INRA, Paris
- Mercier J.C. & Vilotte J.L. (1993b) Structure and function of milk protein genes. *Journal of Dairy Science* **76**, 3079-3098

- Mink S., Härtig E., Jennewein P., Doppler W. & Cato A.C.B. (1992) A mammary cell-specific enhancer in mouse mammary tumour virus DNA is composed of multiple regulatory elements including binding sites for CTF/NFI and a novel transcription factor, mammary cell-activating factor. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 4906-4918
- Monti J.C., Mermoud A.F. & Jollès P. (1989) Anti-bovine beta-lactoglobulin antibodies react with a human lactoferrin fragment and bovine beta-lactoglobulin present in human milk. *Experientia* **45**, 178-180
- Mullally M.M., Meisel H. & FitzGerald R.J. (1997) Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal* **7**, 299-303
- Nagata K., Guggenheimer R.A., Enomoto T., Lichy J.H. & Hurwitz J. (1982) Adenovirus DNA replication *in vitro*: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 6438-6442
- Ng-Kwai-Hang K.F. & Grosclaude F. (1992) Genetic polymorphism of milk proteins. In: *Advanced Dairy Chemistry – 1. Proteins*, pp.405-455, ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science, London
- Ng-Kwai-Hang K.F. (1998) Genetic polymorphism of milk protein: relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Canadian Journal of Animal Science* **78**, 131-147
- Ouwehand A.C., Salminen S.J., Skurnik M. & Conway P.L. (1997) Inhibition of pathogen adhesion by  $\beta$ -lactoglobulin. *International Dairy Journal* **7**, 685-692

- Pena R.N., Sánchez A. & Folch J.M. (2000) Characterization of genetic polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research* **67**, 217-224
- Pérez M.D. & Calvo M. (1995) Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science* **78**, 978-988
- Pervaiz S. & Brew K. (1986) Purification and characterization of the major whey proteins from the milks of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*), and the beagle (*Canis familiaris*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **246**, 846-854
- Pietrolà E., Carta A., Fraghì A., Piredda G. & Pilla F. (2000) Effect of  $\beta$ -lactoglobulin locus on milk yield in Sarda ewes. *Zootecnica e Nutrizione Animale* **26**, 131-135
- Portolano N. (1987). In: *Pecore e capre italiane*. Ed. Edagricole, Bologna, 336
- Puyol P., Pérez M.D., Ena J.M. & Calvo M. (1991) Interaction of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and other bovine and human whey protein with retinol and fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 2515-2520
- Prinzenberg E.M. & Erhardt G. (1999) Molecular genetic characterization of ovine  $\beta$ -lactoglobulin C allele and detection by PCR-RFLP. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **116**, 9-14
- Rampilli M., Cecchi F., Giuliotti L. & Cattaneo G.M. (1997) The influence of  $\beta$ -lactoglobulin genetic polymorphism on protein distribution and coagulation properties in milk of Massese breed ewes. In: *Proceedings of the International Dairy Federation Seminar "Milk protein polymorphism"*, 311-315, Brussels, Belgium

- Raymond M. & Rousset F. (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249
- Recio M.I., Fernandez-Fournier A. & Ramos M. (1995) Genetic polymorphism of the whey proteins for two Spanish ovine breeds. Influence of genetic polymorphism of  $\beta$ -lg on renneting properties. In: *Proceedings of the International Dairy Federation Seminar*, March 28-29<sup>th</sup>, 1995, Zürich, Switzerland
- Recio I., Fernández-Fournier A., Martín-Álvarez P.J. & Ramos M. (1997)  $\beta$ -lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: influence on cheesemaking properties and milk composition. *Lait* **77**, 259-265
- Reddy M., Kella N.K.D. & Kinsella J.E. (1988) Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 737-741
- Rijnkels M., Kooiman P.M., de Boer H.A. & Pieper F.R. (1997) Organization of the bovine casein gene locus. *Mammalian Genome* **8**, 148-152
- Rosen J.M., Wyszomierski S.L. & Hadsell D. (1999) Regulation of milk protein gene expression. *Annual Review of Nutrition* **19**, 407-436
- Rossi P., Karsenty G., Roberts A.B., Roche N.S., Sporn M.B. & de Crombrughe B. (1988) A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- $\beta$ . *Cell* **52**, 405-414
- Sardina M.T., Ballester M., Marmi J., Finocchiaro R., van Kaam J.B.C.H.M., Portolano B. & Folch J.M. (2004) Phylogenetic analysis of Sicilian goats reveals a new mtDNA lineage. *Animal Genetics* **37**, 376-378



- Sawyer L. & Kontopidis G. (2000) The core lipocalin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* **1482**, 136-148
- Schug J. & Overton G.C. (1997) TESS: Transcription Element Search Software on the WWW. Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0. In: *Computational Biology and Informatics Laboratory*, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA
- Shaul Y., Ben-Levy R. & De-medina T. (1986) High affinity binding site for nuclear factor I next to the hepatitis B virus S gene promoter. *The EMBO Journal* **5**, 1967-1971
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680
- Threadgill D.W. & Womack J.E. (1990) Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research* **18**, 6935-6942
- Watson C.J., Gordon K.E., Robertson M. & Clark A.J. (1991) Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter in vitro: identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Research* **19**, 6603-6610
- Wingender E., Dietze P., Karas H. & Knuppel R. (1996) TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Research* **24**, 238-241
- Yahyaoui M.H., Pena R.N., Sánchez A. & Folch J.M. (2000) Rapid communication: Polymorphism in the goat  $\beta$ -lactoglobulin proximal promoter region. *Journal of Animal Science* **78**, 1100-1101

## *SOMMARIO*

CAPITOLO 1.....	2
Introduzione Generale.....	2
Le proteine del latte .....	3
Funzione del gene della $\beta$ -lattoglobulina.....	5
Struttura del gene della $\beta$ -lattoglobulina .....	6
Polimorfismi al locus della $\beta$ -lattoglobulina nelle diverse specie .....	7
CAPITOLO 2.....	12
Primo Contributo Sperimentale .....	12
Caratterizzazione dei polimorfismi genetici al locus della $\beta$ -lattoglobulina in ovini di razza Valle del Belice .....	12
Introduzione .....	13
Scopo del lavoro .....	14
Materiale e Metodi.....	14
Analisi statistiche.....	18
Risultati e discussione.....	18
Conclusioni .....	22
CAPITOLO 3.....	23
Secondo Contributo Sperimentale .....	23
Caratterizzazione molecolare dei polimorfismi presenti nella regione promoter del gene della $\beta$ -lattoglobulina in caprini di razza Girgentana .....	23
Introduzione .....	24
Scopo del lavoro .....	25
Materiale e Metodi.....	25
Analisi statistiche.....	30
Risultati e discussione.....	31
Conclusioni .....	35
CAPITOLO 4.....	37
Terzo Contributo Sperimentale.....	37
Analisi molecolare della regione promoter del gene della $\beta$ -lattoglobulina e ricerca di fattori di trascrizione, in ovini e caprini autoctoni siciliani .....	37
Introduzione .....	38
Scopo del lavoro .....	39
Materiale e Metodi.....	39
Analisi statistiche.....	42
Risultati e discussione.....	43
Conclusioni .....	52
CAPITOLO 5.....	53
Conclusioni .....	53
BIBLIOGRAFIA .....	56
SOMMARIO .....	66