



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

---

*SCUOLA DI DOTTORATO IN*

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE  
E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Giovanni Garippa

***INDIRIZZO IN:* RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE  
ANIMALE XXII CICLO**

Coordinatore: prof. Sergio Ledda

**RICERCA DI POLIMORFISMI NEL  
GENE POU1F1 NEGLI OVI-CAPRINI  
DI RAZZA SARDA**

**Docente Guida**

Chiar.mo Prof. Vincenzo Carcangiu

**Tesi di dottorato della**

Dott.ssa Cinzia Daga

**ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009**

# Indice

1	Introduzione	3
1.1	Sviluppo dell'ipofisi	6
1.2	Sistema ipotalamo-ipofisi	8
1.3	Ormoni ipofisari	10
1.3.1	Ormone somatotropo (GH)	11
1.3.1.1.	Azioni della somatotropina (GH)	13
	GH ed accrescimento	14
	GH e metabolismo proteico	14
	GH e metabolismo glucidico	15
	GH e metabolismo lipidico	15
	GH e lattazione	15
1.3.1.2.	Controllo della secrezione del GH	18
1.3.2	Prolattina (PRL)	22
1.3.2.1.	Azioni della Prolattina (PRL)	23
	PRL e lattazione	24
	PRL e regolazione dell'attività del corpo luteo	25
	PRL e comportamento	25
	PRL sistema immunitario ed equilibrio osmotico	26
1.3.2.2.	Regolazione della secrezione della PRL ipofisaria	27
1.3.2.3.	Rilascio di PRL in risposta a stimoli esterni	29
	Luce	29
	Stress	29

1.4	L'omeostasi organica	31
1.5	Proteina POU1F1	32
	Dominio POU-S	35
	Dominio POU-H	39
1.6	Gene POU1F1	41
	Gene POU1F1 in <i>Mus musculus</i>	41
	Gene POU1F1 in <i>Homo sapiens sapiens</i>	41
	Gene POU1F1 in <i>Gallus gallus domesticus –Meleagris gallonavo</i>	42
	Gene POU1F1 in <i>Sus domesticus</i>	45
	Gene POU1F1 in <i>Bos taurus</i>	46
	Gene POU1F1 in <i>Ovis aries</i> e <i>Capra hircus</i>	48
2	Scopo della ricerca	60
3	Materiali e metodi	62
4	Risultati	80
	4.1 <i>Ovis aries</i>	80
	4.2 <i>Capra hircus</i>	91
5	Discussione	125
6	Conclusioni	135
7	Bibliografia	137
	Ringraziamenti	164

## 1. INTRODUZIONE

La maggior parte della diversità biologica si trova negli ecosistemi naturali, ed essa consiste nelle differenze tra specie, così come nella variabilità tra gli individui di una stessa specie o razza.

Questa variabilità genetica tra gli animali è fondamentale sia per la sopravvivenza delle specie selvatiche che per lo sfruttamento zootecnico di quelle allevate.

L'uomo fin dall'antichità ha sfruttato a proprio vantaggio le piante e gli animali, selezionando caratteri "buoni" senza conoscere il meccanismo che regola la trasmissione dei geni.

Spesso i caratteri di interesse economico sono controllati da più geni, con una manifestazione fenotipica ampia del carattere. Almeno tre geni sono necessari per definire un carattere quantitativo e più numerosi sono i geni che caratterizzano il carattere più ampia sarà la variabilità dello stesso (Pagnacco, 1997). Il controllo del carattere in questione è quindi di tipo poligenico poiché più geni concorrono all'espressione di quel carattere. Precisamente sono definiti QTL (Quantitative Trait Loci) le regioni del genoma responsabili dell'espressione di un determinato carattere quantitativo; ogni QTL può essere dovuto anche all'azione di più geni tra loro strettamente associati (Pagnacco, 1997).

Le mappe genetiche, costruite in base agli eventi di ricombinazione tra cromosomi, attraverso la genotipizzazione degli animali e l'utilizzo di analisi di linkage o di disequilibrium di linkage, sono oggi disponibili per diverse specie. Esse rappresentano il punto di partenza per l'individuazione, il mappaggio e

l'isolamento dei geni che hanno un effetto sulle caratteristiche produttive e riproduttive di interesse zootecnico.

L'utilizzo di diversi markers molecolari ha consentito di ottenere mappe genetiche sempre più precise; utilizzando i microsatelliti ad esempio è possibile individuare, tramite analisi di linkage, l'associazione con un determinato QTL in virtù della loro densità; una volta individuata la regione putativa di un QTL sarà necessario l'utilizzo di ulteriori marcatori a più alta densità entro tale zona (Van der Werf et al., 2007) per restringere la regione. L'utilizzo di opportuni approcci statistici, consente di identificare una regione cromosomica, delimitata in genere da due marcatori anonimi, che ha un effetto rilevante sulla variabilità di un carattere produttivo (Russo et al., 2009).

In alcuni casi è un singolo gene ad avere effetti rilevanti su un carattere di importanza economica quali l'effetto su una via fisiologica, sul metabolismo e l'espressione di un fenotipo: tale gene si definisce gene candidato. Alcuni geni da soli, quindi, in base alla loro funzione fisiologica e biochimica, possono influenzare direttamente o indirettamente un carattere produttivo. L'utilizzo di geni candidati può portare velocemente all'identificazione dei QTL in quanto vengono studiate direttamente le associazioni tra polimorfismi in questi geni ed i caratteri produttivi (Parmentier et al., 2001).

Individuando un set di marcatori molecolari vicino ai geni che controllano una determinata caratteristica dell'animale è possibile usare gli stessi marcatori nei programmi di miglioramento genetico: selezione assistita da marcatori (*Marker Assisted Selection*, MAS).

La conoscenza dell'intero genoma dell'uomo e di alcune specie animali ha portato senza dubbio a notevoli progressi nella selezione contro le malattie ereditarie ed a un miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico.

Inoltre con l'avvento dell'ingegneria genetica l'uomo è "entrato" dentro il programma di vita dei viventi, introducendo geni di "interesse" in batteri o altre cellule. In questo modo sono stati clonati geni e li si è fatti esprimere in cellule adatte producendo sostanze utili quali l'ormone della crescita, l'insulina, alcuni vaccini.

L'utilizzo della biologia molecolare permette di analizzare tratti del genoma degli animali sin dalla nascita e se necessario anche nella vita embrionale. Tale possibilità ha consentito di affrancarsi dalla necessità del "progeny test" per alcuni geni con la scelta in tempi rapidi di riproduttori con i genotipi desiderati. Un esempio al riguardo può essere la distinzione della variante A dalla B della caseina k tramite tecnica PCR. La variante B mostra caratteristiche reologiche migliori in quanto ha tempo di cagliata e fermatura più corto rispetto alla variante A; queste caratteristiche fanno sì che il latte con la variante B della caseina k venga preferito nella produzione di formaggi a grana dura come il parmigiano reggiano (Pagnacco, 1997). Un altro esempio è rappresentato dalla specie ovina sulla quale si sta operando una selezione degli animali che presentano dei genotipi che conferiscono resistenza allo scrapie, attraverso l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare.

Il gene POU1F1 è un gene candidato: esso produce un fattore trascrizionale POU1F1 tessuto specifico con un ruolo critico nella regolazione trascrizionale di molteplici geni in quanto si lega a diversi promotori di geni target (Van et al.,

2000, Weatherly et al., 2001) quali i promotori dell'ormone somatotropo (GH) e della prolattina (PRL). Esso risulta coinvolto nell'attivazione della subunità  $\beta$  dell'ormone che stimola la tiroide (TSH $\beta$ ) e nel legame al promotore del POU1F1 stesso, avendo una funzione autoregolatrice (Chen et al., 1990).

Nella ghiandola pituitaria è importante per la sopravvivenza, la differenziazione e la proliferazione di tre tipi di cellule pituitarie (tireotrope, somatotrope, lattotrope) e svolge un ruolo rilevante nello sviluppo della ghiandola e nell'espressione ormonale (Mol e Meji, 2008).

I numerosi processi fisiologici controllati dall'azione del prodotto di tale gene quali la crescita, la produzione di latte, le caratteristiche della carcassa rafforzano l'approccio d'uso come gene candidato.

### **1.1. SVILUPPO DELL' IPOFISI**

La ghiandola pituitaria o ipofisi è situata alla base del cranio in un'infossatura detta sella turcica, circondata dalla dura madre. Essa è strutturata in due parti, l'adenipofisi e la neuroipofisi. Dal punto di vista funzionale si potrebbe dividere in tre parti anteriore, intermedia e posteriore. Tuttavia, in alcune specie la parte intermedia è rudimentale e fa parte dell'adenipofisi.

L'ipofisi è di origine ectodermica, l'adenipofisi deriva dall'evaginazione dell'ectoderma del tetto della cavità buccale (tasca di Rathke), mentre la neuroipofisi deriva dal peduncolo infundibolare che si sviluppa verso il basso. Durante lo sviluppo embrionale le cellule totipotenti dell'ipofisi danno origine a due principali linee cellulari: le cellule acidofile somatotrope, lattotrope mammosomatotrope e le cellule basofile corticotrope, tireotrope e gonadotrope.

Il tipo di cellule dell'adenoipofisi (lobo anteriore) viene determinato dalla partecipazione di diversi fattori trascrizionali che in sinergia, e secondo una definita cascata temporale, ne determinano il diverso sviluppo. La tasca di Rathke esprime parecchi fattori trascrizionali della famiglia dei LIM omeodominio (Reynaud et al., 2004), e, tra questi, il Lhx3 è il più precoce a manifestarsi nelle cellule destinate a formare il lobo anteriore e quello intermedio. Esso persiste nella ghiandola adulta, ed è essenziale per l'espressione del Pitx1-2 (Sheng et al., 1996) responsabili della trasformazione delle cellule precursore nelle diverse linee cellulari differenziate. Lhx3 ha un'azione sull'enhancer del POU1F1 ed in sinergia con il trascritto di questo gene agisce sui promotori del gene PRL e TSH $\beta$  (Bach et al., 1995); la sua presenza sembra quindi necessaria per l'espressione del POU1F1. Infatti, nell'uomo, la presenza di mutazioni recessive per Lhx3 porta a deficienza di gonadotropine, GH, PRL, TSH ed a una ipofisi ipoplastica e di dimensioni maggiori con associata rigidità nucale responsabile di una limitata rotazione del capo (Netchine et al., 2000). Altri fattori trascrizionali più specifici (Prop1, Pit-1, GATA2, SF1, Tpit-1), oltre ad avere una espressione temporale diversa, sono responsabili della differenziazione terminale delle diverse tipologie cellulari determinando lo sviluppo finale della ghiandola. Molti di questi fattori, oltre ad avere un ruolo preciso nello sviluppo della ghiandola, influenzano anche l'attività delle cellule ipofisarie (Dasen et al., 2001). Mutazioni possono essere presenti nei geni responsabili dell'espressione di ciascun ormone, ad esempio il GH, o possono essere a carico di geni che codificano per fattori che regolano la loro sintesi o secrezione (GHRH), o i loro recettori.



Lo sviluppo di questa piccola ghiandola segue un pattern simile nelle differenti specie. Diversi studi fatti sui roditori hanno permesso di ottenere informazioni sui geni cruciali coinvolti nel suo sviluppo, utilizzando mutanti naturali e topi knock out.

Grazie a questi studi sono stati identificati numerosi fattori di trascrizione e molecole segnale. I fattori di trascrizione comprendono i geni *homeobox* che codificano per fattori omodomini. Questi ultimi contengono una regione che lega il DNA, chiamata omeodominio, che può, una volta legata al DNA target, regolare la sua espressione sia attivando il gene che reprimendolo.

Mutazioni a carico del gene POU1F1, codificante per uno di questi fattori trascrizionali, bloccherebbero lo sviluppo dei lobi anteriori della pituitaria ed avrebbero degli effetti sull'espressione di diversi geni determinando una carenza o una mancanza di GH, PRL, e TSH $\beta$  (Xue et al., 2006) ed uno sviluppo ridotto della ghiandola.

## **1.2. SISTEMA IPOTALAMO-IPOFISI**

L'ipotalamo e la ghiandola ipofisi controllano numerose funzioni vitali quali la termoregolazione ed il metabolismo basale, la sintesi proteica e l'accrescimento, il bilancio idrico salino e l'assunzione di acqua, la regolazione dell'assunzione degli alimenti, la riproduzione, la lattazione, la risposta allo stress. Questo sistema costituisce un perfetto esempio di organizzazione sotto il controllo nervoso ed endocrino.

Si può suddividere in tre principali sottosistemi.

**Un sistema neuro-endocrino** costituito da gruppi di cellule localizzati nella porzione anteriore-centrale dell'ipotalamo ventrale secernenti diversi oligopeptidi che influenzano la secrezione dell'ipofisi. Tali prodotti raggiungono l'eminenza mediana tramite trasporto assonale, da qui vengono rilasciati nei vasi capillari del sistema portale e trasportati all'ipofisi dove raggiungono le loro cellule bersaglio. Fino ad ora sono stati identificati diversi ormoni ipotalamici, chiamati anche fattori di liberazione che attivano la secrezione dell'adenoipofisi; i principali sono CRH, GHRH, TRH, GnRH e PRL. Inoltre l'ipotalamo secreta anche altri ormoni che hanno una funzione inibitoria sul lobo anteriore dell'ipofisi: la somatostatina e il PIF (Amar e Weiss, 2003).

**Un sistema neuro-secretorio** che dall'ipotalamo anteriore (nucleo sopraottico e paraventricolare) attraversa il pavimento dell'ipotalamo ventrale e termina nel lobo neurale della neuroipofisi costituendo una proiezione dell'ipotalamo. Queste terminazioni nervose liberano due ormoni uno, la vasopressina o ADH, coinvolto nella regolazione del bilancio idrico-salico e l'altro, l'ossitocina, che interviene in diversi meccanismi come la secrezione latte, il parto, la regolazione del ciclo ovarico.

**Un sistema neuronale** diretto che controlla la secrezione da parte del lobo intermedio tramite una via inibitoria ed una via attivatoria, importante negli anfibi e nei rettili E' coinvolto nel mimetismo attivando o inibendo la pigmentazione cellulare. Nei mammiferi la sua funzione non è del tutto nota, ma si pensa possa avere lo stesso un ruolo nella pigmentazione cellulare (Mol e Meji, 2008).

I neuroni a funzione endocrina hanno un corpo situato in diverse aree ipotalamiche ed inviano i loro prolungamenti all'eminenza mediana dove le

terminazioni secretrici liberano gli ormoni in prossimità dei capillari sinusoidi e da qui diffondono nel circolo. Nell'eminenza mediana i corpi cellulari sono abbastanza scarsi mentre le terminazioni nervose sono in numero elevato. In questa sede, oltre ai contatti nervosi tra fibre, si ha anche la liberazione di amine e peptidi che svolgono funzioni di controllo sulla secrezione dei diversi ormoni. In questa sede gli ormoni prodotti dall'ipofisi possono effettuare un controllo inibitorio o eccitatorio (feed back generalmente negativo). Le ammine liberate nella sede suddetta, ed in altre aree del SNC, come la noradrenalina, l'adrenalina, la serotonina, l'istamina e la dopamina possono influenzare notevolmente la secrezione degli ormoni con meccanismi alquanto complessi. Tale discorso può essere fatto anche per altri neurotrasmettitori come il GABA e gli oppioidi endogeni.

### **1.3. ORMONI IPOFISARI**

L'ipofisi nei mammiferi può essere suddivisa in due parti in funzione della sua attività: l'adenoipofisi e la neuroipofisi.

Il lobo anteriore o adenoipofisi secreta principalmente somatotropina (GH), prolattina (PRL), corticotropina (ACTH), tireotropina (TSH), ormone follicolo stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH), melanotropina a-b (MSH), lipotropina b (LPH) ed alcuni oppioidi endogeni.

La neuroipofisi libera la vasopressina (ADH) e l'ossitocina.

In questa sede verranno descritte le funzioni svolte dal GH e dalla PRL in quanto sono quelle che maggiormente sembrano essere influenzate dal fattore trascrizionale POU1F1.

### **1.3.1. ORMONE SOMATOTROPO (GH)**

L'ormone somatotropo è prodotto dalle cellule somatotrope acidofile dell'ipofisi anteriore.

Il GH ha una struttura quasi simile a quella della prolattina e del lattogeno placentare, ma è l'unica molecola che esercita una azione postnatale promuovente la crescita ed il metabolismo.

Il gene GH è mappato, sul cromosoma 11 nell'ovino, costituito da 5 esoni e 4 introni è lungo 1800 bp nella pecora, nella capra non è stato ancora mappato, nei mammiferi si estende per 2,6-3.0 Kb. Sono noti diversi polimorfismi nella regione regolatrice, nei diversi esoni e nelle regioni non tradotte. Di questi siti polimorfici due sono localizzati nel 1° e 2° esone, quattro nel 3°, sette nel 4° e cinque nel 5° esone. Solo alcuni sono stati caratterizzati per tipo di sostituzione nucleotidica e cambiamento amminoacidico e correlati con il peso alla nascita ed allo svezzamento (Supakorn, 2009).

Tale gene sintetizza una singola catena di circa 200 aminoacidi, del peso intorno ai 22000 Da che presenta due ponti disolfuro.

Nelle diverse specie animali la proteina mostra alcune differenze per posizione degli aminoacidi nella catena e questo determina la sua specie specificità. Infatti, la somatotropina secreta da altre specie non è attiva sull'uomo e sui primati, con l'eccezione del ratto sul quale risulta attiva quella proveniente da tutte le specie.

L'ormone somatotropo viene trasportato nel circolo sanguigno non legato a proteine di trasporto, la sua emivita è di 40-50 minuti e viene inattivato dal fegato attraverso la rottura dei ponti disolfuro. Il GH è secreto in maniera pulsatile nel ratto, con una frequenza di 3-4 ore, mentre, nei ruminati questa cadenza sembra

non essere rispettata (Tannenbaum e Martin, 1976). Mentre nell'uomo ed in alcune scimmie l'ormone somatotropo manifesta un andamento circadiano con un incremento durante le ore di sonno (Takahashi et al., 1971; Parker et al., 1972), nel ratto e nei ruminanti questo andamento non è evidenziabile (Hart et al., 1975; Tindal et al., 1978).

Un differente modello di secrezione tra i sessi è evidenziabile sia nel ratto che nei ruminanti. I maschi hanno livelli basali più elevati ed i picchi di secrezione dell'ormone risultano più ampi (Keeler et al., 1979).

Le concentrazioni ematiche del GH presentano una variazione legata all'età, allo stadio fisiologico dell'animale ed alle condizioni ambientali del suo habitat.

In relazione all'età, l'ormone della crescita risulta più elevato nel sangue nel periodo fetale rispetto a quello postnatale e nella fase di accrescimento rispetto a quella adulta (Gluckman, 1984).

Lo stadio fisiologico influenza notevolmente la secrezione del GH in quanto questo ormone esplica delle azioni importantissime sul metabolismo intermedio dell'animale. Infatti, nei bovini il tasso ematico del GH dopo il parto aumenta e questo incremento è maggiore negli animali altamente produttivi (Vasilatos e Wangsness, 1980; Carcangiu et al., 1997).

### **1.3.1.1. AZIONI DELLA SOMATOTROPINA (GH)**

Le principali azioni svolte dal GH sono quelle esercitate sull'accrescimento somatico, sullo sviluppo della mammella, sulla lattazione, almeno nei ruminanti, sul metabolismo protidico, glucidico e lipidico. Molti degli effetti di questo ormone non sono diretti ma mediati dalle somatomedine, peptidi prodotti prevalentemente dal fegato, ma anche i tessuti bersaglio del GH hanno la capacità di sintetizzare queste molecole (De Palo et al., 2006).

Le somatomedine o IGF (Insulin-like Growth Factor) sono dei polipeptidi mediatori locali degli effetti del GH e vengono liberate principalmente sotto lo stimolo di questo ormone. Esse sono denominati IGF-1 e IGF-2, costituiti rispettivamente da 70 e 67 amminoacidi (Daughaday et al., 1987). Questi due polipeptidi hanno catene quasi simili tra loro e con la proinsulina e deriverebbero dalla stessa molecola ancestrale. Le IGF circolano nel sangue quasi esclusivamente legate a proteine specifiche e l'emivita è di circa 3 ore (Hintz, 1984). Il principale fattore che determina la liberazione della IGF-1 è il GH, purché l'animale si trovi in uno stato di nutrizione buono, e non sia a digiuno. La sua concentrazione ematica manifesta un cambiamento durante l'età e nella maggior parte dei casi è in relazione alla secrezione del GH. Negli ovini si assiste ad un aumento della secrezione della IGF-1 subito dopo il parto ed a un decremento a circa 40 gg da questo, nell'uomo l'aumento avviene dopo il primo anno di vita ed il decremento si osserva dopo la pubertà (Gluckman et al., 1984; Hall e Sara, 1984).

Le IGF-2, invece, manifestano tassi alquanto alti durante la vita fetale, dopo il parto tendono a decrescere verso i livelli dell'adulto. Quest'ultima somatomedina

è poco influenzata dai livelli del GH anche se sono necessari tassi basali dell'ormone per mantenerne la secrezione.

#### **GH ED ACCRESCIMENTO**

L'intervento del GH sulla crescita dell'animale viene spiegato, principalmente, sull'apparato scheletrico determinando l'allungamento delle ossa a livello delle cartilagini di accrescimento. Questo effetto viene esercitato attraverso le somatomedine o IGF che stimolano l'incorporazione di solfati nei proteoglicani della matrice ossea per favorire in seguito la deposizione del calcio.

Le somatomedine sembrano essere prodotte a livello della cartilagine di accrescimento. Infatti, l'infiltrazione a livello locale del GH determina uno sviluppo maggiore dell'osso rispetto alla somministrazione sottocutanea e conferma, perciò, la secrezione locale delle somatomedine (Russell e Spencer, 1982).

#### **GH E METABOLISMO PROTEICO**

Il GH favorisce l'anabolismo proteico, stimolando la sintesi proteica ed esaltando l'incorporazione degli amminoacidi nelle proteine. Nel contempo inibisce il loro catabolismo e perciò il bilancio azotato diviene positivo e nel sangue aumentano i fosfati e diminuiscono sia l'urea che gli amminoacidi liberi. Questi effetti sono espletati attraverso le somatomedine, favorendo sia il trasporto all'interno delle cellule degli amminoacidi che la trascrizione e la traduzione delle proteine.

## **GH E METABOLISMO GLUCIDICO**

La somatotropina ha sicuri effetti sul metabolismo glucidico, infatti, aumenta la produzione di glucosio da parte del fegato ed inibisce perifericamente l'utilizzo dello stesso da parte delle cellule. Inoltre determina una diminuzione dei recettori cellulari per l'insulina e, perciò, ha un effetto antinsulinico. Se poi, il GH viene somministrato cronicamente, oltre che attraverso l'iperglicemia, agisce anche direttamente sulle cellule  $\beta$  del pancreas causando un aumento dell'insulina. Tali azioni favoriscono l'anabolismo proteico. A livello cardiaco, invece, contrariamente a ciò che accade nel fegato e nel muscolo, il GH determina un aumento del glicogeno che viene trasformato in glucosio e utilizzato dalla cellula muscolare striata (Renaville et al., 2002).

## **GH E METABOLISMO LIPIDICO**

L'intervento del GH nel metabolismo lipidico è, nel suo complesso, di tipo mobilizzante. Infatti, la somministrazione protratta per lunghi periodi di questo ormone determina nei bovini una lipolisi con l'aumento dei NEFA (acidi grassi non esterificati) in circolo (Goodman, 1981; Hart et al., 1984).

## **GH E LATTAZIONE**

L'effetto stimolante la lattazione dell'estratto ipofisario era stato individuato sul ratto (Striker e Grueter, 1928) e sulla capra (Asdell, 1932) molti anni fa, ma solamente negli ultimi decenni è stato dimostrato l'incremento della produzione lattea, a seguito della somministrazione del GH, in quasi tutti i mammiferi in lattazione (Bauman e Vernon, 1993; Etherton e Bauman, 1998).

L'applicazione delle biotecnologie nella produzione della somatotropina ha notevolmente incrementato il numero di sperimentazioni condotte sull'effetto di questo ormone sulla lattazione, oltre che per un interesse puramente scientifico,



anche per valutare il potenziale economico derivante dall'uso di questa molecola nell'allevamento bovino (Bauman, 1992). Sebbene, l'utilizzo commerciale della somatotropina bovina ricombinante abbia dato un importante ritorno economico all'industria lattiera i progressi, ottenuti nella conoscenza della biologia della lattazione, sono sicuramente maggiori.

Infatti, le prime osservazioni svolte nei paesi con una notevole richiesta di latte, come la Russia e durante la seconda guerra mondiale l'Inghilterra, hanno caratterizzato alcuni degli aspetti legati all'utilizzo di questo molecola, ma l'alto costo per la purificazione rendeva antieconomico l'uso negli allevamenti.

Queste esperienze permisero di osservare un aumento della produzione latte, di circa il 40 %, ma le modalità di come questa avvenisse non erano chiare. Vennero postulate due teorie: una asseriva che l'aumento della secrezione latte fosse il frutto del minor utilizzo periferico dei nutrienti con una maggiore quantità di substrati per la mammella. L'altra, invece, attribuiva quest'incremento all'intensificazione del metabolismo mammario al punto da concorrere con gli altri tessuti per i nutrienti (Hammond, 1952).

Circa 30 anni dopo, con l'utilizzo della somatotropina ricombinante, si è chiarito il ruolo svolto da questa molecola, evidenziando che la sua azione biologica non arreca danni all'animale (Tyrrell et al., 1988; Kirchgessner et al., 1991). La sua azione principale è quella di regolare la distribuzione dei substrati energetici attraverso il controllo del metabolismo nei vari tessuti. Tutto ciò porta ad una maggiore disponibilità di molecole energetiche nella mammella con un incremento della sintesi latte (Bauman e Currie, 1980). Inoltre, l'aumentata produzione di latte non va a discapito della sua composizione, infatti, non sono

state osservate differenze nella composizione del latte rispetto agli animali non trattati (Laurent et al., 1992).

La diversa distribuzione dei substrati determinata dalla somministrazione del GH, coinvolge molti, se non tutti, i processi biologici dell'organismo animale e questo non è altro che una intensificazione degli effetti fisiologici della somatotropina.

Infatti è noto che, nei bovini ad alta produzione di latte, l'economia del glucosio costituisce un punto abbastanza critico, in quanto circa il 60 – 85 % di quello prodotto dalla gluconeogenesi epatica viene utilizzato dalla mammella per la sintesi del lattosio (Peel e Bauman, 1987). L'intensificazione della produzione di questo zucchero negli animali lattiferi durante il picco di lattazione, è frutto dell'azione dell'ormone somatotropo, il quale, oltre che, determinare l'aumento della sintesi epatica di glucosio, riduce la sua captazione da parte del muscolo e la sua ossidazione negli altri tessuti (Baldwin e Knapp, 1993).

Inoltre, il medesimo ormone, negli animali con bilancio energetico negativo, stimola la lipolisi ed inibisce la liposintesi determinando un utilizzo dei grassi a fini energetici. Infatti, nei bovini altamente produttivi, la quota di alimento introdotta non è sufficiente ad equilibrare le richieste della mammella, e gli alti livelli di GH fanno sì che vengano mobilizzati i lipidi determinando un aumento nel circolo ematico dei NEFA (Bauman et al., 1982).

Comunque, anche nel meccanismo di secrezione della somatotropina ci sono alcuni paradossi che devono essere considerati per capire meglio i suoi effetti. I livelli del GH sono alti nelle bovine con un potenziale genetico alto e perciò con produzioni di latte elevate, ma si riscontrano anche in animali sottanutriti o con un

management scadente dove la produzione lattea è scarsa. Inoltre, in questi animali con uno stato nutrizionale insufficiente, si osserva un aumento irrilevante della produzione lattea a seguito del trattamento con rST (somatostatina ricombinante di bovino) e nessuna variazione nei livelli di IGF, mediatore a livello mammario dell'effetto del GH. Difatti, non sono stati riscontrati recettori in numero così alto per l'ormone somatotropo nella mammella e gli espianti di tessuto mammario in coltura trattati con il medesimo ormone non manifestano un incremento di sintesi dei costituenti del latte (Gertler et al., 1982).

L'effetto galattogeno, quindi, a livello mammario è svolto dalle somatomedine mentre quello a livello del metabolismo generale dallo stesso ormone della crescita.

Dunque lo stato nutrizionale dell'animale gioca un ruolo molto importante nella regolazione degli effetti del sistema GH/IGF nella lattazione. Infatti, nelle bovine sottonutrite il trattamento con rST mantiene gli effetti sul fegato e sul tessuto adiposo, ma non determina un aumento dei livelli di IGF e di conseguenza della produzione del latte.

Tutto ciò lascia intendere che il GH sia un potente omeoretico che interviene in diversi stadi fisiologici nel regolare la partizione dei nutrienti. Quindi, il controllo esercitato dal sistema GH/IGF, sull'utilizzo sia delle riserve che dei nutrienti, appare essere essenziale negli animali altamente produttivi per salvaguardare la loro salute (Daughaday et al., 1987; Renaville et al., 2002).

### **1.3.1.2. CONTROLLO DELLA SECREZIONE DEL GH**

Due fattori ipotalamici, principalmente, controllano la secrezione dell'ormone somatotropo: il GHRH, che stimola la secrezione del GH, e la somatostatina che

inibisce il rilascio del medesimo ormone. La liberazione da parte dell'ipotalamo di questi due fattori è influenzata da neuroni monoaminergici attraverso un numero elevato di neurotrasmettitori (Noradrenalina, Dopamina, Serotonina) e di neuropeptidi che influenzano notevolmente la secrezione del GH. (McMahon et al., 2001).

Attraverso il circolo portale ipotalamo-ipofisario il GHRH e la somatostatina, secreti dall'ipotalamo, raggiungono il sito d'azione, l'ipofisi. La loro azione viene esercitata attraverso un feedback e perciò alti livelli di GH determinano la liberazione di somatostatina, mentre bassi livelli dell'ormone somatotropo causano un aumento della somatoliberina (GHRH). Comunque, molteplici sono le influenze ipotalamiche sulla secrezione del GH che sono finemente regolate da una complessa varietà di fattori nervosi, metabolici ed ormonali.

Nei monogastrici, l'ipoglicemia è lo stimolo principale che agisce sulla liberazione del GH, nei ruminanti la diminuzione degli acidi grassi non esterificati. Infatti, la somministrazione dei due substrati abbassa, nei diversi tipi di animali, i livelli ematici dell'ormone somatotropo.

Gli stress in generale causano un aumento della secrezione della somatotropina attraverso l'attivazione del sistema adrenergico (Debenedetti, 1998). L'insulina in funzione della sua azione ipoglicemizzante determina un aumento dei livelli del GH, mentre i glicocorticoidi ad alte dosi causano una diminuzione dell'ormone. Agonisti ed antagonisti delle ammine biogene intervengono a livello ipotalamico influenzando la liberazione di GHRH o di somatostatina.

Gli agenti  $\alpha$ -adrenergici provocano in tutti un rilascio di GH e perciò gli  $\alpha$ -antagonisti lo bloccano. Anche i  $\beta$ -mimetici sono utilizzati, in alcune specie domestiche, come gli auxinici poiché determinano un effetto stimolante la liberazione della somatotropina.

### **Somatoliberina (GHRH)**

Il fattore di rilascio dell'ormone somatotropo è stato isolato e caratterizzato da Rivier et al. (1982) come un peptide composto da 40 amminoacidi e fortemente stimolante la secrezione del GH. Nello stesso anno Guilliemin et al. identificarono un altro peptide, formato da 44 aminoacidi, il quale aveva le stesse azioni del primo. Dal confronto delle due molecole è risultato che i primi 40 amminoacidi sono uguali e la forma più lunga è quella che si riscontra fisiologicamente nel circolo. Comunque, le due forme sono biologicamente attive e stimolano la secrezione del GH nelle cellule ipofisarie sia in vitro che in vivo (Moseley et al., 1985), inoltre, conservano attività anche parti della molecola lunghe solo 29 aminoacidi. E' stato identificato anche un pre-ormone di circa 108 aminoacidi. I meccanismi che iniziano la demolizione enzimatica del precursore ed il distacco del cosiddetto "segnal peptide" non sono noti. La somministrazione di questo peptide, dose compresa tra 10 e 1000 mg, determina una proporzionale secrezione di GH entro 5 - 15 minuti negli ovini (Hart et al., 1985). Il trattamento con GHRH per alcuni giorni con 3,6 mg incrementa il livello basale e l'ampiezza dei *pulse* ma non determina una variazione del numero di pulse nelle 12 ore rispetto ai controlli. Tuttavia, se si somministra il GHRH in infusione continua per 12 ore si assiste ad un calo della concentrazione ematica del GH, presumibilmente per un depauperamento delle riserve di questo ormone a livello ipofisario. Tuttavia non si

può escludere una inibizione della secrezione del GH determinata dagli alti livelli dello stesso ormone in circolo, presumibilmente, attraverso la somatostatina o le somatomedine (IGF) (Berelowitz et al., 1981).

### **Somatostatina**

La somatostatina è un peptide formato da 14 amminoacidi, venne isolata dall'ipotalamo di ovino da Brazeau et al., (1973). Questo polipeptide, prodotto dai neuroni dell'area paraventricolare localizzata immediatamente sotto il chiasma ottico, esercita la sua azione inibente sulla secrezione del GH, ma anche del TSH, dell'insulina, del glucagone, della gastrina, del VIP, del pancreas esocrino ed alcune volte anche della PRL.

### 1.3.2 PROLATTINA (PRL)

La prolattina è un ormone sintetizzato e secreto, in massima parte, dalle cellule lattotrope dell'ipofisi anteriore e, per le sue proprietà genetiche, strutturali e funzionali, appartiene allo stesso gruppo dell'ormone somatotropo (GH) e del lattogeno placentare (PLs). La PRL possiede un elevato numero di funzioni biologiche, notevolmente maggiore rispetto a tutti gli altri ormoni dell'ipofisi anteriore. Il gene che codifica per la PRL ha una lunghezza complessiva di circa 10 kb ed è composto da cinque esoni e quattro introni. Il cDNA è composto di 914 nucleotidi contenenti una *Open Reading Frame* di 681 nucleotidi, codificante per un preormone di 227 aa, che a sua volta include un peptide segnale di 28 aa (Sinha, 1995). La forma matura della PRL, negli ovini, è costituita da una singola catena di 199 amminoacidi, con un peso molecolare di 23.000 Da (Li et al., 1970) e tre ponti disolfuro fra sei residui di cisteina (Cooke et al., 1981).

Sebbene la forma predominante dell'ormone riscontrata nell'ipofisi sia di 23 kDa, alcune varianti sono state caratterizzate in molti mammiferi e sono il risultato di splicing alternativi dell'mRNA prolattinico (variante composta da 137 aa) (Sinha, 1986 e 1995), clivaggio proteolitico (3 forme da 14, 16, e 22 kDa) (Clapp et al., 1994 Torner et al., 1995) e altre modificazioni post translazionali (dimerizzazione, polimerizzazione, fosforilazione, glicosilazione) (Sun et al., 1996).

Oltre ad essere sintetizzata e secreta dalle cellule lattotrope, la prolattina è prodotta da numerose altre cellule e tessuti, come le cellule mammosomatotrope della stessa ipofisi, che sintetizzano anche il GH (Frawley et al., 1985), dall'ipotalamo (Griffond et al., 1994), dalla placenta, dall'utero (Anthony et al.,

1991 e 1995), dalle cellule dell'epitelio mammario (Nolin e Witorsch, 1976) e dai linfociti (Jurcovicová et al., 1993; Ben-Jonathan et al., 1996).

La PRL si può ritrovare in diversi fluidi oltre il siero, come il liquido cerebrospinale, il liquido amniotico, il latte, il film lacrimale, il liquido follicolare.

### **1.3.2.1. AZIONI DELLA PROLATTINA (PRL)**

La prolattina è stata originariamente isolata come fattore stimolante lo sviluppo mammario e la lattazione nel coniglio e, successivamente, la stimolazione della produzione del latte del gozzo nei piccioni. I piccoli fino al 10° giorno di vita sono nutriti dai genitori con un particolare prodotto della degenerazione caseosa dell'epitelio che riveste internamente l'ingluvie: il latte del gozzo. Esso, nei primi 10 giorni di vita, rappresenta l'unica fonte di nutrimento; la produzione del latte del gozzo è stimolata, in entrambi i sessi, dai livelli ematici di prolattina la cui secrezione inizia al 14° gg di incubazione delle uova e continua fino a 25 gg dopo la schiusa. La massima produzione si ha 4 gg dopo la schiusa (Balanini, 2001).

Le numerose attività esercitate sulla ghiandola mammaria sono le più conosciute di quest'ormone, per quanto lo stesso sia responsabile di significativi effetti sulla riproduzione dei mammiferi (azione luteotropica), sul bilancio idro-elettrolitico, sulla crescita, sullo sviluppo, sul metabolismo, sul SNC, sul comportamento e sul sistema immunitario.

### **PRL E LATTAZIONE**

I molteplici effetti della prolattina sulla ghiandola mammaria includono: sviluppo (mammogenesi); sintesi del latte (lattogenesi); mantenimento della secrezione latte (galattopoiesi).



Per quanto riguarda lo sviluppo della mammella, la PRL controlla, con un meccanismo diretto sull'epitelio mammario, lo sviluppo lobuloalveolare durante la gravidanza, in preparazione della successiva lattazione (Briskin et al., 1999); infatti, individui privi del gene per la sintesi della PRL presentano un'anormale mammogenesi caratterizzata dalla completa assenza di unità lobuloalveolari (Horseman et al., 1997).

Anche la lattogenesi richiede decisamente l'intervento della PRL ipofisaria, poiché stimola l'*uptake* di alcuni amminoacidi, la sintesi delle caseine e dell' $\alpha$ -lattoalbumina, l'*uptake* del glucosio e la sintesi del lattosio così come del grasso del latte (Barber et al., 1992). Insieme alla PRL, altri ormoni quali progesterone, estrogeni, glucocorticoidi, somatotropina, insulina, ormoni tiroidei, calcitonina, alcuni fattori della crescita giocano un ruolo importante nella galattopoiesi ed anche l'ossitocina può avere parte nella galattopoiesi in diversi mammiferi.

La lattazione viene inibita dalla somministrazione di agonisti della dopamina, essendo questa, il fattore ipotalamico di inibizione della PRL.

Gli stimoli della suzione o della mungitura provocano, tramite un riflesso neuroendocrino, la liberazione di ossitocina per l'eiezione latte e di prolattina per la secrezione. Il rilascio di PRL in seguito allo stimolo ha un periodo maggiore di latenza rispetto all'ossitocina ed il suo picco plasmatico dipende dalla stagione e dallo stadio di lattazione. Negli animali selezionati per la produzione latte il ruolo della PRL nel mantenimento della lattazione si è dimostrato trascurabile, al contrario delle razze non selezionate dove questo è essenziale.

### **PRL E REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEL CORPO LUTEO.**

La PRL possiede un'azione luteotropica, intensificando la produzione di progesterone (Freeman, 1994). In assenza di PRL, il maggiore steroide prodotto dal corpo luteo è il  $20\alpha$ -idrossiprogesterone, catabolita inattivo del progesterone, la cui sintesi è catalizzata dall'enzima  $20\alpha$ -idrossiprogesterone deidrogenasi (Rothchild, 1981). La PRL aumenta la secrezione di progesterone in due modi: potenziando l'azione steroidogenica dell'LH nelle cellule della granulosa (Richards e Williams, 1976) ed inibendo la  $20\alpha$ -idrossiprogesterone deidrogenasi (Freeman, 1994).

Oltre alla sua azione luteotropica, la PRL sembra possedere nei mammiferi anche un ruolo nella luteolisi inducendo la morte cellulare programmata del corpo luteo (Kanuka et al., 1997).

Come fattore regolatore della formazione e distruzione del corpo luteo, la PRL ha quindi un ruolo importante nel mantenimento dello stato fisiologico dell'estro, della gravidanza e della lattazione.

### **PRL E COMPORTAMENTO**

La quasi totalità delle femmine adulte di mammiferi mostra, immediatamente dopo il parto, alcune forme di cure parentali verso la prole, quali la creazione del nido, la protezione, così come il raggruppamento, la pulizia e l'allattamento dei piccoli, mentre nelle femmine nullipare questa risposta è meno intensa o completamente assente. Le variazioni endocrine che si verificano durante ed alla fine della gravidanza, fra le quali l'incremento di PRL e PLs sono considerate responsabili dell'induzione del comportamento materno (Bridges, 1994, Numan, 1994), anche se va sottolineato che la PRL di per se non è capace di dare inizio a

tale comportamento, ma è importante per la diminuzione del periodo di latenza al suo avvio (Bridges et al., 1990).

### **PRL SISTEMA IMMUNITARIO ED EQUILIBRIO OSMOTICO**

La PRL è un mediatore della rete immunoneuroendocrina, dove il sistema nervoso, endocrino ed immunitario comunicano tra loro e gioca un ruolo importante nella regolazione della risposta immunitaria cellulare ed umorale sia negli stati fisiologici che patologici. (Buskila e Shoenfeld, 1996; Neidhart, 1998; Walzer, 1993).

È stabilito che la PRL incrementa l'immunità umorale e cellulo-mediata (Berci e Nagy, 1981, 1982), riduce l'anemia, la leucopenia e la trombocitopenia in topi ipofisectomizzati (Nagy, Berci, 1989). Essa induce, inoltre, la proliferazione dei linfociti e ne inibisce l'apoptosi (Fletcher-Chiappini et al., 1993; LaVoie e Witorsch, 1995).

Alla fine degli anni 80 ed inizio anni 90, è stato dimostrato che l'attivazione dei macrofagi è un effetto mediato dalla PRL, oltre che dall'attività esercitata dal GH, (Bernton et al., 1988). Anche la produzione di anione superossido, responsabile dell'inattivazione degli organismi patogeni (Edwards et al., 1988; Fu, 1992), è un effetto mediato da questo ormone.

Un altro effetto studiato della PRL è la regolazione del trasporto dei soluti attraverso le membrane cellulari nei mammiferi.

Ad esempio la PRL opera numerose attività riguardanti il trasporto dei soluti attraverso le membrane cellulari dell'epitelio mammario. In linea con le sue proprietà lattogeniche, si è visto che diminuisce il trasporto del sodio ed aumenta il trasporto del potassio (Falconer et al., 1983 Falconer e Rowe, 1975). Stimola il

trasporto dell'acqua attraverso le membrane amniotiche (Balsa et al., 1996) ed è responsabile del trasporto di fluidi, sodio, cloro e calcio attraverso le membrane dell'epitelio intestinale (Lamberts e Macleod 1990, Langer et al., 1973).

### **1.3.2.2. REGOLAZIONE DELLA SECREZIONE DELLA PRL IPOFISARIA**

La secrezione della PRL è condizionata da una grande varietà di stimoli esogeni ed endogeni. Gli stimoli fisiologici più importanti che incrementano la secrezione di PRL pituitaria sono la suzione, lo stress ed alti livelli di ormoni steroidei, primariamente estrogeni (Neill 1970, 1974). Questi ultimi agiscono in maniera diretta sulle cellule lattotrope e portano ad un aumento della secrezione di PRL sia a livello basale che in risposta agli stimoli. I glucocorticoidi deprimono invece la risposta della PRL al TRH (fattore stimolante). Questi stimoli sono recepiti dall'ipotalamo che elabora una serie di PRF (Prolactin-releasing factors) e PIF (Prolactin-inhibiting factors). Nei mammiferi l'ipotalamo esercita un ruolo principalmente inibitorio sulla PRL pituitaria (Ben-Jonathan, 1985). Le cellule lattotrope hanno un'alta attività secretoria spontanea, tenuta sotto controllo da un'inibizione tonica esercitata dall'ipotalamo. Quindi esso agisce sul controllo della secrezione di PRL rimuovendo l'inibizione o sovrapponendo un elevato impulso stimolante.

Inoltre, la secrezione di PRL è influenzata da numerosi fattori rilasciati dalle cellule lattotrope stesse (regolazione autocrina) o da altre cellule all'interno dell'ipofisi (regolazione paracrina), in tal modo alcune funzioni della PRL possono essere attivate senza che ci siano variazioni nella sua concentrazione ematica.

La dopamina prodotta dai neuroni dopaminergici tuberoinfundibulari (TIDA), che hanno il corpo cellulare nella porzione dorso-mediale del nucleo arcuato, è il principale fattore di inibizione ipotalamica, questa raggiunge, via circolo portale, l'ipofisi anteriore. Le azioni ormonali di questo sistema si esercitano mediante recettori di tipo D2 (Caron et al., 1978).

Il TRH, secreto dall'ipofisi nei vasi del sistema portale ipotalamo-ipofisario, è considerato un importante PRF, in quanto stimola in modo dose-dipendente il rilascio di PRL dalle cellule lattotrope pituitarie sia in vitro che in vivo (Blake, 1974; Tashjian et al., 1971). Parecchi studi hanno inoltre dimostrato l'importanza del TRH nel rilascio di PRL indotto dalla suzione (Plotsky e Neill, 1982).

Più recentemente è stato isolato dall'ipotalamo di bovino un peptide che ha mostrato la capacità di stimolare il rilascio di prolattina in maniera specifica e potente (Hinuma et al., 1998). Questo peptide, che per tale ragione è stato denominato *Prolactin-releasing peptide* (PrRP), è prodotto da cellule che hanno il loro corpo cellulare per lo più nei nuclei del tratto solitario, nei nuclei ventrali e laterali del midollo allungato e nella porzione caudale dei nuclei dorsomediali dell'ipotalamo, le cui fibre sono proiettate in un ampio raggio di aree cerebrali (Fujii et al., 1999). Nei primi studi (Hinuma et al., 1998; Matsumoto et al., 1999) è stato dimostrato che il PrRP stimola la secrezione di PRL sia in vitro che in vivo con una intensità pari a quella del TRH, anche se lavori più recenti (Jarry et al., 2000; Curlewis et al., 2002) hanno ridimensionato tale ruolo, suggerendo il coinvolgimento del PrRP in un più ampio raggio di funzioni neuroendocrine. Ulteriori studi sono necessari per confermare il coinvolgimento del PrRP nella secrezione di PRL.

### **1.3.2.3. RILASCIO DI PRL IN RISPOSTA A STIMOLI ESTERNI**

#### **Luce**

Negli animali che subiscono l'influenza del fotoperiodo, la luce è un'importante regolatore della secrezione di prolattina. Infatti, nei topi, una alterazione nella durata della fase di luce comporta una alterazione del picco di PRL durante il proestro (Blake, 1976) e quello indotto dall'accoppiamento. In ratti ovariectomizzati trattati con estrogeni, una completa rimozione del fotoperiodo, esponendo gli animali a luce costante, o a vari gradi di privazione della luce, induce una variazione nella secrezione di PRL, simile al picco che si verifica durante il proestro, (Pieper e Gala, 1979) e modifica il picco di secrezione di PRL indotto dall'accoppiamento (Betha e Neill, 1979). Questi dati evidenziano il fatto che questi eventi sono sotto il controllo di un ritmo circadiano endogeno e che la variazione periodica dell'illuminazione guida questo ritmo.

Nella pecora la secrezione di PRL dipende inoltre dalla durata delle ore di luce, poiché il suo rilascio diminuisce durante le stagioni con un breve fotoperiodo (Kennaway et al., 1982). L'effetto del fotoperiodo è mediato dalla melatonina secreta dalla ghiandola pineale, sia passando attraverso il nucleo soprachiasmatico, che agendo direttamente sull'ipofisi.

Durante le giornate brevi diminuisce l'attività dopaminergica (Thiery, 1991), ma questa variazione non sembra avere un effetto diretto sulla secrezione di PRL (Viguie et al., 1996, 1997).

#### **Stress**

È chiaro che la secrezione di PRL è fortemente condizionata dallo stress. Una serie di diversi stimoli stressanti è stata utilizzata in vari studi per caratterizzare il tipo d'effetto sulla secrezione di PRL. Questi includono lo stress indotto dall'etere

(Minamitani et al., 1987; Lookingland et al., 1990; Banky et al., 1994), il confinamento (Fujikawa et al., 1995; Gala e Haisenleder, 1986; Jurcovicova et al., 1990; Kehoe et al., 1991), lo stress termico (Vähä-Eskeli et al., 1991), le emorragie (Carlson et al., 1990), il conflitto sociale (Huhman, 1995). Poichè, in molti casi, la risposta nella secrezione di PRL (stimolazione o inibizione) differisce in relazione alla natura dello stress, non è possibile descrivere un unico meccanismo, ma uno associato ad ogni modalità di stress.

La risposta allo stress indotto dall'esposizione all'etere, riportata in studi effettuati sul ratto, differisce in relazione allo stato riproduttivo dell'animale: durante il diestro lo stress da etere incrementa la secrezione di PRL (Neill, 1970), mentre per quanto riguarda il proestro, non è chiaro se in questa fase del ciclo estrale si abbia un aumento (Jurcovicova et al., 1989), una diminuzione (Morishige and Rothchild, 1974) o nessun effetto sulla secrezione di PRL, in quanto studi diversi hanno fornito dati contrastanti.

Il confinamento applicato prima dell'incremento di PRL nel tardo proestro, lo amplifica. Se, invece, lo stimolo stressante è applicato durante l'incremento della PRL, quest'ultimo è attenuato (Smith and Gala, 1977). Inoltre questo stesso stimolo stressante inibisce l'incremento notturno di PRL durante la pseudogavidanza e la gravidanza (Morehead and Gala 1987a, 1989).

Poichè la dopamina, neuromone ipotalamico, inibisce in maniera tonica la secrezione di PRL, potrebbe essere implicata negli effetti mediati dallo stress sulle variazioni della PRL. Infatti il pimozide, un antagonista della dopamina, previene la diminuzione del picco di PRL indotta dallo stress da confinamento (Gala e Shevach, 1994). Altre sostanze di origine ipotalamica implicate nella variazione

della secrezione di PRL durante lo stress sono la serotonina, l'istamina, l'ossitocina e la vasopressina.

L'importanza fisiologica della variazione nella secrezione di PRL in risposta allo stress per l'organismo è alquanto ambigua. È chiaro che né la diminuzione del picco di PRL durante il proestro indotta dallo stress influenza il ciclo estrale nel ratto, né la riduzione del picco notturno dovuta all'accoppiamento ha alcun effetto sulla conseguente gravidanza o pseudogravidanza nel ratto (Morehead e Gala, 1987b). Dovendo assegnare un ruolo alla PRL nella risposta immunitaria umorale o cellulomediata, si può ragionevolmente ipotizzare che la secrezione di PRL, in risposta allo stress, possieda una funzione immunomodulatrice al fine di proteggere l'organismo dalle conseguenze dello stress (Gala, 1990). Sebbene non ci siano dati sperimentali che provino questa ipotesi, si è visto che la secrezione di PRL, soprattutto durante la lattazione, agisce come un fattore di protezione nelle ulcere gastriche indotte dallo stress (Drago et al., 1990).

#### **1.4. L'OMEOSTASI ORGANICA**

Ogni animale nel suo habitat naturale, si deve confrontare con situazioni potenzialmente dannose come stimoli ambientali di diverso tipo, attacco dei predatori, competizione tra conspecifici. L'abilità a fronteggiare tali situazioni ostili, senza dubbio, ha determinato nella maggioranza dei mammiferi il successo evolutivo, sicuramente attraverso lo sviluppo di una serie di risposte endocrine atte a rendere l'organismo pronto ad una reazione allo stimolo per salvaguardare la sua omeostasi. L'entità di questi adattamenti dipende notevolmente dal tipo e dalla durata dello stimolo ma anche da fattori strettamente individuali quali la



specie e/o la razza, o addirittura la stessa esperienza maturata dal soggetto rispetto allo stimolo. Tali adattamenti rappresentano potenziali danni all'allevamento in quanto possono riflettersi direttamente sulle produzioni e sulla capacità di difesa organica dalle noxae patogene. Le variazioni dell'assetto ormonale fanno parte di questi adattamenti portando l'organismo ad utilizzare le proprie risorse per difendersi dai vari agenti stressogeni. Il sistema ipotalamo-ipofisi-surrene funziona da mediatore bidirezionale tra il corpo e le strutture nervose centrali orchestrando gli adattamenti dell'animale sia di tipo comportamentale che metabolico come l'aumento di alcuni substrati energetici che possono essere considerati di pronto intervento (quali il glucosio, i NEFA ed i trigliceridi).

In tale asse neuroendocrina svolge un'azione anche il prodotto del gene POU1F1 (Ingraham et al.,1999).

### **1.5. PROTEINA POU1F1**

Il fattore di trascrizione pituitario -1 (Pit-1 – nomenclatura ufficiale POU1F1) appartiene al gruppo delle proteine della famiglia POU caratterizzata da uno specifico dominio POU (POU-SD) e da un omodominio (POU HD) che presenta alta affinità di legame con i promotori di differenti geni ed è in grado di attivarne la trascrizione.

Tale proteina è coinvolta in funzioni critiche in diversi eucarioti poiché regola l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo e di quelli tessuto specifici.

Essa si lega a diversi elementi del DNA nei suoi geni target, in quanto possiede un'ampia versatilità nel riconoscimento di tali elementi. Il sub dominio POU specifico si lega perpendicolarmente ai piani delle eliche del DNA. Tale

modalità di legame determina diversi orientamenti nello spazio del dominio rendendo la famiglia delle proteine con dominio POU molto abile nel legame con il DNA, anche in virtù della loro capacità di formare monomeri e dimeri assumendo diverse configurazioni.

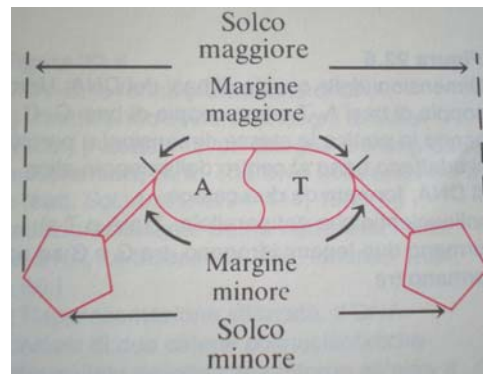
La loro struttura bipartita è costituita da uno specifico dominio il POU, indicato come POU-S, altamente conservato formato da circa 75 aa, legato tramite un *linker* (legame di lunghezza e composizione variabile) all'omodominio di 60 aa indicato come POU-H.

La flessibilità del legame fornisce la possibilità ai diversi sottodomini di assumere differenti orientamenti e distanze nello spazio, ampliando il repertorio dei siti di DNA riconosciuti dalle proteine con dominio –POU. In particolare, POU1F1 si lega ad un complesso di geni “*pattern* di siti promotori ed *enhancer*” regolandone l'espressione. Il sito di legame varia ampiamente intorno ad una debole sequenza consenso (A/T)(A/T)TATNCAT e questo permette al fattore PIT-1 di configurarsi diversamente nei diversi siti di legame (Fig. 1). La maggior parte delle volte il Pit-1 si lega come dimero, altre volte come monomero come nel caso del gene della prolattina 1D (Igramham et al., 1990) ed, in alcuni casi, diverse proteine cooperano (pit-1 ed oct-1) per formare eterodimeri sul sito di alcuni geni (PRL1P della prolattina agisce in sinergia con un recettore di estrogeni nucleare ER in un sito distale enhancer (Dasen e Rosenfeld, 2001).

In alcuni casi alcune proteine appartenenti alla famiglia con POU dominio raggiungono una adattabilità estrema; la Brn-2, proteina neuronale, è in grado di orientare con il suo POU dominio specifico differenti elementi di DNA. Tutto

questo spiega solo in parte la enorme versatilità delle proteine con dominio POU, responsabile della loro specificità funzionale.

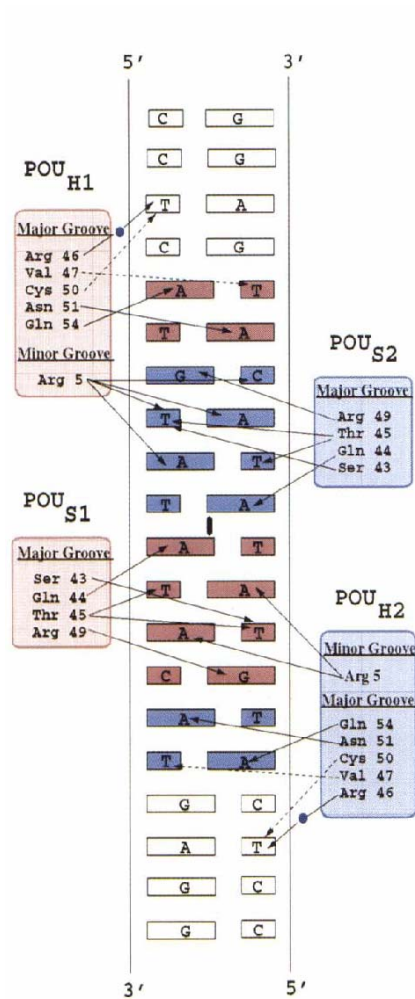
Nel DNA i legami glicosidici tra zucchero e base, di una determinata coppia di basi, non sono diametralmente opposti l'uno all'altro, si formano così, intorno alla doppia elica, due solchi di differente ampiezza come mostrato in figura 1.



**Figura 1.** Sezione trasversale del DNA che illustra l'origine del solco maggiore e del solco minore. Il margine che si estende per più di  $180^\circ$  tra un legame glicosidico e l'altro è il margine maggiore e forma il solco maggiore. Il margine che si estende per meno di  $180^\circ$  tra i due legame glicosidici è il margine minore e forma il solco minore (Rawn, 1990).

Il bordo dell'elica dove l'angolo tra un legame glicosidico e l'altro misura più di  $180^\circ$  è definito margine maggiore ed il solco risultante solco maggiore, mentre il lato dell'elica in cui tale angolo misura meno di  $180^\circ$  è definito margine minore ed il solco risultante solco minore. In entrambi i solchi le basi sono esposte al solvente e sono chimicamente distinguibili, cioè le molecole che interagiscono

con particolari basi possono identificarle senza modificare la doppia elica (Fig. 2).



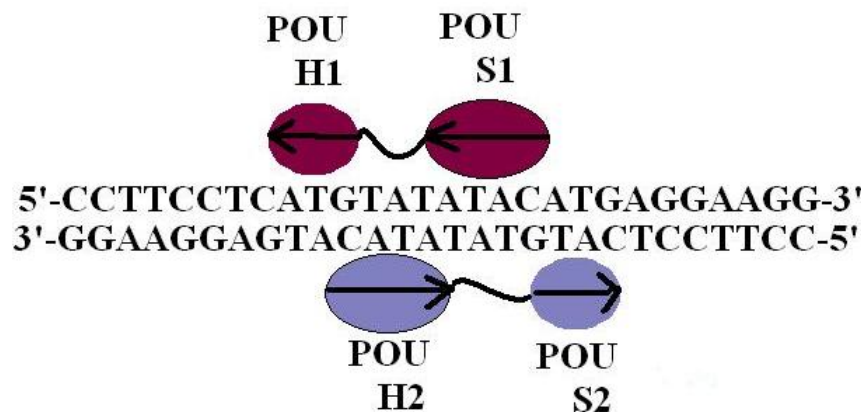
**Figura 2.** Contatti del complesso POU1F1 con le coppie di basi del DNA. I contatti avvengono sia a livello del solco maggiore che di quello minore; i legami idrogeno sono mostrati con frecce continue, le interazioni non polari con frecce tratteggiate. I due monomeri del Pit-1 sono mostrati nei colori azzurro e bordeaux. Le basi del DNA sono colorate con lo stesso colore del sottodominio che prende contatto con il solco maggiore. Nella figura si può notare l'elevata sovrapposizione dei contatti.

### DOMINIO POU-S

Il dominio POU specifico consiste di un cluster di quattro  $\alpha$  eliche, con le eliche  $\alpha 2$  ed  $\alpha 3$  formanti il motivo del dominio, l'elica gomito elica (HTH: *helix-turn-helix*).

Il motivo “elica gomito elica” prevale in modo particolare nelle proteine multimeriche che si legano al DNA. In questi casi le eliche della proteina che sporgono nel solco maggiore sono separate da giri di elica interi di DNA, questo permette alla proteina di stare su un lato dell’elica del DNA e di legarsi alle sequenze simmetriche degli operatori. L’elica 3 si inserisce nel solco maggiore del DNA, l’elica 2 è come se attraversasse tale solco e quattro amminoacidi uniscono le due  $\alpha$  eliche formando un gomito: questo motivo è noto come motivo elica gomito elica.

Il sito riconosciuto è GTAT e l’opposto ATAC per incrociare l’orientamento opposto del dominio POU specifico (Fig. 3).

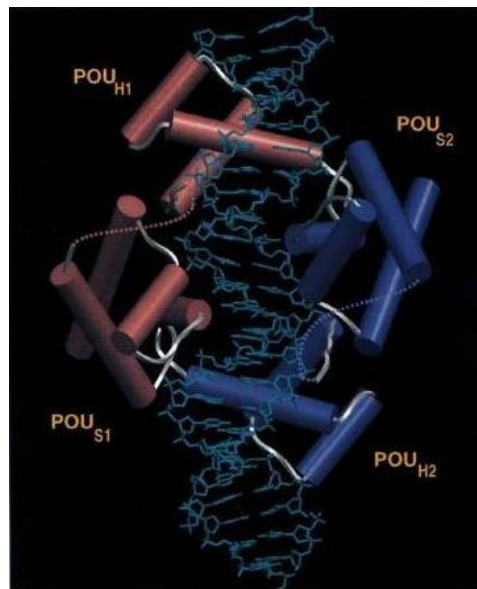


**Figura 3.** Orientamento del legame della proteina POU1F1 al DNA: i due domini POU sono mostrati in azzurro e bordeaux; le frecce indicano l’orientamento relativo del dominio POU-specifico (POU-S) e dell’omodominio (POU-H).

Il motivo elica gomito elica è ancorato al DNA tramite estesi contatti con l’ossatura zucchero fosfato. I residui Arginina 20, Glutamina 27, 44 e Acido glutammico 51 sono conservati in tutti i domini POU specifici negli eucarioti ed anche in alcune proteine procariotiche.

La conservazione nei procarioti e negli eucarioti di alcuni contatti nel dominio, che si lega all'ossatura del DNA, indica un modo simile di ancoraggio nel quale il primo, il secondo ed il sesto residuo amminoacidico lungo l'elica di riconoscimento sono localizzati in maniera tale da riconoscere un sito di 4 bp nel solco maggiore del DNA. (Jacobs e al., 1997).

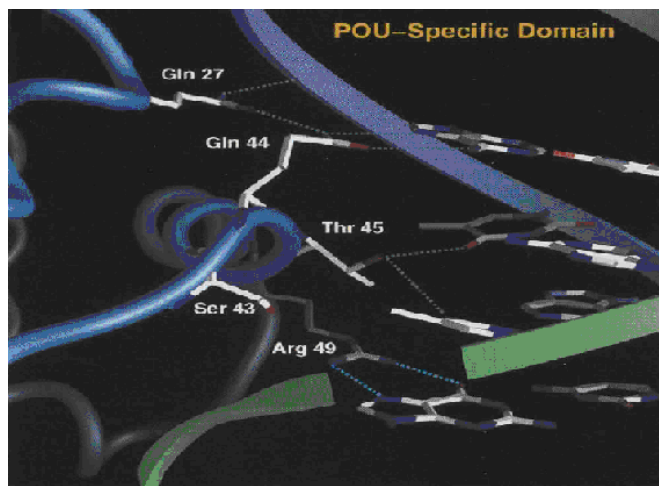
Le due classi di proteine si differenziano comunque, perché le proteine procariotiche raggiungono l'alta affinità di legame tramite formazione di dimeri, mentre quelle eucariotiche tramite un legame ad un secondo dominio (l'omeodominio) che si lega al DNA (fig. 4).



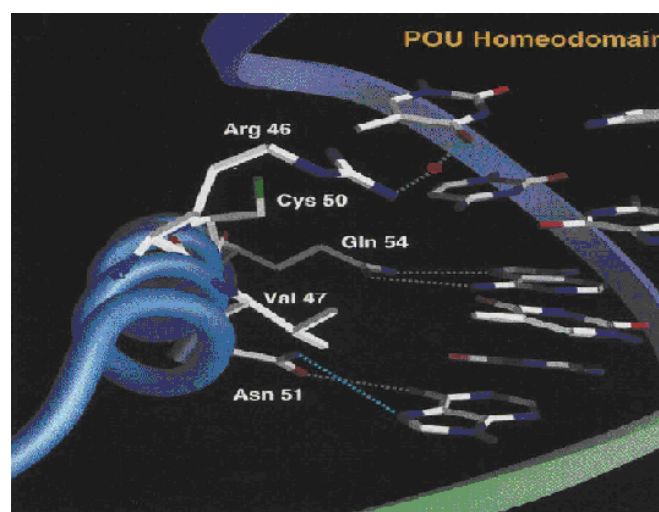
**Figura 4.** Complesso PIT-1. Le linee tratteggiate corrispondono ai legami flessibili che uniscono i domini POU specifici (POU-S) agli omodomini POU-H; l'interfaccia del dimero è formata da il POU-S di un monomero ed il POU-H dell'altro monomero.

Le interazioni proteina-DNA sono mostrate in dettaglio nelle successive figure

Fig. 5a, 5b:



**Figura 5a.** Particolare dell'elica di riconoscimento di un dominio POU-S con in evidenza i residui Ser-43, Gln-44, Thr-45, and Arg-49 che interagiscono con il solco maggiore dell'elica; i legami idrogeno sono mostrati come linee tratteggiate.



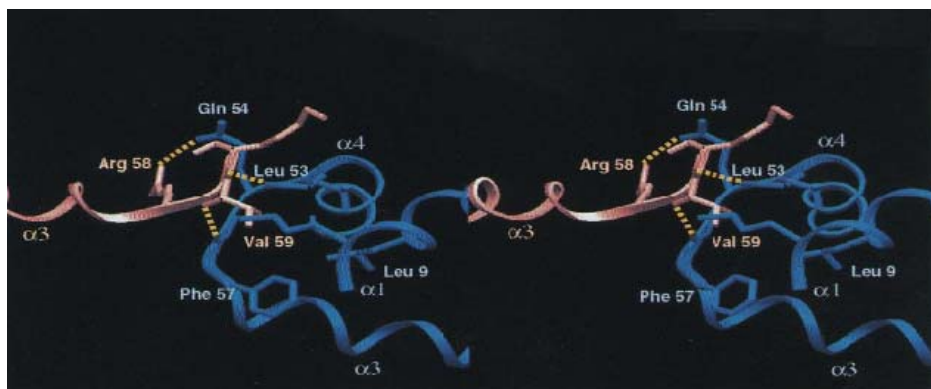
**Figura 5b.** Particolare dell'elica di riconoscimento di un dominio POU-H , nel solco maggiore del DNA mostrandote i legami idrogeno formati dai residui Asn-51 e Gln-54 con le coppie di basi del DNA. L'Arg-46 forma un legame idrogeno con il coinvolgimento di una molecola d'acqua. La Val-47 e la Cys-50 interagiscono con le coppie di basi mediante interazioni di van der Waals . Fig. 4a , 4b sono state create con il programma GRASP (Nicholls 1993) (Jacobs et al., 1997).

La flessibilità raggiunta da questa classe di proteine oltre che dai diversi orientamenti nello spazio, dal legame di tipo multimerico deriva da interazioni di

tipo cooperativo tra le proteine con dominio POU e numerosi cofattori (Holloway et al.,1995) che conferiscono a tali proteine la possibilità di agire su differenti elementi di DNA mantenendo un'azione gene specifica.

### DOMINIO POU-H

L'omeodominio (POU-H) è formato da 3 $\alpha$ -eliche ed un braccio amminoterminale che si inserisce nel solco minore del DNA. Le eliche  $\alpha$  2 e  $\alpha$  3 formano il motivo elica gomito elica (HTH) dell'omeodominio, con  $\alpha$  3 nota come elica di riconoscimento, che interagisce con una coppia di basi nel solco maggiore del DNA. Nella parte carbossiterminale dell'elica di riconoscimento del Pit-1 omeodominio, gli ultimi quattro residui amminoacidici si trovano in una conformazione estesa (aperta) e tramite questa parte si ha l'interazione per la formazione del dimero (Fig. 6).



**Figura 6.** Un'immagine tridimensionale dell'interfaccia del dimero mostrante l'elica di riconoscimento dell'omeodominio di un monomero (in bordeaux) in stretto contatto con il dominio POU specifico dell'altro monomero (in azzurro) La Val-59 si inserisce in una piccola tasca idrofobica sulla superficie del dominio POU-specifico. Inoltre tre legami idrogeno (mostrati con linee tratteggiate in giallo) si stabiliscono tra le molecole; Di questi, due tra gli atomi principali della catena ed il terzo tra l'Arg-58 e la Gln-54.

Alcuni residui dell'interfaccia di dimerizzazione (Arg-58) sono stati identificati come facenti parte del *mutational hot spot* (sequenze del DNA con una suscettibilità elevata alle mutazioni) responsabili della sindrome nota come CPHD



(*Combined Pituitary Hormone Deficiency*) nell'uomo (Ohta et al., 1992; Radovick et al., 1992; Cohen et al., 1995; Radovick, 2002). Gli individui con tale patologia mostrano ridotta sintesi e secrezione del GH e di alcuni ormoni sintetizzati dall'ipofisi anteriore (PRL, TSH, LH, FSH, ACTH).

La sequenza riconosciuta è ATGT (Fig. 2, 3) anche in questo caso alcuni residui per il legame al DNA sono conservati, ma la Glutammina 54, con il suo legame alla adenina, garantisce un livello maggiore di specificità per la sequenza AT presente nel solco maggiore ed è invariante nell'omeodominio della famiglia POU (Fig. 2). La specificità per la coppia di basi che precede la sequenza AT dipende dalla Cisteina 50 che interagisce tramite forze di Van der Waals con il gruppo metile di una timina in posizione 2, e dall'Arginina 46 che forma un legame H mediato da una molecola di acqua. I contatti con il solco minore avvengono per mezzo dell'Arginina 5 del braccio NH<sub>3</sub> terminale ( Fig. 2).

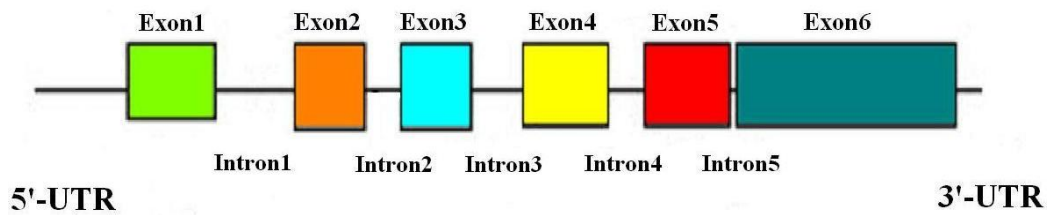
L'interfaccia del dimero è formata dal POU-H di un monomero ed il POU-S del monomero simmetrico. La formazione del dimero coinvolge: la parte carbossiterminale estesa dell'elica di riconoscimento dell'omeodominio di un monomero ( $\alpha$  3), i residui specifici della parte amminotermine dell'elica  $\alpha$  1, il *loop* formato dalle eliche  $\alpha$  3 ed  $\alpha$  4 del dominio POU specifico del relativo monomero simmetrico (Fig. 6).

Le interazioni sono ponti idrogeno e idrofobiche, queste ultime sono attribuibili alla Valina-59 dell'POU-H che si inserisce in una piccola tasca idrofobica sulla superficie del dominio POU-S (Fig. 6).

Il dimero si lega alla forma B del DNA ed interagisce con il DNA al centro del sito (12bp) tramite una *short stretch* sequenza.

## 1.6. GENE POU1F1

Il gene POU1F1 è altamente conservato nelle diverse specie animali ed è costituito da 6 esoni e 5 introni nei mammiferi, mentre negli uccelli da 7 esoni e 6 introni (Fig. 7).



**Figura 7.** Rappresentazione schematica del gene POU1F1 nei mammiferi (*Ovis aries*).

### **Gene POU1F1 in *Mus musculus***

Nei primi anni 90 Li et al. (1990) localizzarono il gene POU1F1 nel cromosoma 16 del topo, (Pit-1 è la forma ortologa murina) e correlarono una mutazione nel gene con la spina bifida nel roditore. I ceppi di topi Snell dwarf (dw) and Jackson dwarf (dw-J) hanno mutazioni puntiformi nel gene Pit-1 che causano una minor presenza di cellule tireotrope, somatotrope e lattotrope.

La proteina nel topo riconosce inoltre le sequenze dei promotori dei geni GH e PRL ed è necessaria per la trans attivazione di questi geni (Yu et al., 2001).

### **Gene POU1F1 in *Homo sapiens sapiens***

Nell'uomo si conoscono 21 mutazioni autosomiche (Turton et al., 2005; Miyata et al., 2005) recessive o dominanti del gene POU1F1 responsabili della insufficiente produzione di GH, PRL e TSH (Reynaud et al., 2004). Le mutazioni

in questo gene possono essere associate con la spina bifida e negli stessi soggetti si registra anche la mancanza di sintesi del GH, ma non c'è ipoplasia della ghiandola pituitaria (Pfalle et al., 1992). Questo suggerisce che il ruolo del POU1F1 non è solo quello di controllare lo sviluppo della ghiandola, ma anche di regolare la sintesi del GH.

#### **Gene POU1F1 in *Gallus gallus domesticus* –*Meleagris gallonavo*.**

Il gene POU1F1 nel pollo risulta localizzato nel cromosoma 1 (GGA1) e si estende per 14Kb. Diversi QTL che influenzano l'accrescimento corporeo sono stati identificati su questo cromosoma, ma solo uno interessa il locus del gene PIT1. Mutazioni a livello di tale gene potrebbero regolare l'espressione del GH, gene con un importante ruolo nella crescita, alterando l'abilità di legame della proteina regolatrice al suo promotore.

Nel pollo sono stati individuati complessivamente 23 SNPs ed un'inserzione di 53bp in una regione di 2400bp del gene Pit-1, ma gli effetti genetici sulle caratteristiche produttive di questi animali sono ancora da identificare (Nie et al., 2005). Uno SNP non sinonimo, una trasversione da adenina (A) a timina (T), è stata trovata nel sesto esone e determina il cambiamento del codone 299 da AAC a ATC portando ad una sostituzione di una asparagina con una isoleucina (Asn299Ile) nel POU dominio (Jiang et al., 2004). La distribuzione dei diversi alleli e le frequenze genotipiche differiscono nei polli da carne (più alta frequenza dell'allele A e del genotipo AA rispetto all'allele T) rispetto alle galline ovaiole (*Layer-Type*). In particolare, il genotipo AA risulta associato ad un accrescimento precoce con un maggiore peso ad 8 settimane dell'animale (Jiang et al., 2004).

Cinque polimorfismi (MR1-MR5) del gene Pit-1 tra quelli individuati, un'inserzione e 4 SNPs, sono stati indagati per evidenziare eventuali correlazioni sulle caratteristiche quanti-qualitative della carcassa (Nie et al., 2008).

L'associazione è stata trovata solo per le caratteristiche di crescita e non per la qualità della carcassa, con un effetto maggiore dei polimorfismi MR2, MR3, MR5 nelle fasi precoci di crescita, MR1 e MR4 nello stadio intermedio.

Nel pollo e nel tacchino è nota un'unica isoforma funzionale del fattore di trascrizione Pit-1, ma non si conosce se ne vengano espresse diverse in altre specie avicole (Kansaku et al., 2007). Nel tacchino si conoscono tre tipi di mRNA (Pit-1, Pit-1 $\beta$  e Pit-1w); nel pollo sono state clonate e caratterizzate 2 isoforme (PIT1 $\alpha$  e PIT1 $\gamma$ ) (Tanaka et al., 1999) prodotte da *splicing* alternativi della lunghezza di 335 aa, 363 aa, 327 aa (Van As et al., 2000). Dal punto di vista strutturale l'isoforma Pit-1 $\alpha$  del pollo corrisponde alla Pit-1 del tacchino, la Pit-1 $\gamma$  del pollo è omologa alla Pit-1w del tacchino. Van As et al. (2000) hanno individuato anche l'mRNA Pit-1 $\beta$  durante l'embriogenesi del pollo. La Pit-1 e Pit-1 $\beta$  degli avicoli sono paragonabili alla Pit-1 $\alpha$  e Pit-1 $\beta$  dei mammiferi. La differenza nella lunghezza e la bassa similarità della regione 3'-UTR può indicare che la mutazione a livello genetico si è verificata durante l'evoluzione ed il processo di speciazione (Kansaku et al., 2007). Nelle specie aviari studiate la maggior parte dei residui amminoacidici entro il dominio specifico (POU-S) ed il dominio omodominio (POU-H) risultano conservati in quanto partecipano al legame con il DNA e presentano elevata similarità. Nonostante ci siano differenze di alcuni amminoacidi la struttura dei due domini è ampiamente conservata in tutti i vertebrati inclusi i pesci (Ono e Takayama, 1992; Yamada et al., 1993). Il

trascritto del gene Pit-1 è più lungo di quello dei mammiferi (355 aa) e probabilmente tale differente lunghezza deriva dall'inserzione di 38 aa codificati da un esone. L'inserzione di 38 amminoacidi riscontrata nel germano reale è localizzata nella stessa posizione dei pesci teleostei (Ono e Takayama, 1992; Yamada et al., 1993; Lorens et al., 1996;). Come nel tacchino, nella carpa, l'inserzione di 33 aa deriva dall'inserzione di un esone (2°) (Kansel et al., 1999), ed, essendo localizzata nel dominio di transattivazione, risulta essenziale per l'attivazione del gene PRL anche nel salmone (Majumdar et al., 1996). Poiché il Pit-1 è in grado, in vitro, di attivare la trascrizione della prolattina e del GH (Weatherly et al., 2001), tale l'inserzione di 38 aa sembra svolgere un ruolo importante nell'attivazione dei geni target negli uccelli. Questo potrebbe far pensare ad una diversa sequenza consenso di legame negli uccelli e nei teleostei ed a una regolazione dell'attivazione dei geni da parte del Pit-1 specifica per le specie aviari. Kansaku et al., (2007) hanno identificato il  $\gamma$  mRNA che codificherebbe per una proteina di 329 aa nell'ipofisi anteriore (Pit-1 $\gamma$ ) del germano reale (*Anas platyrhynchos*), suggerendo che le diverse isoforme possano originarsi nei galliformi ed in altre specie domestiche (anseriformi) per la presenza di differenti siti d'inizio della trascrizione che portano all'espressione di diverse proteine. Il Pit-1 $w/\gamma$  ha un'unica sequenza amminoacidica nella regione aminoterminale, tale differenza deriva da un differente sito d'inizio della trascrizione localizzato nell'introne 1 (Kansaku et al., 2007). La regione in 5' UTR, nel germano reale, ha un'identità di 86% con quella del pollo e del tacchino. Tuttavia la regione in 3'UTR, a valle della posizione 2187, risulta più corta e non mostra similarità con quella del pollo.

Nonostante queste scoperte, il meccanismo di regolazione e di controllo dell'espressione del Pit-1 $\gamma$  non è stato ancora bene caratterizzato; Studi ulteriori negli uccelli potrebbero spiegare il meccanismo di espressione di questa isoforma e chiarire se questo venga espresso in altre specie aviare. Per di più consentirebbero di verificare se i polimorfismi di sequenza riscontrati nel pollo a livello di questo locus genico possano definire in altre specie domestiche aviari, utili markers per operare una selezione per diversi parametri produttivi.

#### **Gene POU1F1 in *Sus domesticus***

Il gene POU1F1 risulta localizzato nel suino nel cromosoma 13 (Yu et al., 1999). In questa specie sono state identificate diverse varianti dell' RNA trascritto e la sequenza completa del cDNA (Chung et al., 1998; Yu et al., 2001).

Nel gene POU1F1 del suino sono stati individuati tre polimorfismi (Yu et al., 1993, 1994) che risultano essere associati con la crescita, lo sviluppo del muscolo e le caratteristiche della carcassa. In particolare, su un frammento di 2100 bp, comprendente la fine dell'esone 3, il terzo introne e l'inizio dell'esone 4, l'utilizzo dell'enzima di restrizione *MspI* permette di individuare due alleli, il D (420bp, 830bp, 850bp) ed il C (420bp, 1680bp). Stancekova et al. (1999) hanno trovato che il genotipo DD nei suini è associato ad un maggior contenuto di grasso ed una carcassa più magra rispetto ai genotipi CC e CD. Questo risultato, ottenuto su razze suine europee (Large White e Large White x Landrace), contraddice quello ottenuto da Yu et al. (1995) che avevano identificato il genotipo CC come quello con più alto contenuto in grasso. Queste discrepanze sembrano dipendere dalle diverse razze utilizzate negli studi, ma il polimorfismo nel terzo introne è stato comunque correlato con il deposito di grasso e l'accrescimento del peso

giornaliero (Song et al., 2005). Inoltre, Sun et al., 2002 hanno evidenziato che i genotipi *MspI* DD avevano alla nascita un minore livello di GH circolante rispetto agli altri genotipi e livelli più elevati di prolattina.

Uno studio di intervallo di mappa ha confermato, nella posizione del gene *POU1F1*, la presenza di un QTL per il peso alla nascita e, nelle vicinanze del gene (20cM), un QTL per lo spessore del grasso (Yu et al., 1995).

Anche l'analisi effettuata con il metodo *RsaI* PCR-RFLP (Yu et al., 1994; Brunsch et al., 2002) ha rivelato che i diversi genotipi sono correlati a diversi parametri quali la qualità della carne, la composizione della carcassa, la suscettibilità allo stress. Sembra comunque che ci sia un effetto sulle caratteristiche quantitative legate ai diversi genotipi del *POU1F1* dipendente dalla razza dei suini. Il gene *POU1F1* avrebbe un effetto maggiore su razze o ibridi per la produzione di carne. (Franco et al., 2005). Quindi il gene *POU1F1* si è rivelato, per il suino, un gene candidato per valutare il rapporto muscolo/grasso e le performance di crescita. Inoltre, gli ibridi commerciali per la produzione di carne (suino leggero da macelleria) presentano una diversa frequenza allelica e genotipica rispetto agli ibridi per la produzione di insaccati (suino pesante da trasformazione). Il genotipo DD ha frequenze più elevate nelle razze da carne europee: Landrace e Duroc, (83,3% e 84,5%), rispetto alle razze tipo pesante Meishan e Jiangquhai, (15% e 11,7%) (Song et al., 2005). Questo indica che la mutazione nel terzo introne nel locus *POU1F1* potrebbe direttamente influenzare la deposizione di grasso ed il contenuto in proteine o essere in linkage (legata a un QTL-Linkage disequilibrium) con un QTL che influenza tali caratteristiche.

#### **Gene *POU1F1* in *Bos taurus***

Nel bovino il gene POU1F1 è stato mappato nel cromosoma 1 (Moody et al., 1995) nel quale sono localizzati i loci per diversi caratteri quantitativi (Woollard, 2000; Ashwell et al., 2004) ciò ha fatto di questo gene un potenziale candidato per i caratteri di accrescimento del bovino. Diversi polimorfismi risultano associati con la produzione dei bovini da latte, con l'accrescimento precoce e con le caratteristiche della carcassa del bovino da carne (Woollard et al., 1994; Renaville et al., 1997a, b; Zhao et al., 2004; Xue et al., 2006).

In particolare uno SNP individuato nel sesto esone risulta influenzare le produzioni di latte (Tuggle e Freeman, 1993; Renaville et al., 1997b). Esso consiste in una mutazione silente A>G che crea un sito di taglio individuato dall'enzima di restrizione *HinfI*. Se questo è presente si origina l'allele B, mentre l'assenza del sito di taglio identifica l'allele A. Le frequenze riportate in letteratura per l'allele A dato dal polimorfismo POU1F1/*HinfI* sono 0,25 per la razza Piemontese (Di Stasio et al., 2002), 0,53 per la Blu Belga (Renaville et al., 1997a), 0,45 per il bovino Angus (Moody et al., 1995), 0,86 per la razza Canchim (Carrijo et al., 2003), 0,00 nella razza pura Zebu (Curi et al., 2006). L'allele A sembra non essere correlato con le caratteristiche della carcassa e la crescita nei bovini da carne (Curi et al., 2006; Zwierzchowski et al., 2002; Di Stasio et al., 2002; Zhao et al., 2004). In alcuni studi l'allele B è risultato influenzare la quantità di latte ed il suo contenuto proteico ma non quello di grasso (Kai et al., 2006). Nella razza Blu Belga, gli animali con genotipo BB risultano più pesanti all'età di 7 mesi (Renaville et al., 1997). Nell'incrocio della razza Canchim taurine/zebu, il genotipo BB è risultato influenzare positivamente il peso allo svezzamento (Carrijo et al., 2003). Sono state identificate altre mutazioni come



quella missenso nel 3° esone 577C>A (allele minore) che comporta la sostituzione dell'amminoacido 76 prolina (Pro) in Istidina (Ist) nella proteina POU1F1. Il genotipo raro 577 AA risulta associato con un incremento significativo nella longevità produttiva nei bovini da latte rispetto al genotipo 577 CC. Questo polimorfismo del gene POU1F1 può essere usato come marcatore nei programmi di selezione assistita dei bovini (Huang et al., 2008).

Nel secondo esone è stato trovato un altro SNP, una sostituzione silente G>A, individuabile tramite l'endonucleasi *TaqI* (Pan et al., 2008).

Altri polimorfismi identificati con la tecnica *HinfI* e *NalIII* PCR-RFLP sono localizzati a livello dell'introne 3, dell'introne 4 e dell'introne 5 (Zhao et al., 2004).

Queste ultime mutazioni non hanno finora mostrato avere relazioni con caratteristiche produttive dei bovini ma, vista la complessità delle azioni di questo gene, non si esclude che in futuro queste relazioni possano essere evidenziate.

#### **Gene POU1F1 in *Ovis aries* e *Capra hircus***

Per quanto riguarda la specie ovina e quella caprina, la localizzazione del gene POU1F1 è la stessa del bovino, cromosoma 1q ed evidenzia una forte omologia con gli altri ruminanti (Woollard et al., 2000).

Gli ovini hanno 54 cromosomi (2n), i bovini e caprini 60. Esiste una similarità tra ovino, caprino e bovino nelle sequenze nucleotidiche con una media del 96-97% di identità con il bovino per quanto riguarda le sequenze nelle regioni codificanti.

*Ovis aries* ha, inoltre, un livello di similarità del 91,2% con *Homo sapiens* e dell'86,2% con *Mus musculus*.

L'elevata similarità tra le specie di ruminanti ha permesso di posizionare diversi marcatori nelle mappe di linkage dell'ovino prima, e poi del bovino e viceversa. Questo risulta spesso vero anche per i caprini anche se gli studi su questa specie sono in numero molto basso e di fatto la mappa di linkage per il caprino è poco sviluppata con soli 307 loci contro i 1333 loci dell'ovino. Benchè bovini e caprini abbiano lo stesso numero di cromosomi, altri aspetti della morfologia e dell'architettura dei cromosomi risultano essere più simili tra ovini e caprini piuttosto che con il bovino (Huang et al., 2005). Nonostante queste specie siano divergenti da lungo tempo, esse possono incrociarsi e questo dimostra che la morfologia dei cromosomi è sufficientemente simile da rendere possibile le sinapsi durante la meiosi; perciò, spesso, si possono mutuare studi genetici tra le due specie (Maddox et al., 2001; Maddox et al., 2005; Maddox e Cockett, 2007).

La caratterizzazione a livello di struttura del gene POU1F1 per la specie ovina è avvenuta recentemente ed esistono poche informazioni sulle funzioni molecolari di base (Bastos et al., 2006b). Per comprendere la regolazione del gene POU1F1 in questa specie, Bastos et al. (2006b) hanno clonato e sequenziato un frammento di 5787 bp che include 6 esoni, 2 introni completi e 3 introni parziali di una razza autoctona portoghese "Churra da Terra Quente"(Fig. 8, 9). Questa razza ovina è importante dal punto di vista economico nella regione portoghese del Nord-Est essendo utilizzata per la produzione di lana, carne e latte. La sua produzione giornaliera di latte varia notevolmente e non sembra dipendere dal management aziendale (Azevedo et al., 1994; Bastos et al., 2001) ma piuttosto da una elevata variabilità genetica della razza.

Alcuni polimorfismi sono stati individuati da parte di questo gruppo di ricerca: nell'esone 2, codone 58, una transizione da una G>A determina un cambiamento dell'amminoacido cisteina in tirosina (frequenza allelica 2%). Nel terzo esone, codone 89, è stata individuata una mutazione da G>A che provoca la sostituzione di una glicina con una asparagina (frequenza allelica 0,5%); sempre nel terzo esone, codone 105, una sostituzione di una G>A (Fig. 9) determina la sostituzione di una alanina con una treonina (frequenza allelica 1,5 %).

Nel quarto introne un polimorfismo in eterozigosi è stato individuato in sei animali (3 % della frequenza allelica).



**Figura 8.** Diagramma schematico del gene POU1F1 in *Ovis aries*, gli introni sono mostrati con doppie linee, gli esoni come rettangoli. Il punto d'inizio dell'esone 1(Ex1) è rappresentato dal codone d'inizio della trascrizione (ATG), la fine del sesto esone (Ex 6) corrisponde al codone di stop (TAG).

**2 fragment: 251 bp**

```

1  GAAACGAATG TGTCTTGAAT CCTCATA CAT TTTCTTACCA GTCCCGTCTA
51  TTTTGTCTTT GATCCAAACT CCTAAATGTT TGTGCACATG TTTTGTGGTG
101 GCAACATTGG GAAACGCAGC AACAGGACTT CATTATTCTG TTCCTTCCTE
151 TCATTACGGA AACCAGTCAT CGACCTATGG CGTGATGGCA GGTAAGAAAA
201 ATTGCTTTTA CATGTAAGAT TGAGTTTGG G GACGCTTGA TGCATTTTCT
251 G

```

**3 fragment: 295 bp**

```

1  GAGGGATAAT TACAAATGGT CCTTTTCTTG TTGTTACAGG GAGCTTAACC
51  CCTTGTCTTT ATAAGTTTCC TGACCACACG CTGAGTCATG GTTTTCCTCC
101 CATGCATCAG CCTCTCCTTT CAGAGGATCC CACTGCCGCT GATTTC AAGC
151 AGGAGCTCAG GCGGAAAAGC AAATTGATG AAGAGCCAAT AGACATGGAT
201 TCTCCAGAAA TTCGAGA AACT TGAAAAGTTT GCCAATGAGT TTAAAGTGAG
251 AAGAATTAAG CTAGGTAGGT GCTTGTTAAC AGCTGTGGGA CACAC

```

**5 fragment: 274 bp**

```

1  CTGTGTTAAC ATTTAACCT AGG GCTTTTA ATCTAAAATG ATGTGTACTG
51  CAAAATTTAA AACAAAAATG TATGATAATT CTATTTTGTA TTATTTTATA
101 AAGAACTTT AAATCCAAAT CTGATAGTTA AAAAAAAAC CTGCTTTGTT
151 TTTGTAATTA TTCACTGTTT TCGCAACACA GCTTTATACA ATGAGAAAGT
201 TGGTGCAAAT GAAAGAAAA GAAACGGAG AACAACTATC AGGTATACTT
251 TTGAGATATT AAAAGTTAGT GGAG

```

**Figura 9.** Mutazioni individuate da Bastos et al., 2006b a livello esonico ed intronico.

Per quanto riguarda la lunghezza della proteina, nella pecora esistono il wild-type lunga 291 aa ed altre tre varianti POU1F1- $\beta$ , POU1F1- $\gamma$ , POU1F1- $\delta$ , derivanti da diversi siti di *splicing* (Bastos et al., 2006a).

Nella regolazione del promotore del GH, la variante  $\beta$  ha una capacità di trans attivazione del 10% più elevata rispetto al wild-type ed entrambe interagiscono nell'attivazione del promotore del gene GH raddoppiandone l'attivazione rispetto al wild type. Le varianti  $\gamma$  e  $\delta$  non sono invece in grado di transattivare il promotore ed agiscono come proteine repressore riducendo in maniera significativa l'attivazione da parte della proteina wild-type (Bastos et al., 2006a).

Per quanto riguarda la specie *Capra hircus* Lan et al. (2007a), basandosi sulla sequenza ovina disponibile in banca dati (AJ 549207) e su quella bovina, hanno

individuato diverse sostituzioni nel 6° esone del gene Pit-1 e tra queste una sostituzione T>G silente al locus del POU1F1 nel nucleotide 58 del 6° esone. Tale sostituzione determina un cambiamento del codone codificante TCT in TCG, ma non modifica l'amminoacido, serina, nella posizione 241 della proteina matura di 291 amminoacidi.

La presenza di una G al posto di una T rimuove il sito di restrizione dell'enzima *DdeI*: CT▲NAG (CT▲CAG – CGCAG) (DQ826397) (Lan et al., 2007 b, c).

L'allele caratterizzato dalla presenza di T è stato indicato come POU1F1 [D. sub. 1]; l'allele caratterizzato dalla presenza di G è stato indicato come POU1F1 [D. sub. 2] (Lan et al., 2007 b).

Gli individui con genotipo POU1F1 TT, presentano superiori *performance* per la produzione di latte, la prolificità, il peso alla nascita, se paragonati con gli individui con il genotipo POU1F1 TG.

Il genotipo POU1F1 GG non è stato mai riscontrato negli studi effettuati fino ad ora.

La regione esonica che presenta questa sostituzione risulta caratterizzata dalla presenza di 5 amminoacidi serina. Diversi codoni determinano la traduzione in serina (UCU, UCG, UCC, UCA, AGC, AGU); la frequenza di utilizzo del codone UCU nella regione analizzata del genoma di *Capra hircus* è pari a 2,400, dei codoni UCG ed UCA a 0,000, di AGC, AGU, UCC a 1,200.

Il codone UCU (TCT) che codifica per la serina presenta quindi un'alta frequenza, mentre UCG (TCG) è un codone raro (Lan et al., 2007c).

L'uso differente dei codoni che codificano per gli stessi amminoacidi è definito *Codon Bias*; esso varia tra gli organismi e per i diversi geni di uno stesso organismo (Kanaya et al., 2001). Sembra che questo differente utilizzo possa dipendere da numerosi fattori genomici quali la lunghezza del gene, il contenuto in guanina e citosina, la frequenza di ricombinazione, il livello di espressione genica ed il numero dei geni (Lavner e Kotlar, 2005).

Per spiegare il *Codon Bias* sono stati proposti due processi: la selezione naturale, che agirebbe per mezzo di mutazioni silenti e quelle che determinano effetti nel DNA (*acting or silent changes in DNA*).

L'uso differenziale favorirebbe i codoni con un elevato numero di geni codificanti per il tRNA che aumenterebbero il livello di espressione delle proteine: questo spiegherebbe l'azione della selezione naturale sul *Codon Bias* mezzo utilizzato per incrementare l'efficienza di traduzione (Kanaya et al., 2001).

E' stato dimostrato che l'efficienza di traduzione nel genoma umano stimata usando il numero di copie di geni di tRNA è debolmente correlata con il livello di espressione. L'utilizzo differenziale dei codoni avrebbe un ruolo in questo, anche se non è di facile descrizione (Archetti, 2004). Nei geni altamente espressi il *Codon Bias* sembrerebbe favorire i codoni che presentano un numero elevato di geni che codificano per il tRNA. D'altra parte, si pensa che, negli eucarioti non mammiferi, possa agire nella regolazione dell'espressione genica favorendo i codoni con un basso numero di copie di geni per il tRNA nei geni poco espressi.

Questa ipotesi venne fatta da Konigsberg (1983) e Kanaya et al. (1999) per diversi batteri, tra i quali *Escherichia coli*, e per numerosi organismi, tra i quali i primati (Zhang et al., 1991). Nel 2005 Lavner e Kotlar., dimostrarono l'esistenza

di una debole correlazione tra il livello di espressione genica e la frequenza dei codoni ottimali, cioè quelli con più alto numero di copie di geni per il tRNA, anche indicato come *Major codon* o codone con livello superiore di traduzione per 14000 geni umani.

Questo meccanismo viene spiegato da Lavner e Kotlar (2005) dicendo che la selezione agisce sul *Codon Bias* non soltanto incrementando la velocità di allungamento favorendo i codoni ottimali nei geni altamente espressi, ma anche rallentandola favorendo i codoni non ottimali nei geni poco espressi. Inoltre i codoni ottimali sembrano essere preferiti nella sintesi di proteine la cui produzione richiede un elevato costo energetico di biosintesi (Heizer et al., 2006).

Il *Codon Bias* incrementerebbe l'efficienza di traduzione, ridurrebbe il numero di amminoacidi introdotti erroneamente e ridurrebbe la sintesi di quelle proteine che possono essere svantaggiose se presenti ad alta concentrazione. Inoltre, in questo caso, verrebbero preferiti gli amminoacidi con alto costo biosintetico, essendo l'efficienza di traduzione influenzata dalle dimensioni, struttura e costo di produzione degli amminoacidi incorporati nella proteina, all'opposto i geni con elevati livelli di espressione tenderebbero a codificare per amminoacidi meno costosi e più semplici (Lavner e Kotlar, 2005).

Inoltre Lan et al., 2007c sostengono che la poca abbondanza del codone UCG può determinare un decremento nella velocità di traduzione dell'mRNA limitando l'efficienza di sintesi della proteina. La mutazione silente, pur non provocando nessuna sostituzione amminoacidica, avrebbe, probabilmente, come risultato un cambiamento dei codoni sinonimi della serina utilizzati da, (UCU) più frequente,

(2,400), a (UCG), meno frequente (0,000). In tal modo si ipotizza che il *Codon Bias* sia associato al livello di espressione di POU1F1.

Il genotipo POU1F1 TG associato con il raro codone (UCG) e, quindi, con un minore livello di espressione di Pit-1, regolerebbe il livello di espressione dei geni GH, PRL, TSH (beta). Tale genotipo presenterebbe perciò *performance* minori, tali argomentazioni spiegherebbero anche l'assenza degli individui POU1F1 GG (Lan et al., 2007c).

Queste ipotesi, seppur complesse sono molto interessanti per cercare di spiegare alcuni processi, ma necessitano di ulteriori studi per capire meglio il ruolo dei codoni isoaccettori e del loro utilizzo differenziato nella sintesi proteica.

Nella regione in 3', fiancheggiante il sesto esone, è stata individuata un'altra mutazione: T>C, 172 nucleotide (AGT) serina con (AGC) serina che, sorprendentemente, produce un'ulteriore mutazione silente nella posizione 279 della proteina matura.

Tale mutazione può essere individuata tramite digestione enzimatica con l'enzima AluI (Lan et al., 2007a). L'allele che presenta la T è stato indicato come POU1F1-T, mentre quello che presenta la C come POU1F1-C. Su 801 capre appartenenti a 9 razze native cinesi si è osservato un'associazione significativa tra i genotipi TT e TC ed alcune caratteristiche produttive (Lan et al., 2009a). Il genotipo TC presenta infatti produzioni di latte superiori rispetto al TT, come pure un peso alla nascita inferiore. Le popolazioni indigene cinesi presentano un ampio spettro di diversità al locus AluI POU1F1 nella capra con una predominanza del genotipo TT.



Nella regione non tradotta in 3'UTR è stata individuata una terza mutazione G>A in posizione 92 che però non determina la creazione di un sito di restrizione.

La quarta mutazione, una transizione T>C in posizione 110 della regione 3'UTR, può essere individuata con l'enzima di restrizione *Pst*I (Lan et al., 2009b).

Nella popolazione analizzata, 847 capi appartenenti alla razza Inner Mongolia White Cashmere, la frequenza dell'allele C risulta nettamente inferiore (0,041) rispetto all'allele T (0,959). Il genotipo CC meno frequente è stato ritrovato in altre razze di capre. L'allele POU1F1-C è individuato tramite la tecnica PCR-digestione enzimatica con *Pst*I perché l'enzima riconosce il sito di taglio presente per la C mutata nella sequenza CTGCAG ed origina 2 frammenti da 370bp e 80bp. L'allele POU1F1-T è riconoscibile poiché l'enzima non riconosce nessun sito di taglio ed il frammento conserva le dimensioni di 450bp (TTGCAG). Il genotipo TT risulta associato con una superiore produzione di lana da parte delle capre di 2, 4, 5 anni rispetto al genotipo TC e costituisce un marcatore molecolare per la produzione di lana cashmere nelle capre senior, ma non per lo spessore e lunghezza del pelo.

Tale sostituzione, pur non modificando la sequenza amminoacidica, può regolare l'espressione del pit-1 stesso e dei geni GH, PRL. E' stato osservato che le sequenze in 3'UTR possono influenzare il meccanismo di deanelizzazione e degradazione dell' mRNA (Xu et al., 1997; Lan et al., 2009b). Essa potrebbe influenzare la stabilità dell'mRNA di pit-1, GH e PRL e di conseguenza la quantità delle proteine prodotte. Oppure, l'effetto potrebbe essere spiegato con il fatto che la proteina prodotta dal gene POU1F1 regola l'espressione della prolattina e di conseguenza agisce sul ciclo di crescita del pelo.

D'altra parte, la mutazione trovata potrebbe non essere la mutazione determinante l'effetto, ma essere in "linkage disequilibrium" con un gene che influenza la produzione di lana.

Nonostante non ne sia nota l'azione precisa, questo gene può essere considerato un marker genetico utile per la selezione nelle capre produttrici di Cashmere.

Nella figura 10 sono mostrate le mutazioni trovate nell'esone 6 e regione in 3' UTR del gene POU1F1 nei caprini.



**Figura 10.** Mutazioni a livello del sesto esone e del V introne trovate in *Capra hircus* prendendo come punto di riferimento il primo nucleotide del sesto esone.

Lan et al., (2009c), con le stesse tecniche utilizzate nella nostra ricerca (PCR-SSCP, sequenziamento del DNA), hanno effettuato uno studio a livello degli esoni 1, 2, 3, 4, 5; parte delle regioni introniche (1, 2, 3, 4, 5); la regione in 5'UTR

del gene POU1F1 nella razza caprina Inner Mongolia White Cashmere a duplice attitudine (carne e cashmere).

La ricerca in questione, disponibile online da metà settembre 2009, ha evidenziato la presenza di 12 nuovi SNPs al locus Pit-1 distribuiti negli esoni 3, 4, 5 e negli introni 1, 3, 4.

Il terzo esone ed il terzo introne si sono rivelati quelli maggiormente polimorfici con ben 6 polimorfismi in linkage EX3 113, G>T (Glu109His); EX3 114, G>T (Glu110ter); IVS3 + 8, C>T; IVS3 + 41, T>G; IVS3 + 41 42 insT; IVS3 + 175, T>A).

La presenza dei nucleotidi indicati tra parentesi (EX3 113, G; EX3 114, G; IVS3 + 8, C; IVS3 + 41, T; IVS3 + 41 42insT; IVS3 + 175, T) costituisce l'allele C più frequente, rispetto l'allele indicato come D nella razza studiata.

La delezione di una adenina in posizione 53 nel 4° esone causa un *frame shift* che determina la formazione di un codone di stop ed una proteina di soli 164 aa anziché 291aa. L'allele caratterizzato dalla presenza della adenina è indicato come E e risulta il più frequente; quello con la delezione come F e, non è stato rintracciato in omozigosi. La delezione infatti eliminerebbe una parte del dominio POU S e l'intero omodominio determinando un *frame shift* letale per l'animale. Inoltre il genotipo FF non avendo una parte del 4° esone, ed essendo caratterizzato dall'assenza del 5° e 6° esone risulta simile alla variante ovina  $\delta$  (Bastos et al., 2006a) difettiva degli esoni 3-5.

Nel 4° introne è stato individuato uno SNP (IVS4 + 710T >A). Nel 5° esone è stato individuato uno SNP (EX5 14G>A) sinonimo (Glu206Glu), e due SNPs missenso, rispettivamente in posizione 34: (EX5 34G>A) Arg213Lys e 59: (EX5

59G>A) Arg218Lys. I quattro SNPs in linkage tra loro (IVS4 + 710T; EX5 14G; EX5 34G; EX5 59G) originano l'allele G, l'allele H è determinato dalla presenza della A, in tutte e quattro le posizioni di mutazione. Il genotipo GH ha mostrato un peso lordo di cashmere maggiore rispetto al genotipo GG.

Nella regione in 5'UTR, nel 2° esone e nel 5° introne non sono stati individuati SNPs.

Tra tutti i polimorfismi individuati, risultano associati alle produzioni di cashmere, quello localizzato nel 1° introne, la delezione nel 4° esone (-53 A) e la sostituzione nel 4° introne +710. Inoltre l'allele C del 3° esone risulta correlato ad una maggiore lunghezza della fibra e quello del 5° al peso lordo di cashmere.

Inoltre anche le sostituzioni nel 3° esone 113 G>T (Glu109His), 114 G>term (Glu110ter), e nel 5° esone Glu206Glu, Arg213Lys e Arg218Lys sono risultate correlate con il peso lordo e la lunghezza della fibra nelle capre di due anni di età. Questo suggerisce l'utilizzo del POU1F1 come gene candidato nella produzione di cashmere nella capra.

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

La produzione di latte è sotto il controllo di diversi fattori come la genetica dell'animale, l'alimentazione e l'ambiente. Per quanto riguarda questi ultimi due fattori l'uomo ha cercato di mitigare il loro effetto sull'animale attraverso il miglioramento delle tecniche di allevamento e di alimentazione, sia dal lato quantitativo che qualitativo, ottenendo una sempre maggiore produzione.

Tuttavia solo questi miglioramenti strutturali ed alimentari non sono sufficienti ad ottenere nuclei omogenei di animali altamente produttivi, se non supportati da piani mirati di selezione genetica.

In Sardegna insistono maggiormente due tipi di allevamenti, ovino e caprino, che hanno avuto un approccio selettivo molto differente. Nell'allevamento ovino attraverso una selezione ben realizzata ed un miglioramento delle tecniche di allevamento si sono ottenuti buoni animali lattiferi e con livelli produttivi quasi omogenei.

Lo stesso discorso non può essere fatto per i caprini allevati nell'isola in quanto questo settore è rimasto marginale e con l'utilizzo di aree non dedicabili allo sfruttamento agricolo. Questo fatto ha indotto ad uno scarso investimento sia nel miglioramento delle strutture che nell'attuazione di piani di selezione atti a determinare progressi produttivi del settore caprino.

Lo studio di geni che possano migliorare le produzioni negli ovini di razza Sarda ed ancor più nei caprini costituisce un utile strumento per poter applicare piani di selezione utili al progresso del settore.

Nell'analisi genetica degli animali di allevamento, i marcatori molecolari stanno assumendo un ruolo sempre più importante, in quanto consentono

all'allevatore di operare con più efficacia nella selezione e forniscono informazioni per gli accoppiamenti tra individui di genotipo conosciuto, prevedendo il fenotipo della discendenza. Le tecniche di biologia molecolare permettono di studiare accuratamente anche alcuni geni coinvolti in diverse performances produttive degli animali di interesse zootecnico.

Tra questi geni il POU1F1 riveste sicuramente un interesse notevole in quanto modula l'espressione di alcuni geni che codificano per diversi ormoni ipofisari. Infatti tale gene può influenzare le secrezioni di GH, PRL e TSH tutti ormoni che hanno un ruolo molto importante nella secrezione latte nei ruminanti.

L'effetto di diversi polimorfismi del gene suddetto sono state descritte in differenti animali e sono state correlate sia positivamente che negativamente ai diversi tratti produttivi.

La presente ricerca ha come finalità lo studio di alcune regioni codificanti del gene POU1F1 ed in particolare gli esoni 2, 3, 6 nella razza Sarda di *Ovis aries* e *Capra hircus* e di verificare la presenza in esse di polimorfismi correlandoli con le caratteristiche produttive.

### 3. MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su 120 individui di razza sarda appartenenti alla specie *Ovis aries* e 187 soggetti di razza sarda appartenenti alla specie *Capra hircus*.

I soggetti della specie *Ovis aries* appartenevano a due allevamenti con capi iscritti al libro genealogico e situati nell'agro di Osilo e Dorgali. Sono stati scelti i soggetti dei quali è stato possibile registrare almeno quattro lattazioni. Le aziende, gestite a livello familiare, presentavano condizioni igieniche buone, erano dotate di spazi adatti al ricovero degli animali e mungitura meccanica. Le pecore venivano alimentate prevalentemente al pascolo e con mangime concentrato due volte al giorno.

I soggetti della specie *Capra hircus* appartenevano a tre allevamenti dislocati rispettivamente nei comuni di Orotelli (100 capre in lattazione), Santadi (200 capre in lattazione) e Sant'Anna Arresi (300 capre in lattazione). Le tre aziende erano gestite con le tradizionali tecniche di allevamento estensivo della capra in Sardegna, con un'alimentazione basata sull'utilizzo estensivo del pascolo naturale in ambienti di alta collina e montagna, caratterizzati dalla presenza delle tipiche essenze mediterranee con ridotta integrazione. Questa, somministrata al rientro nel caprile dopo l'avvenuto pascolo, era costituita da mangime in forma di pellets concentrato, 200 g per animale (18% proteina cruda e 12,5 MJ ME/kg sostanza secca). La mungitura veniva effettuata manualmente al mattino, senza detersione della mammella. La riproduzione era basata sulla monta naturale con una sex ratio di circa 1/25, con allattamento dei capretti da parte delle rispettive madri.

I campionamenti sono stati effettuati dal mese di marzo in poi ad intervalli di 30 giorni fino al mese di giugno.

Per ogni animale appartenente alle due specie è stata registrata la produzione lattea in grammi ed effettuato un prelievo individuale di latte in provette sterili da 50 ml per l'analisi del contenuto di proteine totali, grasso, con l'uso di uno spettrofotometro all'infrarosso (Milko-Scan 133B; Foss Electric, DK-3400 Hillerød, Denmark) secondo lo standard dell'International Dairy Federation (IDF 141C:2000).

Da ciascun capo sono stati prelevati dalla vena giugulare 10 ml di sangue intero mediante provette sottovuoto contenente EDTA. Da ciascuna provetta, trasportata a 4°C in laboratorio, sono state preparate almeno due aliquote da 300 µl di sangue conservate a -20°C.

I campioni di DNA sono stati estratti da sangue partendo da un'aliquota di 300 µl con un Kit commerciale (Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany). La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono stati valutati tramite lettura spettrofotometrica (BioFotometro Eppendorf, Amburgo, Germania): per le successive analisi molecolari si è utilizzato il DNA con  $260/280 > 1,7$ ,  $260/230 > 2$  e concentrazione  $> 50$  ng/µl.

Per l'amplificazione degli esoni analizzati sono stati utilizzati i primers disegnati da Bastos et al. (2006b) indicati di seguito.

## **ESONE 2**

**Pit 1 EX2FW:** 5'- GAAACGAATGTGTCTTGAATC -3'

**Pit 1 EX2RW:** 5'- CAGAAAATGCATCCAAGCGTCC -3'



### **ESONE 3**

**Pit 1 EX3FW:** 5'- GAGGGATAATTACAAATGGTCC -3'

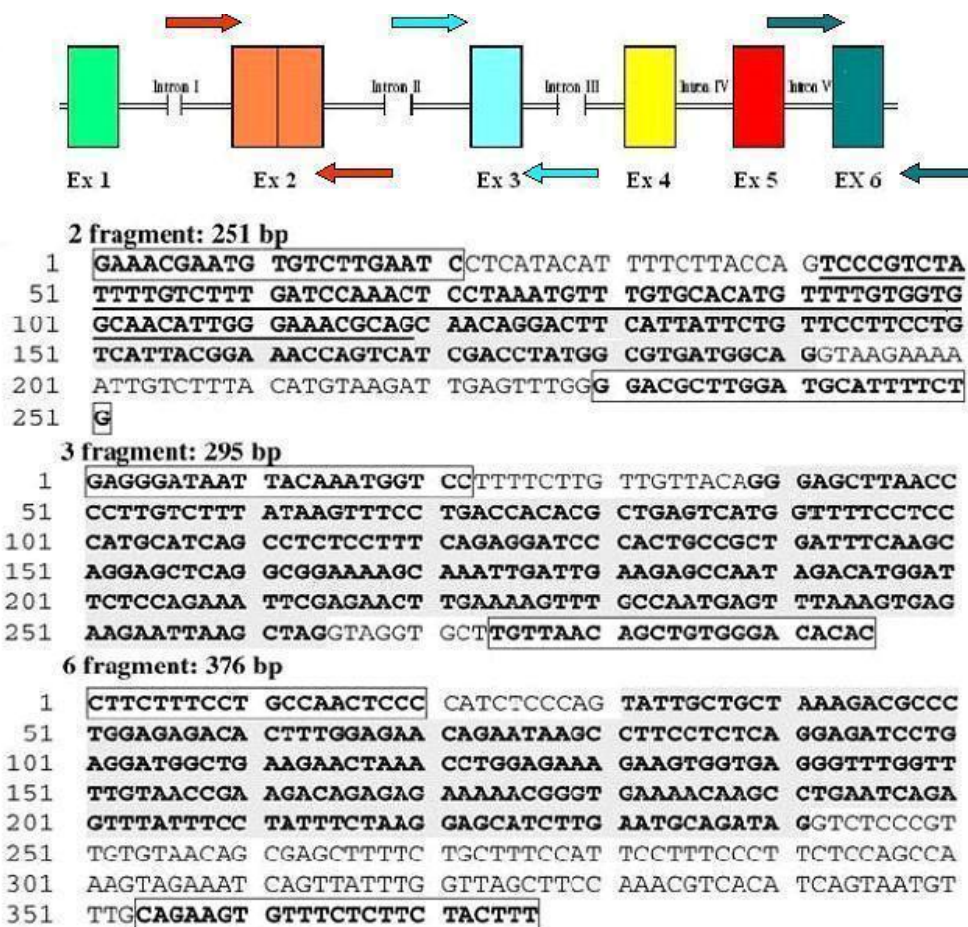
**Pit 1 EX3RW:** 5'- GTGTGTCCCACAGCTGTTAACA -3'

### **ESONE 6**

**Pit 1 EX6FW:** 5'- CTTCTTTCCTGCCAACTCCC -3'

**Pit 1 EX6RW:** 5'- AAAGTAGAAGAGAAACACTTCTG -3'

Tali primers sono stati utilizzati anche per la specie *Capra hircus* in quanto all'inizio della ricerca, in GenBank, non vi era ancora depositata nessuna sequenza di tali esoni relativi a tale specie. Nell'unico studio effettuato all'inizio della nostra ricerca su tale gene (Lan et al., 2007a) erano stati utilizzati primers costruiti sulle sequenze ovina e bovina, ma che non si appaiavano bene con la sequenza ovina di riferimento AJ549207 *Ovis aries*, (Bastos et al., 2006b) soprattutto all'estremità 5'(Fig. 11).



**Figura 11.** Primers utilizzati per l'amplificazione dei tre esoni; le sequenze codificanti risultano evidenziate in grigio, i primers utilizzati sono racchiusi all'interno di rettangoli.

La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25µl con concentrazioni dei diversi reagenti per ciascun esone indicate nella tabella 1.

**Tabella 1.** Concentrazione dei reagenti nelle reazioni di PCR per i tre esoni.

	<b>ESONE 2</b>	<b>ESONE 3</b>	<b>ESONE 6</b>
<b>DNA</b>	100 ng	100 ng	100 ng
<b>MgCl<sub>2</sub></b> ,	1,5 mM	2 mM	1,5 mM
<b>dNTPs</b> ,	200 µM	200 µM	200 µM
<b>Primer</b>	0,32 µM	0,48 µM	0,32 µM
<b>Taq Platinum</b>	0,5 U	0,5 U	0,5 U
<b>Volume finale</b>	25 µl	25 µl	25 µl

Il ciclo di amplificazione per i tre esoni veniva ripetuto 30 volte dalla fase 2 alla fase 4 con i tempi e le temperature indicate nella tabella 2.

**Tabella 2.** Protocolli di PCR per l'amplificazione dei tre esoni.

		<b>ESONE 2</b>	<b>ESONE 3</b>	<b>ESONE 6</b>
<b>1</b>	<b>Attivazione iniz. 94 C°</b>	2'30''	2'30''	2'30''
<b>2</b>	<b>Denaturazione 94°C</b>	20''	20''	20''
<b>3</b>	<b>Appaiamento</b>	57°C 30''	55°C 30''	55°C 30''
<b>4</b>	<b>Estensione 72°C</b>	15''	18''	23''
<b>5</b>	<b>Estensione finale 72°C</b>	10'	10'	10'

L'avvenuta amplificazione dei diversi esoni veniva confermata tramite corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1,5% (100 V per 35 min) seguita da

colorazione con bromuro d'etidio (0,5 mg/ml) e visualizzazione delle bande al transilluminatore dopo esposizione a raggi di luce UV.

Gli esoni del gene POU1F1 di *Capra hircus* come detto precedentemente, sono stati amplificati utilizzando gli stessi primers usati per amplificare il medesimo frammento codificante in *Ovis aries*, con identiche condizioni di reazione.

## **IDENTIFICAZIONE DI SEQUENZE DI DNA MUTATE**

### **Tecnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

Nel caso si vogliano ricercare mutazioni sconosciute, si devono utilizzare metodiche capaci di riconoscere una sequenza mutata qualunque sia la localizzazione della variante all'interno del segmento di DNA analizzato. Le metodiche utilizzate devono possedere una elevata sensibilità, cioè essere in grado, possibilmente, di scoprire sempre la presenza di mutazioni. Una metodica semplice, universalmente utilizzata per l'identificazione di sequenze di DNA mutate, è l'analisi mediante SSCP. Essa si basa sul principio che la mobilità elettroforetica di una singola elica di DNA non dipende solo dalle dimensioni della molecola, ma anche dalla conformazione assunta in base alla sua sequenza nucleotidica. Nell'analisi SSCP, il DNA viene amplificato, denaturato ad alta temperatura in presenza di formammide per ottenere filamenti singoli.

Il frammento di DNA a doppia elica infatti, sottoposto a denaturazione a 95°C, se viene raffreddato velocemente, dà origine ad appaiamenti delle singole eliche stabili in quanto le singole eliche tendono a riassociarsi in corrispondenza delle zone di sequenza complementari. Le conformazioni assunte saranno uniche nel

caso in cui non siano presenti differenze nella sequenza, saranno molteplici e quindi differenti nel caso che la loro sequenza sia diversa.

Eventuali variazioni nella migrazione elettroforetica in gel di acrilammide non denaturante indicheranno la presenza di varianti nella sequenza in esame. L'analisi mediante SSCP consente di identificare l'80% circa delle mutazioni, la diversa mobilità elettroforetica risulta discriminata se il frammento analizzato a singola elica non supera la lunghezza di 400 bp.

La visualizzazione delle bande al transilluminatore del filamento avviene tramite colorazione con syber gold o altre sostanze fluorescenti intercalanti (Orita et al., 1989).

L'identificazione della presenza di sequenze di DNA mutate è stata effettuata mediante tale tecnica, utilizzando la camera elettroforetica verticale D-CODE System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) per SSCP.

Il DNA amplificato (2,5  $\mu$ l) è stato sottoposto a denaturazione per 10 min a 95°C in presenza di 7,5  $\mu$ l di soluzione denaturante (95% formamide, 10mM NaOH, 0,05% xilene-cianolo e 0,05% bromofenolo), al fine di ottenere filamenti a singola elica in grado di assumere conformazioni diverse in base alla sequenza nucleotidica determinanti differenze nella velocità di migrazione. I campioni venivano mantenuti in ghiaccio, per impedirne la rinaturazione, fino al momento del caricamento su gel di poliacrilammide.

Sono state utilizzate diverse concentrazioni del gel e diverse condizioni di corsa a seconda dell'esone che si doveva analizzare. Esse sono state messe a punto in seguito a diverse prove di laboratorio. L'utilizzo di gel a concentrazione diversa, tampone di corsa TBE (0,44 M di Tris base, 0,44 M di acido borico e

0,01 M di EDTA a pH 8), differenti temperature e durata della corsa ha permesso di individuare le condizioni più adatte per una distinzione nitida delle bande nel gel per i diversi esoni (Tab. 3).

Per la ricerca di polimorfismi di sequenza negli esoni di *Capra hircus* sono state utilizzate le stesse condizioni di corsa SSCP per gli esoni 2 e 6 di *Ovis aries*, per l'esone 3 si è utilizzato anche glicerolo al 10% nella preparazione del gel, in quanto il frammento mostrava pattern diversi se fatto correre in presenza di tale triolo. L'utilizzo di tale componente nella miscela del gel aumenta, talvolta, la risoluzione delle bande presenti (Bastos et al., 2001).

**Tabella 3.** Protocolli utilizzati nell'analisi SSCP dei tre diversi esoni in *Ovis aries* e *Capra hircus*.

	<i>Ovis aries</i> <i>Capra hircus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Ovis aries</i> <i>Capra hircus</i>
	<b>ESONE 2</b>	<b>ESONE 3</b>	<b>ESONE 3</b>	<b>ESONE 6</b>
<b>AV</b>	1000	1000	1000	1000
<b>W</b>	25	25	25	25
<b>[ ] gel</b>	8%	10%	10%	12%
<b>T C°</b>	15	15	15	12
<b>Tampone TBE</b>	0,5 X	0,5 X	0,5 X	1X
<b>Tempo corsa</b>	5,30 h	7 h	8 h	8h
<b>glicerolo</b>			1ml	

Per la visualizzazione delle bande di DNA a filamento singolo si è utilizzata la colorazione del gel con Syber gold (Invitrogen, Milano, Italia) 1X per 30min. Il gel è stato fotografato dopo esposizione ai raggi UV con il sistema (Uv-fotoDoc).

Il sequenziamento di alcuni campioni con differente profilo SSCP è stato utilizzato per caratterizzare eventuali SNP associati allo stesso profilo.

Prima di sottoporre i campioni al sequenziamento, i prodotti di PCR, sono stati purificati con il “Charge switch PCR purification kit” (Invitrogen). Tale kit permette di eliminare i primers non utilizzati ed i sali che potrebbero disturbare la reazione di sequenza, sfruttando la capacità del DNA di legarsi a delle biglie magnetiche. Tramite il sistema Magna Rack (Invitrogen), il DNA legato alle biglie viene “ripulito”, mediante una serie di soluzioni, dalle sostanze interferenti e poi eluito in TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8).

Per il sequenziamento ci siamo appoggiati a diversi servizi commerciali a questo dedicati disponibili oggi sul mercato (GENELAB, Roma, Italia; SharDNA, Piscinna Manna (Ca), Italia; BIOFAB Research, Roma, Italia). Ogni campione è stato sequenziato in entrambe le direzioni.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti in banca dati tramite il programma BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) per avere conferma dell’amplificazione del frammento di interesse; analizzate singolarmente (frammento *forward* e *reverse*) con il software FinchTV (Geospiza, Seattle, USA), per valutare l’attendibilità delle singole sostituzioni presenti; confrontate ed allineate tra loro tramite il software ClustalW (<http://www.align.genome.jp/>) e BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) Tom Hall Ibis Biosciences,

Carlsbad, USA) con il quale si è effettuata anche la traduzione “in silico” rispettando il *frame* di lettura (*frame 2* per esone 6; *frame 3* per esone 3) e la ricerca degli enzimi di restrizione.

Una volta trovate delle sostituzioni che potevano essere individuate anche con l'uso di endonucleasi di restrizione tutti i campioni sono stati sottoposti a digestione enzimatica.

### **Tecnica RFLP**

La tecnica RFLP (Restriction fragment length polymorphism) richiede l'utilizzo di enzimi di restrizione (o endonucleasi di restrizione) in grado di digerire il DNA in corrispondenza di siti specifici (siti di restrizione).

Questi tratti sono costituiti nella maggior parte dei casi da un numero pari di basi (4, 6, 8) di norma palindromi leggibili in direzione 5'→3' e 3'→5'. Se una sequenza viene modificata a causa di una mutazione, cambia il sito di taglio di un enzima di restrizione. Tale sito non verrà più riconosciuto dall'enzima ed i soggetti mutati potranno essere distinti da quelli non mutati. Facendo correre i frammenti di DNA ottenuti dopo digestione del prodotto di PCR su gel di agarosio o su gel di poliacrilammide, nel caso le differenze tra i frammenti siano di poche paia di basi, questi, migrando in base alla loro lunghezza, daranno profili diversi (le eventuali mutazioni produrranno una differenza nel numero e nelle dimensioni dei frammenti) (Fig. 12, 13, 14).

La variabilità potrà essere registrata in base alla lunghezza dei frammenti o alla presenza/assenza del sito di restrizione. Nella nostra ricerca sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione *SfcI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) per confermare la sostituzione trovata tramite tecnica SSCP, in posizione 92 C>T, nel



terzo esone in *Capra hircus* e distinguere gli omozigoti TT dagli eterozigoti CT (Fig. 12). Nel sesto esone nella regione codificante sono state utilizzate le endonucleasi *MlyI* (New England Biolabs) per confermare la sostituzione in posizione 17 G>T individuata tramite tecnica SSCP (Fig. 13) e *DdeI* (New England Biolabs) (Lan et al., 2007 b, c) per identificare la sostituzione T>G in posizione 58 (Fig. 14).

Esone 3 92 C>T:

***SfcI***

5'...C<sup>▼</sup>TRYAG...3'  
3'...GAYRT<sup>▲</sup>C...5'

Esone 6 17 G>T:

***MlyI***

5'...GAGTC(N)<sub>5</sub><sup>▼</sup>...3'  
3'...CTCAG(N)<sub>5</sub><sup>▲</sup>...5'

Esone 6 58 T>G:

***DdeI***

5'...C<sup>▼</sup>TNAG...3'  
3'...GANT<sup>▲</sup>C...5'

## SfcI

5'...C<sup>▼</sup>TRYAG...3'  
3'...GAYRT<sup>▲</sup>C...5'

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05) Restriction Mapping Utility  
(c)1998, Tom Hall

334 Sa Forrew exon 3 Restriction Map  
21/09/2009 18.10.59  
295 base pairs **TT**  
Translations: none

Restriction Enzyme Map:

```
1      GAGGGATAATTACAAATGGTCCTTTCTTGTGTTACAGGGAGCTTAACCCCTTGTCTTTATAAGTTTCTGACCACACG
80     CTCCCTATTAATGTTTACCAGGAAAAGAACAACAATGTCCCTCGAATTGGGGAACAGAAATATTCAAAGGACTGGTGTGC

81     CTGAGTCATGGTTTTCTCCCATGCATCAGCCTCTCCTTTACAGAGGATCCTACAGCCGCTGATTTCAAGCAGGAGCTCAG
160    GACTCAGTACCAAAAAGGAGGTACGTAGTCGGAGAGGAAAATCCTTAGGATGTCGGCGACTAAAGTTCGTCTCCTCAGTC
                                           ▲
                                           SfcI
                                           ▼

161    GCGGAAAAGCAAATTGATCGAAGAGCCAATAGACATGGATTCTCAGAAATCCGAGAACTTGAAAAGTTTGCCAATGAGT
240    CGCCTTTTCTGTTTAACTAGCTTCTCGGTTATCTGTACCTAAGAGGTCCTTAGGCTCTTGAACTTTTCAAACGGTTACTCA

241    TTAAAGTCGAGAAGAATTAAGCTAGGTAGGTGCTTGTTAACAGCTGTGGGACACAC 295
295    AATTTCACTCTTCTTAATTCGATCCATCCACGAACAATGTGCGACACCCTGTGTG
```

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
SfcI	C'TryA_G	1	131

### dimensione dei frammenti

CC	CT	TT
295 bp	295 Bp	
	164 bp	164 bp
	131 bp	131 bp

**Figura 12.** Mappa di restrizione per la mutazione in posizione 92 C>T ottenuta tramite il software BioEdit.

Una quantità pari a 5  $\mu$ l dell'amplicone dell'esone 3 del gene POU1F1 veniva sottoposta a digestione enzimatica secondo le condizioni indicate in tabella 4.

**Tabella 4.** Condizione di digestione mediante l'enzima *SfcI* per l'individuazione della mutazione in posizione 92 C>T 3° esone.

<b>DNA amplicone</b>	5 $\mu$ l
<b>Buffer 1X</b>	NeBuffer 4: 50 mM acetato di potassio 20mM tris acetato 50 mM acetato di potassio 1mM DDT.
<b>BSA 1X</b>	0,3 $\mu$ l
<b>Endonucleasi <i>SfcI</i></b>	5U(10000U/ml) 0,5 $\mu$ l
<b>Volume finale</b>	30 $\mu$ l
<b>Tempo di digestione</b>	2 h a 37 C° in bagnetto termostato

20  $\mu$ l del prodotto di digestione, venivano sottoposti ad elettroforesi in gel al 2% di agarosio con le seguenti condizioni di corsa:

- $\Delta V$   $\rightarrow$ 100;
- Tempo di corsa  $\rightarrow$ 1h
- Buffer  $\rightarrow$  TAE 1X
- colorazione con bromuro d'etidio (0,5mg/ml).
- Visualizzazione delle bande al transilluminatore

# MlyI

5'...GAGTC(N)<sub>5</sub>'...3'  
 3'...CTCAG(N)<sub>5</sub>'...5'

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05) Restriction Mapping Utility  
 (c)1998, Tom Hall

426 S Restriction Map **TT**  
 27/09/2009 12.23.27  
 376 base pairs  
 Translations: none

5'...GAGTC(N)<sub>5</sub>'...3'  
 3'...CTCAG(N)<sub>5</sub>'...5'

Restriction Enzyme Map:

```

1      CTTCTTTCTGCCAACTCCCCACCTCCCAGTATTGCTGCTAAAGACTCCCTGGAGAGACACTTTGGAGAACAGAATAAGC 80
      GAAGAAAGGACGGTTGAGGGTGGAGGCTATAACGACGATTTCTGAGGGACCTCTCTGTGAAACCTCTTGCTTTATTCG

81      CTTCTCTCAGGAGATCCTGAGGATGGCTGAAGAACAACCTGGAGAAAGAAGTGGTGGGGTTTGGTTTTGTAACCGA 160
      GAAGGAGAGTCTCTAGGACTCCTACCGACTTCTTGATTTGGACCTCTTCTTCCACCCTCCCAAACCAAAACATTGGCT

161     AGACAGAGAGAAAAACGGTGAAAACAAACCTGAATCAGAGTTTATTTCCTATCTCTAAGGAGCATCTTGAATGCAGATA 240
      TCTGTCTCTCTTTTGGCCACTTTTGTTCGGACTTAGTCTCAAATAAAGGATAGAGATTCTCTGTAGAACTTACGTCTAT

241     GGTCTCCCATTTGTGTAATAGCGAGTTTTCTGCTTTTCTTTCCCTTCTTCTCCAGCCAAAGTAGAAATCAGTTATTTG 320
      CCAGAGGGTAACAATTATCGCTCAAAAAGACGAAAAGAAAGGGAAAGAGAAAGGGTCGGTTTCATCTTTAGTCAATAAAC

321     GTTAGCTTCAAACGTCACATCAGTAATGTTTGCAGAAAGTGTTCCTTCTTCTACTTT
      CAATCGAAGGTTTGCAGTGTAGTCATTACAAAACGCTTTCACAAAAGAGAAGATGAAA 376
  
```

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
MlyI	GAGTCnmmn'	1	39

### dimensione frammenti

<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>
376 bp	376 bp	
	337 bp	337 bp

**Figura 13** Mappa di restrizione per la mutazione in posizione 17 G>T ottenuta tramite il software BioEdit.

Una quantità pari a 20µl dell'amplicone dell'esone 6 del gene POU1F1 veniva sottoposta a digestione enzimatica secondo le condizioni indicate in tabella 5.

**Tabella 5.** Condizioni di digestione mediante l'enzima *MlyI* per l'individuazione della mutazione in posizione 17 G>T 6° esone.

<b>DNA amplicone</b>	20 µl
<b>Buffer 1X</b>	NeBuffer 4 50 mM acetato di potassio 20mM tris acetato 10mM acetato di magnesio 1mM DDT
<b>BSA 1X</b>	0,3 µl
<b>Endonucleasi <i>MlyI</i></b>	3 U(10000U/ml) 0,3 µl
<b>Volume finale</b>	30 µl
<b>Tempo di digestione</b>	2 h a 37 C° in bagnetto termostato

20 µl del prodotto di digestione, venivano sottoposti ad elettroforesi in gel al 3% di agarosio con le seguenti condizioni di corsa:

- $\Delta V$  →60;
- Tempo di corsa →4h
- Buffer → TAE 1X
- colorazione con bromuro d'etidio (0,5mg/ml).
- Visualizzazione delle bande al transilluminatore

E' stato utilizzato l'enzima *DdeI* per identificare un SNP nella regione codificante dell'esone 6 in *Capra hircus* presente in posizione 58.

**DdeI**

5'... C<sup>T</sup> n A<sub>G</sub> ... 3'  
 3'... G<sub>A</sub> n T<sub>C</sub> ... 5'

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05) Restriction Mapping Utility  
 (c)1998, Tom Hall

409 santadi Restriction Map  
 22/07/2009 17.25.27 **TT**  
 376 base pairs  
 Translations: none

Restriction Enzyme Map:

```

1      CTTCTTCTCGCCAACCTCCACCTCCAGTATTGCTGCTAAAGACGCCCTGGAGAGACACTTTGGAGAACAGAATAAGC
80     GAAGAAAGGACGGTTGAGGGGTGGAGGGTCATAACGACGATTCTGCGGGACCTCTCTGTGAAACCTTTGTCTTATTCCG

81     CTTCTCTCAGGAGATCCTGAGGATGGCTGAAGAATAAACCTGGAGAAAAGAGTGGTGGGGTTTGGTTTGTAAACCGA
160    GAAGGAGAGTCTCTTAGGACTCTACCGACTTCTTGATTTGGACCTCTTCTCTACCCTCCAAAACCAAAACATTGGCT
           DdeI      DdeI

161    AGACAGAGAGAAAAACGGGTGAAAAACAAGCCTGAATCAGAGTTTATTTCCTATCTCTAAGGAGCATCTTGAATGCAGATA
240    TCTGTCTCTCTTTTGGCCACTTTTGTTCGGACTTAGTCTCAAATAAAGGATAGAGATTCCTCGTAGAACCTTACGTCTAT
                                           DdeI

241    GGTCTCCATTGTGTAATAGCGAGITTTTCTGCTTTTCTTTCCCTTCTCTCTCAGC CAAAGTAGAAATCAGTTATTGG
320    CCAGAGGGTAACACATTATCGCTCAAAAAAGACGAAAAAGAAAGGGAAGAGAAGAGGTCTGTTTTCATCTTTAGTCAATAAAC

321    GTTAGCTTCCAAACGTACATCAGTAATGTTGCAGAAAGTGTCTTCTTCTACTTTT 376
321    CAATCGAAGGTTTGCAGTGTAGTCATTACAAACGTCTTCACAAAGAGAAGATGAAA 376
  
```

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
DdeI	C <sup>T</sup> TnA <sub>G</sub>	3	88, 99, 217

<b>TT</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>
159 bp	159 bp	159 bp
118 bp	118bp	118 bp
	99 bp	99 bp
88 bp	88 bp	

**Figura 14.** Mappa di restrizione per la mutazione in posizione 58 T>G ottenuta tramite il software BioEdit.

Una quantità pari a 20µl dell'amplicone dell'esone 6 del gene POU1F1 veniva sottoposta a digestione enzimatica secondo le condizioni indicate in tabella 6:

**Tabella 6.** Condizioni di digestione mediante l'enzima *DdeI* per l'individuazione della mutazione in posizione 58 T>G 6° esone.

<b>DNA amplicone</b>	20 µl
<b>Buffer 1X</b>	NEBuffer 3 50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10mM MgCl <sub>2</sub> 1mM DDT.
<b>BSA 1X</b>	0,3 µl
<b>Endonucleasi <i>DdeI</i></b>	3 U(10000U/ml) 0,3 µl
<b>Volume finale</b>	30 µl
<b>Tempo di digestione</b>	2 h a 37 C° in bagnetto termostato

Il prodotto di digestione è stato sottoposto a corsa elettroforetica verticale (PAGE) in gel di acrilammide al 15% (29:1); infatti il gel di acrilammide, grazie a delle maglie più strette rispetto al gel di agarosio, consente la separazione di frammenti con differenze anche piccole nella lunghezza come quelle dei prodotti di digestione in questione i quali differivano di 11bp.

A 5 µl di prodotto digerito venivano aggiunti 3 µl di loading buffer 6X di cui 5 µl venivano caricati su gel.

Le condizioni di corsa applicate per erano le seguenti:

- $\Delta V$  →80;
- Tempo di corsa →4h
- Buffer → TBE 1X
- colorazione con Syber gold 1x (15min)
- Visualizzazione delle bande al transilluminatore

La ripetizione delle corse SSCP, caricando il gel in maniera tale che i campioni uguali fossero caricati vicini tra loro e ad un campione sequenziato caratterizzato da un determinato profilo, ci ha permesso di attribuire il genotipo in base al profilo elettroforetico. Tutte le altre sostituzioni nucleotidiche sono state quindi individuate mediante tecnica SSCP associata al sequenziamento di diversi campioni che mostravano profili uguali.

Le frequenze genotipiche ed alleliche nelle popolazioni analizzate sono state calcolate ed analizzate con il software GENEPOP (Raymond M. e Rousset F. 1995) applicando il test Chi-quadro per la valutazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite il software Minitab (Minitab Inc., State College, USA), test ANOVA, per valutare se le produzioni di latte raccolte durante un anno di produzione, la composizione in proteine ed in grasso del latte fossero associati con gli SNPs trovati.

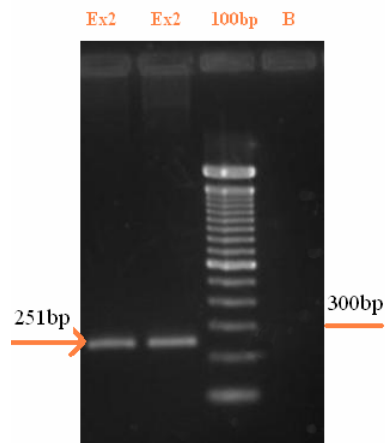


## 4.RISULTATI

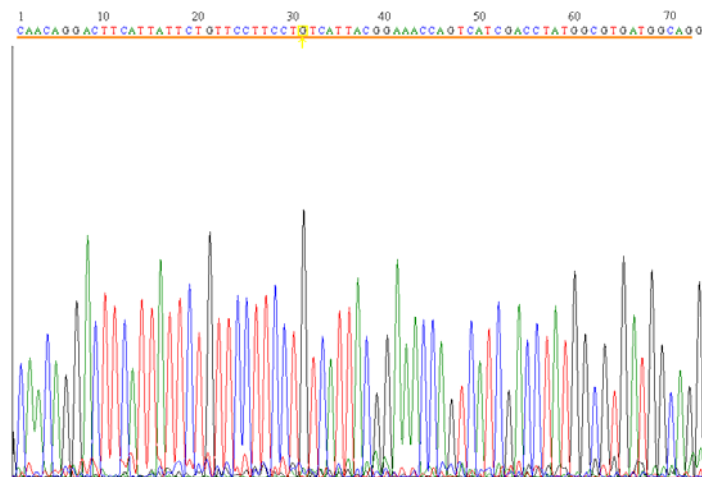
### *Ovis aries*

#### SECONDO ESONE

Dall'amplificazione del 2° esone, del gene POU1F1 è stato ottenuto un amplicone di 251bp corrispondente, come lunghezza, al frammento atteso (Fig.15)



**Figura 15.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 251 bp ottenuto tramite PCR.



**Figura16.** Elettroferogramma del 2° esone *Ovis aries*, razza Sarda, ottenuto tramite sequenziamento. In colore arancione è sottolineata la sequenza codificante, nel quadratino giallo è racchiuso il nucleotide che risultava mutato nella razza portoghese.

## Appaiamento con BLAST del campione sequenziato:

```
>  emb|AJ549205.2|  Ovis aries pit1 gene, exon 2
Length=1303

GENE ID: 443370 POU1F1 | POU class 1 homeobox 1 [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 464 bits (251), Expect = 9e-128
Identities = 251/251 (100%), Gaps = 0/251 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAAACGAATGTGTCTTGAATCCTCATAACATTTCTTACCAGTCCCGTCTATTTTGTCTTT 60
      |
Sbjct 341 GAAACGAATGTGTCTTGAATCCTCATAACATTTCTTACCAGTCCCGTCTATTTTGTCTTT 400

Query 61 GATCCAAACTCCTAAATGTTTGTGCACATGTTTTGTGGTGGCAACATGGGAAACGCAGC 120
      |
Sbjct 401 GATCCAAACTCCTAAATGTTTGTGCACATGTTTTGTGGTGGCAACATGGGAAACGCAGC 460

Query 121 AACAGGACTTCATTATTCTGTTCCTTCCTGTCATTACGGAAACAGTCATCGACCTATGG 180
      |
Sbjct 461 AACAGGACTTCATTATTCTGTTCCTTCCTGTCATTACGGAAACAGTCATCGACCTATGG 520

Query 181 CGTGATGGCAGGTAAGAAAAATGTCTTTACATGTAA GATTGAGTTTGGGGACGCTTGA 240
      |
Sbjct 521 CGTGATGGCAGGTAAGAAAAATGTCTTTACATGTAA GATTGAGTTTGGGGACGCTTGA 580

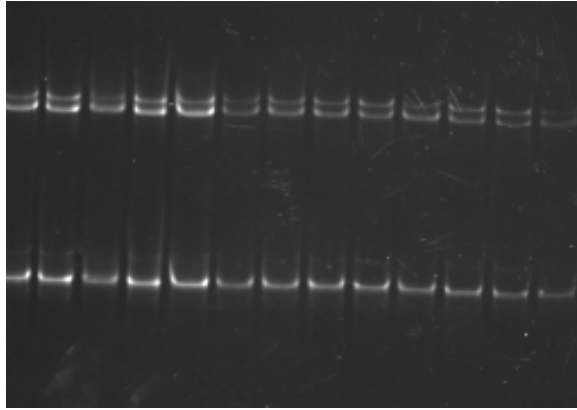
Query 241 TGCATTTTCTG 251
      |
Sbjct 581 TGCATTTTCTG 591
```

**Figura 17.** Appaiamento della sequenza codificante del 2° esone con le sequenze presenti in banca dati.

Il sequenziamento, in entrambe le direzioni (Fig. 16), dell'amplicone ottenuto tramite PCR, ha confermato la corrispondenza del frammento amplificato con la regione che si voleva investigare, esone 2 (Fig. 17).

Gli ampliconi di 251 bp appartenenti a due allevamenti di *Ovis aries*, razza Sarda, hanno mostrato tutti identico pattern elettroforetico all'analisi SSCP indicando assenza di polimorfismo per questo esone.

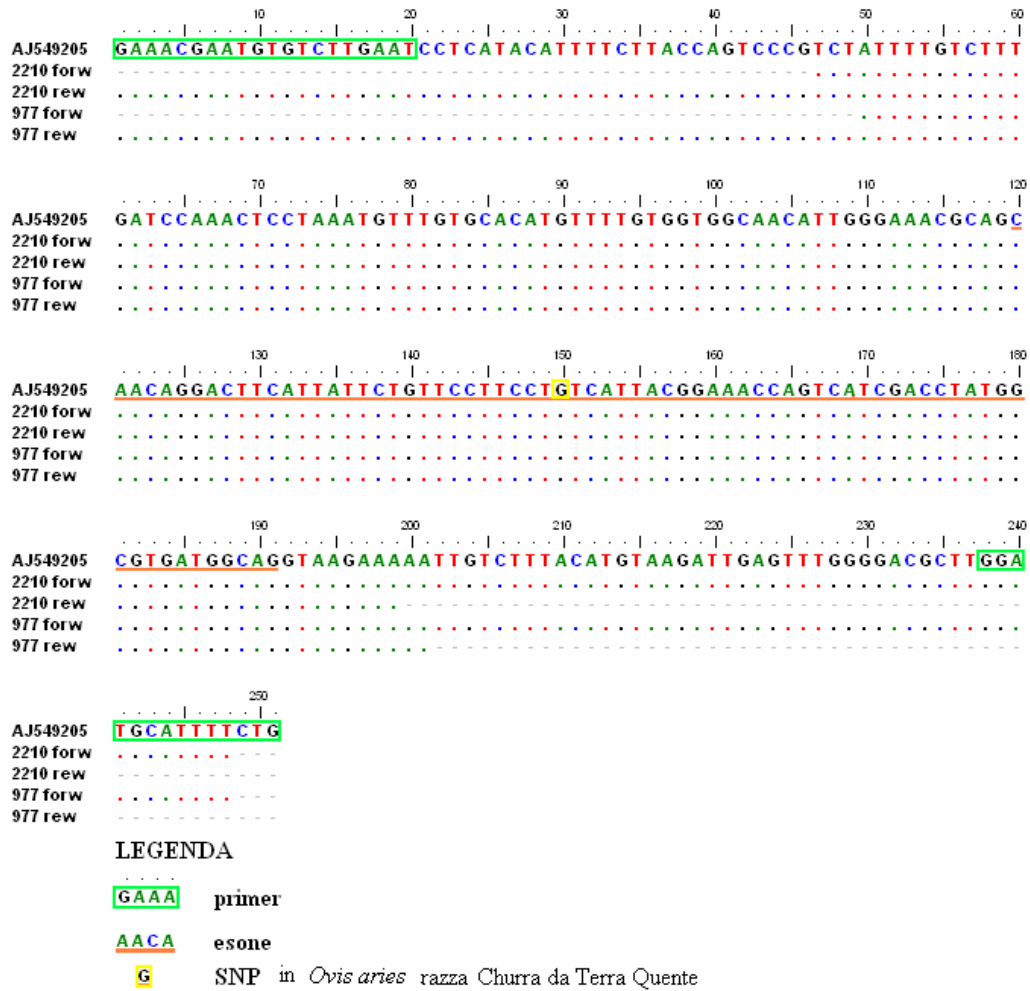
I risultati ottenuti dall'analisi SSCP del secondo esone del gene POU1F1 di 140 campioni appartenenti alla razza Sarda di *Ovis aries* sono mostrati in Fig. 18.



**Figura 18.** SSCP in gel di poliacrilamide 8% e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 2° esone del gene POU1F1 in *Ovis aries*.

Il sequenziamento e l'allineamento di alcuni campioni con la sequenza presente in banca dati relativa al 2° esone della razza Churra da Terra Quente, ha mostrato la perfetta sovrapposizione della sequenza codificante, l'esone 2 della razza Sarda, con quella portoghese non mutata (Fig. 19).

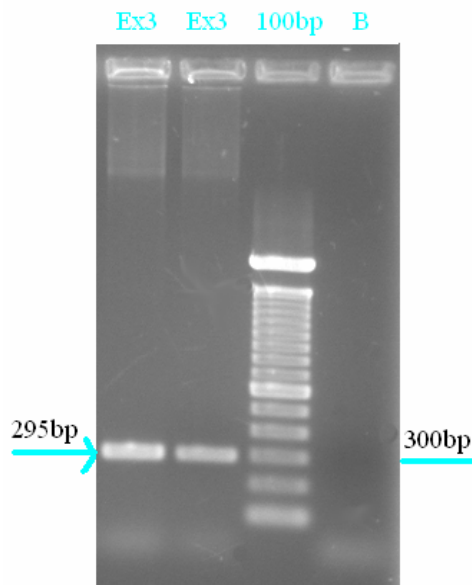
Allineamento delle sequenze dei campioni di *Ovis aries* con quelle della razza portoghese:



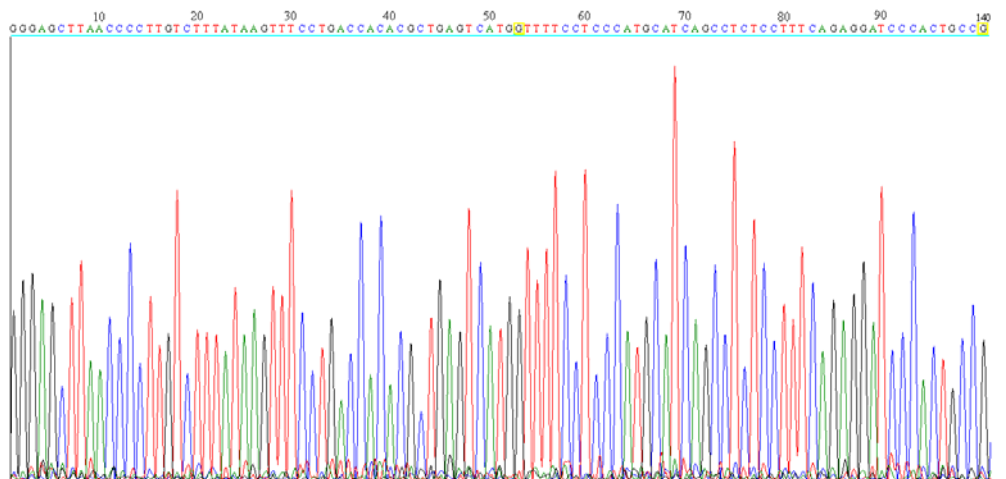
**Figura 19.** Allineamento delle sequenze relative al 2° esone di due campioni di razza Sarda appartenenti ai due diversi allevamenti con la sequenza corrispondente della razza portoghese.

## TERZO ESONE

L'amplificazione del terzo esone ha prodotto un frammento di 295 bp (Fig. 20)



**Figura 20.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 295 bp ottenuto tramite PCR.



**Figura 21.** Elettroferogramma del 3° esone *Ovis aries*, razza Sarda ottenuto tramite sequenziamento. In colore celeste è sottolineata la sequenza codificante, nei quadratini gialli sono racchiusi i nucleotidi che risultavano mutati nella razza portoghese.

## Appaiamento con BLAST del campione sequenziato:

```
>  emb|AJ549206.1|  Ovis aries pit1 gene, exon 3
Length=1285

GENE ID: 443370 POU1F1 | POU class 1 homeobox 1 [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 545 bits (295), Expect = 4e-152
Identities = 295/295 (100%), Gaps = 0/295 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAGGGATAATTACAAATGGTCCTTTTCTTGTGTTACAGGGAGCTTAACCCCTTGTCTTT 60
      |||
Sbjct 602 GAGGGATAATTACAAATGGTCCTTTTCTTGTGTTACAGGGAGCTTAACCCCTTGTCTTT 661

Query 61 ATAAGTTTCCTGACCACACGCTGAGTCATGGTTTTTCCATGCCATCAGCCTCTCCTTT 120
      |||
Sbjct 662 ATAAGTTTCCTGACCACACGCTGAGTCATGGTTTTTCCATGCCATCAGCCTCTCCTTT 721

Query 121 CAGAGGATCCCACTGCCGCTGATTTCAAGCAGGAGCTCAGGCGGAAAAGCAAATTGATTG 180
      |||
Sbjct 722 CAGAGGATCCCACTGCCGCTGATTTCAAGCAGGAGCTCAGGCGGAAAAGCAAATTGATTG 781

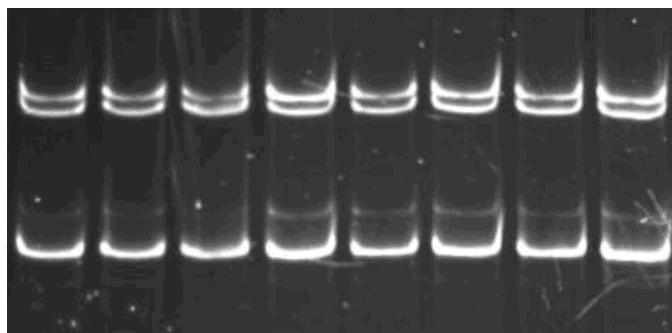
Query 181 AAGAGCCAATAGACATGGATTCTCCAGAAATTCGAGAACTTGAAAAGTTTGCCAATGAGT 240
      |||
Sbjct 782 AAGAGCCAATAGACATGGATTCTCCAGAAATTCGAGAACTTGAAAAGTTTGCCAATGAGT 841

Query 241 TTAAGTGAGAAGAATTAAGCTAGGTAGGTGCTTGTTAACAGCTGTGGGACACAC 295
      |||
Sbjct 842 TTAAGTGAGAAGAATTAAGCTAGGTAGGTGCTTGTTAACAGCTGTGGGACACAC 896
```

**Figura 22.** Appaiamento della sequenza codificante del 3° esone con le sequenze presenti in banca dati.

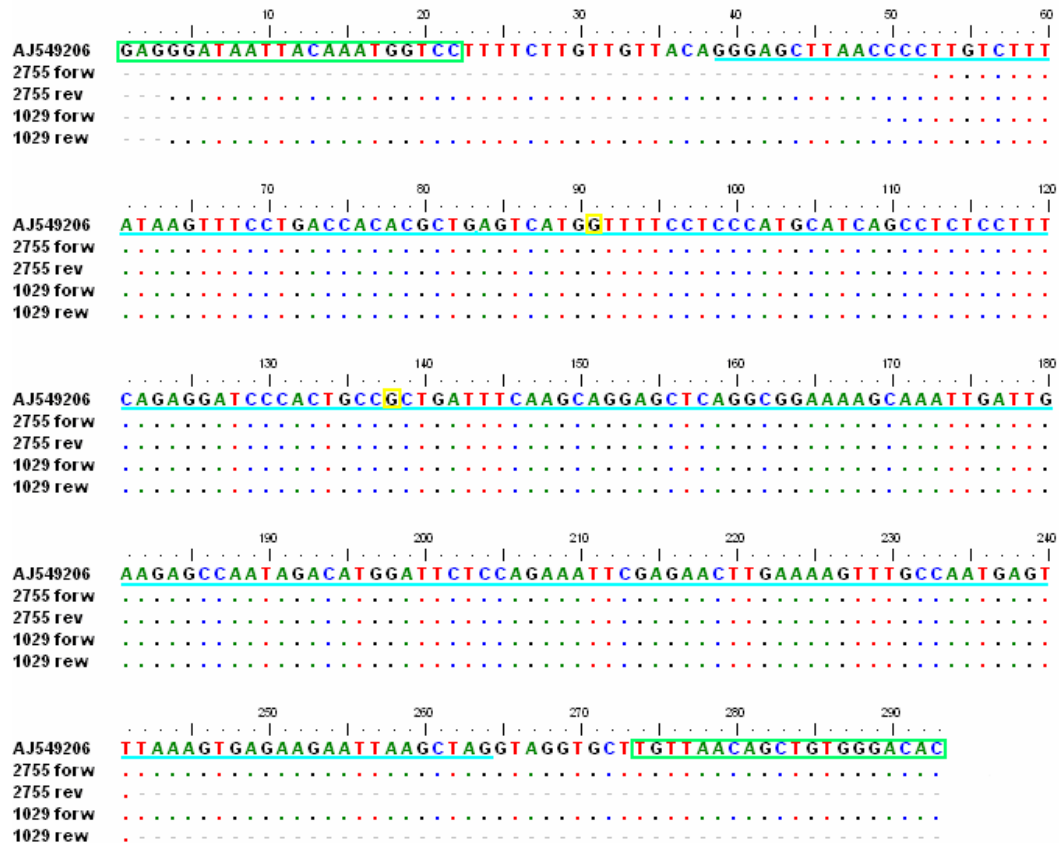
Il sequenziamento di alcuni campioni ha confermato la corrispondenza con la regione di riferimento (Fig. 21, 22).

L'analisi SSCP dei 140 campioni non ha mostrato anche in questo caso differenze nel profilo elettroforetico anche utilizzando differenti condizioni di corsa (Fig. 23).



**Figura 23.** SSCP in gel di poliacrilamide 10% e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 3° esone del gene POU1F1 in *Ovis aries*.

L'intera sequenza codificante del terzo esone della razza Sarda si sovrappone perfettamente con quella portoghese non mutata (Fig. 24):



#### LEGENDA

**GAGG** primer

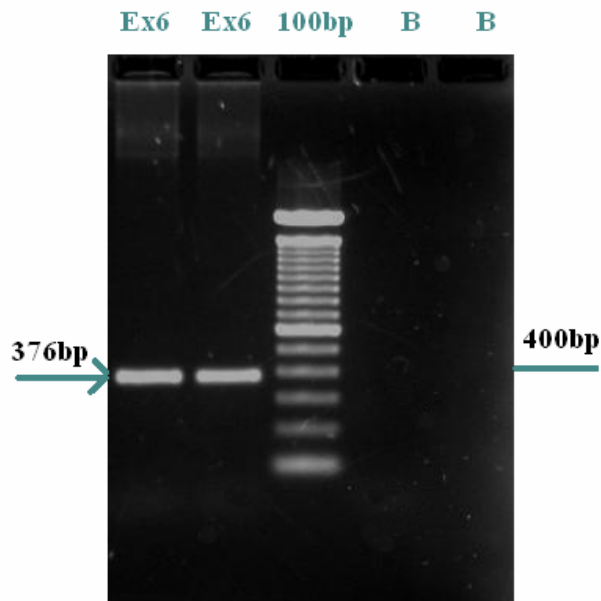
**GGGA** esone

**G** SNP in *Ovis aries* razza Churra da Terra Quente

**Figura 24.** Allineamento delle sequenze relative al 3° esone di due campioni di razza Sarda appartenenti ai due diversi allevamenti con la sequenza corrispondente della razza portoghese.

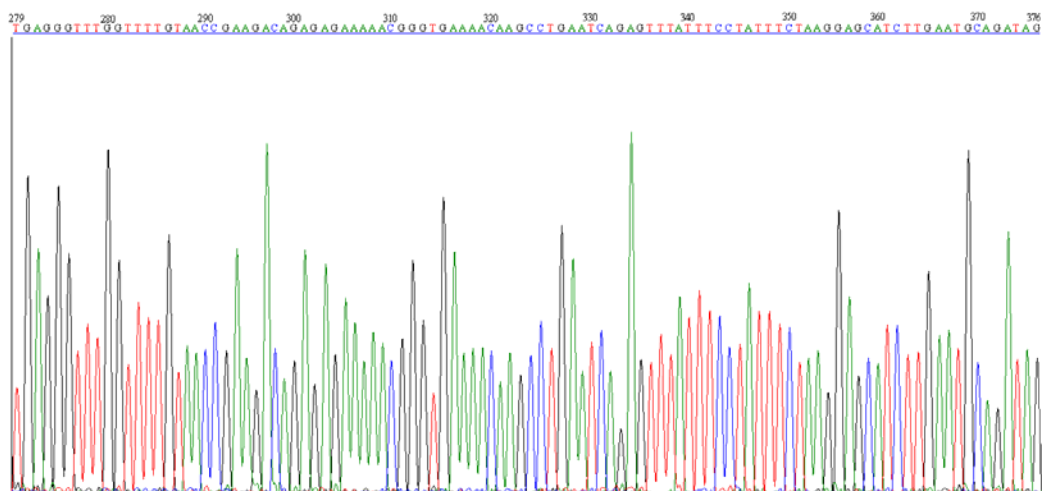
## SESTO ESONE

Un amplicone di 376 bp è stato ottenuto dall'amplificazione del sesto esone (Fig. 25).



**Figura 25.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 376 bp ottenuto tramite PCR.

Il sequenziamento di alcuni campioni ha confermato la corrispondenza con la regione di riferimento (Fig. 26, 27).



**Figura 26.** Elettroferogramma del 6° esone *Ovis aries*, razza Sarda ottenuto tramite sequenziamento. In colore blu è sottolineata parte della sequenza codificante (regione terminale dell'esone).



Appaiamento con BLAST del campione sequenziato:

```

>| emb|AJ549207.1| G Ovis aries pit1 gene, exons 4-6
Length=2962

GENE ID: 443370 POU1F1 | POU class 1 homeobox 1 [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 603 bits (326), Expect = 2e-169
Identities = 326/326 (100%), Gaps = 0/326 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GCCCTGGAGAGACACTTTGGAGAACAGAATAAGCCTTCCTCCTCAGGAGATCCTGAGGATG 6
            |
Sbjct 2506   GCCCTGGAGAGACACTTTGGAGAACAGAATAAGCCTTCCTCCTCAGGAGATCCTGAGGATG 2

Query 61     GCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAGAAGTGGTGAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGACAG 1
            |
Sbjct 2566   GCTGAAGAACTAAACCTGGAGAAAGAAGTGGTGAGGGTTTGGTTTTGTAACCGAAGACAG 2

Query 121    AGAGAAAAACGGGTGAAAAACAAGCCTGAATCAGAGTTTATTTCCCTATTTCTAAGGAGCAT 1
            |
Sbjct 2626   AGAGAAAAACGGGTGAAAAACAAGCCTGAATCAGAGTTTATTTCCCTATTTCTAAGGAGCAT 2

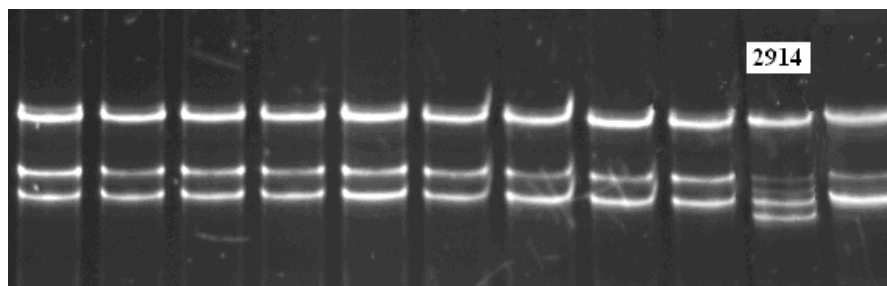
Query 181    CTTGAATGCAGATAGGTCTCCCGTTGTGTAAACAGCGAGCTTTTCTGCTTTCATTCCTTT 2
            |
Sbjct 2686   CTTGAATGCAGATAGGTCTCCCGTTGTGTAAACAGCGAGCTTTTCTGCTTTCATTCCTTT 2

Query 241    CCCTTCTCCAGCCAAAAGTAGAAATCAGTTATTTGGTTAGCTTCCAAACGTCACATCAGTA 3
            |
Sbjct 2746   CCCTTCTCCAGCCAAAAGTAGAAATCAGTTATTTGGTTAGCTTCCAAACGTCACATCAGTA 2

Query 301    ATGTTTGCAAGTGTTCCTCTTCTA 326
            |
Sbjct 2806   ATGTTTGCAAGTGTTCCTCTTCTA 2831
    
```

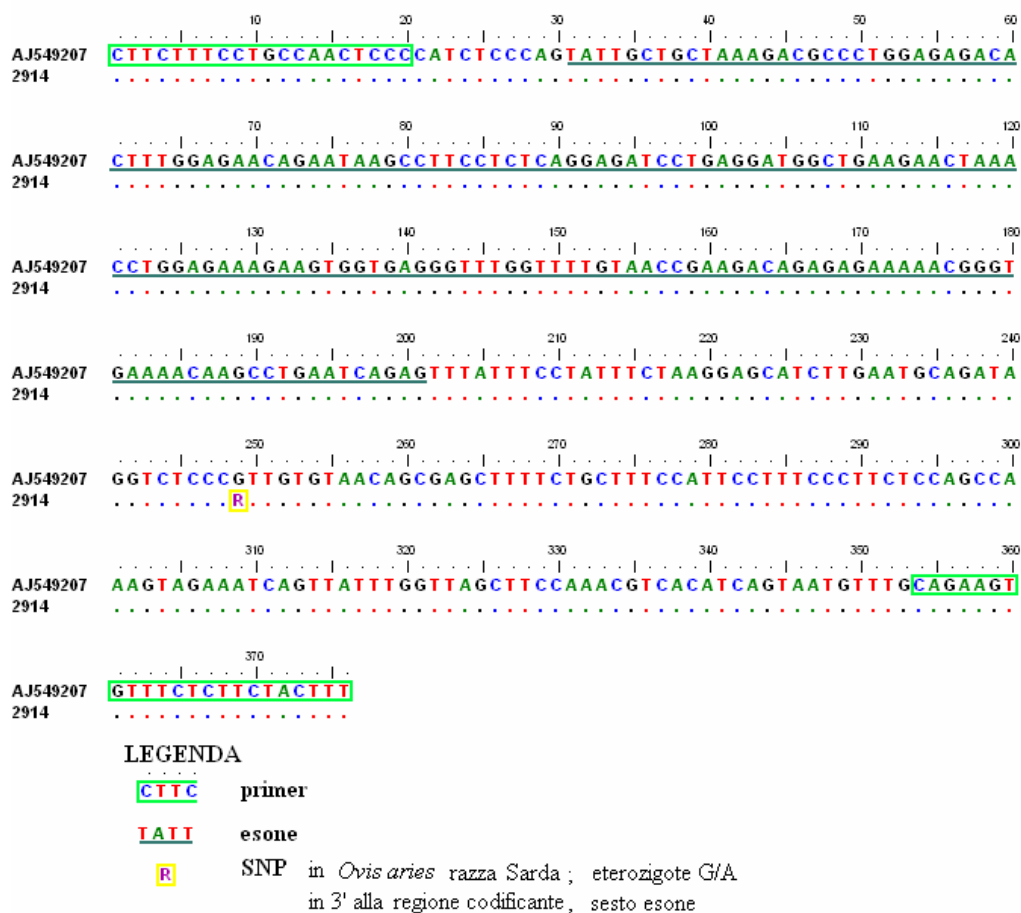
**Figura 27.** Appaiamento della sequenza codificante del 6° esone con le sequenze presenti in banca dati.

L'analisi SSCP dei 140 campioni ha mostrato in questo caso un unico campione con profilo differente dagli altri (Fig. 28).

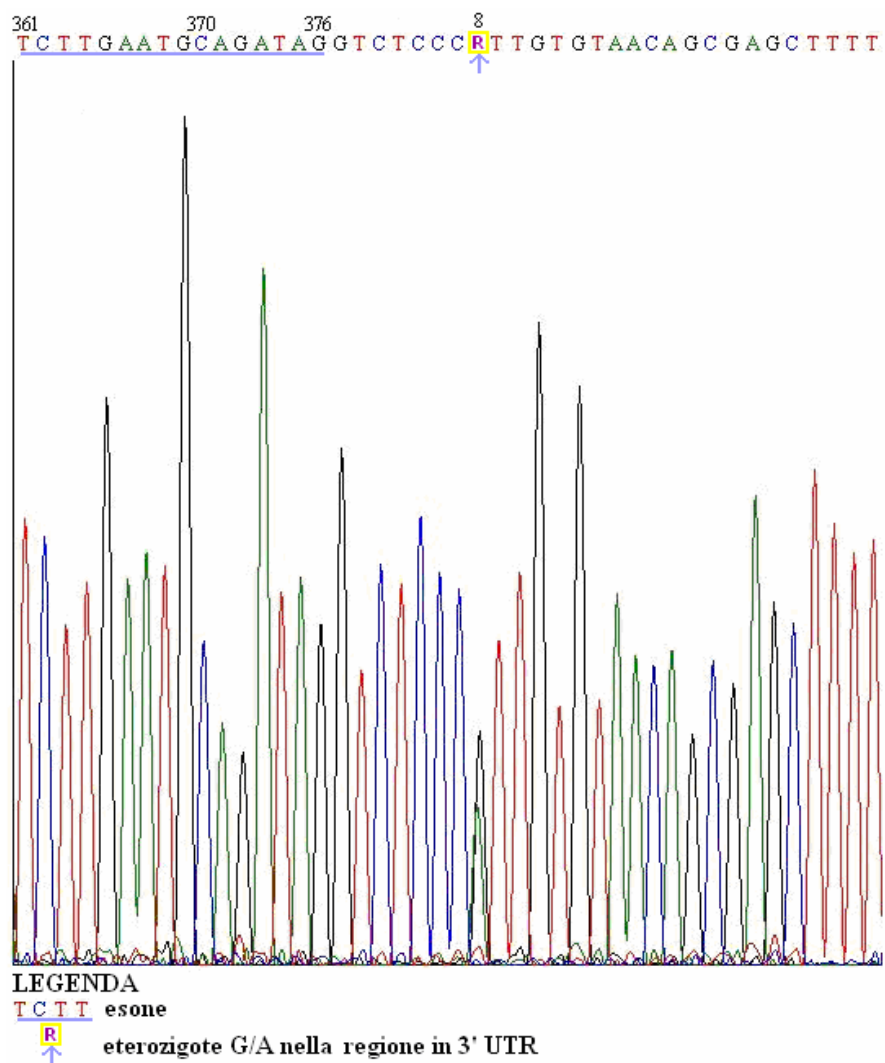


**Figura 28.** SSCP in gel di poliacrilamide 12% e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 6° esone del gene POU1F1 in *Ovis aries*.

L'intera sequenza codificante dell'esone 6 della razza Sarda si sovrappone perfettamente a quella portoghese non mutata eccetto il caso di un unico campione (2914) che presenta nella regione 3'UTR una mutazione in eterozigosi G>A (Fig. 29, 30).



**Figura 29.** Allineamento della sequenza di razza Sarda mutata nella regione 3' UTR del 6° esone con la sequenza corrispondente della razza portoghese.

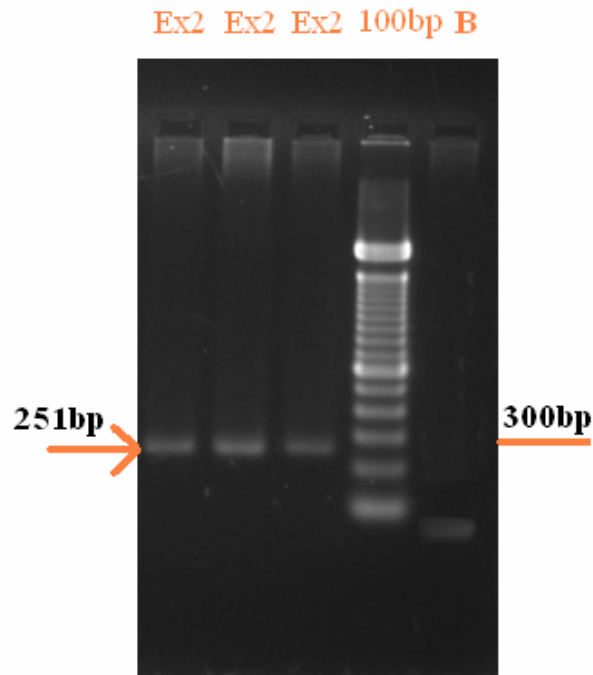


**Figura 30.** Elettroferogramma del campione 2914 mutato nella regione 3'UTR ottenuto tramite sequenziamento.

## *Capra hircus*:

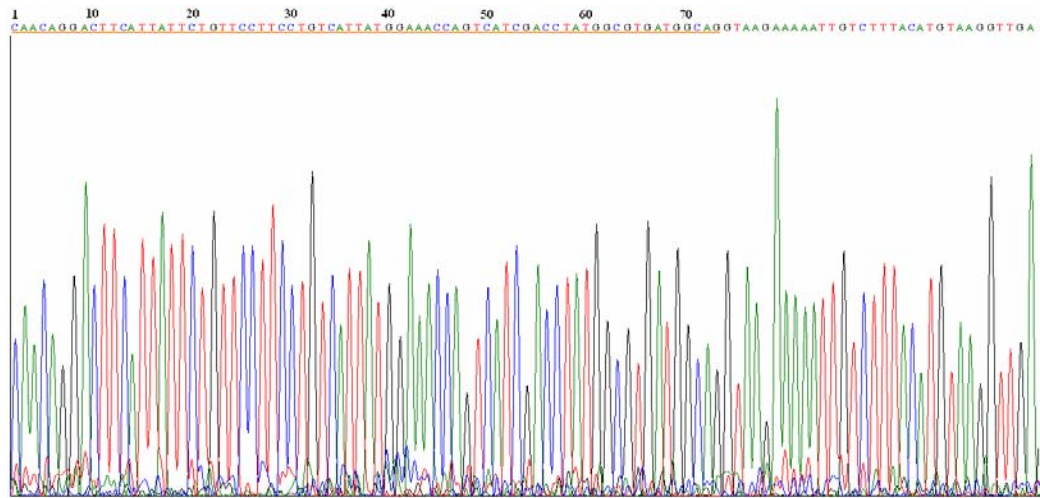
### SECONDO ESONE

Per quanto riguarda l'amplificazione del secondo esone, è stato ottenuto un amplicone di 251 bp corrispondente come lunghezza al frammento atteso (Fig. 31)




**Figura 31.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 251 bp ottenuto tramite PCR.

Il sequenziamento, in entrambe le direzioni, di un campione amplificato tramite PCR, ha confermato la corrispondenza del frammento amplificato con la regione che si voleva investigare, esone 2 (Fig. 32 33).



**Figura 32.** Elettroferogramma del 2° esone *Capra hircus*, razza Sarda ottenuto tramite sequenziamento.

Appaiamento con BLAST del campione sequenziato:

```
>  emb|AJ549205.2|  Ovis aries pit1 gene, exon 2
Length=1303

GENE ID: 443370 POU1F1 | POU class 1 homeobox 1 [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 348 bits (188), Expect = 7e-93
Identities = 194/197 (98%), Gaps = 0/197 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GTCTTTGATCCAAACTCCTAAATGTTTGTGCACATGTTTTGTGGTGGCAACATTGGGAAA 60
            |||
Sbjct 395    GTCTTTGATCCAAACTCCTAAATGTTTGTGCACATGTTTTGTGGTGGCAACATTGGGAAA 454

Query 61     CACAGCAACAGGACTTCATTATTCTGTTCCCTCCCTGTCATTATGGAAACCAAGTTCATCGAC 120
            |
Sbjct 455    CGCAGCAACAGGACTTCATTATTCTGTTCCCTCCCTGTCATTACGGAAACCAAGTTCATCGAC 514

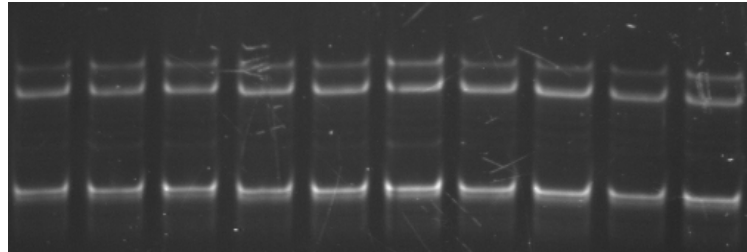
Query 121    CTATGGCGTGATGGCAGGTAAGAAAAATTGCTTTTACATGTAAGGTTGAGTTTGGGGACG 180
            |||
Sbjct 515    CTATGGCGTGATGGCAGGTAAGAAAAATTGCTTTTACATGTAAGATTGAGTTTGGGGACG 574

Query 181    CTTGGATGCATTTTCTG 197
            |||
Sbjct 575    CTTGGATGCATTTTCTG 591
```

**Figura 33.** Appaiamento della sequenza codificante del 2° esone con le sequenze presenti in banca dati.



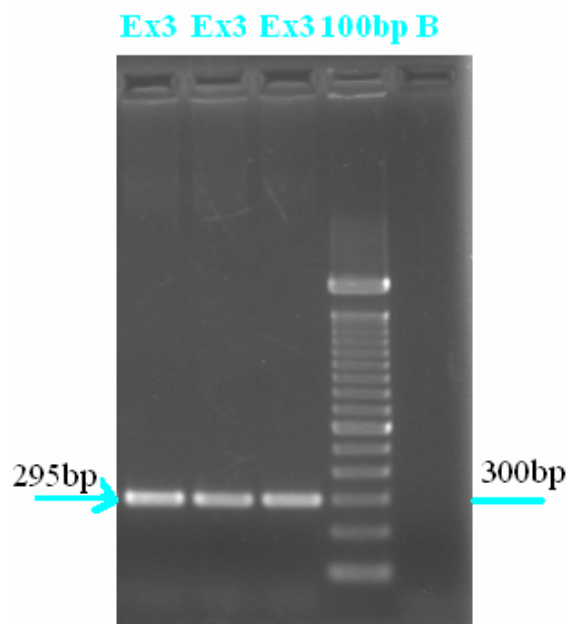
L'analisi SSCP dei 180 campioni non ha mostrato anche in questo caso differenze nei profili elettroforetici (Fig. 35) nonostante siano state utilizzate differenti condizioni di corsa.



**Figura 35.** SSCP in gel di poliacrilamide 8% e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 2° esone del gene POU1F1 in *Capra hircus*.

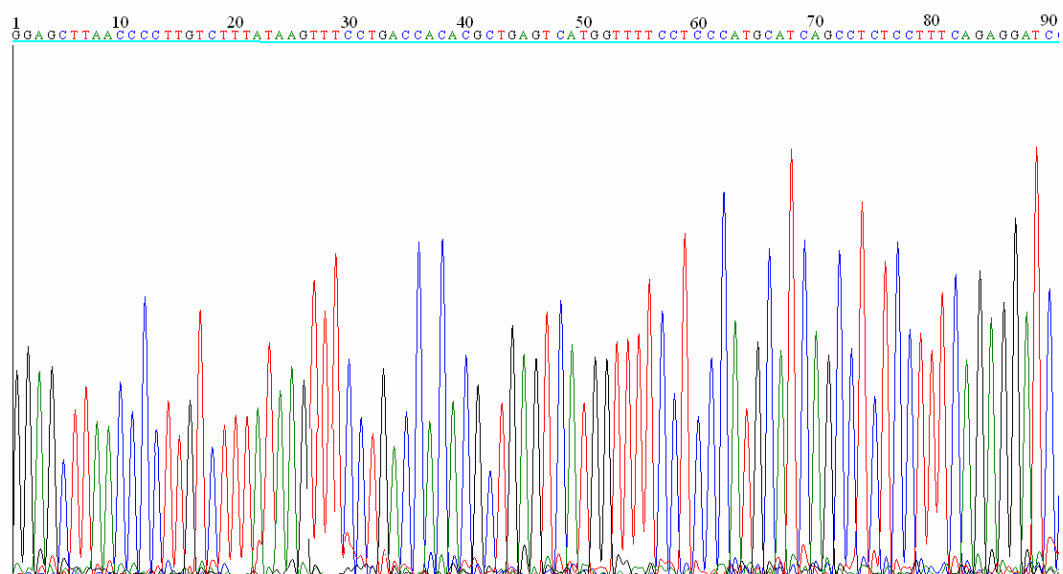
### TERZO ESONE

L'amplificazione del terzo esone ha prodotto un frammento di 295 bp (Fig. 36)



**Figura 36.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 295 bp ottenuto tramite PCR.

Il sequenziamento, in entrambe le direzioni, di un campione amplificato tramite PCR, ha confermato la corrispondenza dell'amplicone con la regione che si voleva investigare e cioè il 3° esone,(Fig. 37, 38).



**Figura 37.** Elettroferogramma dell'esone 3 *Capra hircus*, razza Sarda ottenuto tramite sequenziamento.

Appaiamento con BLAST del campione sequenziato:

```
>  emb|AJ549206.1 G Ovis aries pit1 gene, exon 3
Length=1285

GENE ID: 443370 POU1F1 | POU class 1 homeobox 1 [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 545 bits (295), Expect = 4e-152
Identities = 295/295 (100%), Gaps = 0/295 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAGGGATAATTACAAATGGTCCTTTCTTGTGTTACAGGGAGCTTAACCCCTTGTCTTT 60
      |||
Sbjct 602 GAGGGATAATTACAAATGGTCCTTTCTTGTGTTACAGGGAGCTTAACCCCTTGTCTTT 661

Query 61 ATAAGTTTCCTGACCACACGCTGAGTCATGGTTTTCC TCCCATGCATCAGCCTCTCCTTT 120
      |||
Sbjct 662 ATAAGTTTCCTGACCACACGCTGAGTCATGGTTTTCC TCCCATGCATCAGCCTCTCCTTT 721

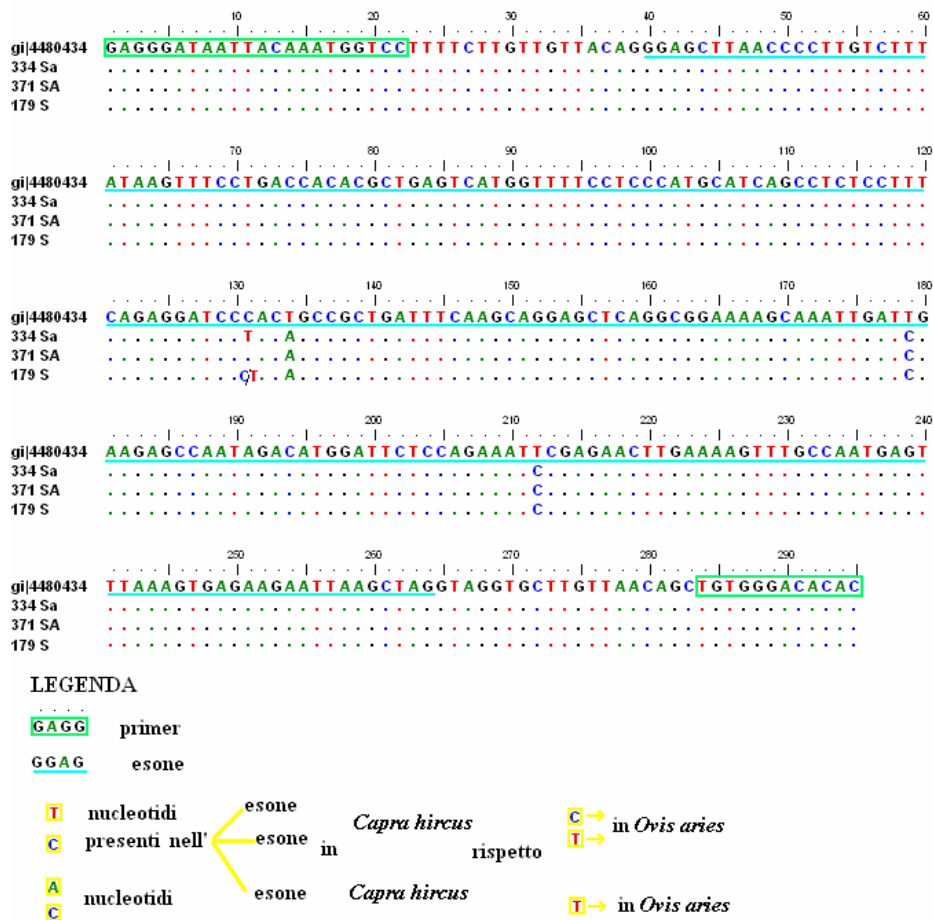
Query 121 CAGAGGATCCCACTGCC GCTGATTTC AAGCAGGAGCTCAGGCGGAAAAGCAAATTGATTG 180
      |||
Sbjct 722 CAGAGGATCCCACTGCC GCTGATTTC AAGCAGGAGCTCAGGCGGAAAAGCAAATTGATTG 781

Query 181 AAGAGCCAATAGACATG GATTCTCCAGAAATTCGAGAACTTGAAAAGTTTGCCAATGAGT 240
      |||
Sbjct 782 AAGAGCCAATAGACATG GATTCTCCAGAAATTCGAGAACTTGAAAAGTTTGCCAATGAGT 841

Query 241 TTAAAGTGAGAAGAATTAAGCTAGGTAGGTGCTTGTGTTAACAGCTGTGGGACACAC 295
      |||
Sbjct 842 TTAAAGTGAGAAGAATTAAGCTAGGTAGGTGCTTGTGTTAACAGCTGTGGGACACAC 896
```

**Figura 38.** Appaiamento della sequenza codificante del 3° esone con le sequenze presenti in banca dati.

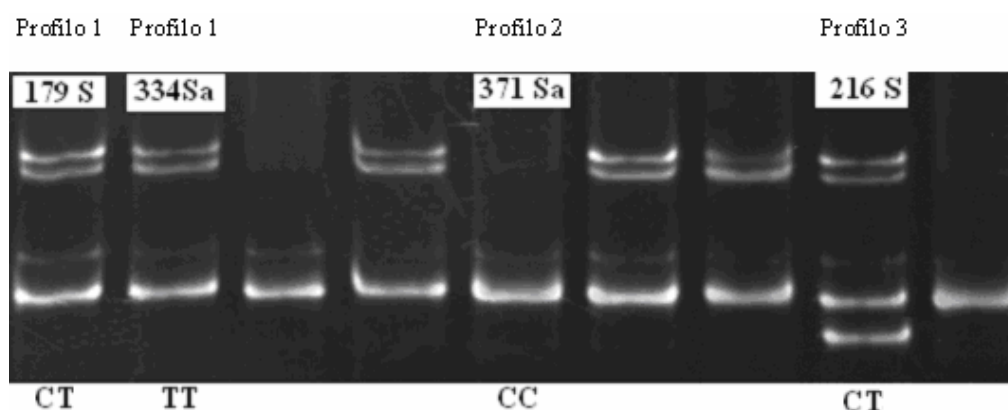




**Figura 39.** Allineamento della sequenza del 3° esone di *Capra hircus* con il corrispondente esone di *Ovis aries* presente in banca dati.

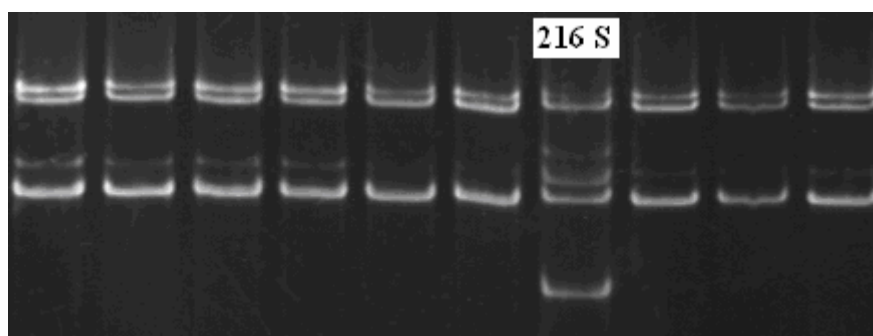
L'allineamento della sequenza di *Capra hircus* con quella corrispondente di *Ovis aries* depositata in banca dati ha evidenziato delle differenze nucleotidiche. Due di queste si trovano nella sequenza codificante e corrispondono ad una mutazione T>A; ed a una mutazione T>C (Fig. 39.)

Tutti i 180 campioni sono stati analizzati con tecnica SSCP. I campioni di *Capra hircus*, razza Sarda, analizzati hanno mostrato 3 differenti “pattern” elettroforetici all’analisi SSCP in gel di acrilammide al 10% con aggiunta di 1 ml di glicerolo (Fig. 40).



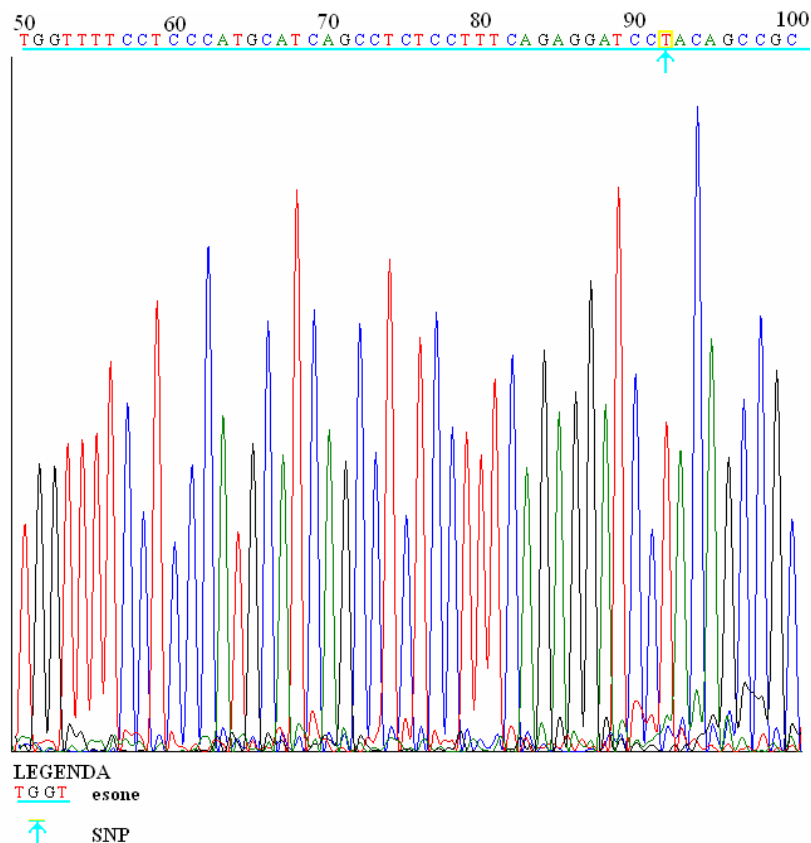
**Figura 40.** SSCP in gel di poliacrilamide 10% (8h) contenente 1 ml di glicerolo e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 3° esone del gene POU1F1 in *Capra hircus*.

La stessa analisi effettuata senza l’utilizzo del glicerolo nella preparazione del gel ha mostrato un unico campione differente (Fig. 41).



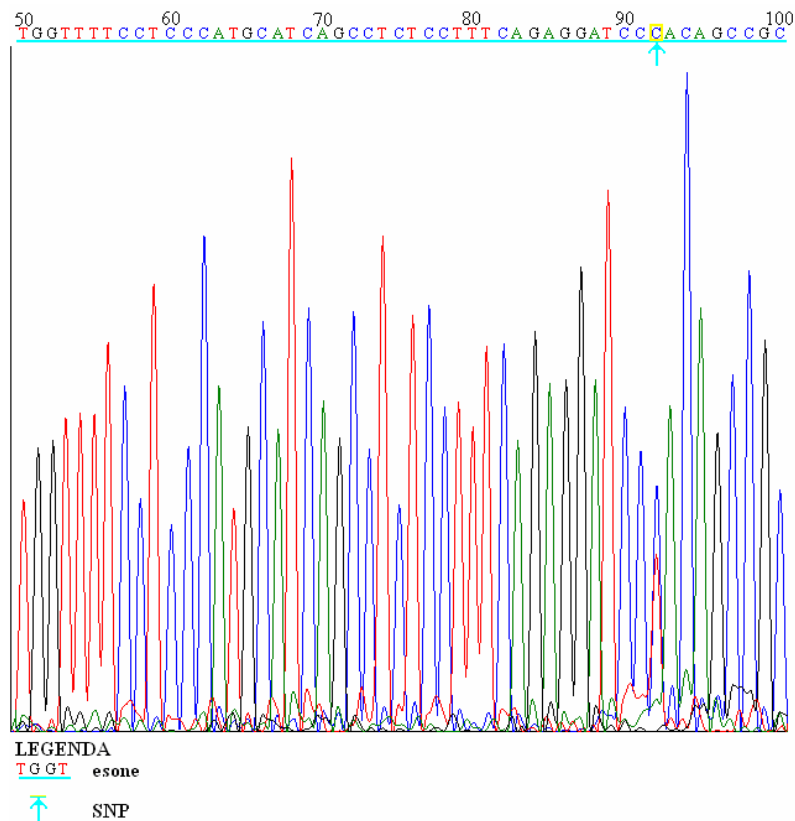
**Figura 41.** SSCP in gel di poliacrilamide 10% (8h) e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 3° esone del gene POU1F1 in *Capra hircus*.

L'utilizzo di glicerolo in una analisi SSCP può aiutare in alcuni casi a discriminare meglio le bande, ma per capire meglio le differenze, è stato necessario sequenziare i campioni che mostravano i tre profili differenti con glicerolo e l'unico diverso senza glicerolo.



**Figura 42.** Elettroferogramma del campione 334 Sa (omozigote TT).

Nella figura 42 prendendo come inizio della numerazione il primo nucleotide della sequenza codificante del terzo esone in *Ovis aries*, si può notare una timina in posizione 92 che nel campione in esame era presente in omozigosi (Profilo 1) (Fig. 40).

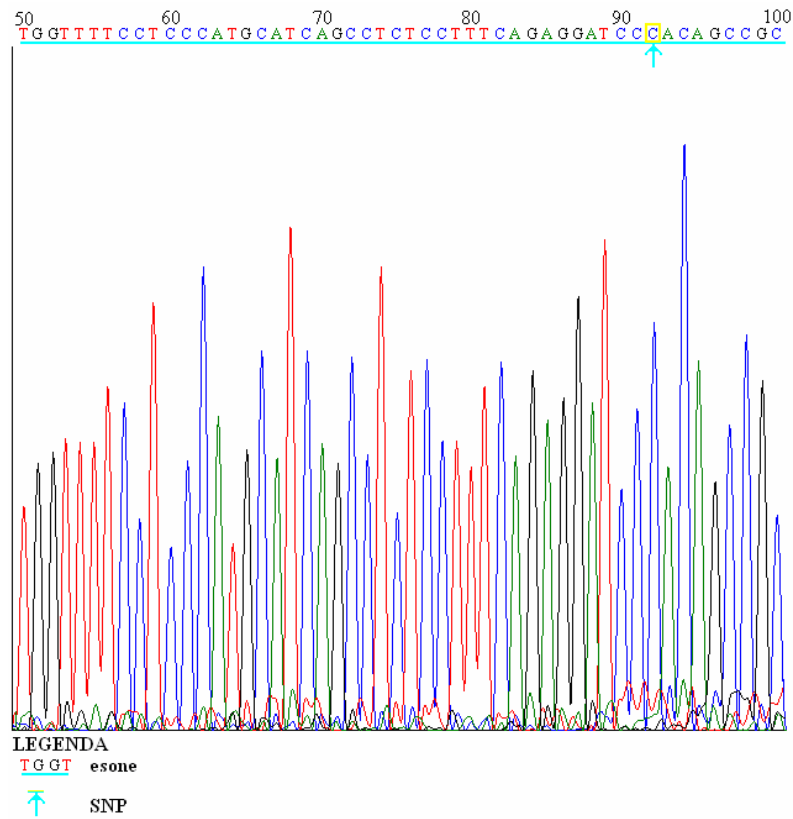


**Figura 43.** Elettroferogramma del campione 179 S (eterozigote CT).

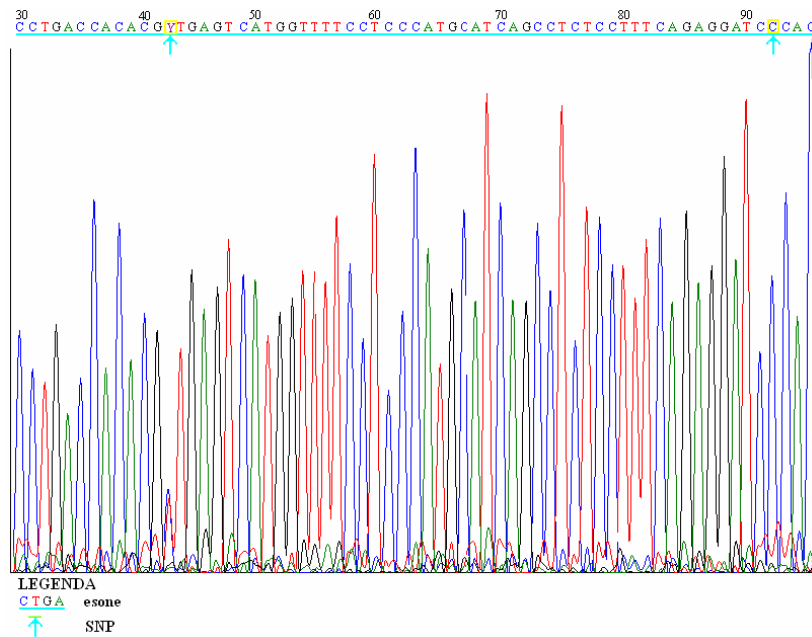
Nella Fig.43, si può notare la presenza di un doppio picco in posizione 92 che ci indica la presenza in eterozigosi di citosina e timina (Profilo 1) (Fig. 40).

Nella Fig. 44, (pagina successiva) si può notare la presenza in posizione 92 di una citosina in omozigosi (Profilo 2) (Fig. 40).

Nella Fig. 45 (pagina successiva) si può notare che il campione 216 S mostra in posizione 92 una Citosina ed in posizione 42 è eterozigote CT (profilo 3) (Fig. 40).

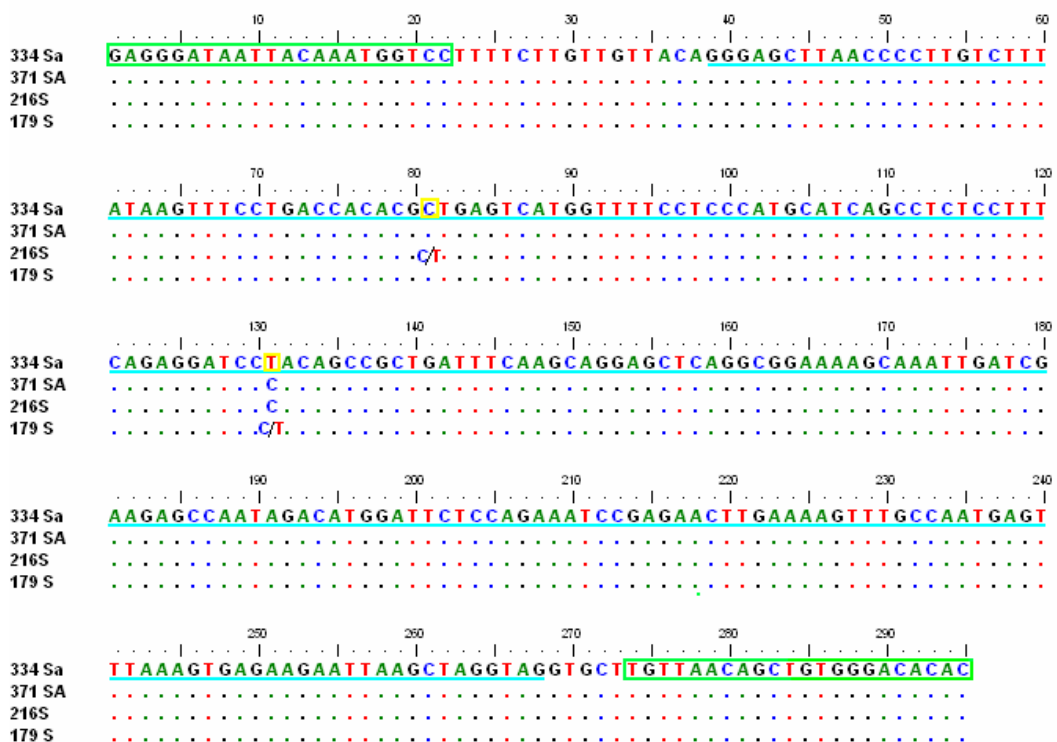


**Figura 44.** Elettroferogramma del campione 371 Sa (omozigote CC).



**Figura 45.** Campione 216 S eterozigote TC in posizione 42 ed omozigote CC in posizione 92 (profilo 3).

L'allineamento delle sequenze dei campioni di *Capra hircus* che avevano profili uguali in SSCP (profilo1: 334 Sa e 179 S) (Fig. 40) dimostra che questa tecnica non ci permette di distinguere gli omozigoti TT dagli eterozigoti CT, mentre ci consente di distinguere chiaramente gli omozigoti CC (profilo 2) ed il campione omozigote CC in posizione 92 che presenta anche una mutazione in eterozigosi CT in posizione 42 (profilo 3) (Fig. 40).



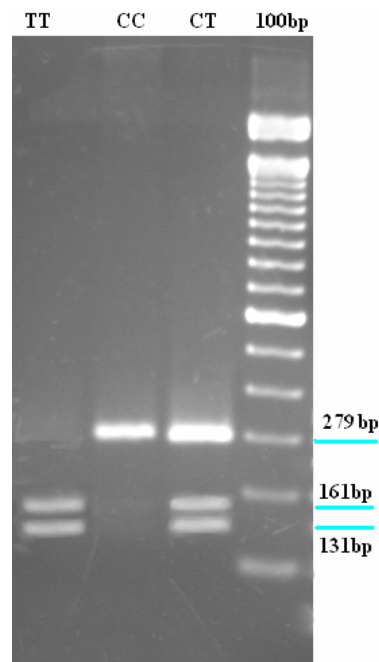
**LEGENDA**

- GAGG primer
- GGGA esone
- T C SNP presente in omozigosi TT,CC eterozigosi CT

**Figura 46.** Allineamento delle sequenze dei campioni differenti del 3° esone di *Capra hircus*.

Gli omozigoti TT e gli eterozigoti CT sono stati distinti con l'endonucleasi di restrizione *SfcI* (Biolabs) che riconosce il sito di taglio C'TACAG e ci permette di distinguere gli omozigoti TT dagli eterozigoti TC in quanto:

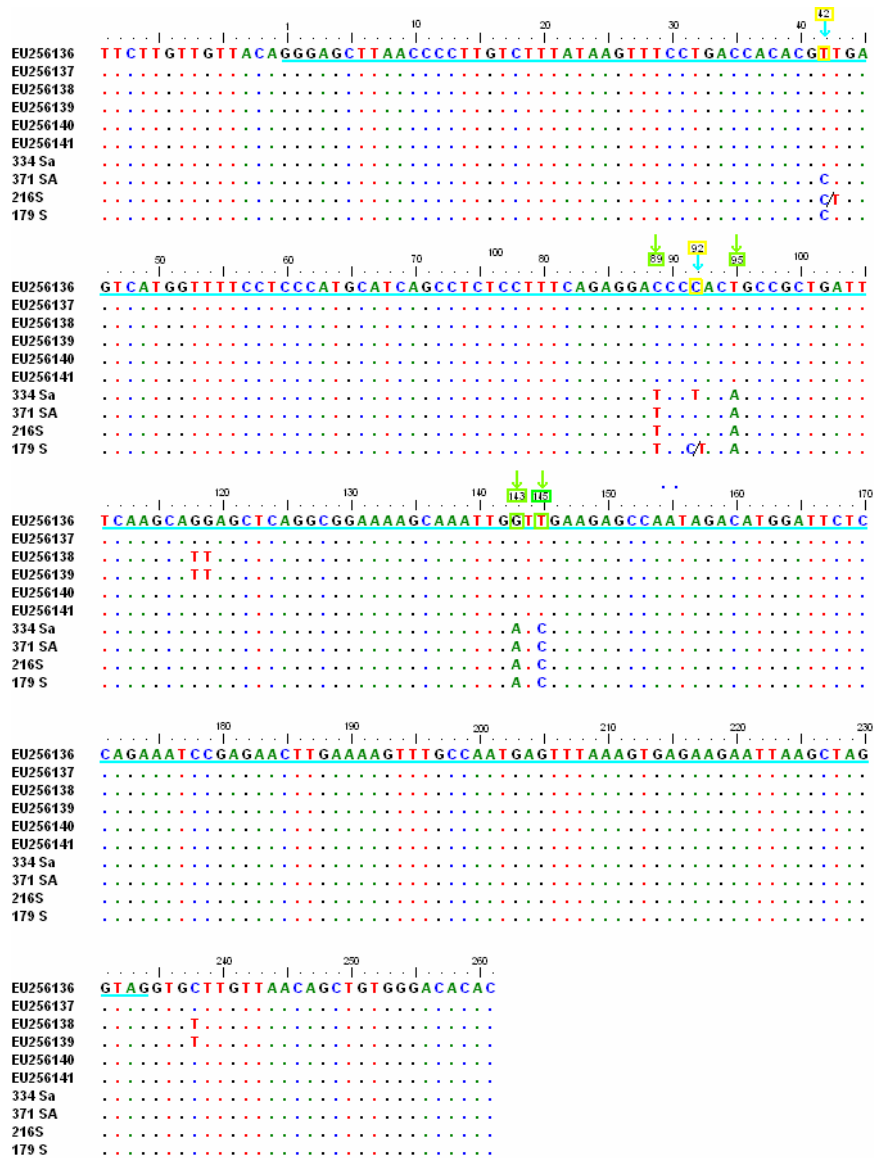
L'omozigote TT dà origine a due frammenti di 164 bp e 131 bp, l'omozigote CC non dà origine ad alcun frammento poiché non possiede il sito di taglio, l'eterozigote CT origina tre frammenti 295 bp; 164 bp, 131 bp (Fig. 47).



**Figura 47.** Elettroforesi in gel di agarosio al 2% del 3° esone digerito con *SfcI*.

L'appaiamento con le sequenze presenti in banca dati del 3° esone mostra che i diversi campioni di razza Sarda presentano delle mutazioni in posizione 92 C>T ed in posizione 42 T>C rispetto alla razza Inner Mongolia White Cashmere.

Inoltre la razza Sarda presenta diversi SNPs rispetto alla razza cinese e precisamente C>T in posizione 89; T>A in posizione 95; G>A in posizione 143; T>C in posizione 145 come mostrato in Fig. 48.



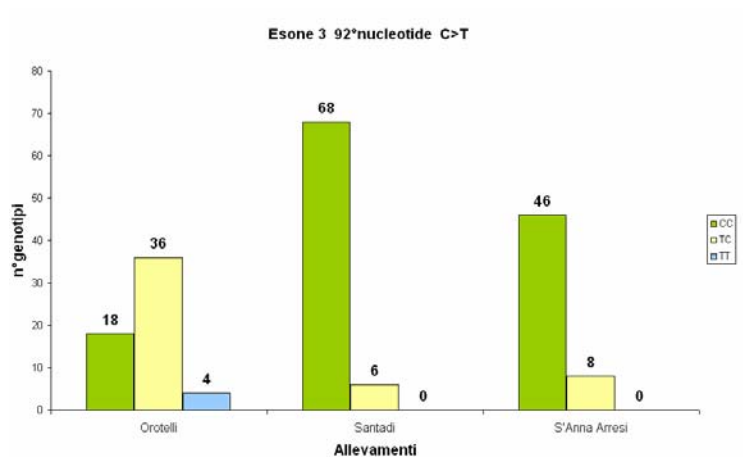
LEGENDA

- GGG A esone
- TT CT SNP TT, CT, CC razza sarda
- ↓ SNP rispetto alla razza Inner Mongolia White Cashemere

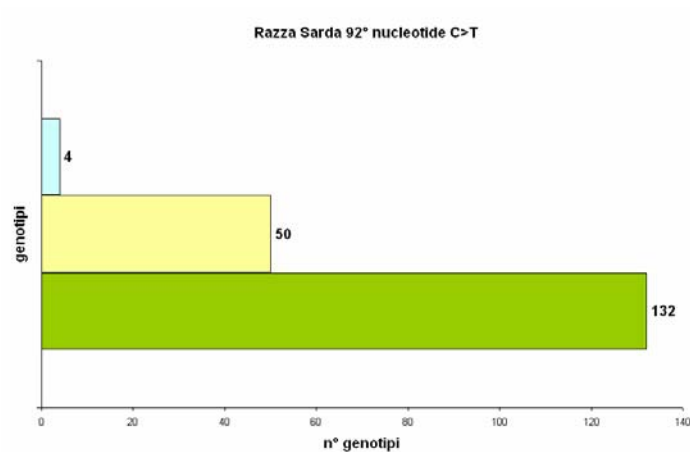
**Figura 48.** Allineamento delle sequenze dei campioni di razza Sarda (3° esone) differenti tra loro, con le sequenze della razza Inner Mongolia White Cashemere depositate in GenBank il 01/11/09.



Nelle figure seguenti è rappresentata la consistenza numerica dei genotipi per la sostituzione in posizione 92 C>T trovati nei diversi allevamenti (Fig. 49) e complessivamente nella razza Sarda (Fig. 50).



**Figura 49.** Numero dei genotipi relativi alla sostituzione in posizione 92 C>T.



**Figura 50.** Numero genotipi relativi alla sostituzione in posizione 92 C>T

Le frequenze alleliche e genotipiche per la sostituzione C>T in posizione 92 sono indicate in Tab.7.

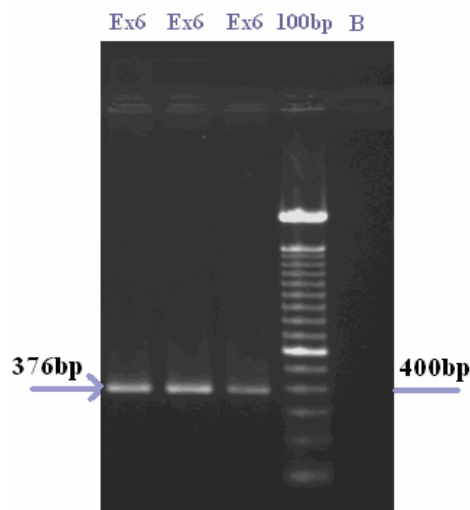
Terzo esone allevamento	92 nucleotide C>T			Frequenze alleliche os			Genotipi attesi			$\chi^2$
	Genotipi osservati			N	C	T	CC	TC	TT	
	CC	TC	TT							
OROTELLI	18	36	4	58	0,621	0,379	22,34	27,31	0,05	<b>P=0,015</b>
SANTADI	68	6	0	74	0,959	0,041	68,12	5,76	0,12	<b>P=0,72</b>
S'ANNARRESI	46	8	0	54	0,926	0,074	46,30	7,41	0,30	<b>P=0,57</b>
				<b>186</b>						

**Tabella 7.** Frequenze alleliche e genotipi osservati ed attesi riscontrati nei tre allevamenti

Solo l'allevamento di Orotelli non risulta in equilibrio di Hardy-Weinberg con  $\chi^2 P < 0,05$  per la sostituzione al nucleotide 92 C>T.

### SESTO ESONE

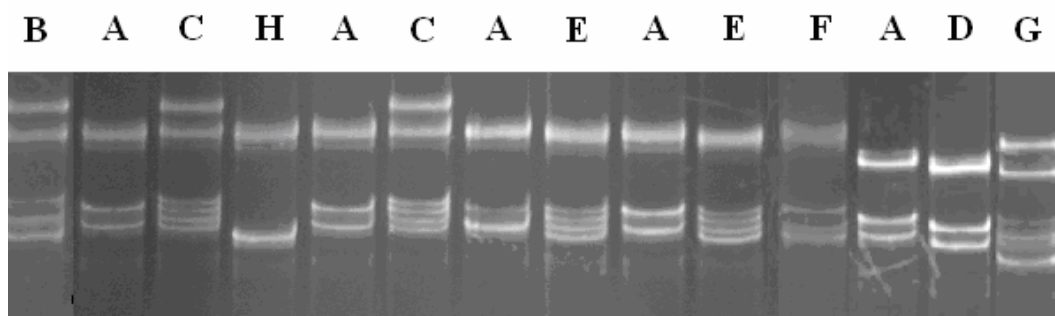
Per quanto riguarda l'amplificazione del sesto esone, è stato ottenuto un amplicone di 376 bp (Fig. 51).



**Figura 52.** Corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5% e colorazione con bromuro di etidio del frammento da 376 bp ottenuto tramite PCR.



L'analisi con tecnica SSCP dei 187 campioni (gel di acrilammide al 12%, 8 h di corsa) ha mostrato un complesso pattern elettroforetico che ha permesso di individuare profili differenti da noi indicati come: A, B, C, D, E, F, G, H (Fig. 55)



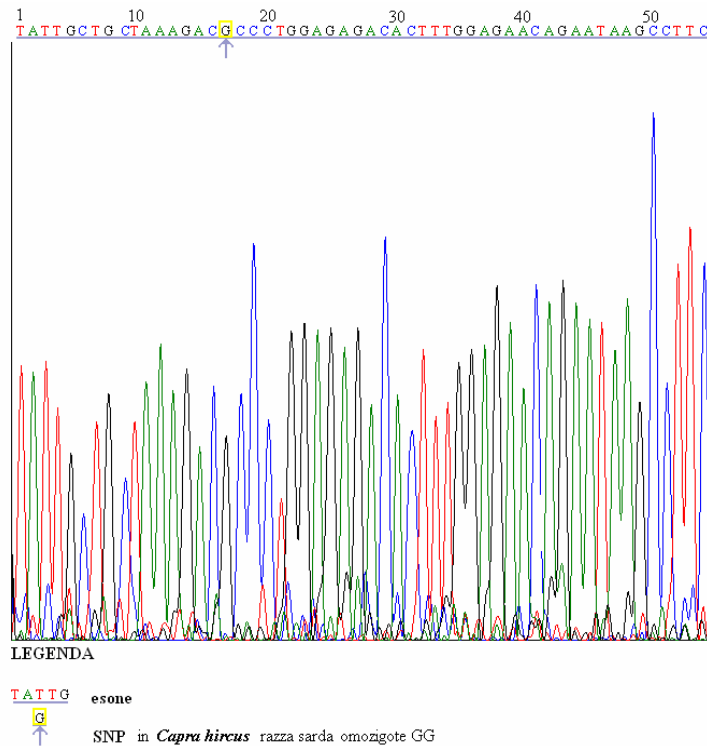
**Figura 55.** SSCP in gel di poliacrilamide 12% (8h) e colorazione con Syber Gold dei frammenti di DNA del 6° esone del gene POU1F1 in *Capra hircus*.

Tali pattern si sono ripetuti in diverse corse SSCP. Diversi prodotti rappresentativi degli 8 diversi profili sono stati sequenziati in entrambe le direzioni per individuare il tipo di sostituzione presente, e verificare se un determinato profilo poteva essere correlato a più di una sostituzione.

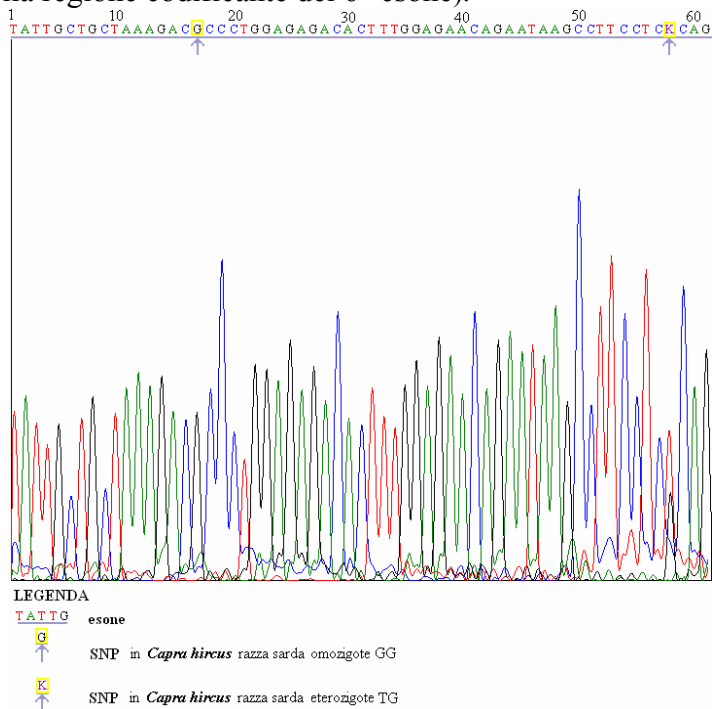
**Tabella 8.** Sostituzioni riscontrate tramite sequenziamento: in rosso sono rappresentati i nucleotidi caratterizzanti il tipo di profilo SSCP.

Nucleotide	PROFILI ELETTROFORETICI IN SSCP									
	A	A	B	C	D	E	F	F	G	H
	409 Sa	195 Or	355 Sa	173 Or	134 Or	144 Or	174 S	348 Sa	342 Sa	426 Sa
17	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GT	GT	GG	TT
58		TG						GT		TT
172	TT	TT	TC	TC	TT	TT	TT	TT	TC	TT
110 3'UTR	TT	TT	TT	TT	CC	TC	TT	TT	TC	TT

**Pattern A.** Il profilo caratteristico (Fig. 55) è rappresentato dalla stato di omozigote GG in pozione 17, (Fig. 56). Inoltre può presentare in posizione 58 lo stato di omozigosi GG, o di eterozigosi come mostrato nella Fig. 57.

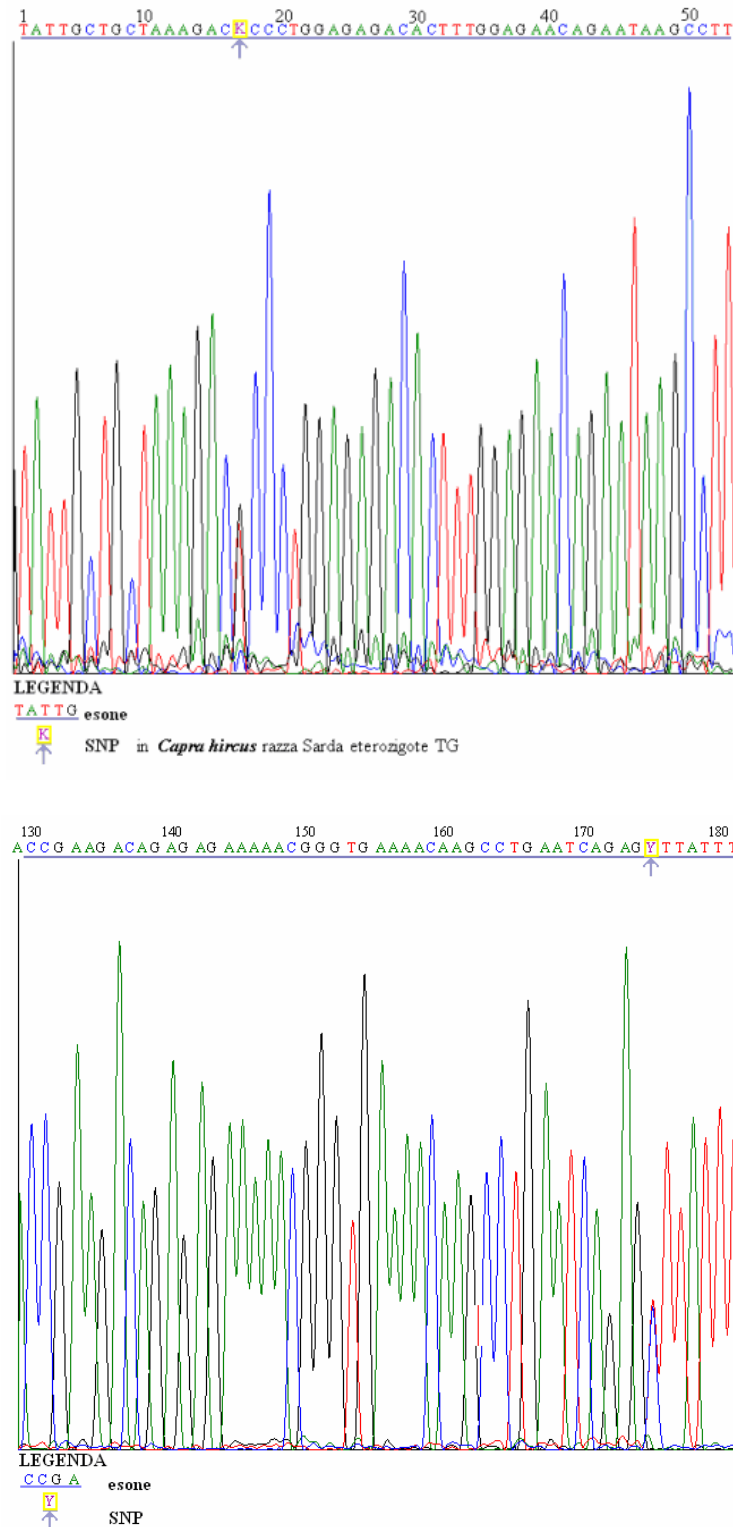


**Figura 56.** Elettroferogramma del campione 409 Sa (omozigote GG al 17 nucleotide della regione codificante del 6° esone).



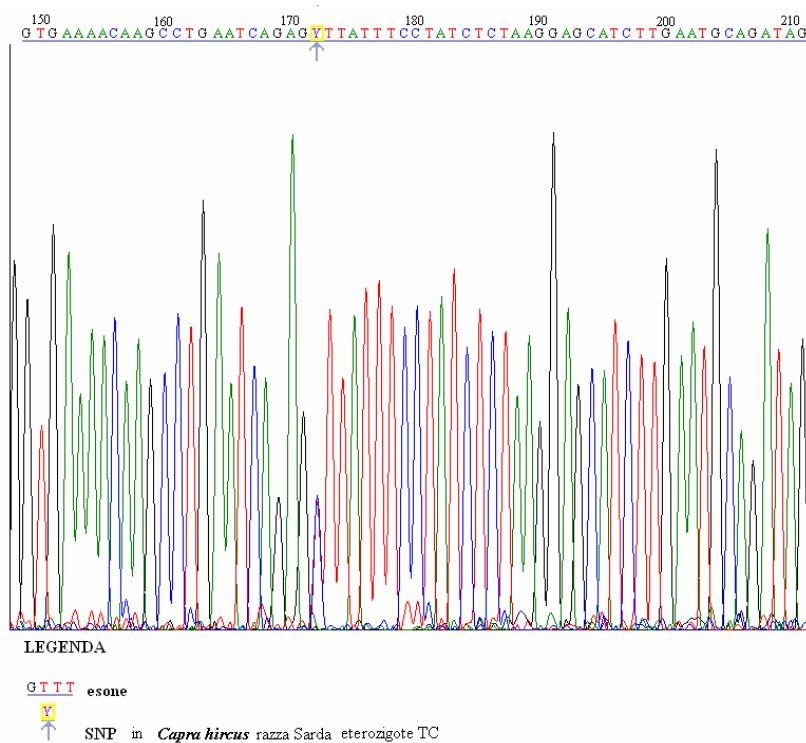
**Figura 57.** Elettroferogramma del campione 195 Or (omozigote GG al 17 nucleotide della regione codificante del sesto esone, eterozigote al 58 nucleotide TG).

**Pattern B.** (Fig. 55) Eterozigote GT al 17 nucleotide ed eterozigote TC al 172 nucleotide della regione codificante (Fig.58).



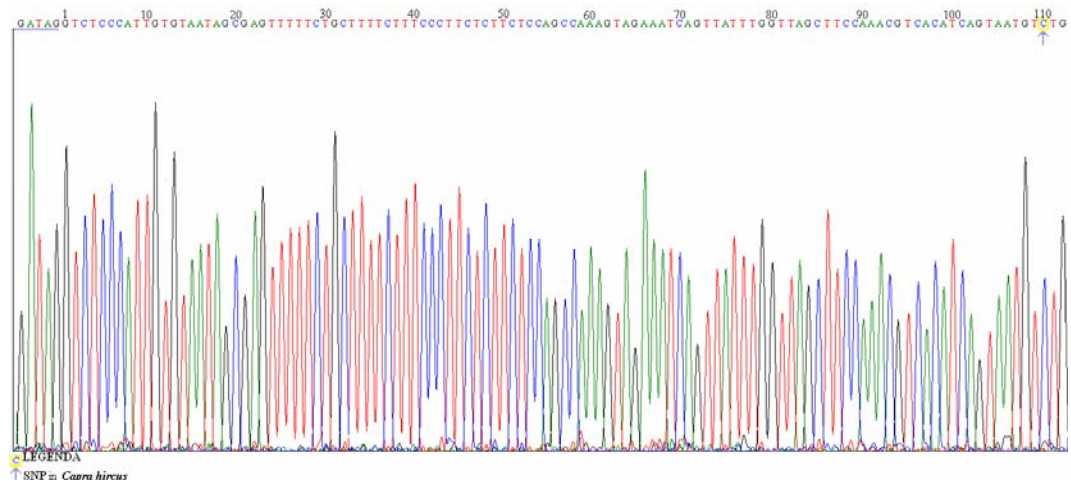
**Figura 58.** Elettroferogramma del campione 355 SA (eterozigote TG al 17 nucleotide della regione codificante, eterozigote TC al 172 nucleotide della regione codificante).

**Pattern C.** (Fig. 55) Eterozigote TC al 172 nucleotide della regione codificante (Fig. 59).



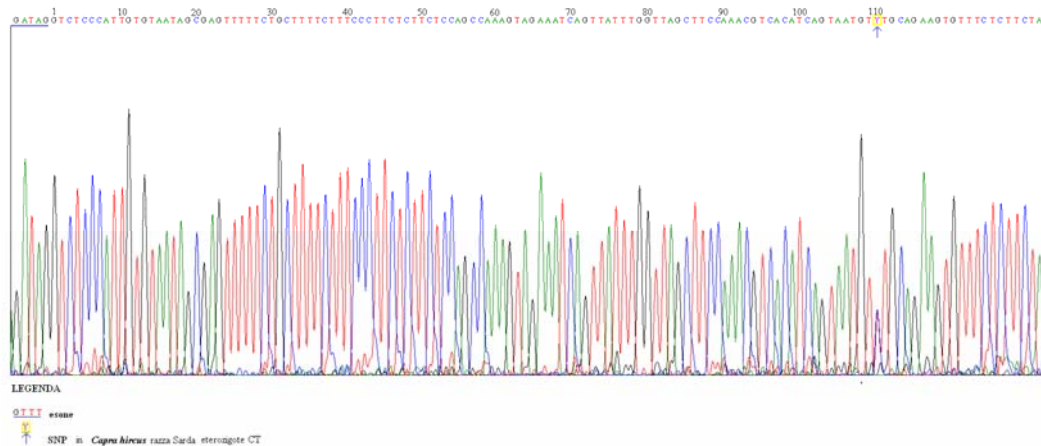
**Figura 59.** Elettroferogramma del campione 173 Or (eterozigote TC al 172 della regione codificante)

**Pattern D.** (Fig. 55) Omozigote CC in posizione 3' 110 UTR (Fig. 60).



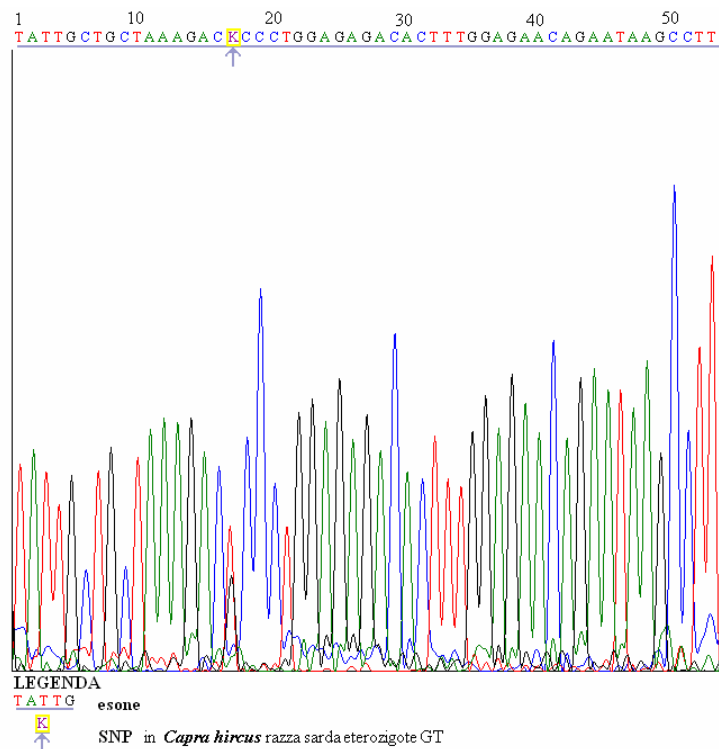
**Figura 60.** Elettroferogramma del campione 134 Or (omozigote CC al 110 nucleotide della regione 3'UTR contando dal 1° nucleotide a valle del 6° esone).

**Pattern E.** (Fig. 55) Il profilo è caratterizzato dallo stato di eterozigosi TC, in posizione 3' 110 UTR (Fig. 61).



**Figura 61.** Elettroferogramma del campione 144 Or (eterozigote TC al 110 nucleotide della regione 3'UTR contando dal 1° nucleotide a valle del sesto esone).

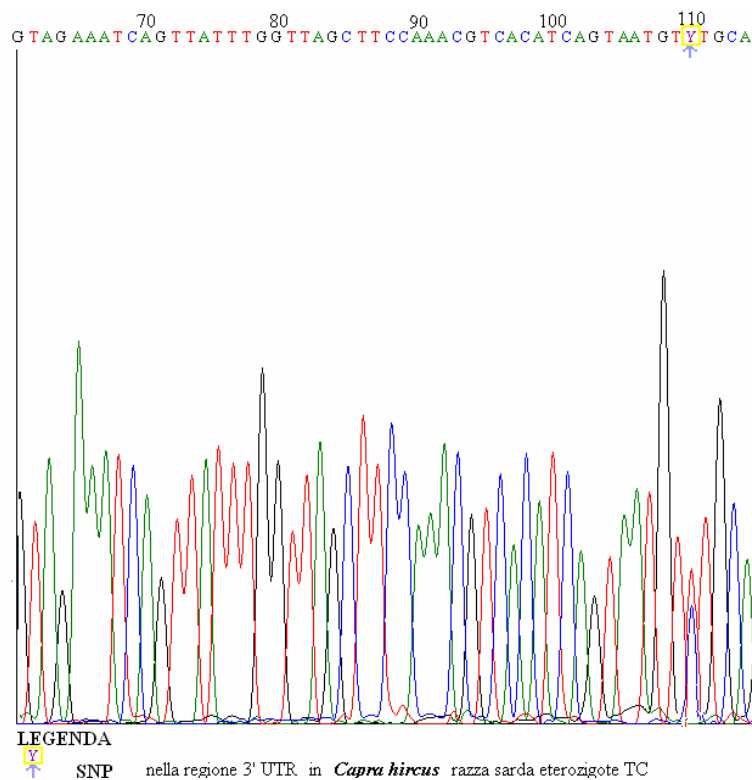
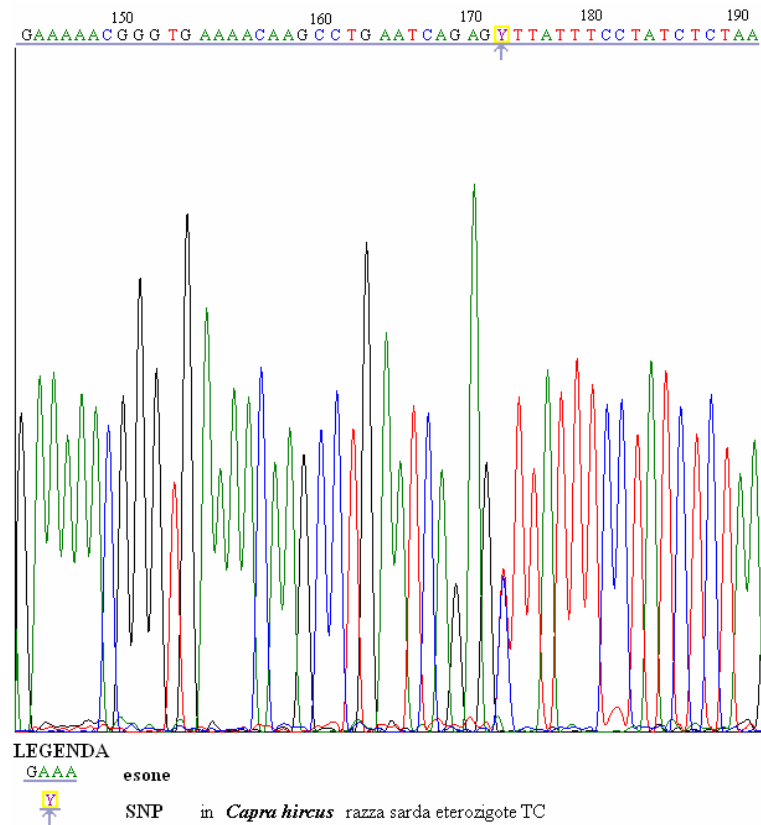
**Pattern F.** Il profilo caratteristico (Fig. 55) è rappresentato dalla stato di eterozigote GT in pozione 17, (Fig.62). Inoltre può presentare in posizione 58 lo stato di omozigosi GG o di eterozigosi come mostrato nella Fig. 63.



**Figura 62.** Elettroferogramma del campione 174 S (eterozigote TG al 17 nucleotide della regione codificante).

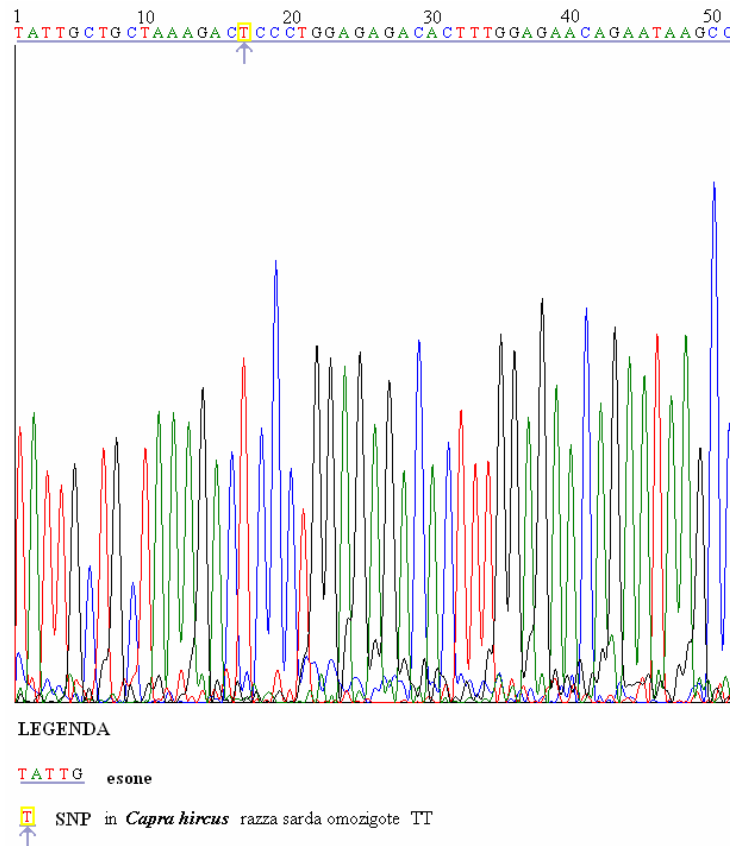






**Figura 64.** Elettroferogrammi del campione 342 Sa (eterozigote TC al 172 nucleotide del 6° esone, eterozigote TC al 110 nucleotide della regione 3'UTR).

**Pattern H** (Fig. 55). Omozigote TT al 17 nucleotide della regione codificante del 6° esone (Fig. 65).



**Figura 65.** Elettroferogramma del campione 426 Sa (omozigote TT al 17 nucleotide della regione codificante del sesto esone).

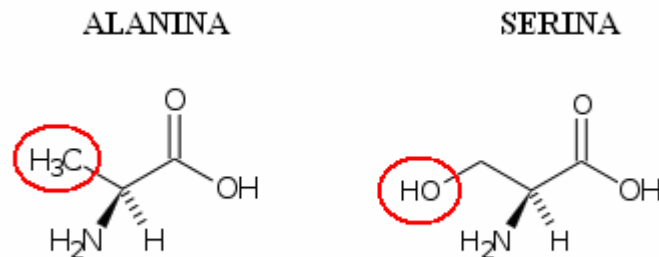
Delle diverse varianti A, B, C, D, E, F, G, H, identificabili per un determinato profilo SSCP, le varianti F, H, A, in base al sequenziamento mostrano: la variante F, lo stato di eterozigosi GT al 17 nucleotide della regione codificante, la variante H lo stato di omozigosi TT, la variante A di omozigosi GG.

Questa sostituzione in posizione 17 (G>T) è individuabile chiaramente tramite corsa SSCP in quanto il genotipo TT, il più raro, è caratterizzato sempre dal profilo H; l'eterozigote GT dal profilo F. Il profilo B risulta differente pur essendo eterozigote GT in posizione 17 in quanto presenta lo stato di eterozigote TC in posizione 172.



T>C in eterozigosi TC (profilo E), o in omozigosi CC (profiloD) e si distinguevano quindi in base alla corsa SSCP.

La sostituzione in posizione 17 cambia una G>T, questa mutazione muta l'amminoacido alanina in serina nella proteina matura di 291 aa (Fig 67).



**Figura 67.** Amminoacidi coinvolti nello SNP in posizione 17.

```

1 mscqpftstd tfiplnsess atplimhps aaeclpvsnh atnvmstatg lhysvpschy
61 gnqsstygvvm agsltpclye fpdhtlshgf ppmhqpllse dptaadfkqe lrrkskliee
121 pidmnspeir elekfanefk vrriklgytq tnvgealaav hgsefsqtti crfenlqlsf
181 knacklkail fkwleeeaqy galynekvga nerkrkrtrt isiaakdle rhfgeqnkps
241 sqeilmraee lnlekevrvv wfcnrrqrek rvktslnqsl fpnskehlec r

```

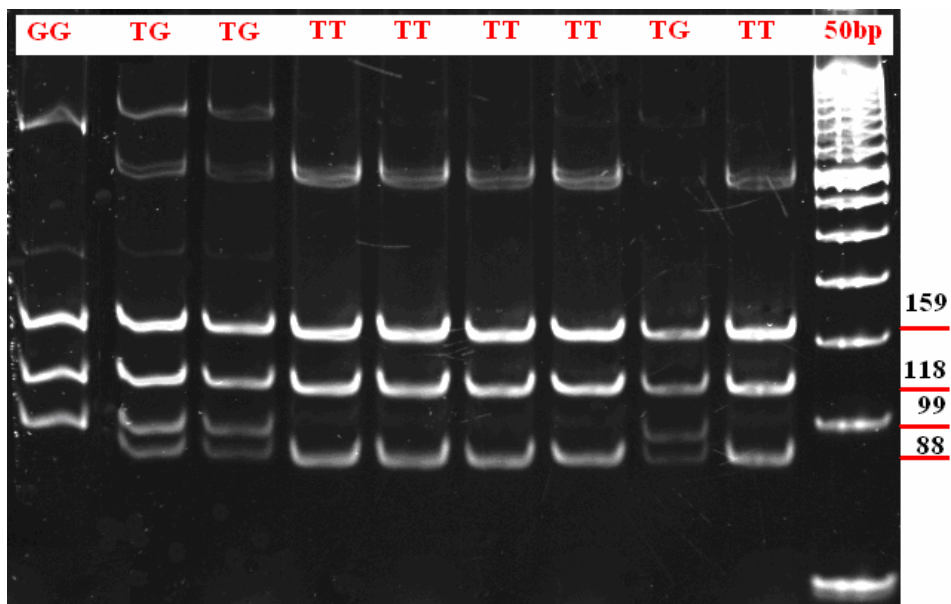
Quindi poiché' cambia un amminoacido non è silente ed inoltre sostituisce un amminoacido non polare con uno polare.

Per verificare la sostituzione nucleotidica in posizione 58 è stato necessario sottoporre i campioni a digestione enzimatica perché tale sostituzione non determina uno specifico pattern elettroforetico. La sostituzione T>G al 58 nucleotide della regione codificante può essere individuata tramite l'utilizzo dell'enzima di restrizione *DdeI* (Lan et al., 2007 b, c).

*DdeI*                    5'... C<sup>T</sup> n A\_G ... 3'  
                              3'... G<sup>A</sup> n T\_C ... 5'

I primers utilizzati nel nostro lavoro sono differenti ed amplificano un frammento più corto, 376 bp rispetto ai 450 bp degli autori sopra citati, gli alleli che porteranno i nucleotidi T e G saranno indicati nella stessa maniera dei suddetti autori ma la digestione enzimatica produrrà nel nostro caso frammenti di lunghezza differente.

E precisamente nel caso si tratti di omozigote TT (159bp, 118bp, 88bp); di eterozigote TG (159bp, 118bp, 99bp, 88bp); di omozigote GG (159bp, 118bp, 99bp) (Fig. 68).



**Figura 68.** Corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide al 15% dei campioni digeriti con l'enzima *DdeI* (58 nucleotide: omozigoti TT, eterozigoti TG, omozigoti GG).

Le frequenze alleliche per le diverse mutazioni in posizione 17, 58, 172, 110 3'UTR nei tre diversi allevamenti sono riportate nella Tab. 8.

<b>17 nucleotide G&gt;T</b>									
allevamento	Genotipi osservati			Frequenze alleliche os			Genotipi attesi		
	GG	TG	TT	N	G	T	GG	TG	TT
OROTELLI	54	4	0	58	0,966	0,034	54,05	3,89	0,05
SANTADI	52	21	3	76	0,822	0,178	51,32	22,35	2,32
S'ANNARRESI	30	21	2	53	0,773	0,226	31,63	18,74	2,63
				187					

<b>58 nucleotide T&gt;G</b>									
allevamento	Genotipi osservati			Frequenze alleliche os			Genotipi attesi		
	TT	TG	GG	N	T	G	TT	TG	GG
OROTELLI	40	16	0	58	0,828	0,171	39,65	16,70	1,65
SANTADI	39	33	4	76	0,730	0,269	40,43	30,14	5,43
S'ANNARRESI	31	21	1	53	0,030	0,218	32,41	18,18	2,41
				187					

<b>110 nucleotide T&gt;C</b>									
allevamento	Genotipi osservati			Frequenze alleliche os			Genotipi attesi		
	TT	TC	CC	N	T	C	TT	TC	CC
OROTELLI	50	7	1	58	0,92	0,08	49,31	8,37	0,31
SANTADI	75	1	0	76	0,99	0,01	75	1	0
S'ANNARRESI	46	7	0	53	0,94	0,06	42,20	6,60	0,20
				187					

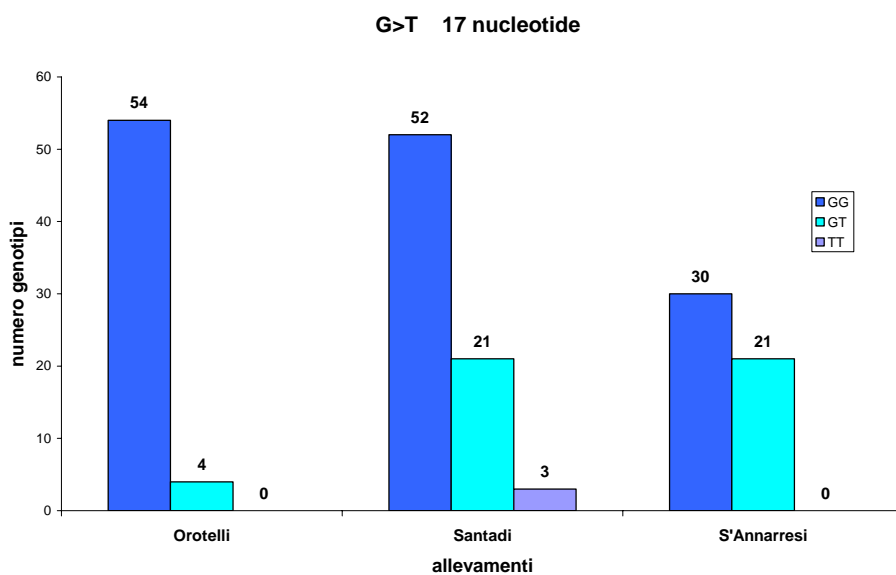
  

<b>172 nucleotide T&gt;C</b>									
allevamento	Genotipi osservati			Frequenze alleliche os			Genotipi attesi		
	TT	TC	CC	N	T	C	TT	TC	CC
OROTELLI	51	7	0	58	0,934	0,06	51,18	6,63	0,18
SANTADI	62	14	3	76	0,908	0,09	62,6	12,79	0,60
S'ANNARRESI	45	8	0	53	0,755	0,236	45,27	7,47	0,27
				187					

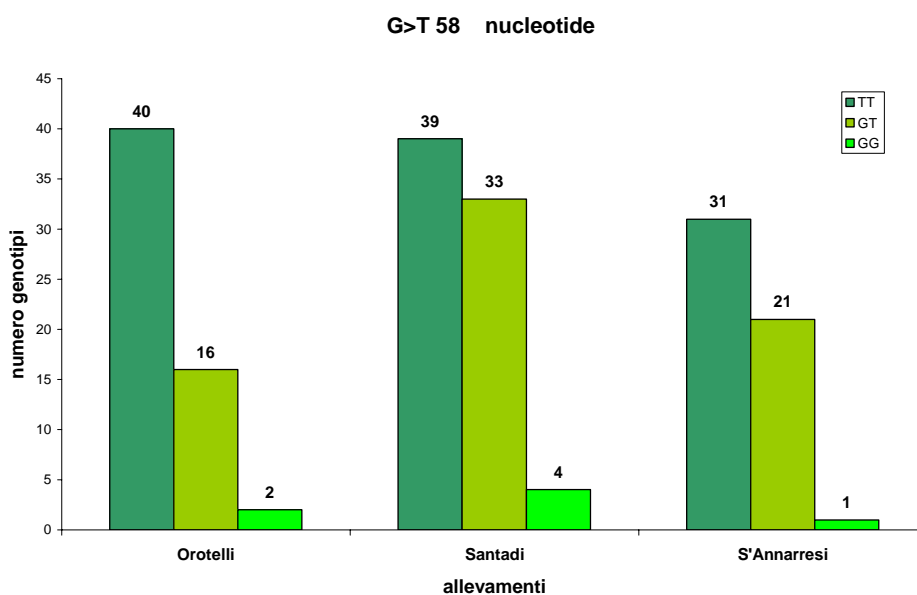
**Tabella 9.** Frequenze alleliche, genotipi osservati ed attesi nei tre allevamenti per le sostituzioni nelle differenti posizioni del 6° esone.

Tutti gli alleli nei tre allevamenti risultano in equilibrio di Hardy-Weinberg con  $\chi^2 P > 0,05$ .

Il numero dei genotipi per le diverse mutazioni in posizione 17 G>T, 58 T>G, 172T>C, 110 3'UTR T>C è illustrato nelle figure: 69, 70, 71, 72 rispettivamente.

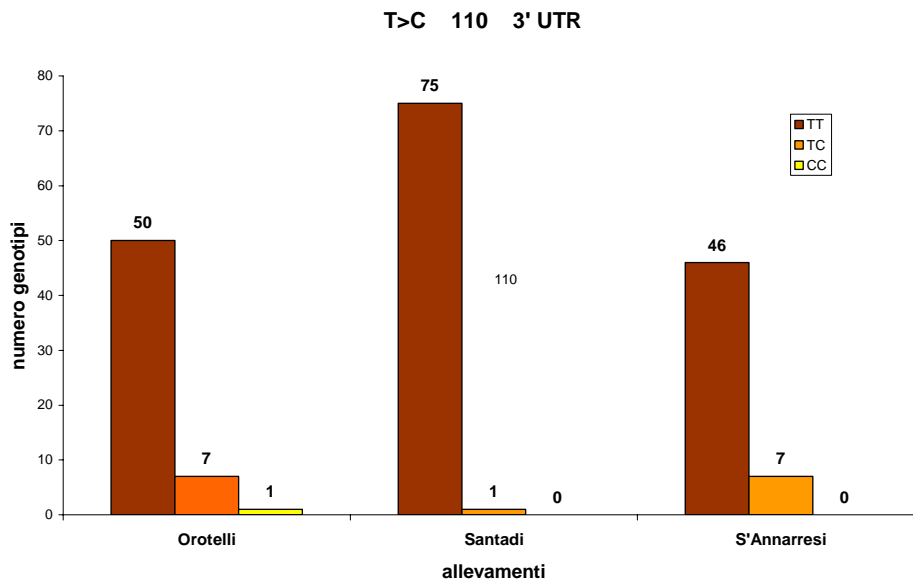


**Figura 69.** Numero dei genotipi relativi alla sostituzione in posizione 17 nel 6° esone.

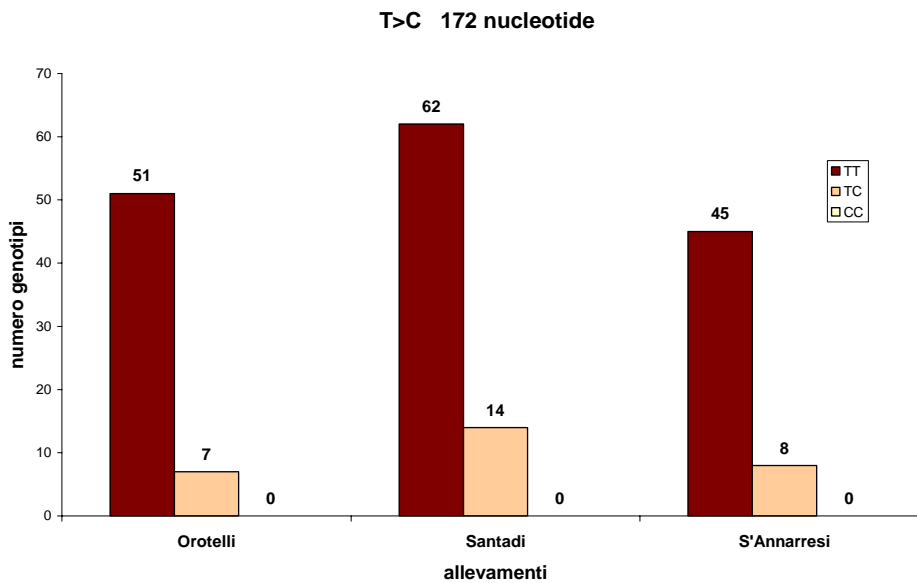


**Figura 70.** Numero dei genotipi relativi alla sostituzione in posizione 58 nel 6° esone



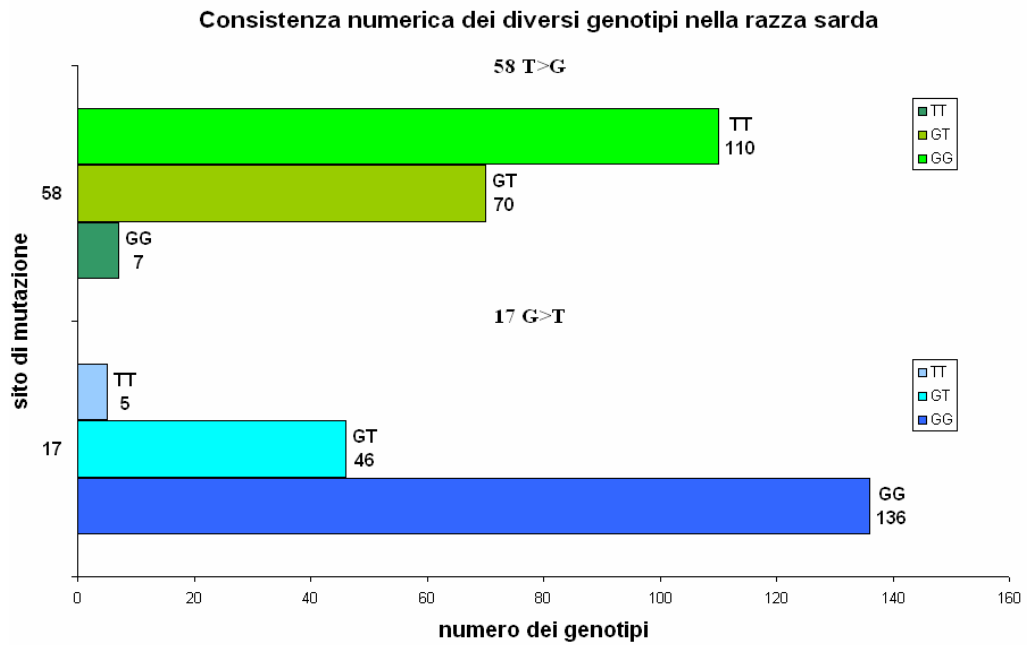


**Figura 71.** Numero dei genotipi relativi alla sostituzione in posizione 110 3'UTR del 6° esone.

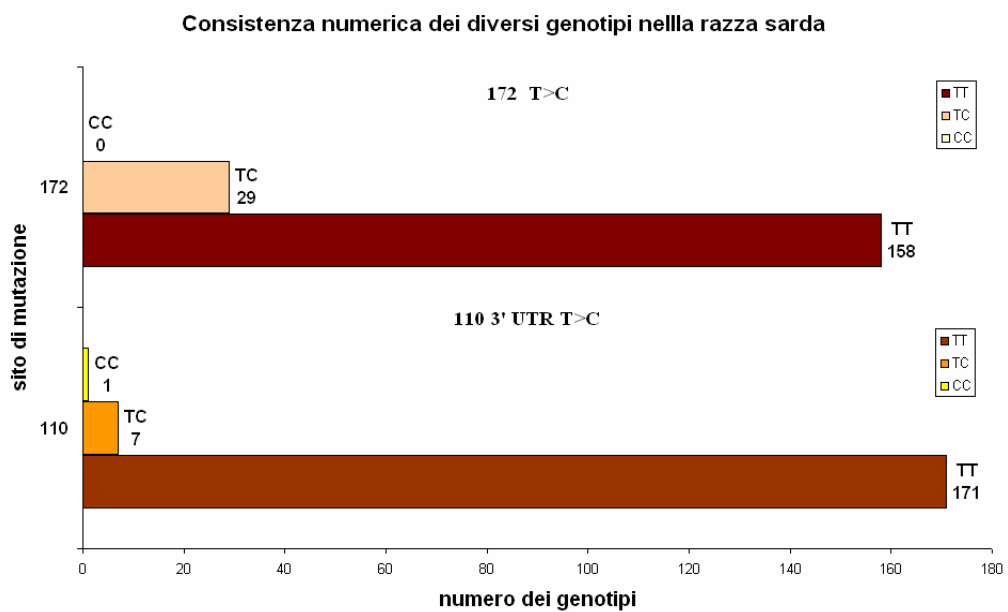


**Figura 72.** Numero dei genotipi relativi alla sostituzione in posizione 172 del 6° esone.

Rappresentazione schematica del numero dei genotipi trovati per ciascuna sostituzione nella razza Sarda:



**Figura 73.** Genotipi nella razza Sarda corrispondenti alle mutazioni in posizione 17, 58.



**Figura 74.** Genotipi nella razza Sarda corrispondenti alle mutazioni in posizione 172, 110 3' UTR.

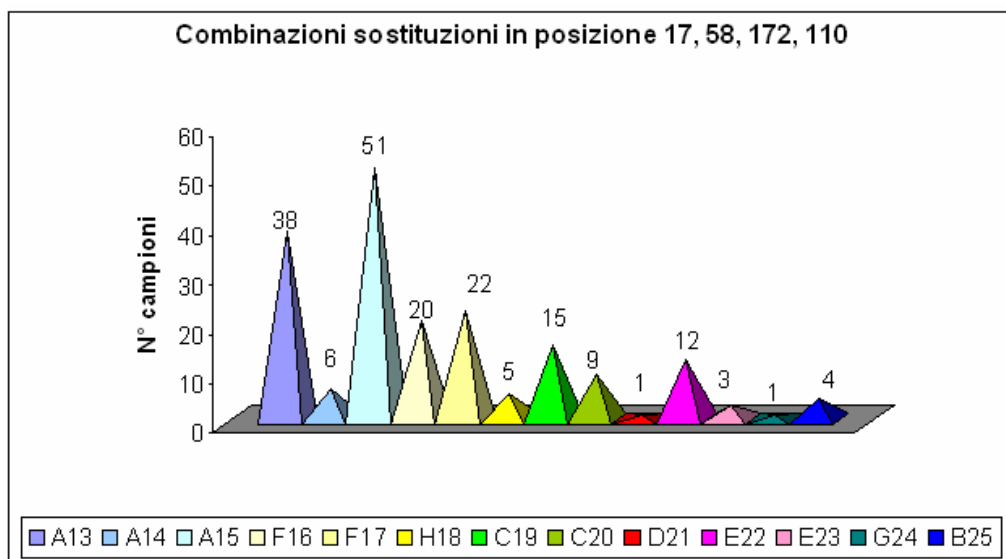
Sono state trovate 13 combinazioni dei diversi genotipi illustrate nella tabella

Tabella 10.

**Tabella 10.** Combinazioni delle diverse sostituzioni al nucleotide 17, 58, 172 ed in posizione 110 nella regione in 3'UTR del 6° esone del gene POU1F1.

	Profilo SSCP	17 <i>MlyI</i>	58 <i>DdeI</i>	172 <i>AluI</i>	110 3'UTR <i>PstI</i>
13	A	GG	TG	TT	TT
14	A	GG	GG	TT	TT
15	A	GG	TT	TT	TT
16	F	GT	TG	TT	TT
17	F	GT	TT	TT	TT
18	H	TT	TT	TT	TT
19	C	GG	TT	TC	TT
20	C	GG	TG	TC	TT
21	D	GG	TT	TT	CC
22	E	GG	TT	TT	TC
23	E	GG	TG	TT	TC
24	G	GG	TT	TC	TC
25	B	GT	TT	TC	TT

In alcuni casi lo stesso profilo elettroforetico è condiviso da più di una di queste combinazioni, come mostrato nella Tabella 10. Alcune combinazioni presentano un unico profilo elettroforetico: 18, 21, 24, 25 e tra queste, due, le combinazioni D (campione 134 Or) e G, (campione 342 Sa) le ritroviamo in un unico campione.



**Figura 75.** Numero di animali con le combinazioni di sostituzioni indicate in tabella 9.

Come si può vedere dalla Fig.75, nella razza Sarda, la combinazione di sostituzioni più frequente è la 15, seguita dalla 13, 17 e 16.

Nelle tabelle successive si riportano le associazioni trovate tra le singole sostituzioni nucleotidiche, individuate tramite l'utilizzo combinato delle tecniche SSCP, digestione enzimatica e sequenziamento con la produzione, il contenuto in proteine e grasso del latte.

				92 C>T			
		StDev				StDev	
PESO	CC	959,30	282,30	GRASSO	CC	5,07**	0,76
	CT	997,90	294,6,		CT	4,52	0,65
	TT	859,20	107,60		TT	4,34	0,35
				PROTEINE			
				CC	4,09*	0,45	
				CT	3,91	0,37	
				TT	3,76	0,34	

**Tabella 11.** Valori medi(+ d.s.) della produzione di latte, grasso e proteine riferiti al SNP in posizione 92. Con \* , si indicano differenze significative (P<0,05); con \*\* si indicano differenze significative (P<0,01)

	17 G>T			58 T>G			172 T>C			110 3'UTR T>C		
	Gen	g	StDev	Gen	g	StDev	Gen	g	StDev	Gen	g	StDev
PESO	GG	949,40	277,40	TT	986,00	303,80	TT	962,60	269,20	TT	976,20	287,00
	GT	990,30	286,50	TG	937,40	242,40	TC	1001,20	350,20	TC	877,90	226,00
	TT	1294,7*	207,90	GG	1005,70	322,80	CC			CC	1141,00	0,00
GRASSO	GG	4,85	0,78	TT	4,86	0,79	TT	4,91	0,75	TT	4,90	0,78
	GT	5,1*	0,75	TG	4,96	0,74	TC	4,85	0,90	TC	4,94	0,74
	TT	4,49	0,24	GG	5,04	0,90	CC			CC	4,72	0,00
PROTEINE	GG	4,03	0,45	TT	4,00	0,44	TT	4,04	0,43	TT	4,04	0,45
	GT	4,10	0,40	TG	4,07	0,43	TC	4,00	0,51	TC	4,00	0,32
	TT	3,602*	0,19	GG	4,18	0,54	CC			CC	3,75	0,00

**Tabella 12.** Valori medi( $\pm$ d.s.) della produzione di latte grasso e proteine riferiti ai diversi SNP. Con \* , si indicano differenze significative ( $P<0,05$ ).

13	comb sostiz	SSCP	18	comb sostiz	SSCP	22	comb sostiz	SSCP
	GG(GT,TT,TT)	A		TT(TT,TT,TT)	H		GG(TT,TT,TT)	E
		StDev			StDev			StDev
PESO	918,60	230,40	PESO	1294,7*	207,90	PESO	857,80	250,90
GRASSO	4,84	0,77	GRASSO	4,49	0,24	GRASSO	4,97	0,78
PROTEINE	4,08*	0,43	PROTEINE	3,60	0,19	PROTEINE	4,03*	0,30
13	comb sostiz	SSCP	16	comb sostiz	SSCP	19	comb sostiz	SSCP
	GG(GT,TT,TT)	A		GT(GT,TT,TT)	F		GG(TT,CT,TT)	C
		StDev			StDev			StDev
PESO	918,60	230,40	PESO	953,60	252,90	PESO	977,60	341,40
GRASSO	4,84	0,77	GRASSO	5,12*	0,71	GRASSO	4,50	0,71
PROTEINE	4,08	0,43	PROTEINE	4,09	0,42	PROTEINE	3,96	0,56

**Tabella 13.** Valori medi( $\pm$  d.s.) della produzione di latte, grasso e proteine riferiti alle diverse combinazioni di SNP. Con \* , si indicano differenze significative ( $P<0,05$ ).

## 5. DISCUSSIONE

Lo studio del gene POU1F1 effettuato sull'ovino di razza Sarda al fine di evidenziare la presenza di alcuni SNP ha fornito interessanti informazioni.

I tre esoni sequenziati (2, 3, 6) del suddetto gene hanno permesso il confronto con le sequenze depositate in banca dati (Genebank AJ549205-207). Tale raffronto ha evidenziato una certa similitudine tra la sequenze da noi ottenute e quelle già depositate (Fig.19, 24, 29). Infatti, le diverse analisi SSCP effettuate hanno mostrato, nonostante le diverse condizioni di corsa da noi utilizzate (concentrazione del gel, durata della corsa, temperatura), una uniformità dei profili elettroforetici per tutti i campioni degli esoni 2 e 3 (Fig. 18 e 23). Tale dato non si accorda con quanto riscontrato in pecore portoghesi nelle quali sia l'esone 2 che quello 3 presentano due mutazioni (Bastos et al., 2006b). Precisamente l'esone 2 in posizione 58 mostra, anche se in solo 4 animali, una sostituzione di una G>A che comporta anche un cambiamento amminoacidico. Inoltre sempre nella stessa ricerca si sono riscontrati due polimorfismi in posizione 89 (G>A) e 105 (G>A) nel terzo esone. Nella nostra ricerca, solo per il sesto esone, è stato evidenziato un SNP nella regione in 3'UTR (Fig. 28, 29, 30) e precisamente una sostituzione G>A riscontrata solamente in eterozigosi (Fig. 30). Tale sostituzione non è stata segnalata in nessuna altra razza di ovini. Nell'ovino esistono pochi dati sulla relazione dei polimorfismi con i tratti produttivi. Anche nella nostra esperienza non è stato possibile effettuare nessun raffronto tra questo ed i tratti produttivi poiché è stato riscontrato un polimorfismo in un unico campione. È risaputo che la pecora Sarda è una ottima produttrice di latte e tale caratteristica deriva da specifici programmi di selezione che risalgono al primo ventennio del

900. Questo fatto ha portato ad ottenere pecore con elevati livelli produttivi e con buone caratteristiche qualitative del latte. Conoscendo l'influenza di alcuni ormoni come il GH sulla lattazione è plausibile pensare che gli animali selezionati siano quelli che presentano un assetto metabolico ormonale caratteristico per la produzione del latte. Inoltre considerate le interazioni tra POU1F1 e la somatropina si può ipotizzare che la selezione abbia portato ad una riduzione della variabilità genetica del gene oggetto della ricerca. Infatti, è stato dimostrato che la presenza di mutazioni in questo gene determina una diversa espressione del gene dell'ormone GH. La variante POU1F1- $\delta$  ovina mancante degli esoni 5 e 6 (Bastos et al., 2006a) non è in grado di trans attivare il promotore del GH ed agisce da repressore, riducendo la trans attivazione del "wildtype" in maniera significativa ( $P < 0,001$ ). Tale variante mostra anche un'azione analoga sul promotore della prolattina ( $P < 0,05$ ). Questo è confermato dalla maggiore variabilità trovata nel gene POU1F1 nelle pecore di razza rustica Churra da Turra Quente a triplice attitudine, razza caratterizzata da un'elevata variabilità genetica con produzioni giornaliere di latte comprese tra 0,25 e 1,5 litri (Bastos et al., 2001). Tuttavia, considerando che in Sardegna esistono piccoli gruppi di animali per nulla selezionati e, con caratteristiche definite ancestrali, sarebbe opportuno ampliare lo studio di questo gene utilizzando tali animali (ad esempio la pecora nera di Arbus) al fine di capire quanto la selezione abbia agito sulla variabilità dello stesso. Comunque, nonostante questa specie appartenga ai ruminanti ed abbia un'elevata similarità con le sequenze nucleotidiche del bovino e del caprino con i quali condivide un'elevata similarità genetica rafforzata per di più dallo stesso posizionamento sulla mappa di "linkage" di numerosi marcatori, POU1F1

compreso, recenti lavori (Lan et al., 2009c) sottolineano che nell'ovino esisterebbero differenze nelle mutazioni a carico del gene POU1F1.

Nella seconda specie studiata, la capra di razza Sarda, la sequenza del secondo esone del gene POU1F1 è risultata differente rispetto a quella dell'ovino (Fig.34). In questa razza, dei tre esoni analizzati, solo il secondo non ha mostrato polimorfismo (Fig. 35) come è stato trovato anche in altre razze (Lan et al., 2009c).

L'analisi del terzo esone ha evidenziato nella catena nucleotidica il ritrovamento di due nuovi SNP silenti, uno in posizione 42 (T>C) e l'altro in posizione 92 (C>T). Queste sostituzioni sono diverse da quelle riscontrate nelle capre di razza IMGWC, situate in posizione 113 (G>T) e 114 (G>T) nella sequenza nucleotidica dell'esone suddetto. Lan et al. (2009c) hanno evidenziato che queste mutazioni sono associate alla lunghezza della fibra. Inoltre, nello stesso esone nella razza Sarda sono state da noi riscontrate diverse sostituzioni nucleotidiche silenti in posizione 89 C>T, 95 T>A, 143 G>A e 145 T>C rispetto alla sequenza depositata in GenBank EU256136 (Fig. 48).

L'analisi del sesto esone ha evidenziato diversi polimorfismi in posizione 17 G>T, 58 T>G, 172 T>C, 92 3'UTR G>A, 110 3'UTR T>C.

La mutazione in posizione 17, determina un cambiamento amminoacidico di una alanina con una serina. Questi SNPs con l'eccezione del primo si accordano con quanto rilevato recentemente anche da Lan et al., 2007a,b,c; Lan et al., 2009a,b).

La mutazione in posizione 58, non determina un cambiamento amminoacidico (S241S), è stata correlata con la quantità di latte prodotto, con la prolificità, con il



peso ad un anno di età delle capre ( $P < 0,05$ ). In tali studi sui caprini (Lan et al., 2007b, c) si riscontra un'alta frequenza del genotipo TT ed una minore frequenza del TG con una assenza totale dell'omozigote GG. L'associazione dell'allele T con superiori *performances* è più evidente quando questo è in omozigosi.

Il codone che deriva dalla mutazione T>G, e cioè UCG, codifica sempre per la serina ma la sua efficienza è inferiore. Questa inferiorità deriverebbe dalla minore velocità di traduzione del mRNA nella proteina regolatrice oltre che ad una sua minore capacità di sintesi per il fenomeno noto come *Codon bias* (Lavner e Kotlar, 2005). Questo spiegherebbe l'assenza dell'omozigote GG nelle razze finora analizzate, infatti, la poca efficienza di traduzione determinerebbe una minore produzione della proteina del Pit1 con un effetto negativo sulle sopraindicate *performances*.

Precisamente nelle razze cinesi si è riscontrato che l'allele T presentava una frequenza compresa tra 0,60 e 1,00 (Lan et al., 2007a,b). Nella nostra ricerca i diversi allevamenti analizzati presentano una diversa frequenza per gli alleli suddetti (Tab. 9). In tutte e tre gli allevamenti è stata riscontrata la presenza del genotipo GG, assente come precedentemente detto nelle razze analizzate da altri autori [(Inner Mongolia White Cashmere (IMWC), Xinong sannen dairy (XS), Laoshan dairy (LS), Guanzhong dairy (GW), Guizhou Black (GB), Matou (MT), Bannjiao (BJ), Guizhou White (GW), Leizhou (LS)]. Nel complesso, nella razza Sarda le frequenze degli alleli T e G sono rispettivamente 0,78 e 0,22 e risultano paragonabili solo con alcune delle razze precedentemente citate (Leizhou, Matou). Pertanto, l'effetto di questo allele riscontrato sulle produzioni nelle razze cinesi non è stato evidenziato nel nostro studio. Tuttavia, visti i differenti risultati,

ulteriori approfondimenti saranno necessari per chiarire meglio l'effetto di questo SNP.

La mutazione in posizione 172, caratterizzata da una transizione T>C silente, comporta il cambiamento del codone AGT (serina) in AGC (serina) e corrisponde alla posizione dell'amminoacido 279 nella proteina matura (Lan et al., 2007a). Uno studio effettuato da Lan et al., 2009a su 13 razze indigene ha rilevato una predominanza del genotipo TT con una frequenza dell'allele compresa tra 0,757 e 0,976. Il genotipo TT risulta associato ad una maggiore produzione di latte, mentre il TC ad un più elevato peso alla nascita. Il genotipo TT è risultato predominante in alcune razze da latte e da cashmere cinesi. In quelle da carne invece la predominanza dell'omozigote TT sull'eterozigote TC è dipendente dalla razza.

Nella capre di razza Sarda analizzate la frequenza dell'allele T è stata di 0,82 mentre per l'allele C di 0,08, quindi come per altre razze da latte la prevalenza è per l'omozigote TT.

La terza mutazione nel 92 nucleotide in 3'della regione non tradotta (UTR) consiste in una transizione G>A ed è stata individuata in eterozigosi in alcuni dei nostri campioni sequenziati. Poiché però non determina la creazione di un sito di restrizione e non determina modificazioni del profilo elettroforetico, la sua identificazione è rilevabile solo con il sequenziamento. Per tale motivo non è stata possibile ricercarla nei nostri campioni.

Una quarta mutazione, nella posizione 110 della regione 3' UTR, una transizione T>C rintracciabile con l'enzima di restrizione *PstI* è risultata associata a differenti produzioni di cashmere (Lan et al., 2009b). In questo studio gli

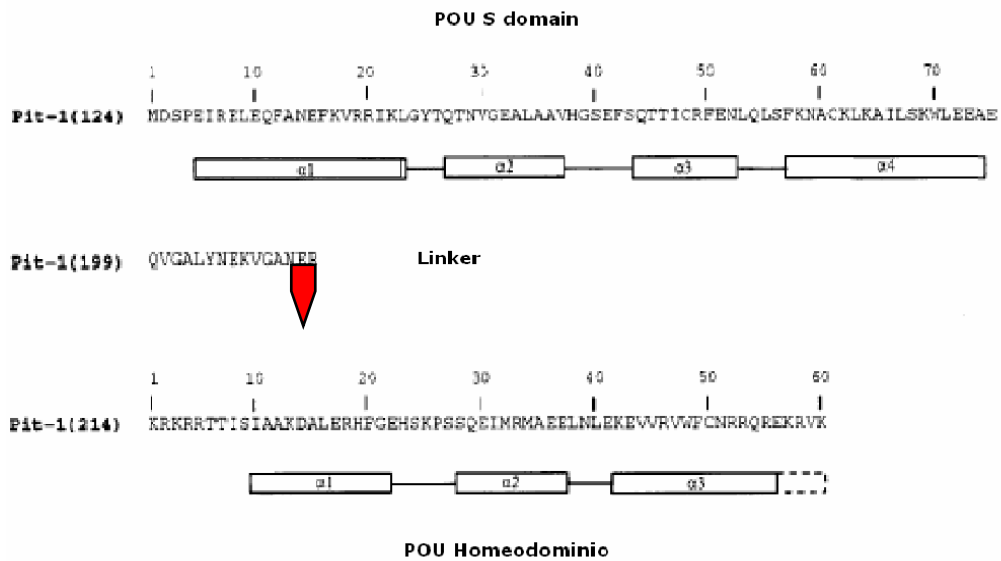
animali di 2, 4, 5 anni di età con genotipo TT, appartenenti alla razza Inner Mongolia White Cashmere, presentavano una produzione in peso superiore di filato, come pure una produzione media maggiore rispetto agli individui con genotipo TC. Nessun genotipo CC è stato riscontrato anche se gli autori ne segnalano la presenza in altre razze. In quella popolazione le frequenze alleliche per gli alleli T e C erano rispettivamente 0,959 e 0,041. Tra gli allevamenti da noi analizzati solo in quello di Orotelli si è trovato un animale con genotipo CC (Fig. 71, Tab. 9). In generale la razza Sarda ha mostrato una frequenza dell'allele T di 0,96, per C di 0,04. Le frequenze alleliche riscontrate collimano con quelle della razza IMWC.

Oltre queste mutazioni segnalate in bibliografia e riscontrate tutte nella razza Sarda abbiamo trovato una nuova mutazione nel 17 nucleotide del sesto esone che provoca il cambiamento di una G>T. Nella razza sarda complessivamente l'allele G ha una frequenza di 0,85 mentre l'allele T 0,15.

Tutte le sostituzioni trovate nei tre allevamenti risultano in equilibrio di Hardy Weinberg con  $P > 0,05$  per  $\chi^2$  (Tab. 9).

La sostituzione G>T in posizione 17 nel sesto esone comporta nella proteina matura una sostituzione di una alanina con una serina. L'alanina è un amminoacido non polare che presenta come gruppo laterale un metile; dopo la glicina è il più piccolo degli amminoacidi. La serina è un amminoacido polare in quanto reca come gruppo laterale un ossidrile, tale gruppo aumenta la capacità la reattività.(Fig. 67)

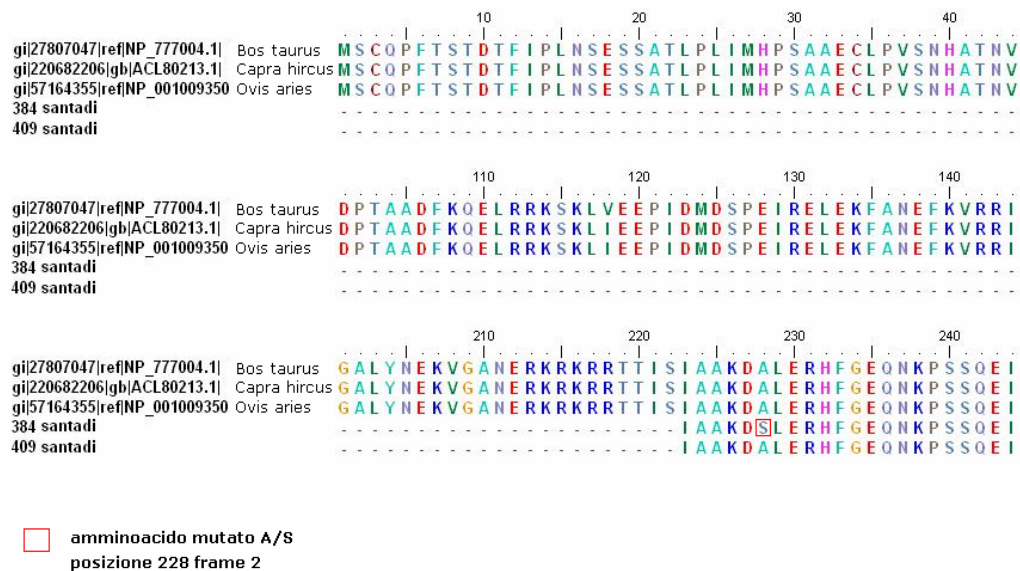
Tale mutazione si verifica nell'elica  $\alpha 1$  del POU omodominio della proteina POU1F1 e tale sostituzione potrebbe influire sulla conformazione della proteina.



**Figura 76.** Schema relativo alle sequenze aa dei diversi domini della proteina e localizzazione della sostituzione aa derivata dal SNP G>T in posizione17.

La posizione 220 è occupata sempre dall'alanina in diverse specie di ruminanti della famiglia bovidi come si può vedere nella figura 77.

### Allineamento del fattore di trascrizione POU1F1 nei ruminanti



**Figura 77.** Allineamento della proteina POU1F1 nei ruminanti.

Nel complesso, possiamo affermare che le popolazioni caprine di razza Sarda presentano un'ampia variabilità genetica al locus del gene POU1F1.

L'analisi statistica ha evidenziato che la sostituzione al nucleotide 17 nel sesto esone allo stato di omozigosi è significativamente correlata con la produzione di latte  $P < 0,05$  e con un contenuto minore in proteine. Lo stato di eterozigosi invece determina una maggiore produzione di grasso  $P < 0,05$  (Tab. 12).

Le altre sostituzioni in posizione 58, 110, 172, considerate singolarmente, non determinano effetti sulle performances degli animali studiati.

Tra le 13 combinazioni di sostituzioni nucleotidiche, riscontrate nella razza Sarda nel sesto esone del gene POU1F1 (Tab.10), la più rappresentata risulta la combinazione 15 (profilo SSCP A), seguita dalla 13 (profilo SSCP A), dalla 17 (profilo SSCP F) e dalla 16 (profilo SSCP F) (Fig. 75).

Nei siti di mutazione in posizione 17 e 58 si rileva un'elevata frequenza dello stato di eterozigosi GT e TG rispetto a quanto trovato per i siti di mutazione in posizione 172 e 110 3'UTR.

Nel caso della sostituzione C>T (EU256136) in posizione 92 nel terzo esone la presenza dell'allele C in omozigosi è significativamente correlata con una maggiore percentuale di grasso  $P < 0,001$  e di proteine  $P < 0,05$  (Tab. 11). Infatti i soggetti con genotipo CC mostrano una maggiore produzione di grasso e proteine rispetto agli eterozigoti CT ed omozigoti TT. Questo genotipo risulta il più frequente nella popolazione studiata e l'unico trovato nella razza IMWC (Lan et al. 2009c). Tale polimorfismo non è stato rilevato nelle ricerche effettuate precedentemente (Lan et al., 2009c) in quanto non sono stati mai riscontrati soggetti eterozigoti CT ed omozigoti TT. Questi autori tuttavia individuano nel

terzo esone, diversi SNPs alcuni dei quali risultano associati con maggiori performances produttive.

L'effetto da noi riscontrato sulle produzioni è da tenere in considerazione al fine di una selezione mirata degli animali nel caso della razza Sarda.

L'associazione dei polimorfismi, indicati da noi con dei numeri progressivi in (Tab. 10), in posizione 17, 58, 172 e 110 ha mostrato influenzare diverse caratteristiche produttive. La presenza in omozigosi della Timina in tutte le posizioni di mutazione indicate sopra determina una maggiore produzione di latte (Tab. 12). Invece la presenza dell'omozigote GG in posizione 17, lo stato di eterozigosi GT in 58 e lo stato di omozigosi TT in tutti gli altri siti di mutazione (172 TT, 110 3' UTR TT) determina un incremento della produzione delle proteine (Tab. 13).

Infine, lo stato di eterozigosi TG in posizione 17 e 58 con lo stato di eterozigosi in posizione 172 TC (Tab. 13) comporta un incremento della percentuale di grasso nel latte.

I risultati da noi ottenuti si accordano in parte con quanto evidenziato in precedenti studi (Lan et al., 2007a,b,c; Lan et al., 2009a,b,c). Infatti questi autori hanno riportato che i polimorfismi in posizione 58 e 172 e 110 determinano considerati singolarmente un incremento della produzione di latte (Lan et al., 2007a, Lan et al., 2009a); della prolificità e del peso alla nascita (Lan et al., 2007b,c), della produzione e lunghezza della fibra cashmere (Lan et al., 2009b,c) I nostri dati mostrano che risulta importante l'associazione dei diversi SNPs e che tale associazione influenza positivamente o negativamente le produzioni.

Inoltre, gli effetti riscontrati nella nostra ricerca confermano l'importante ruolo svolto da questo gene nell'influenzare le performances produttive dei caprini.

## 6. CONCLUSIONI

I nostri dati hanno aggiunto informazioni nuove sul gene POU1F1 degli ovini e caprini di razza Sarda. Infatti, fino ad oggi, non si conoscevano le sequenze di alcuni tratti codificati del gene suddetto in queste razze ovi-caprine.

In particolare è emerso che questo gene nella pecora di razza Sarda non presenta diversità contrariamente a quanto rilevato nell'unica razza studiata finora (Churra de Turra Quente). Tale omogeneità probabilmente deriva dalla spinta selettiva operata in questi anni per ottenere animali altamente produttivi.

Invece nella capra Sarda la variabilità genetica è elevata ed alcuni polimorfismi sono diversi da quelli osservati in razze caprine cinesi.

Gli SNPs individuati, sia singolarmente che in associazione, influenzano diverse caratteristiche produttive. Precisamente il polimorfismo a carico del sesto esone in posizione 17 determina una maggiore produzione di latte (TT) e di grasso (GT). Il medesimo SNP associato con quello in posizione 58 e 172 influenza diverse caratteristiche produttive.

Inoltre il polimorfismo riscontrato in posizione 92 nel terzo esone, individuato nella nostra ricerca per la prima volta, è correlato con la percentuale di grasso e proteine.

I nostri dati confermano che questo gene ha una notevole influenza sulle produzioni sia quantitative che qualitative.

Per quanto riguarda gli SNP individuati nella nostra ricerca in posizione 92 del 3° esone e 17 del 6° esone abbiamo inoltre indicato un metodo veloce ed accurato per la rilevazione tramite tecnica RFLP.



Sulla base dei dati ottenuti possiamo dire che sarebbe interessante proseguire l'indagine ampliando lo studio ad un numero maggiore di animali studiati al fine di rafforzare i risultati ottenuti e quindi poter utilizzare poi tali polimorfismi come utili marcatori nella selezione genetica dei caprini.

Inoltre sarebbe opportuno estendere lo studio anche ai rimanenti esoni per valutarne la variabilità e le eventuali relazioni con le caratteristiche produttive.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.

Amar A.P. and Weiss M.H. 2003. Pituitary anatomy and fisiology. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 14: 11-23.

Anthony R.V., Liang R., Gellersen B. Bonhoff A., Hunt N. and Bohnet H.G. 1991. Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinol.* 129: 158–168.

Anthony R.V., Liang R., Kayl E.P., and Pratt S.L. 1995. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant *placentae*. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49: 83–95.

Archetti M. 2004. Codon usage bias and mutation constraints reduce the level of error minimization of the genetic code. *J. Mol. Evol.* 59: 258–266.

Asdell S.A. 1932. The effect of the injection of hypophyseal extract in advanced lactation. *Am. J. Physiol.* 100: 137-140.

Ashwell M.S., Heyen D.W., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Da Y., VanRaden P.M., Ron M., Weller J.I. and Lewin H.A. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 87: 468–475.

Azevedo J., Mascarenhas M., Valentim R., Almeidal J., Silva S., Pires S. and Teixeira M. 1994. Preservação e Valorização dos Ovinos da Raça Churra da Terra Quente. Relatório Final do Projecto PAN I da Associação Nacional de Criadores de Ovinos Churra da Terra Quente, Torre de Moncorvo, Portugal.

Balanini D. 2001. Zootecnia applicata. Avicunicoli e allevamenti alternativi. Edagricole. Bologna.

Baldwin R.L. and Knapp J.R. 1993. Recombinant bovine somatotropin's effects on patterns of nutrient utilization in lactating dairy cow. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 282S-286S.

Balsa J.A., Sánchez-Franco F., Lorenzo M.J., Pazos F., Lara J.I. and Cacicedo L. 1996. Autoparacrine action of vasoactive intestinal peptide on dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology.* 137: 508–513.

Banky Z., Nagy G.M. and Halasz B. 1994. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology.* 59: 63–71.

Barber M.C., Clegg R.A, Finley E., Vernon R.G and Flint D.J. 1992. The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *J. Endocrinol.* 135: 95–202.

Bastos E., Ávila S., Cravador A., Renaville R., Guedes-Pinto H. and Castrillo J.L. 2006a. Identification and characterization of four splicing variants of ovine POU1F1 gene. *Gene* 382: 2–19.

Bastos E., Cravador A., Azevedo J. and Guedes-Pinto H. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in the Portuguese indigenous sheep breed “Churra da Terra Quente”. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5: 7–15.

Bastos E., Santos I., Parmentier I., Castrillo J.L., Cravador A., Guedes-Pinto H. and Renaville R. 2006b. *Ovis aries* POU1F1 gene: cloning, characterization and polymorphism analysis. *Genetica*. 126: 303–314.

Bauman D.E. 1992. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 75: 3432-3451.

Bauman D.E. and Currie W.B. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanism involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.* 63: 1514-1529.

Bauman D.E. and Vernon R.G. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Ann. Rev. Nutr.* 13: 437-461.

Bauman D.E., Eisenman J.H. and Currie W.B. 1982. Hormonal effects on partitioning of nutrients for tissue growth: role of growth hormone and prolactin. *Fed. Proc.* 41: 2538-2544.

Ben-Jonathan N. 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr. Rev.* 6: 564–589.

Berczi I. and Nagy E. 1982. A possible role of prolactin in adjuvantarthritis. *Arthritis Rheum.* 25: 591–594.

Berelowitz N., Szabo M., Frohman L.A., Firestone S. and Chun L. 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science.* 212: 1279-1281.

Bernton E.W., Meltzer M.S. and Holaday J.W. 1988. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science.* 239: 401–404.

Bethea C.L. and Neill J.D. 1979. Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinol.* 104: 870–876.

Blake C.A. 1974. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats. *Endocrinol.* 94: 503–508.

Blake C.A. 1976. Effects of pinealectomy on the rat oestrous cycle and pituitary gonadotrophin release. *J. Endocrinol.* 69: 67–75.

Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J. and Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science.* 179: 77-79.

Bridges R.S. 1994. The role of lactogenic hormones in maternal behavior in female rats. *Acta Paediatr.* 83 (S397): 33–39.

Bridges R.S., Numan M., Ronsheim P.M., Mann P.E. and Lupini C.E. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid treated, nulliparous female rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 8003–8007.

Briskin C., Kaur S., Chavarria T.E., Binart N., Sutherland R.L., Weimberg R.A., Kelly P.A. and Ormandy C.J. 1999. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev. Biol.* 210: 96–106.

Brunsch C., Sternstein I., Reinecke P. and Bieniek J. 2002. Analysis of associations of PIT1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs. *J. Appl. Genet.* 43: 85–91.

Buskila D. and Shoenfeld Y. 1996. Prolactin, bromocriptine and autoimmune diseases. *Isr. J. Med. Sci.* 32: 23–27.

Carcangiu V., Vacca G.M., Bini P.P., Parmeggiani A., Ortu A. e Nuvoli P. 1997. Parametri metabolici, GH, PRL durante la lattazione in capre primipare di razza Sarda con diversi livelli produttivi. *Atti So. Fi. Vet.* 2: 192-198.

Carlson D.E., Klemcke H.G. and Gann D.S. 1990. Response of prolactin to hemorrhage is similar to that of adrenocorticotropin in swine. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 258: R645–R649.

Caron M.C., Beaulieu M., Raymond V., Gagné B., Drouin J., Lefkowitz J. and Labrie F. 1978. Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. Correlation of [<sup>3</sup>H]dihydroergocryptine binding with the dopaminergic control of prolactin release. *J. Biol. Chem.* 253: 2244-2253.

Carrijo S.M., Regitano L.C.A., Alencar M.M. and Toral F.L.B. 2003. Influência das variantes genéticas do gene Pit1 sobre características de produção de carne em animais da raça Canchim. *Proceedings of the 49th Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP, Brasil.*

Chen R., Ingraham H., Treacy M.N., Albert V.R., Wilson L. and Rosenfeld M.G. 1990. Autoregulation of PIT-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature.* 346: 583–586.

Chung H.O., Kato T., Tomizawa K. and Kato Y. 1998. Molecular cloning of pit-1 cDNA from porcine anterior pituitary and its involvement in pituitary stimulation by growth hormone-releasing factor. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106 (3): 203–210.

Clapp C., Torner L., Gutiérrez-Ospina G., Alcántara e López-Gómez F.J., Nagano M., Kelly P.A., Mejía S., Morales M.A. and Martínez de la Escalera G. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic neurohypophyseal

system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91: 10384–10388.

Cohen L.E., Wondisford F.E. and Radovick S. 1995. Role Of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin and thyrotropin. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25: 523-540.

Cohen L.E. and Radovick S. 2002. Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr. Rev.* 23: 431-442.

Cooke N.E., Coit D., Shine E.J., Baxter J.D. and Martial J.A. 1981. Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.* 256: 4007–4016.

Curi R.A., Palmieri D.A., Suguisawa L., de Oliveira H.N., Silveira A.C. and Lopes C.R. 2006. Growth and carcass traits associated with GH1/Alu I and POU1F1/Hinf I gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. *Genet. Mol. Biol.* 29: 56-61.

Curlewis J.D., Kusters D.H.L, Barclay J.L. and Anderson S.T. 2002. Prolactinreleasing peptide in the ewe: cDNA cloning, mRNA distribution and effects on prolactin secretion in vitro and in vivo. *J. Endocrinol.* 174: 45–53.

Daughaday W.H., Hall K., Salmon W.D. Jr., Van den Brande J.L. and Van Wyk J.J. 1987. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 1075-1076.

Dasen J.S. and Rosenfeld M.G. 2001. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Ann. Rev. Neurosci.* 24: 327-355.

Debenedetti A. 1998. *Endocrinologia*. In: Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. – *Endocrinologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET, Torino, 655-768.

De Palo E.F., Gatti R., Antonelli G. and Spinella P. 2006. Growth hormone isoforms, segments/fragments: does a link exist with multifunctionality? *Clin. Chim. Acta.* 364: 77-81

Di Stasio L., Sartore S. and Alberta A. 2002. Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Anim. Genet.* 33: 61-64.

Drago F., D'Agata V., Spadaro F., Grassi M. and Valerio C. 1990. Prolactin as a protective factor in stress-induced gastric ulcers. *Ann. NY Acad. Sci.* 597: 248–251.

Edwards III C.K., Ghiasuddin S.M., Schepper J.M., Yunger L.M., Kelley K.W. 1988. A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. *Science.* 239: 769–771.

Etherton T.D. and Bauman D.E. 1998. The biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 78: 745-761.

Falconer I.R. and Rowe J.M. 1975. Possible mechanism for action of prolactin on mammary cell sodium transport. *Nature.* 256: 327–328.

Falconer I.R., Langley J.V. and Vacek A.T. 1983. Effect of prolactin on <sup>86</sup>Rb<sup>1</sup> uptake, potassium content and [<sup>3</sup>H]ouabain binding of lactating rabbit mammary tissue. *J. Physiol.* 334: 1–17.

Fu Y.K., Arkins S., Fuh G., Cunningham B.C., Wells J.A., Fong S., Cronin M.J., Dantzer R. and Kelley K.W. 1992. Growth hormone augments superoxide anion secretion of human neutrophils by binding to the prolactin receptor. *J. Clin. Invest.* 89: 451–457.



Fletcher-Chiappini S.E., Compton M.M., Lavoie H.A., Day E.B. and Witorsch R.J. 1993. Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb2 lymphoma cells: Antiproliferative vs. anticytolytic effects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202: 345–352.

Franco M.M., Antunes R. C., Silva H.D. and Goulart L.R. 2005. Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. *J. Appl. Genet* 46: 195-200.

Frawley L.S., Boockfor F.R. and Hoeffler J.P. 1985. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinol.* 116: 734–737.

Freeman M.E. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill J.D., New York: Raven, p. 613–658.

Fujii R., Fukusumi S., Hosoya M., Kawamata Y., Habata Y., Hinuma S., Sekiguchi M., Kitada C., Kurokawa T., Nishimura O., Onda H., Sumino Y. and Fujino M. 1999. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul. Pept.* 83: 1–10.

Fujikawa T., Soya H., Yoshizato H., Sakaguchi K., Doh-Ura K., Tanaka M. and Nakashima K. 1995. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology.* 136: 5608–5613.

Gala R.R. 1990. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 6: 1407–1420.

Gala R.R. and Haisenleder D.J. 1986. Restraint stress decreases afternoon plasma prolactin levels in female rats, influence of neural antagonist and agonists on restraint-induced changes in plasma prolactin and corticosterone. *Neuroendocrinology*. 43: 115–123.

Gala R.R. and Shevach E.M. 1994. Evidence for the release of a prolactinlike substance by mouse lymphocytes and macrophages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205: 12–19.

Gertler A., Weil A. and Cohen N. 1982. Hormonal control of casein synthesis in organ culture of the bovine lactating mammary gland. *J. Dairy Res.* 49: 387-398.

Gluckman P.D. 1984. Functional maturation of the neuroendocrine axis in the perinatal period: studies of the somatotrophic axis in the ovine fetus. *J. Dev. Physiol.* 6: 301- 312.

Goodman H.M. 1981 Separation of early and late responses of adipose tissue to growth hormone. *Endocrinol.* 109: 120-129.

Griffond B., Deray A., Jacquemard C., Fellmann D. and Bugnon C. 1994. Prolactin immunoreactive neurons of the rat lateral hypothalamus: immunocytochemical and ultrastructural studies. *Brain Res.* 635: 179-186.

Guilleminin R., Brazeau P., Bohlen P., Esch F., Ling N. and Wehrenberg W.B. 1982. Growth hormone releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218: 585-587.

Hall K. and Sara V.R. 1984. Somatomedin in childhood, adolescence and adult life. *Clin. Endocrinol. Met.* 13: 91-112.

Hammond J. 1952. Physiological limits to intensive production in animals. *Br. Agric. Bull.* 4: 222-224.

Hart I.C., Chadwick P.M.E., Boone T.C., Rangely K.E., Rudman C. and Sowre L.M. 1984. A comparison of the growth-promoting, lypolitic, diabetogenic and immunological properties of pituitary and recombinant-DNA-derived bovine growth hormone. *J. Biochem.* 224: 93-100.

Hart I.C., Chadwick P.M.E., Coert A., James S. and Simmonds A.D. 1985. Effect of different growth hormone-releasing factor on the concentration of growth hormone, insulin and metabolites in the plasma of sheep maintained in positive and negative energy balance. *J. Endocrinol.* 105: 133-139.

Hart I.C., Flux D.S., Andrews P. and Mcnelly A.S. 1975. Radioimmunoassay for ovine and caprine growth hormone. Its application to to measurement of basal circulating level of growth hormone in the goat. *Horm. Metab. Res.* 7: 35-41.

Heizer E.M. Jr, Raiford D.W., Raymer M.L., Doom T.E., Miller R.V. and Krane D.E. 2006. Amino acid cost and codon-usage biases in 6 Prokaryotic genomes: a whole-genome analysis. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1670-1680.

Hintz R.L. 1984. Plasma form of somatomedin and the binding protein phenomenon. *Clin. Endocrinol. Metab.* 13: 31-42.

Hinuma S., Habata Y., Fujii R., Kawamata Y., Hosoya N., Fukusumi S., Kitada C., Masuo Y., Asano T., Matsumoto H., Sekiguchi M., Kurokawa T., Nishimura O., Onda H. and Fujino M. 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393: 272–276.

Holloway J.M., Szeto D.P., Scully K.M., Glass C.K. and Rosenfeld M.G. 1995. Pit-1 binding to specific DNA sites as a monomer or dimer determines

gene-specific use of a tyrosine dependent synergy domain. *Gene Dev.* 9: 1992-2006.

Horseman N., Zhao W., Montecino-Rodriguez E., Tanaka M., Nakashima K, Engle S.J., Smith F., Markoff E. and Dorshkind K. 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J.* 16: 6926–6935.

<http://www.align.genome>.

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Huang L., Nie W., Wang J., Su W. and Yang F. 2005. Phylogenomic study of the subfamily “Caprinae” by cross-species chromosome painting with Chinese muntjac paints. *Chromosome Res.* 13: 89–399.

Huang W., Maltecca C. and Khatib H. 2008. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. *Anim. Genet.* 39: 554–557.

Huhman K.L., Mougey E.H., Moore T.O. and Meyerhoff J.L. 1995. Stressors, including social conflict, decrease plasma prolactin in male golden hamsters. *Horm. Behav.* 29: 581–592.

Ingraham, H.A., Flynn S.E., Voss J.W., Albert V.R., Kapiloff M.S, Wilson L. and Rosenfeld M.G. 1990. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence specific, high affinity DNA binding and DNA dependent Pit 1-Pit 1 interactions. *Cell* 61: 1021-1033.

Ingraham H.A., Albert V.R., Chen R., Crenshaw E.B., Elsholtz H.P., Kapiloff M.S., Mangalam H.J., Swanson L.W., Treacy M.N. and Rosenfeld M.G. 1999. A

family of POU-domain and PIT1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Annual Rev. Physiol.* 52: 773-791.

FIL-IDF: Standard 141C:2000. Whole milk-Determination of milk fat, protein and lactose content-Guide for the operation of mid-infra-red instruments.

Jacobson E.M., Li P., Leon-del-Rio A., Rosenfeld M.G. and Aggarwal A.K. 1997. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev.* 11: 198-212.

Jarry Y.H., Heuer H., Schomburg L. and Bauer K. 2000. Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo. *Neuroendocrinol.* 71: 262–267.

Jiang R., Li J., Qu L., Li H. and Yang N. 2004. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate. *Anim. Genet.* 35: 344–346.

Jurcovicova J., Le T. and Krulich L. 1989. The paradox of  $\alpha_2$  adrenergic regulation of prolactin (PRL) secretion. II. PRL-releasing action of the  $\alpha_2$  receptor antagonists. *Brain Res. Bull.* 23: 425–432.

Jurcovicova J., Kvetnansky R., Dobrakovova M., Jezova D., Kiss A. and Makara GB. 1990. Prolactin response to immobilization stress and hemorrhage: the effect of hypothalamic deafferentations and posterior pituitary denervation. *Endocrinology* 126: 2527–2533.

Jurcovicova J., Day R.N. and Macleod R.M. 1993. Expression of prolactin in rat lymphocytes. *Prog. Neuroendocrinim.* 5: 256–263.

Kai X., Chen H., Wang S., Xin K., Liu B., Zhang C.F., Lei C.Z., Wang X.Z., Wang Y.M. and Niu H. 2006. Effect of genetic variations of the POU1F1 gene on growth traits of Nanyang cattle. *Acta Genetica Sinica.* 33: 901-907.

Kanaya S., Yamada Y., Kudo Y. and Ikemura T. 1999. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 238: 143–155.

Kanaya S., Yamada Y., Kinouchi M., Kudo Y. and Ikemura T. 2001. Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage assessed by multivariate analysis. *J. Mol. Evol.* 53: 290–298.

Kansaku N., Ohkubo T., Guémenè D., Kühnlein U. and Zadworny D. 2007. Molecular cloning of Pit-1 cDNA and genomic DNA of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Anim.Sci. J.* 78: 180–188.

Kanuka H., Matsuyama S., Ohnishi M., Matsumoto Y., Nishihara M. and Takahashi M. 1997. Prolactin expresses differential effects on apoptotic cell death of luteal cells in vivo and in vitro. *Endocr. J.* 44: 11–22.

Kausel G., Vera M.I., San Martin R., Figuero J., Molina A., Muller M., Martial J. and Krauskopf M. 1999. Transcription factor pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: Identification of two pit-1 genes in the carp. *J. Cell. Biochem.* 75: 598–609.

Keeler D.G., Smith V.G., Coulter G.H. and King G.J. 1979. Serum growth hormone concentration in Hereford and Angus calves: Effect of breed, sire, age of dam and diet. *Can. J. Anim. Sci.* 59: 367-378.

Kehoe L., Janik J. and Callahan P. 1991. Effects of immobilization stress on tubero infundibular dopaminergic (TIDA) neuronal activity and prolactin levels in lactating and non-lactating female rats. *Life Sci.* 50: 55–63.

Kennaway D.J., Dunstan E..A, Gilmore T.A and Seamark R.F. 1982. Effects of shortened daylength and melatonin treatment on plasma prolactin and melatonin levels in pinealectomised and sham-operated ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 287–294.

Kirchgessner M., Windisch W., Schwab W. and Muller H.L. 1991. Energy metabolism of lactation dairy cow treated with prolonged-release bovine somatotropin or energy deficiency. *J. Dairy. Sci.* 74 (2): 35-43.

Konigsberg W. and Godson N. 1983. Evidence for use of rare codons in the dna G gene and other regulatory genes of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 80 (3): 687–691.

Lan X.Y., Pan C.Y., Chen H., Zhang C.L., Li J.Y., Zhao M., Lei C.Z., Zhang A.L. and Zhang L. 2007a. An *AluI* PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat *POU1F1* locus and its association with production traits. *Small Rumin. Res.* 73: 8–12.

Lan X.Y., Pan C.Y., Chen H. and Lei C.Z. 2007b. A *DdeI* PCR-RFLP detecting genetic variation of goat *POU1F1* gene. *Can J. Anim. Sci.* 87: 13-14.

Lan X.Y., Pan C.Y., Chen H., Lei C.Z., Hua L.S., Yang X.B., Qiu G.Y., Zhang R.F. and Lun Y.Z. 2007c. *DdeI* polymorphism in coding region of goat *POU1F1* gene and its association with production traits. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 20:1 342-1348.

Lan X.Y., Li M.J., Chen H., Zhang L.Z., Jing Y.J., Wei T.B., Ren G., Wang X., Fang X.T., Zhang C.L. and Lei C.Z. 2009a. Analysis of caprine pituitary specific transcription factor-1 gene polymorphism in indigenous Chinese goats. *Mol. Biol. Rep.* 36: 705-709.

Lan X.Y., Shu J.H., Chen H., Pan C.Y., Lei C.Z., Wang X., Liu S.Q. and Zhang.Y.B. 2009b. A *Pst*I polymorphism at 3' UTR of goat POU1F1 gene and its effect on cashmere production. *Mol. Bio. Rep.* 36: 1371–1374.

Lan X.Y., Pan C.Y., Li J.Y., Guo Y.W., Hua S., Wang J., Liu Y.B., Hua S.R., Lei C.Z. and Chen H. 2009c. Twelve novel SNPs of the goat POU1F1 gene and their associations with cashmere traits. *Small Rumin. Res.* 85: 116–121.

Laurent F., Vignon B., Coomans D., Wilkinson J. and Bonnel A. 1992. Influence of bovine somatotropin on the composition and manufacturing properties of milk. *J. Dairy Sci.* 75: 2226-2234.

Lavner Y. and Kotlar D. 2005. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene.* 345: 127–138.

Lavoie H.A. and Witorsch R.J. 1995. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209: 257–269.

Li S., Crenshaw III E.B., Rawson E.J., Simmons D.M., Swanson L.W. and Rosenfeld M.G. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene PIT-1. *Nature.* 347: 528–533.

Lookingland K.J., Gunnet J.W., Toney T.W. and Moore K.E. 1990. Comparison of the effects of ether and restraint stress on the activity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in female and male rats. *Neuroendocrinology.* 52: 99–105.

Lorens J.B., Aasland R., Brunstad H., Bergh H. and Male R. 1996. Two variants of the pituitary specific transcription factor Pit-1 in Atlantic salmon. *J. Mol. Endocrinol.* 17: 225–236.



Maddox J.F., Davies K.P., Crawford A.M., Hulme D.J., Vaiman D., Cribiu E.P., Freking B.A., Beh K.J., Cockett N.E., Kang N., Riffkin C.D., Drinkwater R., Moore S.S., Dodds K.G., Lumsden J.M., van Stijn T.C., Phua S.H., Adelson D.L., Burkin H.R., Broom J.E., Buitkamp J., Cambridge L., Cushwa W.T., Gerard E., Galloway S.M., Harrison B., Hawken R.J., Hiendleder S., Henry H.M., Medrano J.F., Paterson K.A., Schibler L., Stone R.T. and van Hest B. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11: 1275–1289.

Maddox J.F. 2005. A presentation of the differences between the sheep and goat genetic maps. *Genet. Select. Evol.* 37: S1–S10.

Maddox J.F. and Cockett N.E. 2007. An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. *Small Ruminant Res.* 70: 14-20.

Majumdar S., Irwin D.M. and Elsholtz H.P. 1996. Selective constraints on the activation domain of transcription factor Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10256–10261.

Matsumoto H., Noguchi J., Horikoshi Y., Kawamata Y., Kitada C., Hinuma S., Onda H., Nishimura O. and Fujino M. 1999. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 321–324.

McMahon C.D., Radcliff R.P., Lookingland K.J. and Tucker H.A. 2001. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20: 65-87.

Minamitani N., Minamitani T., Lechan R.M., Bollinger-Gruber J. and Reichlin S. 1987. Paraventricular nucleus mediates prolactin secretory responses to

restraint stress, ether stress, and 5-hydroxy-L-tryptophan injection in the rat. *Endocrinology*. 120: 860–867.

Miyata I., Vallette-Kasic S., Saveanu A., Takeuchi M., Yoshikawa H., Tajima A., Tojo K., Reynaud R., Gueydan M., Enjalbert A., Tajima N., Eto Y. and Brue T. 2006. Identification and functional analysis of the novel S179R POU1F1 mutation associated with combined pituitaryhormone deficiency. *The J. Clin. Endocrin. Metab.* 91:4981–4987.

Mol J.A. and Meij B.P. 2008. Pituitary function. In: “Clinical Biochemistry of Domestic Animals”. 6<sup>th</sup> edition. Elsevier Inc., pp.561-604.

Moody D.E., Pomp D. and Barendse W. 1995. Restriction fragment length Polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene assignment of PIT1 to bovine chromosome 1. *Anim. Genet.* 26: 45–47.

Morehead M.H. and Gala R.R. 1987a. Restraint stress depresses prolactin surges in pseudopregnant rats and adrenalectomy does not alter the response. *Life Sci.* 41: 1491–1498.

Morehead M.H. and Gala R.R. 1987b. The lack of a physiologic effect of the stress-induced decrease of the proestrous prolactin surge in the rat. *Life Sci.* 41: 2355–2362.

Morehead M.H. and Gala R.R. 1989. The restraint stress-induced decrease of the nocturnal prolactin surge and the physiology of pseudopregnancy and pregnancy in the rat. *Life Sci.* 45: 207–215.

Morishige W.K. and Rothchild I. 1974. A paradoxical inhibiting effect of ether on prolactin release in the rat: comparison with effect of ether on LH and FSH. *Neuroendocrinology*. 16: 95–107.

Moseley W.M., Krabill L.F., Friedman A.R. and Olsen R.F. 1985. Administration of synthetic human pancreatic growth hormone-releasing factor for five days sustains raised serum concentration of growth hormone in steers. *J. Endocrinol.* 104: 433- 439.

Nagy E. and Berczi I. 1981. Prolactin and contact sensitivity. *Allergy.* 36: 429–431.

Nagy E. and Berczi I. 1989. Pituitary dependence of bone marrow function. *Br. J. Haematol.* 71: 457–462.

Neidhart M. 1998. Prolactin in autoimmune diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 408–419.

Neill J.D. 1970. Effect of “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 87: 1192–1197.

Neill J.D. 1974. Prolactin: its secretion and control. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology. The Pituitary Gland and Its Neuroendocrine Control.* Washington, DC: Am. Physiol. Soc., sect. 7, vol. IV, p. 469–488.

Netchine I., Sobrier M.L., Krude H., Schnabel D., Maghnie M., Marcos E., Duriez B., Cacheux V., Moers A., Goossens M., Grüters A. and Amselem S. 2000. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* 25 (2): 182–186.

Nie Q., Lei M., Ouyang J., Zeng H., Yang G. And Zhang X. 2005. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet. Sel. Evol.* 37: 339-360.

Nie Q., Fang M., Xie L., Zhou M., Liang Z., Luo Z., Wang G., Bi W., Liang C., Zhang W. and Zhang X. 2008. The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. *BMC Genet.* 9: 20.

Nolin J.M. and Witorsch R.J. 1976. Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. *Endocrinology.* 99: 949–958.

Numan M. 1994. Maternal behaviour. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E. and Neill J.D. New York: Raven, p. 221–302.

Ono M. and Takayama Y. 1992. Structures of cDNAs encoding chum salmon pituitary-specific transcription factor, Pit-1/GHF-1. *Gene.* 116: 275–279.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* 86: 2766-2770.

Pagnacco G. 1997. *Genetica applicata alle produzioni animali.* Città Studi Edizioni.

Pan C., Lan X., Chen H., Guo Y., Shu J., Lei C. and Wang X. 2008. A TaqI PCR-RFLP detecting a novel SNP in Exon 2 of the Bovine POU1F1 Gen. *Biochem. Genet.* 46: 424–432.

Parker D.C., Morishima M., Koerber D.J., Gale C.C. and Goodman C.J. 1972. Pilot study of growth hormone of the chair-adapted baboon: potential as model of human sleep release. *Endocrinology.* 91: 1462-1467.

Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R. and Renaville R. 1999. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17: 139-148.

Peel C.J. and Bauman D.E. 1987. Somatropin and lactation. *J. Dairy Sci.* 70: 474-486.

Pfaffle R.W., Di Mattia G.E., Parks J., Brown M., Wit J.M., Jansen M., Van der Nat H., Van den Brande J.L., Rosenfel M.G. and Ingraham H.A. 1992. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science.* 257: 1118–1121.

Pieper D.R. and Gala R.R. 1979. The effect of light on the prolactin surges of pseudopregnant and ovariectomized, estrogenized rats. *Biol. Reprod.* 20: 727–732.

Plotsky P.M. and Neill J.D. 1982. Interactions of dopamine and thyrotropin releasing hormone in the regulation of PRL release in lactating rats. *Endocrinology.* 111: 168-173.

Radovick S. Nations M., Du Y., Berg L.A., Weintraub B.D. and Wondisford F.E. 1992. A mutation in the POU homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science.* 257: 1115–1118.

Raymond M. and Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity,* 86: 248-249.

Rawn J.D. 1990. *Biochimica.* Editore McGraw-Hill Libri Italia s.r.l, Milano, p. 672.

Renaville R., Gengler N., Parmentier I., Mriaux F., Massat S., Bertozzi C., Burny A. and Portetelle D. 1997a. Pit-1 gene *Hinf*I RFLP and growth traits in double muscled Belgian Blue cattle. *J. Anim. Sci.* 75: 146.

Renaville R., Gengler N., Vrech E., Prandi A., Massart S., Corradini C., Bertozzi C., Mortiaux F., Burny A. and Portetelle D. 1997b. PIT-1 gene

polymorphism, milk yield and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 80: 3431–3438.

Renaville R., Hammadi M. and Portetelle D. 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 351–360.

Reynaud R., Saveanu A., Barlier A., Enjalbert A. and Brue T. 2004. Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. *Growth Horm. IGF Res.* 14: 442–448.

Richards J.S. and Williams J.L. 1976. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology.* 99: 1571–1581.

Rivier J., Spiess J., Thorner M. and Vale W. 1982. Characterization of Growth hormone releasing from human pancreatic islet tumor. *Nature.* 300: 276-278.

Rothchild I. 1981. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Rec. Prog. Horm. Res.* 37: 183–298.

Russell S.M. and Spencer E.M. 1985. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibialepiphyseal growth in hypophysectomized rat. *Endocrinology.* 116: 2563-2567.

Russo V., Fontanesi L. e Davoli R. La genetica molecolare in zootecnia. [www.biolab.it/htmbank/ita/incontri/gen\\_zootecnia.pdf](http://www.biolab.it/htmbank/ita/incontri/gen_zootecnia.pdf). Accesso ottobre 2009.

Sinha Y.N. 1986. Structural variants of prolactin. In: *Pars Distalis of the Pituitary Gland—Structure, Function and Regulation*, edited by Yoshimura F and Gorbman A. Elsevier Science, Amsterdam, p. 399–412.

Sinha Y.N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* 16: 354–369.

Sheng H.Z., Zhadanov A.B., Mosinger B.Jr, Fujii T., Bertuzzi S., Grinberg A., Lee E.J., Huang S.P., Mahon K.A and Westphal H. 1996. Specification of pituitary cell lineages by the LIM Homeobox gene Lhx3. *Science* 272: 1004-1007.

Smith S.W. and Gala R.R. 1977. Influence of restraint on plasma prolactin and corticosterone in female rats. *J. Endocrinol.* 74: 303–314.

Song C.Y., Gao B., Teng Y., Wang X.Y., Wan Z.G., Li Q., Mi H.F., Jing R.B. and Mao J. 2005. MspI polymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their associations with growth performance. *J. Appl. Genet.* 46: 285-289.

Stančeková K., Vašíček D., Peškovičová D., Bulla J. and Kúbek A. 1999. Effect of genetic variability of the porcine pituitary specific transcription factor (PIT-1) on carcass traits in pigs. *Anim. Genet.* 30: 313–315.

Striker P. and Grueter F. 1928. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *Comptes Rendus.* 99: 1778-1980.

Sun H.S., Anderson L.L., Yua T.P., Kim K.S., Klind J. and Tuggle C.K. 2002. Neonatal Meishan pigs show POU1F1 genotype effects on plasma GH and PRL concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 223–237.

Sun P.Q, Lou L.M. and Maurer R.A. 1996. Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J. Biol. Chem.* 271: 3066–3073.

Supakorn C. 2009. The Important Candidate Genes in Goats - A Review. *Walailak J. Sci. Tech.* 6: 17-36.

Takahashi K., Daughaday W.H. and Kipnis D.M. 1971. Regulation of immunoreactive growth hormone. *Endocrinology*. 88: 909-917.

Tanaka M., Yamamoto I., Ohkubo T., Wakita M., Hoshino S. and Nakashima K. 1999. cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary. *Gen. Comp. Endocr.* 114: 441–448.

Tannenbaum G.S. and Martin J.B. 1976. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 98: 562-570.

Tashjian A.H.J., Barowsky N.J. and Jensen D.K. 1971. Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 516–523.

Thierry J-C. 1991. Monoamine content of the stalk median eminence and hypothalamus in adult sheep as affected by daylength. *J. Neuroendocrinol.* 3: 407–411.

Tindal J.S., Knaggs G.S., Hart I.C. and Blake L.A. 1978. Release of growth hormone in lactating and non-lactating goats in relation to behaviours, stages of sleep, electroencephalograms, environmental stimuli and levels of prolactin , insulin, glucose and free fatty acids in the circulation. *J. Endocrinol.* 76: 333-346.

Torner L., Mejía S., López-Gómez F.J., Quintanar A., Martínez de La Escalera G. and Clapp C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology*. 136: 5454–5460.



Tuggle C.K. and Freeman A.E. 1997. Genetic Marker for Improved Milk. US Patent 5: 614.364.

Turton J.P.G., Reynaud R., Mehta A., Torpiano J., Saveanu A., Woods K.S., Tiulpakov A., Zdravkovic V., Hamilton J., Attard-Montalto S., Parascandalo R., Vella C., Clayton P.E., Shalet S., Barton J., Brue T. and Dattani M.T. 2005. Novel mutations within the POU1F1 gene associated with variable combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 4762–4770.

Tyrrel H.F., Brown A.C.G., Reynolds J., Haaland G.L., Bauman D.E., Peel C.J. and Steinhour W.D. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: energy and nitrogen utilization as determined by respiratory calorimetry. *J. Nutr.* 118: 1024-1030.

Van As P., Buys N., Onagbesan O.M. and Decuyper E. 2000. Complementary DNA cloning and ontogenic expression of pituitary-specific transcription factor of chickens (*Gallus domesticus*) from the pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 27–136.

Van der Werf J.H.J., Marshall K. and Lee S. 2007. Methods and experimental designs for detection of QTL in sheep and goats. *Small Rum. Res.* 70: 21–31.

Vasilatos R. and Wangsness P.J. 1980. Diurnal variations in plasma insulin and growth hormone associated with two stages of lactation in high producing dairy cows. *Endocrinology.* 108: 300-304.

Vigue C., Thibault J., Thiery J.C., Tillet Y. and Malpoux B. 1996. Photoperiodic modulation of monoamines and amino-acids involved in the control of prolactin and LH secretion in the ewe: evidence for a regulation of tyrosine hydroxylase activity. *J. Neuroendocrinol.* 8: 465–47.

Vigue C., Thibault J., Thiery J.C., Tillet Y. and Malpoux B. 1997. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology*. 138: 499–506.

Weatherly K.L., Ramesh R., Strange H., Waite K.L., Storrie B. Proudman J.A. and Wong E.A. 2001. The turkey transcription factor Pit-1/GHF-1 can activate the turkey prolactin and growth hormone gene promoters in vitro but is not detectable in lactotrophs in vivo. *Gen. Comp. Endocr.* 123: 244–253.

Woollard J., Schmitz C.B., Freeman A.E. and Tuggle C.K. 1994. HinfI polymorphism at bovine PIT locus. *J. Anim. Sci.* 72: 3267.

Woollard J., Tuggle C.K. and Ponce de Leon F.A. 2000. Rapid communication: localization of POU1F1 to bovine, ovine, and caprine 1q21–22. *J. Anim. Sci.* 78: 242–243.

Xue K., Chen H., Wang S., Cai X., Liu B., Zhang C.F., Lei C.Z., Wang X.Z., Wang Y.M. and Niu H. 2006. Effect of genetic variations of the POU1F1 gene on growth traits of Nanyang cattle. *Acta Genetica Sinica* 33(10): 901–907.

Xu N., Chen C.Y. and Shyu A.B. 1997. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4611–4621.

Yamada S., Hata J. and Yamashita S. 1993. Molecular cloning of fish Pit-1 cDNA and its functional binding to promoter of gene expressed in the pituitary. *J. Biol. Chem.* 268: 24361–24366.

Yu T.P., Rothschild M.F. and Tuggle C.K. 1993. A MspI restriction fragment length polymorphism at the swine POU1F1 locus. *J. Anim. Sci.* 71: 2275.

Yu T.P., Schmitz C.B., Rothschild M.F. and Tuggle C.K. 1994. Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine PIT-1 gene. *Anim. Genet.* 25: 229–233.

Yu T.P., Tuggle C.K., Schmitz C.B. and Rothschild M.F. 1995. Association of PIT1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 73: 1282-1288.

Yu T.P., Wang L., Tuggle C.K. and Rothschild M.F. 1999. Mapping genes for fatness and growth on pig chromosome 13: a search in the region close to the pig PIT1 gene. *J. Anim. Breed. Genet.* 116: 269–280.

Yu T.P., Sun H.S., Wahls S., Sanchez-Serrano I., Rothschild M.F. and Tuggle C.K. 2001. Cloning of the full length pig PIT1 (POU1F1) cDNA and a novel alternative PIT1 transcript, and functional studies of their encoded proteins. *Anim. Biotech.* 12: 1–19.

Zhang S., Zubay G. and Goldman E. 1991. Low usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly, and primates. *Gene.* 105: 61–72.

Zhao Q., Davis M.E. and Hines H.C. 2004. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 82: 2229-2233.

Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N., Siadkowska E. and Ryniewicz A. 2002. Effect of polymorphisms of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield

and composition of Polish Blackand-White cows. Anim. Sci. Pap. Rep. 20: 213–  
227.

*Un ringraziamento particolare ai professori e colleghi della sezione di endocrinologia zootecnica e benessere animale che, con discrezione ed umanità, hanno atteso e hanno donato parte del loro tempo ascoltandomi, aiutandomi ed incoraggiandomi sempre. Non per ruolo ricoperto ma per umana dote.*

*Alla mia famiglia e gli amici che mi hanno dato il loro profondo affetto, conforto e sostegno nei momenti più difficili.*

*In ricordo della signora Adelina, amante degli animali, esempio per me di forza, gentilezza ed amore per la vita che, “nonostante tutto”, sperò sempre.*

*Un grazie al prof. Scanu, dott. Cicu e dott. Tanca per la professionalità e disponibilità.*

*A me medesima per la forza di lottare a dispetto di....*