



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

**DOTTORATO DI RICERCA IN:
RIPRODUZIONE, PRODUZIONE E BENESSERE ANIMALE
CICLO XXI
Coordinatore Prof. Salvatore Naitana**

STUDIO DEL POLIMORFISMO DEL GENE DELL'ORMONE DELLA CRESCITA (GH) E SUE ASSOCIAZIONI CON LE PERFORMANCES PRODUTTIVE IN CAPRE DI RAZZA SARDA

**Tutor:
Prof. GIUSEPPE MASSIMO VACCA**

**Tesi di dottorato della
Dott.ssa ANGELA MARIA ROCCHIGIANI**

Anno Accademico 2007-2008

Indice

1	Introduzione	”	2
2	Scopo della ricerca	”	54
3	Materiali e metodi	”	57
4	Risultati e discussione	”	68
5	Conclusioni	”	92
6	Bibliografia	”	95

1. Introduzione

La Capra hircus

Il genere Capra appartiene alla classe dei Mammiferi, all'ordine degli Artiodattili e alla famiglia dei Bovidi. Del suddetto genere fanno parte nove specie fra le quali, appunto, la *Capra hircus* o capra domestica.

Le diverse razze della capra domestica avrebbero avuto origine da tre progenitori appartenenti al genere Capra per selezione naturale e/o meticciamiento:

Capra aegagrus (Egagro o il Bezoar asiatico) da cui deriverebbero le razze occidentali, caratterizzata da lunghe corna a sciabola, ridotta ormai alle zone montuose dell'Asia minore, presente anche in alcune isole della Grecia (Falaschini, 1996). In Italia è presente nell'isola di Montecristo e rappresenta una delle poche popolazioni di capra selvatica in Italia. Sarebbe stata introdotta sull'isola in epoca romana o nel corso del medioevo dai monaci camaldolesi e rappresenta un patrimonio naturale molto interessante dal punto di vista scientifico e faunistico (Spagnesi et al., 1986)

la *Capra prisca*, la capra carpatica e balcanica, ormai estinta. Secondo Marcuzzi e Vannozi (1981) da queste deriverebbe la capra Vallese, una piccola popolazione dalle corna ritorte, allevata sul bordo svizzero.

Capra falconeri, il markor del kashmir, dalle corna a spirale. E' la specie originatasi nella regione del Tibet e da cui si sono originate le capre cashmere dal vello pregiato (Millar, 1986).

La capra si ritiene sia stato il primo ruminante ad essere addomesticato (Chef, 1995). E' un animale agile, attivo arrampicatore, molto versatile che se preferisce un habitat montagnoso, ben si adatta a condizioni estreme quali quelle presenti negli ambienti semi-desertici. Ha una elevata capacità di digerire alimenti grossolani e possiede una fecondità e prolificità superiori ad ogni altro ruminante. La capra è stata e lo è ancora, una fonte importante di latte, carne, pellame e lana (Cashmere e Mohair) in tantissimi paesi dell'Africa, dell'Asia e del bacino del Mediterraneo, in tutte le zone dove prevalgono le aziende a conduzione pastorale (Ajmone-Marsan et al., 2001). I dati della FAO (2006) stimano la popolazione mondiale caprina in circa 816 milioni di capi. Nell'U.E. i 27 Paesi Membri possiedono un patrimonio caprino di circa 13.700.000 capi. L'Italia dispone con i suoi 945.000 capi, solo del 7% del patrimonio caprino comunitario, mentre il 39,5% del totale appartiene alla Grecia e il 20,7% alla Spagna. Nonostante il numero dei capi allevati in Italia si sia sensibilmente ridotto rispetto al 2000, in cui la popolazione caprina nazionale era stimata in 1.397.000 capi, risulta in costante aumento nel nostro Paese la produzione di latte (da 112.800 tonnellate del 2000

a 115.000 del 2004). Questo fatto è da addebitarsi ai progressi compiuti dalla zootecnia nell'incrementare le produzioni sia in termini di miglioramento genetico, sia in termini di gestione dell'allevamento di questa specie.

Secondo l'ultimo censimento ISTAT (2007), in campo nazionale, la popolazione caprina si distribuisce per il 16% nelle regioni del nord, per il 7% nel centro e per il 77% nell'Italia meridionale. Tra le regioni italiane, la Sardegna riveste un ruolo di rilievo. Nell'isola sono presenti infatti, circa 209.500 capi, distribuiti in 3.290 aziende agricole, dislocate prevalentemente nella provincia di Nuoro (Baronie e Barbagie), dell'Ogliastra, di Cagliari (Sarrabus e Gerrei), di Carbonia Iglesias (Sulcis e Iglesiente) e del Medio Campidano (Arburese). La consistenza media degli allevamenti per azienda è di 64 animali, contro una media nazionale di 19 animali. L'allevamento caprino, per le sue caratteristiche, bene si colloca infatti, nei territori impervi, aridi o comunque inaccessibili della Sardegna permettendo lo sfruttamento di aree che altrimenti resterebbero abbandonate e selvagge (Bittante et al., 2005). La tipologia d'allevamento è quella di tipo estensivo che si basa sull'utilizzo diretto dei pascoli naturali fatti soprattutto di macchia mediterranea. Il ruolo di rilievo che l'allevamento caprino riveste nell'economia zootecnica della Sardegna è pertanto dovuto al numero dei capi allevati e al ragguardevole

numero delle aziende coinvolte, al volume delle produzioni, ma soprattutto alla tipicità dei prodotti ottenibili. Infatti, in Sardegna sono allevati caprini di razza sarda che sono un vero e proprio serbatoio di biodiversità.

Nei paesi industrializzati, le aziende che basano la loro economia sul profitto usano capre appartenenti a razze cosmopolite, mentre l'uso di razze autoctone è promosso da sistemi aziendali ad economia sostenibile. Questi, infatti, puntano sulla diversificazione del prodotto, dove è presente un mercato di prodotti tipici e alla creazione di metodi di controllo adatti ad effettuare la biodiversità e conservare l'habitat e l'integrità del paesaggio (De Haan et al., 1997).

Il Libro Genealogico (L.G.) rappresenta lo strumento attraverso il quale viene attuato il miglioramento genetico delle specie animali d'interesse zootecnico, sulla base di specifici obiettivi di selezione individuati e definiti dai competenti Comitati di Razza e dalle Commissioni Tecniche Centrali, nel rispetto delle prescrizioni contenute nei Disciplinari di Razza/Specie.

Le razze caprine riconosciute in Italia, sono state inizialmente sette a seguito del decreto ministeriale del 13/VI/1985 "Regolamento per lo svolgimento dei controlli funzionali del latte della specie caprina" e in base alle caratteristiche morfologiche, produttive e alla provenienza geografica rientrano all'interno di due gruppi: 1) il gruppo delle razze

Africane o Mediterranee, a cui appartengono la Garganica e la Jonica di origine pugliese, la Maltese e la Girgentana di origine siciliana, e infine la razza Sarda, considerata più che una vera e propria razza, una razza-popolazione, vale a dire caratterizzata da una palese variabilità genetica, morfologica e produttiva. Tutte queste razze sono caratterizzate dall'essere buone lattifere e dimostrare spiccata adattabilità agli ambienti climatici estremi; 2) il gruppo delle razze Alpine o Europee, come la Camosciata delle Alpi e la Saanen di origine svizzera, ormai diffuse in tutto il territorio italiano e, contrariamente alle altre razze, allevate in maniera intensiva. La loro caratteristica principale consiste in una elevata produzione di latte, ma di non pregevole qualità, in quanto povero in sostanza secca, soprattutto in grassi e proteine. La situazione razziale della popolazione caprina in Italia è definita attualmente dal Decreto Ministeriale del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali dell'11 maggio 1998 con il quale è stato approvato il nuovo testo del Disciplinare del Libro Genealogico della specie caprina e il nuovo testo delle Norme Tecniche di selezione delle razze caprine. Tale decreto, apportando alcune modifiche alle norme tecniche dei libri genealogici, ha aggiunto la razza caprina Orobica di origine lombarda, precisamente della regione della Valtellina, a quelle già stabilite nella precedente lista. La legge n° 280 del 1999 ha istituito inoltre, il

“Registro anagrafico delle popolazioni ovine e caprine autoctone a limitata diffusione”, corredata dall’ elenco delle trentatre popolazioni caprine ammesse. Tali popolazioni locali in numero esiguo sono ristrette a piccoli territori; in Italia, quindi le razze riconosciute costituiscono il 45% del patrimonio nazionale, di cui oltre la metà è costituita dalla razza Sarda, la parte restante è rappresentata da popolazioni locali etnicamente non ben definite e meticce, destinate alla produzione del latte (Bittante et al., 2005) e razze straniere, fra le quali la Toggenburg, l’Anglo-Nubiana, ceppi svizzeri e francesi delle razze alpine.

La capra di razza Sarda

La razza caprina “ Sarda”, annoverata nel gruppo delle razze mediterranee, è una razza autoctona, presente in Sardegna sin dal Neolitico, influenzata negli anni dagli incroci con la razza maltese e altre razze del bacino del mediterraneo (Ajmone-Marsan et al., 2001). Uno studio condotto nel 1978 sulla razza da Brandano e Piras, distingue all’interno della razza, in base ai caratteri morfologici, 3 subpopolazioni che si caratterizzano, comunque, da indici somatici simili e tutti riconducibili al tipo lattifero mediterraneo.

- La prima sub-popolazione dislocata principalmente in Ogliastra, Montalbo e Gerrei, è caratterizzata da taglia piccola, e rappresenta circa il 25% del patrimonio regionale;
- La seconda presente nelle zone delle Barbagie, del Sarrabus e dell’Iglesiente e costituisce una popolazione più consistente (60%);
- La terza, tipica delle zone costiere quali le Baronie, il Sulcis e la Planargia, è caratterizzata da taglia grande ed è la meno rappresentata.

Nelle norme tecniche allegate al Disciplinare del libro genealogico sono descritte tutte le caratteristiche della razza e le finalità della sua selezione (Asso.Na.Pa., 2002). Per quanto riguarda le caratteristiche

morfologiche è definita di taglia media con testa piccola e leggera nella femmina, più grossa nel maschio, profilo fronto-nasale quasi rettilineo. Presenta le orecchie di lunghezza e larghezza media con portamento quasi orizzontale. Le corna possono essere presenti o assenti. Il collo si presenta lungo e sottile, le tettole possono essere assenti o presenti. Il tronco viene distinto da un torace profondo, un addome ampio; la regione dorso-lombare è quasi rettilinea; la groppa è sviluppata ed inclinata posteriormente. L'apparato mammario si caratterizza per essere composto da mammelle ben sviluppate, con attacco ampio, globose e con capezzoli grandi e distanziati. I capezzoli accessori sono considerati un difetto se presenti, ma vengono tollerati. Gli arti sono descritti come robusti con unghie solidi. Il mantello frequentemente bianco e grigio, può essere di colore variabile. I caratteri biometrici e riproduttivi indicano che il peso è di circa 40 kg per i maschi di 18 mesi d'età, di 60 kg per gli adulti e tra 30 kg e 45 kg per le femmine della stessa categoria. E'una capra con una modesta prolificità, attestata da caratteri riproduttivi quali la fertilità (capre partorite su capre alla monta) intorno allo 0,92, la prolificità su base annua (capretti nati su capre partorite) intorno a 1,3 e la fecondità (capretti nati su capre alla monta) pari a 1,20. L'età media al primo parto è di circa 18 mesi. Il ciclo produttivo della capra sarda prevede i parti nel periodo compreso tra novembre e febbraio, ma risulta

condizionato dalla disponibilità alimentare circannuale dei pascoli (Branca e Casu, 1986). La razza sarda, presenta una produzione lattea modesta attestandosi sui 120 kg nelle primipare in 150 giorni di lattazione e su circa 200 kg nelle pluripare (lattazione di 210 giorni) (Usai et al., 2004). La quantità di latte prodotta è influenzata notevolmente dall'ambiente. Infatti, le capre pluripare che sono allevate sul litorale producono annualmente circa 232 kg di latte, mentre quelle allevate in pianura 162 kg.. Il latte, comunque, presenta un contenuto lipidico (4,5%) e proteico (4%) elevati, proprietà espresse conseguentemente nelle caratteristiche organolettiche e reologiche dei formaggi (Casu et al., 1989).

La produzione della carne è modesta (kg 3÷3,5 nei maschi e 2,5÷3 nelle femmine, alla nascita; kg 14 e 11, rispettivamente, a 90 d), ma di qualità eccellente.

Grandi sono la rusticità e l'adattabilità della razza, che riesce a fornire accettabili produzioni anche in ambienti molto difficili, per quanto riguarda l'orografia, la natura del suolo, l'altitudine e la scarsa disponibilità di foraggi (Carta et al., 2001) Per queste caratteristiche è infatti allevata in tutta la Sardegna, in allevamenti medi o grandi, prevalentemente allo stato semibrado o brado. Relativamente alla variabilità morfologica, alcuni studi (Macciotta et al., 2002) hanno evidenziato come le differenze siano più marcate tra i soggetti allevati

nelle zone costiere, rispetto a quelli di montagna. Parte di queste sono imputabili ai diversi indirizzi selettivi realizzati dagli allevatori i quali, da sempre, all'interno del patrimonio autoctono, effettuano scelte dettate dal gusto personale (colore del mantello, presenza o assenza di corna) e/o da necessità funzionali (forma della mammella).

La situazione attuale (Pazzola et al., 2002) mostra come nelle zone della fascia costiera orientale (Sarrabus, Ogliastra e Baronia) e nelle montagne del Centro Sardegna (Barbagia), si allevino soggetti con caratteri di maggiore rusticità (minore taglia, orecchie piccole, presenza di corna etc.), mentre nelle aree occidentali (Sulcis e Arburese-Guspinese) è più evidente l'influenza della razza Maltese. Quest'ultima razza è stata abbondantemente sfruttata nei piani di miglioramento genetico della razza Sarda. Infatti, per incrementare la produzione di latte, anziché provvedere a dei piani di selezione genetica, nel secolo scorso gli allevatori ricorsero a becchi appartenenti soprattutto al ceppo Maltese. Conseguenza di queste pratiche d'ibridazione, ai nostri giorni rinveniamo un'elevatissima variabilità genetica (Vacca et al., 2003). La razza che quindi è risultata da queste pratiche mostra comunque grande resistenza a condizioni ambientali difficili, efficiente utilizzo anche di alimenti grossolani, buona longevità e fertilità media (Vacca et al., 2005). Nonostante la produzione media di latte sia più bassa di quella delle razze altamente

specializzate, essa è comunque da considerarsi soddisfacente, in relazione alle tecniche di allevamento, ma soprattutto all'ottima percentuale di residuo secco del latte e al peso vivo degli animali e, dunque, dei loro fabbisogni energetici, sicuramente inferiori (Bittante et al., 2005).

La selezione si prefigge di valorizzare la produzione di latte sotto l'aspetto qualitativo e quantitativo, specialmente quello destinato alla trasformazione casearia per particolari prodotti tipici e tradizionali, avvalendosi di tutti gli strumenti tecnici atti a realizzare lo scopo. E' contemplata anche la possibilità di avvalersi di altri strumenti quali la costituzione di nuclei di selezione e prove di stazione. Data la rusticità della razza, la selezione ha lo scopo di migliorarne diversi aspetti: l'attitudine al pascolamento in montagna, con particolare attenzione agli appiombi e alla robustezza della costituzione, le caratteristiche morfologiche, associate alla taglia e alla forma della mammella, la fertilità e la prolificità degli animali preferendo i parti plurimi.

I metodi, gli strumenti e gli schemi operativi per realizzare tali obiettivi vengono definiti dalla Commissione Tecnica Centrale che dispone annualmente la pubblicazione e la divulgazione di liste di animali di particolare pregio, cui gli allevatori facciano riferimento per la realizzazione di un più celere progresso genetico. L'iscrizione dei soggetti di razza Sarda ai tre diversi registri del libro genealogico,

avviene in conformità alle norme dettate dal disciplinare del libro stesso. Numerose aziende, in seguito all'istituzione dei registri, hanno aderito agli Organi Ufficiali di controllo. In particolare, la razza Sarda risulta essere, in assoluto, quella con il maggior numero di animali e aziende iscritte ai rispettivi Libri Genealogici. Nell'anno 2008 risultano iscritti ai registri anagrafici 10.100 capi di razza Sarda, che comunque, rappresenta appena il 5% della popolazione stimata (Banca Dati Asso.Na.Pa.).

La razza capra sarda primitiva con D.M. n.21251 del 28 -03-1997 è stata inserita nel registro anagrafico delle popolazioni ovine e caprine a limitata diffusione. Il registro anagrafico rappresenta lo strumento per la conservazione e la salvaguardia delle popolazioni ovine e caprine autoctone ammesse e ne promuove la valorizzazione culturale ed economica. Le popolazioni ammesse al Registro sono quelle prive di Libro genealogico e vi si accede per mezzo di semplici registrazioni anagrafiche. La gestione ed il funzionamento dei Libri Genealogici e dei Registri Anagrafici delle specie ovina e caprina sono affidati all'Associazione Nazionale Pastorizia (Asso.Na.Pa.) dallo Stato Italiano ai sensi delle Leggi n.30/1991 e n.280/1999. La sarda primitiva è una razza costituita da capre con prevalente attitudine alla produzione di latte per la trasformazione casearia, anche se la carne rappresentata prevalentemente dal capretto da latte è di pregevole

valore. Questa razza allevata con un sistema di allevamento di tipo tradizionale, è presente prevalentemente nell'Ogliastra, in parte del Sulcis-Iglesiente, Sarrabus-Gerrei e Nuorese.

La migliore strategia per il recupero della razza Sarda originale, a rischio di estinzione, per la conservazione del suo patrimonio genetico, serbatoio di biodiversità si basa sull'utilizzo degli strumenti forniti dalla genetica molecolare, che utilizza la conoscenza di particolari geni marcatori associati alle caratteristiche qualitative e/o quantitative delle produzioni per la selezione dei caratteri di produttività, fertilità e prolificità propri della razza.

Il latte di capra

Il latte è l'alimento principale del neonato in tutti i mammiferi. Presenta notevoli variazioni nella composizione chimica e nel valore energetico fra le varie specie animali, legate alla velocità e alle condizioni di crescita del piccolo (Sandrucci et al., 1980). Il latte fornisce al neonato il giusto apporto di glucidi, lipidi, protidi e minerali necessari dalla nascita allo svezzamento, oltre all'immunità passiva dovuta alle immunoglobuline. La composizione chimica del latte di capra è simile a quella trovata in altre specie ruminanti, dei quali riflette anche le proprietà nutritive e funzionali, anche se il latte di capra presenta notevole variabilità in funzione della razza, passando da valori simili a quelli del latte di vacca, per le razze alpine, a quelli più vicini al latte ovino, per le razze mediterranee. (Trujillo et al., 1997; Awad et al., 1998). Sebbene il latte di vacca sia quello più utilizzato per l'alimentazione umana, e come sostituto del latte materno nel neonato, in alcuni casi possono insorgere dei problemi di intolleranza ad alcune componenti di tale alimento. Il problema noto da secoli, è stato risolto con la ricerca di alimenti sostitutivi e il latte di capra si è rivelato uno dei migliori. Presenta infatti, caratteristiche che lo rendono più simile al latte umano di quanto non lo sia quello vaccino. L'intolleranza del neonato parrebbe, infatti, dovuta ad alcune

proteine termostabili, come la β -lattoglobulina e le caseine, che sono assorbite, senza essere degradate, dall'intestino e riconosciute come non-self dall'organismo. Il latte dei ruminanti, infatti, si differenzia dal latte umano per un quantitativo inferiore in lattosio e α -lattalbumina e per un quantitativo superiore in β -lattoglobulina e caseine (El-Agamy, 2007;).

Il latte di capra presenta un'alta digeribilità dovuta al diametro inferiore dei globuli di grasso, facilmente utilizzabili a livello gastrico (Chandan et al., 1992; Attaie et al., 2000), un contenuto proteico ad alto valore biologico, in quanto ricco di aminoacidi essenziali quali la Taurina contenuto in alta percentuale (aminoacido importante nella fase neonatale) (Mehaia et al., 1992) e contenuto in selenio simile a quello presente nel latte umano

Le proteine costituiscono dall'1% al 5% circa della composizione chimica del latte nelle varie specie e si distinguono in caseine, che rappresentano l'80% delle proteine del latte dei ruminanti, e sieroproteine che ne rappresentano invece il 20%. La frazione caseinica del latte di capra è stata oggetto di numerosi studi, dai quali risulta che sebbene la struttura delle proteine e le sequenze aminoacidiche sono simili alle altre specie, il rapporto fra le diverse caseine non è lo stesso. Il latte di capra mostra infatti, differenti rapporti delle 4 frazioni caseiniche, se comparato con il latte bovino.

Oltre a ciò, enormi variazioni sono state evidenziate fra le varie razze caprine o addirittura fra individui della stessa razza, dovute essenzialmente alla presenza di polimorfismi nei geni che le codificano che influenzano fortemente la coagulazione e quindi la trasformazione.

Negli ultimi anni particolare attenzione si è dedicata alla frazione lipidica del latte e in particolare, del latte di capra. Questo interesse è dovuto a motivi tecnologici e alimentari. Infatti, la frazione lipidica influenza notevolmente la trasformazione del latte. È stato dimostrato che il rapporto grasso/proteine ha effetti notevoli sulla tessitura e sulle proprietà di fusione del formaggio (Addeo et al., 1993). Inoltre, la componente lipidica influenza notevolmente l'aroma e il sapore del prodotto finito e, non ultimo è da considerare l'aspetto relativo alla salute umana. I principali lipidi del latte sono i triacilgliceroli, secreti sotto forma di globuli di grasso (MGF) di misura variabile (Leroux et al., 2003). Il latte nell'uomo e nelle specie bovina e caprina ha un contenuto di grasso quasi simile, all'incirca fra i 30 e i 45 g/kg (Chilliard e Lamberet, 2001).

Come osservato anche per le proteine, il contenuto in grasso è variabile all'interno della stessa specie.

Il contenuto percentuale delle differenti classi di lipidi presenta una distribuzione molto simile a quello degli altri ruminanti. La differenza

principale fra il latte di vacca e il latte di capra sta nel contenuto di acidi grassi a corta catena. La capra produce una grande quantità di acido caprico (C10:0), caprilico (C8:0) e caproico (C6:0). Questi acidi grassi sono responsabili del suo caratteristico aroma. Per quanto concerne il colesterolo, il latte di capra si distingue da quello vaccino per un contenuto leggermente superiore. Infatti, nella vacca abbiamo dai 14 ai 17 mg di colesterolo per 100 g di latte, mentre nella capra dagli 11 ai 25 mg per 100 g (Park, 2000). La dimensione media dei globuli di grasso del latte caprino è inferiore rispetto a quella dei globuli di grasso del latte bovino. Questo dato influenza l'affioramento della crema, elemento considerevole dal punto di vista tecnologico. L'affioramento della crema risulta quindi più basso nel latte di capra, a causa anche della mancanza, nella membrana dei globuli di grasso, di una proteina (agglutinina), presente nel latte vaccino che promuove l'agglutinazione (Jennes et al., 1971). Tutte queste caratteristiche evidenziano che il latte di capra è meno adatto alla caseificazione rispetto a quello vaccino. Questa differenza può essere spiegata anche da altri elementi, come il basso contenuto in caseine e le specifiche proprietà delle micelle caseiniche, quali composizione, dimensione e idratazione (Remeuf, 1992). Il basso contenuto in caseine e il basso "numero caseinico" del latte di capra se confrontato col latte vaccino (caseine/azoto totale: 75% contro 78%)

sono responsabili di scarsa resa in formaggio e influenzano la reologia.

I principali fattori che condizionano la coagulazione presamica del latte di capra sono: il contenuto caseinico, la concentrazione del calcio colloidale e calcio totale, la misura media delle micelle caseiniche ed infine il rapporto fra α_s e β caseine (Remeuf et al., 1989). Quindi il latte di capra produce un caglio che risulta più fragile e soffice di quello prodotto dal latte vaccino, anche quando è presente la medesima concentrazione caseinica (Park, 2007). Tuttavia, le proprietà tecnologiche proprie del latte di capra sono sfruttate per la creazione di prodotti assolutamente peculiari, non ottenibili col latte di altre specie. Una famiglia estremamente eterogenea di formaggi è prodotta dal latte di capra, caratterizzati da tipici aromi e sapori, che rappresentano dei “prodotti di nicchia”, molto apprezzati dai consumatori di differenti Paesi.

Polimorfismo genetico:

Il polimorfismo genetico è determinato da differenze in una medesima sequenza di DNA di individui, gruppi o popolazioni. Concorrono a determinare i polimorfismi due tipi di mutazioni: quelle che rimaneggiano la sequenza nucleotidica e quelle che aggiungono o tagliano paia di basi della sequenza.

Una determinata posizione della sequenza nucleotidica genomica è identificata come uno SNP (Single Nucleotide Polymorphism) se in essa esistono almeno due differenti sequenze alternative (alleli), presenti negli individui normali di una popolazione con una frequenza almeno del 1% o più elevata. Altri tipi di polimorfismo genetico derivano dalla inserzione o dalla delezione di una porzione di DNA, che include sequenze nucleotidiche (minisatelliti e microsatelliti) e dalla delezione, duplicazione e riarrangiamenti di grandi regioni di DNA maggiori di 500 paia di basi. Questo tipo di alterazioni genomiche possono essere determinate con metodiche di citogenetica ad alta risoluzione, soprattutto quelle mutazioni che alterano il numero dei cromosomi o determinano traslocazioni cromosomali.

I minisatelliti sono sequenze di DNA, ipervariabili, prive di significato funzionale che si estendono lungo estesi tratti di DNA fino a 0,5Kb in sequenza ripetuta, sono infatti detti anche VNTR (Variable

Number Tandem Repeat). Se costituiti dalla ripetizione di 5 basi prendono il nome di minisatelliti, se sono costituiti dalla ripetizione di 1 a 4 basi, prendono il nome di microsatelliti o STRs (Short tandem repeats). Si trovano localizzati principalmente nelle regioni intergeniche, dispersi in modo irregolare nel genoma, preferibilmente nei telomeri dei cromosomi. Questi polimorfismi determinati da un'elevata variabilità nel numero delle ripetizioni delle basi sono usati in studi di linkage.

Gli SNPs possono essere localizzati nelle regioni codificanti dei geni come pure nelle sue regioni regolatorie e possono essere considerati il tipo più semplice e più diffuso di variabilità genetica. Nel genoma umano sono presenti con una frequenza di uno ogni 1300 paia di basi (Lander et al., 2001). Ancestralmente, gli SNPs nel genoma umano potrebbero essere stati polimorfismi bi, tri e tetra-allelici, ma così rari, soprattutto quelli tri e tetra-allelici da scomparire cosicché qualche volta possono essere riportati come marcatori diallelici (Brookes 1999).

All'origine degli SNPs possono esserci transizioni o trasversioni della base di un nucleotide, intendendo per Transizione la sostituzione tra purine (A e G) o tra pirimidine (C e T) e per Trasversioni, la sostituzione di una purina con una pirimidina e viceversa.

Le mutazioni puntiformi che si determinano in una regione di DNA codificante possono essere silenti o non silenti in base al tipo di effetto che provocano sulla proteina codificata. La sostituzione silente non determina una variazione dell'amminoacido, mentre quella non silente ne causa la modifica o se la mutazione è anche non-senso, determina l'origine di un codone non senso, cioè un codone di stop nella sintesi proteica. Gli SNPs pur distribuiti in modo non uniforme all'interno di un singolo cromosoma, generalmente sono poco presenti nelle regioni regolatorie dei geni così come sono poco frequenti queglii SNPs che determinano una variazione dell'amminoacido nelle regioni codificanti di un gene, secondo pressioni selettive che tendono a diminuire la diversità in queste regioni di DNA. Questo è derivato dal fatto che gli SNPs possono indurre differenti modificazioni del fenotipo provocando in alcuni casi alterazioni della struttura o della funzione della proteina codificata se lo SNPs interessa una regione codificante o una zona regolatoria di un gene. In produzione animale esempi di questo tipo

Metodi di rilevamento delle mutazioni puntiformi

Esiste una varietà di metodiche per la rivelazione di mutazioni puntiformi che bene si adattano anche alla rivelazione delle mutazioni dovute a delezione o inserzione di pochi nucleotidi. La scelta del metodo dipende dal tipo di acido nucleico che si andrà ad analizzare, dal tipo di campione dal quale si parte per l'estrazione dell'acido nucleico, dal fatto che le mutazioni siano o meno conosciute, da quante siano le mutazioni da identificare, dalla necessità di identificarle tutte. Sarà necessario inoltre, valutare anche l'attendibilità del metodo e quanto sia possibile standardizzarlo e utilizzarlo come test di routine. Le strategie da utilizzare possono essere distinte per semplicità in due categorie generali: le metodiche specifiche e quelle di screening, che rispettivamente permettono di rivelare mutazioni specifiche conosciute in piccole e definite regioni di DNA le prime e fare uno screening delle mutazioni conosciute e non lungo estesi frammenti di DNA (fino alle 2 Kb) le seconde. A quest'ultima categoria appartengono le tecniche basate sulla mobilità elettroforetica su gel come la SSCP (single strand conformation polymorphisms), la HA (Hetero-duplex assay), la DGGE (Denaturative gradient gel electrophoresis) e la TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis) e tecnologie avanzate come i

microarray e la Real-time PCR. La SSCP e la HA più usate per via della semplicità di esecuzione, i bassi costi e l'alta sensibilità insita nel metodo.

In questa sede saranno brevemente descritte solo le metodiche di screening considerando che la rivelazione della mutazione sarà determinata con il sequenziamento, oramai automatico, che può essere certamente considerato il “gold standard” (Nollau et al., 1997). In generale le sequenze da analizzare sono inizialmente sottoposte all'amplificazione tramite la reazione di amplificazione a catena (PCR) condotta con la Taq polimerase. Gli errori che potrebbero derivare dall'utilizzo di questo enzima, sono oramai ridotti al minimo dal momento che oggi giorno sono commercializzate delle Taq proofreading che associano all'attività polimerasica un'attività 5'-esonucleasica con la quale l'enzima ha la capacità di correggere l'inserimento errato di nucleotidi in base al filamento stampo. Inoltre la possibilità di introdurre la mutazione con la PCR diminuisce proporzionalmente al diminuire del numero delle molecole di DNA utilizzate come stampo di partenza (in genere < 100 molecole) (Krawczak et al., 1989).

Ci sono in letteratura diversi esempi di polimorfismi ben caratterizzati in particolari loci che determinano un effetto su caratteristiche produttive, riproduttive, di resistenza alle malattie nella

specie bovina e suina (Russo e Fontanesi, 2001). Gli esempi in letteratura sono tanti: la mutazione nel gene CRC o gene alotano che nei suini causa un difetto nella carne e impedisce la produzione di prosciutti di alta qualità (Zhang et al., 1992). Nella specie caprina i geni che codificano per le principali proteine del latte presentano associate differenze quantitative che influenzano direttamente e in misura rilevante le caratteristiche chimiche, tecnologiche e nutrizionali del latte (Ramunno et al., 2000), (Martini et al., 2006) (Moioli et al., 2007).

Anche nella specie ovina sono stati identificati polimorfismi al locus dell' α -s1 caseina (Chianese et al., 1996) che determinano nel latte variazioni qualitative e quantitative; polimorfismi al locus di due geni come l'Acil CoAdiacilglicerol aciltransferasi (DGAT1) e lo Steroil-CoA denaturasi (SCD) sono stati associati rispettivamente con la variabilità del contenuto in grasso nel latte bovino (Winter et al. 2002) e in quello della capra (Angiolillo et al., 2007) e con variazioni di acido linoleico coniugato (CLA) nel latte (Peterson et al., 2002); polimorfismi nel gene dell'ormone della crescita (Growth Hormone GH) sono stati associati con variabilità quantitative e qualitative del latte nella specie bovina (Zhou et al., 2005), caprina (Marques et al., 2003) ed ovina (Marques et al., 2006) ed anche con caratteristiche della carcassa nella specie bovina.

La suscettibilità da parte delle pecore alla Scrapie è strettamente associata al polimorfismo del gene PrP della proteina prionica: l'allele ARR è associato con la resistenza, l'allele VRQ alla suscettibilità (Hunter et al., 1996).

SSCP (single strand conformation polymorphisms) o polimorfismo conformazionale del singolo filamento

L'SSCP è una delle metodiche più diffuse. La regione di DNA che si presume contenga il polimorfismo è inizialmente amplificata in PCR. I frammenti sono quindi denaturati con agenti chimici e fisici quali la formammide e il calore necessari per separare i singoli filamenti e sottoposti a corsa elettroforetica su gel di acrilammide non denaturante. I frammenti a singolo filamento assumeranno una conformazione tridimensionale in dipendenza della composizione in basi che alterata dalla sostituzione di un singolo nucleotide mostrerà una variazione della mobilità elettroforetica su un gel di poliacrilammide non denaturante (Orita et al., 1989). La SSCP è una metodica di facile esecuzione, ma è suscettibile a piccole variazioni nelle condizioni applicate, perciò per la riproducibilità dei risultati e l'ottenimento di una sensibilità di circa l'80-90% è necessario l'utilizzo di sistemi che consentano il monitoraggio continuo e il

mantenimento costante della temperatura, parametro che influisce sulla conformazione nucleotidica e conseguente mobilità elettroforetica. Inoltre, per il raggiungimento di ottimi risultati è necessario che la lunghezza dei frammenti di DNA analizzati sia compresa tra le 150 e le 200 bp (Sheffield et al. 1993). Infatti, il numero delle mutazioni individuate diminuisce man mano che aumenta la lunghezza dei frammenti esaminati. Il profilo elettroforetico è rivelato dopo colorazione con nitrato d'argento o con syber safe intercalante dell'alfa elica del DNA. L'ottimizzazione empirica del metodo deve valutare in base alla grandezza del frammento anche la concentrazione della poliacrilamide da utilizzare, la presenza del glicerolo all'interno del gel che in concentrazione del 10-15% aumenta le differenze di migrazione tra i filamenti wilde-type e i mutati e il tempo di durata della corsa che può variare mediamente tra le 3 e 8 ore. La SSCP, inoltre si è dimostrata una metodica specifica e molto sensibile soprattutto per i frammenti di DNA ricchi in G+C. La spiegazione di questo è che tra Guanina e Citosina vengono a formarsi per via della complementarità delle basi tre legami a ponte di idrogeno e solo due tra la Adenina e la Timidina. I legami ad idrogeno che si instaurano all'interno del singolo filamento influenzano la complessità conformazione terziaria del DNA a singolo filamento in un gel non denaturante. Pertanto, più legami ad idrogeno

vengono formati nel singolo filamento del DNA per via della alta concentrazione di G e C e più complesso sarà il ripiegamento del filamento. Variazioni di sequenza saranno facilmente identificate per quei frammenti ricchi in G e C che modificando il loro delicato stato conformazionale cambieranno la mobilità elettroforetica su gel.

Analisi degli eteroduplex

Il principio su cui si basa l'analisi degli eteroduplex è simile a quello su cui si basa l'SSCP. Il metodo permette la rivelazione degli eteroduplex che sono generati dal riacoppiamento di singoli filamenti denaturati di una miscela di DNA wilde-type e mutato. Gli eteroduplex esibiranno una mobilità elettroforetica distinta su gel di poliacrilamide non denaturante, differente da quella esibita dagli omoduplex.. Quando è evidente che campione non è eterozigote o il rapporto DNA wilde type-DNA mutante non è definito, si aggiungerà al campione una quantità di DNA wilde-type per permettere la formazione di eteroduplex necessari per la rivelazione delle mutazioni (Nagamine et al., 1989). In generale la presenza della mutazione rallenta la mobilità elettroforetica rispetto al DNA wilde-type La lunghezza ottimale dei frammenti è compresa tra le 200bp e le 600bp. La quantità di mutazioni puntiformi rivelate dal metodo è valutata

intorno all'80% (Cotton, 1983). Uno studio condotto da Nataraj et al. (1999) ha dimostrato che la tecnica HA non è influenzata dal contenuto di G+C, dalla lunghezza del frammento tra le 100 e le 600bp e la posizione del disappaiamento tra le basi dovuto a presenza di mutazione in uno dei filamenti. Il fattore principale che influenza la separazione elettroforetica degli eteroduplex dagli omoduplex è il tipo di base che causa il disappaiamento dei filamenti. La separazione avviene, infatti con questo ordine: G:G/CC > A:C/T:G = A:G/T:C > A:A/T:T. L'ordine di risoluzione osservato è in concordanza con il fatto che le distorsioni più grandi dei filamenti, causate da più basi disaccoppiate, risulteranno in differenze di migrazione lungo il gel più se comparate con la velocità tenuta dai filamenti pienamente appaiati. I primi sono termodinamicamente più instabili via via che i disaccoppiamenti aumentano tra i filamenti (Ikuta et al., 1987; Wernteges et al. 1986).

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) o Elettroforesi su Gel Denaturante in Gradiente e TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) o Elettroforesi in Gradiente di Temperatura

Questa tecnica trova fondamento sulla proprietà che le molecole di DNA che differiscono tra loro per mutazioni puntiformi hanno seppur lievi differenze nelle corrispondenti temperature di melting o di fusione (T_m) in virtù delle quali migrano con velocità distinte se sottoposte ad elettroforesi su un gel denaturante. Il DNA a doppia elica è fatto migrare, infatti su un gel a gradiente con concentrazioni crescenti di sostanze denaturanti, quali urea e formamide o su un gradiente di temperature crescenti. Proporzionalmente alla concentrazione degli agenti denaturanti e all'aumentare delle temperature i filamenti delle molecole di DNA si dissociano quando incontrano sul gel una concentrazione di sostanza denaturante o una temperatura in accordo con le loro T_m . La T_m è strettamente legata alla composizione nucleotidica del DNA e quindi la presenza di una sostituzione di una coppia di basi ne modifica il valore. Quando le molecole di DNA raggiungono le proprie T_m diminuiscono la velocità elettroforetica. La differenza di 1bp tra due molecole di DNA a doppio filamento omozigoti varia la T_m di 1°C o più. La presenza di disaccoppiamenti

tra basi in molecole di DNA a doppio filamento eterozigoti conduce a una destabilizzazione dei domini analizzati che si traducono in differenze di T_m fra gli omozigoti ed eterozigoti sino a 6°C . di T_m . Questo è un motivo ragionevole per utilizzare questa strategia nell'analisi di mutazioni puntiformi fra molecole di DNA wilde-type e quelle che contengono la mutazione in eterozigoti (Nollau,1997).

La determinazione teorica dei profili di T_m in base alla presenza di polimorfismi in determinati domini di DNA possono essere predetti con l'utilizzo di particolari software (Lerman et al., 1987).

La rivelazione di polimorfismi in qualunque punto del DNA, anche in quelli ad alta T_m può essere facilitata dall'aggiunta all'estremità del frammento, attraverso PCR, di "GC-clamps", cioè sequenze di 40-90 coppie di basi ricche in GC che hanno un alta T_m e che quindi costituiscono sempre il dominio a più alta T_m alterando così la T_m del frammento a cui è stata aggiunta, rendendolo di conseguenza tutto dominio a bassa temperatura e di più facile rivelazione in un gel costituito da un unico tipo di gradiente denaturante (Myers et al., 1985). La sensibilità del metodo nella rivelazione di mutazioni puntiformi è dell'ordine del 100% quando i frammenti eteroduplex sono originati da filamenti di lunghezza massima di 1000bp, senso e antisenso e quando vengono unite all'estremità delle "GC-clamps"

(Myers et al., 1985; Scholz et al., 1993). L'utilizzo della DDGE risiedono nell'elevata accuratezza e ai bassi costi del metodo.

Gli svantaggi risiedono invece nel fatto che le condizioni per l'esecuzione del metodo devono essere definite ogni volta per ogni prodotto di PCR prima dell'analisi che consente peraltro l'esame di non tanti campioni per volta.

Microarray

La tecnologia dei microarray è utilizzata in genere in studi di espressione genica per analizzare il profilo trascrizionale di un campione biologico; con la tecnica Variant Detection Array (VDA) è applicata anche agli studi di analisi di variabilità genetica, nella ricerca di polimorfismi non ancora identificati in lunghe sequenze di DNA (Halushka et al., 1999). La tecnica si basa sull'ibridazione tra frammenti di molecole di acidi nucleici (sonde), di sequenza nota fissati su supporti solidi, generalmente in vetro o plastica e il campione che si vuole analizzare. Le sonde fissate sui chips possono essere in numero variabile tra le centinaia e le migliaia. Il campione di acido nucleico da analizzare (target) è inizialmente amplificato, in modo da incorporare dei nucleotidi fluorescenti. La differenza tra la stringenza fra le sonde e il DNA target dovuta al fatto che ci sia

completa omologia o sia presente un solo nucleotide disappaiato sarà misurata da uno scanner laser ad elevata risoluzione che rivela i segnali fluorescenti e li analizza con software informatici di cui è corredato. La metodica dei microarray può essere applicata ad uno screening in larga scala di grandi quantità di DNA per l'identificazione di polimorfismi non conosciuti, ma meglio si applica allo screening contemporaneo di polimorfismi noti. Nel settore delle produzioni animali è applicata per esempio per identificare i numerosi polimorfismi genetici a ciascuno dei loci caseifici della specie caprina, ancor prima della specie bovina (Chessa et al., 2007; Chessa et al., 2008).

Sequenziamento diretto

Il sequenziamento diretto è il metodo di eccellenza per accuratezza e sensibilità, utilizzato per la determinazione dell'esatta natura e posizione di una mutazione nota e non, che contraddistingue un polimorfismo. Quindi, è la tecnica di elezione per confermare e identificare l'esatta base alterata in una regione di DNA, precedentemente identificata come polimorfica, con uno dei metodi di screening di cui discusso precedentemente. Il metodo dei dideoossi o di Ranger, il più frequentemente utilizzato, si basa sulla sintesi enzimatica di un filamento di DNA su un filamento stampo. Per la

sintesi viene usata una miscela di desossinucleotidi, normali dNTPs insieme ad analoghi nucleotidi didesossi marcati con fluorocromi diversi. Quando, durante la reazione di polimerizzazione viene incorporato un nucleotide dideoxi caratterizzato dall'assenza del gruppo idrossido al carbonio 3' che impedisce la formazione del legame fosfodiesterico con il successivo nucleotide, la reazione termina e l'allungamento della catena si arresta a quel momento. L'incorporazione di un dideoxi o "terminatore" origina dei prodotti di amplificazione che differiscono fra di loro per un solo nucleotide e che sono pertanto, separati in elettroforesi capillare in base alla loro lunghezza. Il sistema rivelatore ottico collegato, misura la differenza tra le lunghezze d'onda emesse dai quattro fluorocromi legati ai nucleotidi terminatori. L'analisi dei dati avviene attraverso dei programmi informatici che determinano o una comparazione fra le differenze della sequenza data e una sequenza standard o una comparazione diretta dei tracciati di sequenza mutati e wilde-type.

L'ormone della crescita

L'ormone della crescita (GH, Growth hormone), chiamato anche somatotropina (STH, Somatotropic Hormone) è un ormone che insieme alle somatomedine o fattori della crescita insulino-simili (IGF-I e IGF-II, Insulin-like Growth factors), le rispettive proteine trasportatrici e i rispettivi recettori nelle cellule bersaglio compongono l'asse somatotropico che gioca un ruolo chiave nel controllo della regolazione dei processi metabolici e fisiologici. Altri ormoni quali l'insulina, la leptina, i glicocorticoidi, gli ormoni tiroidei partecipano a questa regolazione intervenendo sulla modulazione della sintesi e della disponibilità dell'ormone della crescita e/o del IGF-I (Renaville et al., 2002). Il GH viene sintetizzato dalle cellule somatotrofe, acidofile costituenti il 4-10% in peso dell'adenoipofisi. La secrezione pituitaria dell'ormone è, a sua volta, sotto il controllo di due neuropeptidi ipotalamici: la somatoliberina o somatocrinina (GHR, Growth hormone Releasing Hormone), che stimola la secrezione del GH e la somatostatina che ne esercita un'azione inibente. Uno degli stimoli metabolici più efficaci ai fini della secrezione del GH è l'ipoglicemia e la diminuzione di altri substrati energetici, tipo acidi grassi che possono venir meno durante il digiuno, la malnutrizione o il malassorbimento. Anche gli stress di diversa natura, quali quelli

emozionali, quelli che fanno seguito a traumi, provocano sempre un rilascio di GH (Aguggini et al., 1992). Un esempio della complessità della relazione esistente fra metabolismo ed asse somatotropico sono i grandi cambiamenti energetici che si manifestano nel metabolismo delle bovine da latte, durante il passaggio dal periodo di sufficiente energia metabolica della tarda fase gravidica, al deficit energetico delle prime fasi della lattazione, nelle quali la richiesta di energia aumenta di circa quattro volte rispetto al precedente periodo gravidico. Questa esigenza, in genere, non viene compensata da un adeguato aumento di energia nutrizionale, fatto che conseguirebbe in una limitazione nella produzione di latte (Bell, 1995;). Negli anni 80, furono Barman e Currie ad esaminare il ruolo degli ormoni che orchestrano i cambiamenti “cronici” nel metabolismo, come quelli visti durante la gravidanza e la prima fase di lattazione nelle bovine da latte e coniarono per descriverne il tipo di regolazione il termine di “omeoresi” (Bauman et al., 1980) e indicarono l’ormone della crescita come regolatore “omeoretico”, anche se con la limitazione che il GH assume in alcune funzioni nella prima fase della lattazione. La leptina, scoperta nel 1994, ormone che viene secreto dal tessuto adiposo e dalle cellule epiteliali mammarie durante la gravidanza e fase di lattazione (Bonnet et al., 2002; Laude et al., 1999 ; Leury et al., 2003), può essere considerato un altro regolatore omeoretico. L’azione del

GH sull'organismo si esplica per una via diretta determinata dall'interazione con il suo recettore affine e per una via indiretta, mediata dalla induzione da parte del fegato della sintesi di IGF-I plasmatico (Le Roith et al., 2001). La via indiretta, da alcuni autori, è stata messa in discussione sulla base dell'osservazione che topi con concentrazioni deficitarie di IGF-I plasmatico, mostravano una crescita normale (Sjogren et al., 1999; Yakar et al., 1999), anche se l'IGF-I anche in questi animali era comunque necessario per ultimare la crescita corporea e lo sviluppo osseo (Ueki et al., 2000; Yakar et al., 2002). Pertanto, l'IGF-I sintetizzato nel fegato, può essere considerato solo in parte, il mediatore dell'azione periferica del GH, anche nel tessuto della ghiandola mammaria. Questo è suggerito dalla debole regolazione che il GH esercita sulla sintesi epatica dell'IGF-I nelle bovine nel periodo di bilancio energetico negativo come quello che precede il parto (Bauman et Vernon, 1993). La base molecolare di questa debole regolazione risiede nel fatto che nel fegato delle bovine, in questo periodo, non vengono sintetizzati i recettori epatici del GH a partire dalla riduzione nella sintesi del suo RNA messaggero. Il motivo di questa riduzione rimane ancora sconosciuto (Kim et al., 2004; Radcliff et al., 2003). Barman e Vernon proposero che il GH, per contro contribuisce al mantenimento della omeostasi metabolica agendo in modo completo sul muscolo scheletrico e sul tessuto

adiposo durante la fase della lattazione, determinando una diminuzione dell'utilizzo del glucosio ematico, soprattutto da parte del muscolo scheletrico e una mobilitazione dei lipidi da parte del tessuto adiposo (Bauman, 2000;). In generale questa regolazione tende ad economizzare l'utilizzazione di nutrienti, come il glucosio da parte dei tessuti che non siano quelli della ghiandola mammaria per renderli disponibili per la sintesi di latte (Bauman, 2000; Bell, 1995) Nel tessuto adiposo l'azione del GH si svolge in modo diretto; questo è provato dal fatto che gli adipociti maturi sono privi di recettori per il IGF-I (Caro et al., 1988), mentre nel tessuto muscolare l'azione del GH potrebbe anche essere indiretta visto che le cellule muscolari presentano recettori per entrambi gli ormoni (Le Roith et al., 2001), anche se sarebbe l'azione diretta del GH ad attenuare l'effetto dell'insulina sulle cellule muscolari scheletriche e, quindi, l'utilizzazione del glucosio (Yakar et al.2004).

L'ormone della crescita: la proteina

L'ormone della crescita è un polipeptide a singola catena di circa 190-200 aminoacidi nella maggior parte delle specie, di peso molecolare di 22KDa. Sebbene sia presente nell'uomo una variante di 20KDa originata da un arrangiamento alternativo dell'RNA messaggero che porta al taglio di una sequenza segnale di 26 aminoacidici (Baumann et al., 1991). Varianti proteiche sono state evidenziate anche nel bovino (Lucy et al., 1993). Sono state anche supposte delle varianti glicosilate del GH dell'uomo, del topo e dei polli (Baumann et al., 1991). Il GH dal punto di vista evolutivo è considerata una proteina conservata nella sequenza e nella struttura che interagisce con il suo recettore (GHR) presente nelle cellule bersaglio e/o con le proteine trasportatrici con una affinità di legame che varia di poco nelle varie specie (Thomas et al., 1998). Il GH ha una caratteristica struttura terziaria costituita dall'avvolgimento di un fascio di quattro alfa eliche antiparallele che pare essere tipica della superfamiglia delle citochine (Forsyth et al., 2002). Nel GH una lunga forcina non elicoidale unisce l'alfa elica 1 con la 2 e una piccola porzione di proteina connette l'elica 2 con la 3 e una seconda lunga forcina connette l'elica 3 con la 4. La configurazione che deriva è definita "up-up-down-down" e presenta anche due ponti disolfuro.

Nell'uomo è stato dimostrato che il GH si lega con il proprio recettore presente sulle cellule bersaglio (GHR) o con la sua proteina trasportatrice (GH-BP) attraverso due regioni, separate tra loro: il sito 1, un interfaccia leggermente concava costituita dai residui amminoacidici presenti nelle superfici esposte delle alfa eliche 1 e 4 e nella regione tra le eliche 1 e 2 e il sito 2, un interfaccia leggermente più piccola e piatta costituita dai residui amminoacidici localizzati sulla alfa-elica 1,3 e l'estremità N-terminale della proteina. Il sito 1 è coinvolto per l'85% dell'attività totale di legame del GH con il suo recettore contro l'8% svolto dal sito 2. Sei sono i residui coinvolti nel mantenimento del legame con il recettore del GH: P⁶¹, R⁶⁴, K¹⁷², T¹⁷⁵, F¹⁷⁶ e R¹⁷⁸ (Wells et al., 1996). Analisi cristallografica a raggi X e studi biofisici di legame hanno dimostrato che una molecola di GH si lega a due molecole di GHR in un rapporto stechiometrico di 1:2. Per spiegare il modello di legame fra GH e GHR è stato proposto che attraverso il sito 1 avviene il primo legame con una molecola di GHR, a cui fa seguito il legame di una seconda molecola di GHR mediato dal sito 2. Questa sequenza successiva dei due legami porta ad una dimerizzazione, requisito essenziale per l'attivazione del recettore del GH (Fuh et al., 1992). Un modello di legame di questo tipo spiega come una concentrazione elevata di GH agisce da antagonista nell'attivazione del GHR. Infatti la presenza di un numero elevato di

molecole di GH si traduce in un aumento dei legami al sito 1 con conseguente sottrazione di molecole di GHR per il legame con il sito 2, e quindi alla impossibilità di formazione dei dimeri (Ilondo et al., 1994). Una mutazione che coinvolge in posizione 120 l'amminoacido G sostituendolo con R determina un GH che presenta un aumento dell'affinità di legame al sito 1 rispetto al sito 2 (Fuh et al., 1992). Identico effetto è prodotto dalla delezione di otto amminoacidi all'estremità carbossi-terminale del GH (Rowlinson et al., 1995).

La struttura primaria dell'ormone della crescita bovino è costituito da una singola catena polipeptidica in cui sono presenti 4 residui di metionina, il primo posizionato alla distanza di 5 aminoacidi dall'estremità N-terminale, il secondo distanziato dal primo da 115 aminoacidi, il terzo distanziato dal secondo da 20 aminoacidi, il quarto distanziato dal terzo da 27 aminoacidi e dall'estremità COOH-terminale da dieci residui aminoacidici. I residui metioninici sembrerebbero entrare in parte nell'attività biologica del GH, infatti la loro carbossimetilazione con acido iodoacetico, a pH 3,5 influisce negativamente sulla attività biologica dell'ormone. Probabilmente la carbossimetilazione dell'ormone è accompagnata da cambiamenti conformazionali che porterebbero alla inattivazione dell'attività (Wallis et al., 1972). La comparazione della sequenza aminoacidica del GH bovino, del maiale e quella umana (Li et al.1971; Niall et al., 1971)

evidenza che solo la metionina II delle quattro è conservata nelle tre specie. Il GH del bovino mostra una stretta omologia con la struttura primaria del GH ovino, presenta uguale microeterogeneità nella estremità N-terminale della sequenza e simile distribuzione dei residui di metionina nella catena. La microeterogeneità nella sequenza N-terminale del GH bovino può essere dimostrata per differenze minime dovute per esempio alla presenza o assenza di un unico amminoacido: l'alanina (Wallis, 1969).

Studi di omologia condotti su GH appartenenti su diverse specie hanno evidenziato che esistono differenze lievi nella struttura terziaria, nonostante siano presenti marcate differenze nella struttura primaria. L'ormone della crescita è specie specifico. Da studi comparativi di sequenza si è osservato che i GH della maggior parte dei mammiferi placentari non appartenenti ai primati differiscono per circa il 35% di tutti i residui amminoacidici dal GH umano, ma sono molto simili tra loro con l'eccezione dei GH dei ruminanti che differiscono per circa il 10% dei residui amminoacidici totali dai GH degli altri mammiferi compresi gli altri artiodactili quali il maiale (Wallis, 1989). Questo spiega il motivo del debole legame del GH dei non primati ai recettori presenti sui tessuti umani e la scarsa attività biologica da loro svolta. Al contrario è stato osservato che il GH umano mostra una buona affinità di legame ai recettori presenti sui

tessuti dei mammiferi non-primati e svolge la propria attività biologica, promuovendo la crescita in animali quali il ratto. La specificità del GH legata alla specie sembrerebbe dovuta a singole variazioni amminoacidiche nell'ormone e nel recettore corrispondente (Behncken et al., 1997; Souza et al., 1995).

L'ormone della crescita: il gene

Il gene dell'ormone della crescita appartiene a una grande famiglia di geni che includono oltre al GH, la prolattina (PRL) e i lattogeni placentari, anche chiamate somatomammotropine (CS).

Nella maggior parte dei mammiferi, ad eccezione dei grandi primati, il GH è codificato da un solo gene non associato ad alcun altro strettamente correlato. Nell'uomo, invece, sia il GH che le proteine correlate sono codificati da una cassetta genica (cluster) composta da cinque geni compresi in circa 50Kb di DNA, mappati sul braccio lungo del cromosoma 17(q24.2) (Miller et al., 1983; Chen et al., 1989). Il solo gene posizionato all'estremità 5' del cluster è espresso nella ghiandola pituitaria e codifica per il normale GH1. Gli altri quattro hanno più del 90% di sequenza omologa con il gene GH1, sono espressi nella placenta e codificano due per l'ormone lattogeno placentare con identica sequenza proteica (CSH1 e CSH2), uno per

una variante del lattogeno placentare (CSHL1) ed uno per una variante del GH che può assumere il ruolo del GH pituitario nello stato di gravidanza (Chen et al., 1989; Alsat et al., 1997). Studi condotti sul cDNA della Scimmia Rhesus hanno evidenziato nel genoma un uguale numero di geni che codificano per proteine GH e simili, uno espresso nella ghiandola pituitaria e quattro nella placenta, anche se non esattamente uguali alla cassetta genica presente nel genoma umano (Golos et al., 1993). Le scimmie del Nuovo Mondo hanno più di un gene simil-GH, sebbene l'organizzazione del cluster genico sia differente da quello umano: il Marmoset possiede in una regione di 35Kb di DNA ben otto geni tipo GH e pseudogeni (Wallis et al., 2002). Il gene GH è costituito da cinque esoni e quattro introni che coprono approssimativamente dalle 2,6 alle 3,0 paia di Kb nella maggior parte dei mammiferi. Nel pollo e nella trota iridea, tuttavia il gene GH copre una lunghezza di 3,5 e 4,5 paia di Kb, a causa della maggior lunghezza degli introni (Tanaka et al., 1992; Agellon et al., 1988). Il gene dell'ormone della crescita bovino, mappato nel cromosoma 19 (19q22) è un singolo gene costituito da 1793 nucleotidi, distribuiti in cinque esoni e quattro introni (Fries et al., 1993). Nella pecora il GH, mappato nel cromosoma 11, si estende per circa 1,8 paia di Kb ed è costituito da cinque esoni e quattro introni. Il GH caprino non è stato ancora collocato sulla mappa cromosomica

della capra, si estende per 2,544 paia di Kb ed è anch'esso costituito da cinque esoni e quattro introni.

Nei caprini (Yamano et al., 1991) e negli ovini (Valinsky et al., 1990), è stato osservato che nel locus del gene GH, sono presenti due alleli. Nelle pecore, in un allele (Gh1), il GH è rappresentato da una singola copia (gene GH1), mentre nell'altro (Gh2) il GH si presenta in duplicato: quello all'estremità 5' è il GH2-N, mentre quello all'estremità 3' è il GH2-Z e la loro espressione è regolata in modo differente. Il GH2-N è espresso nelle cellule somatotrope della ghiandola pituitaria anteriore (Warwick et al., 1989), mentre la copia GH2-Z è espressa nei trofoblasti della placenta e nel sincizio tra i 30 e 60 giorni di gravidanza, cioè nel periodo in cui la placenta ha il massimo sviluppo (Lacroix et al., 1996). Non è espresso, invece, nella ghiandola pituitaria (Gotwine et al., 1996). Nella placenta ovina, perciò sono espresse in bassa concentrazione 2 proteine del GH, una delle quali è probabilmente identica alla proteina pituitaria, prodotta dal gene GH1 o GH2-N, mentre l'altra differente seppur lievemente nella sequenza, è il prodotto del gene GH2-Z. (Lacroix et al., 1996). La proteina codificata dal gene GH2-Z differisce da quella codificata dal gene GH2-N per la sostituzione in posizione 9 di una glicina con una arginina e in posizione 63 di una glicina con una serina. Non ci sono prove dirette sul fatto che queste forme proteiche svolgano

differenti attività biologiche, ma la prima sostituzione coinvolge un amminoacido che fa parte del secondo sito di legame del GH con il suo recettore, mentre la seconda sostituzione è posizionata nella struttura a loop del primo sito di legame (Ofir et Gootwine, 1997). E' stato, comunque, ipotizzato che mentre la sostituzione aminoacidica Gly→Arg aumenta l'affinità del prodotto del gene GH2-Z per il suo recettore, la sostituzione Gly→Ser in posizione 63 interferisce con il legame al recettore (Wallis et al., 1998). Nella popolazione ovina, pertanto sono presenti soggetti omozigoti per GH1 o GH2 presentano rispettivamente due e quattro geni GH, mentre soggetti eterozigoti per GH1e GH2 hanno nel loro genoma tre geni GH.

Mappe di restrizione dei geni GH1, GH2-N, GH2-Z condotte sugli ovini hanno dimostrato che i geni hanno sequenza molto simile, solo le sequenze che fiancheggiano l'estremità 5' del GH1 e GH2-N uguali fra loro differiscono dalle sequenze che fiancheggiano l'estremità 5' del GH2-Z (Valinsky et al., 1990). Si è inoltre osservato che l'allele con i due geni GH2 si manifesta con una frequenza maggiore rispetto all'allele con il solo gene GH1e che fra gli ovini, gli animali che portano l'allele GH2-Z rappresentano più del 90% della popolazione, il che suggerisce che lo stesso può conferire alcuni vantaggi selettivi (Marques et al., 2006).

Figura 1. Sequenza del trascritto del gene GH

```

1  CACCAGACGACTCAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCTATGATGGCTGCAGGCCCCCGG
   .....ATGATGGCTGCAGGCCCCCGG
   .....-M--M--A--A--G--P--R--

61  ACGTCCCTGCTCCTGGCTTTCACCCTGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC
22  ACCTCCCTGCTCCTGGCTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGACTCAGGTGGTGGGCGCC
   8  -T--S--L--L--L--A--F--T--L--L--C--L--P--W--T--Q--V--V--G--A--

121  TTCCCAGCCATGTCCTTGTCCGGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTG
82  TTCCCAGCCATGTCCTTGTCCGGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCTCAGCACCTG
28  -F--P--A--M--S--L--S--G--L--F--A--N--A--V--L--R--A--Q--H--L--

181  CATCAACTGGCTGCTGACACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCGGAGGGACAG
142  CATCAGCTGGCTGCTGACACCTTCAAAGAGTTTGAGCGCACCTACATCCGGAGGGACAG
48  -H--Q--L--A--A--D--T--F--K--E--F--E--R--T--Y--I--P--E--G--Q--

241  AGATACTCCATCCAGAACACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCCGAAACCATCCGGGCCCCC
202  AGATACTCCATCCAGAACACCCAGGTTGCCTTCTGCTTCTCCGAAACCATCCGGGCCCCC
68  -R--Y--S--I--Q--N--T--Q--V--A--F--C--F--S--E--T--I--P--A--P--

301  ACGGGCAAGAATGAGGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTC
262  ACGGGCAAGAATGAGGCCCAGCAGAAATCAGACTTGGAGCTGCTTCGCATCTCACTGCTC
88  -T--G--K--N--E--A--Q--Q--K--S--D--L--E--L--L--R--I--S--L--L--

361  CTTATCCAGTCGTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCCTG
322  CTCATCCAGTCGTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCCTG
108  -L--I--Q--S--W--L--G--P--L--Q--F--L--S--R--V--F--T--N--S--L--

421  GTGTTTGGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTG
382  GTGTTTGGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTG
128  -V--F--G--T--S--D--R--V--Y--E--K--L--K--D--L--E--E--G--I--L--

481  GCGCTGATCGGGAGCTGGAAGATGTTACCCCGGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACC
442  GCCCTGATCGGGAGCTGGAAGATGGCACCCCGGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACC
148  -A--L--M--R--E--L--E--D--V--T--P--R--A--G--Q--I--L--K--Q--T--

541  TATGACAAATTTGACACAAACATGCGGAGTGACGACGCGCTGCTGAAGAACTACGGTCTG
502  TATGACAAATTTGACACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTGAAGAACTACGGTCTG
168  -Y--D--K--F--D--T--N--M--R--S--D--D--A--L--L--K--N--Y--G--L--

601  CTCTCCTGCTTCGGGAAGGACCTGCACAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGT
562  CTCTCCTGCTTCGGGAAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGT
188  -L--S--C--F--R--K--D--L--H--K--T--E--T--Y--L--R--V--M--K--C--

661  CGCCGCTTCGGGGAGGCGAGCTGCGCGTTCTAG
622  CGCCGCTTCGGGGAGGCGAGCTGTGCCTTCTAG
208  -R--R--F--G--E--A--S--C--A--F--*--

```

Fonte: Ensemble genome browser (www.ensembl.org)

background giallo : regione 5'UTR

colori del testo alternati : esoni

colori alternati del background: codoni

Il GH delle capre (fig. 1) presenta lo stesso tipo di varianti alleliche, una contiene un singolo gene GH ed è identificata come GH1, mentre l'altra è costituita da due geni presenti in tandem che sono identificati come GH2 e GH3. Questo arrangiamento genico in tandem è simile a quello osservato per i geni GH2-N e GH2-Z nelle pecore, anche se informazioni esatte sulle sequenze non sono al momento disponibili (Wallis et al., 1998).

Polimorfismo del gene dell'ormone della crescita

Il polimorfismo genetico nel gene del GH è stato osservato in varie specie di animali domestici, principalmente bovini, e in alcuni studi sono state stabilite correlazioni significative tra le specifiche varianti polimorfiche del gene GH e le caratteristiche produttive degli animali. Il polimorfismo può essere identificato con svariati metodi, tra i quali i più utilizzati sono stati la RFLP e la PCR-SSCP. Quest'ultima tecnica è definita da alcuni autori la più efficiente nel rivelare le mutazioni, oltre che la più economica e veloce rispetto a tecniche quali la PCR allele-specifica e la RFLP, anche con tutto lo svantaggio che deriva da questa metodica per via della possibile comparsa di occasionali bande inattese che possono complicare l'analisi (Marques et al., 2006).

Cowan et al. (1989) e Hilbert et al. (1989) rivelarono un sito polimorfico che era identico al sito di taglio dell'endonucleasi di restrizione MspI, localizzato nell'introne 3 del gene GH bovino, in posizione 1547 (Zhang et al., 1993). E' stato osservato che i genotipi, soprattutto in omozigosi per l'allele del polimorfismo per il sito di restrizione dell'endonucleasi MspI ($\text{GH}^{\text{MspI}^+}$) sono significativamente associati con produzioni maggiori di latte e percentuale di proteine (Zhou et al., 2005; Yao et al., 1996; Sabour et al., 1997). I genotipi che non presentano l'allele del polimorfismo per il sito di restrizione dell'endonucleasi MspI ($\text{GH}^{\text{MspI}^-}$) sono invece significativamente associati con maggiore composizione di grassi nel latte (Falaki et al., 1996; Zhang et al., 1993; Lee et al., 1994; Høj et al., 1993;) e con maggiore composizione in proteine in peso e in peso percentuale (Lagziel et al., 1996).

Sempre nel bovino, è stato osservato un polimorfismo caratterizzato da una singola sostituzione nucleotidica (SNP) C→G nella posizione 2141 dell'esone 5 del GH che determina un cambiamento dell'amminoacido Leu¹²⁷-Val¹²⁷ nella proteina matura codificata. La presenza di questa transversione annulla il sito di restrizione riconosciuto dall'endonucleasi AluI, pertanto l'enzima è stato utilizzato per la genotipizzazione del polimorfismo Alu (+/-) nel locus del GH bovino. Grochowska et al. (2001) ipotizzarono che la

sostituzione Leu¹²⁷-Val¹²⁷ comporta cambiamenti che coinvolgono le performance dell'attività metabolica del GH. Molto interessante è l'osservazione che l'allele che porta il polimorfismo GH^{Alu-} in omozigosi o in eterozigosi sembra essere associato a più alte concentrazioni plasmatiche di GH esibendo un effetto dominante rispetto all'allele che porta il polimorfismo GH^{Alu+} associato al rilascio di più alte concentrazioni di IGF-I. Questo è in contrasto con lo studio condotto da Schlee et al. (1994) che riportano un'associazione significativa tra il polimorfismo in omozigosi GH^{Alu+} e l'aumento delle concentrazioni del GH in bovine di razza Frisona in un allevamento tedesco. La presenza dell'allele GH^{Alu+} sarebbe coinvolto anche con un aumento della quantità di latte prodotto (Grochowska et al., 2001; Lucy et al., 1993; Zhang et al., 1992), anche se per Van der Werf et al. (1996) è la presenza dell'allele GH^{Alu-} a determinare un effetto positivo sulla produzione di latte.

Studi molto significativi di analisi di linkage sono stati realizzati usando la tecnica dell'SSCP. Lagziel et al. nel 1996, allo scopo di identificare degli aplotipi nel locus del gene del GH in bovine da latte di razza Holstein israeliana (*Bos taurus*) e in bovine progenitrici appartenenti al Bovine Reference Family Panel (bovini derivati dall'incrocio di *Bos taurus* e *Bos indicus*, analizzarono nove frammenti del gene GH e rivelarono in SSCP otto aplotipi, fra i quali

uno, di sicura origine *B.indicus* è stato correlato con significativi effetti sulla percentuale di proteine prodotte nel latte. Gli aplotipi sottoposti a sequenza hanno svelato 12 varianti alleliche (Lagziel et Soller, 1999).

Malveiro et al. (2001) con uno studio preliminare identifica con la tecnica PCR-SSCP alcuni polimorfismi all'interno degli esoni del gene GH in capre Algarvia di razza portoghese. Due profili polimorfici per gli esoni 1 e 2, quattro per l'esone 3, sei per l'esone 4 e cinque per l'esone 5. L'analisi della correlazione dei profili polimorfici con le caratteristiche produttive evidenzia che un profilo polimorfico nell'esone 4 e uno nell'esone 5 sono significamene associati con caratteristiche produttive di latte. Nel 2003 lo studio ripreso da Marques et al. conferma la stretta associazione fra polimorfismo genetico negli esoni del GH e le caratteristiche produttive in capre portoghesi di razza Serrana, appartenenti a due ecotipi: Ribatejano e Jarmelista. La correlazione fra i profili polimorfici osservati (due per gli esoni 1 e 2, sei per l'esone 3, dieci per l'esone 4 e cinque per l'esone 5) e le produzioni (quantità di latte, di grassi e di proteine, percentuale in peso di proteine e di grassi) ha evidenziato un'associazione significativa ($P < 0.05$) tra due profili polimorfici presenti rispettivamente nell'esone 4 e nell'esone 2 e la quantità di latte e un'associazione significativa ($P < 0.05$) tra due profili

polimorfici presenti rispettivamente nell'esone 1 e nell'esone 2 e la percentuale in peso di proteine. Questi autori, in base ai risultati ottenuti sottolineano l'importanza del gene GH come gene candidato per la selezione assistita da marcatori nella capra suggeriscono che l'esone 4 può essere considerato l'esone preferenziale fra i cinque del GH, per lo studio delle mutazioni coinvolte con variazioni nella quantità di latte prodotto. Anche nel GH della specie ovina, attraverso indagini in SSCP è stato trovato un elevato grado di polimorfismo da diversi autori (Bastos et al., 2001; Santos et al., 2004; Marques et al., 2006). Le regioni codificanti nel gene del GH ovino presentano maggior grado di polimorfismo rispetto a quelle del gene del GH bovino, nel quale le regioni polimorfiche coinvolgono principalmente le regioni non codificanti e l'esone 5 del gene L'esone 1 e il 5'-UTR si presentano come regioni altamente conservate, sia nel gene GH1 che in quello GH2-N (Marques et al., 2006). In ovini di razza Serra da Estrela (Marques et al., 2006) e in pecore di razza Merinos (Santos et al., 2004) è stato osservato che l'esone 2 del GH presenta il maggior numero di varianti polimorfiche, esattamente il contrario di quanto è stato notato nello stesso esone del gene caprino. Il gran numero di profili polimorfici che sono stati osservati nell'esone 4 del GH caprino non sono stati rivelati nel corrispettivo esone ovino (Marques et al., 2006; Marques et al., 2003; Malviero et al., 2001).

2. Scopo della ricerca

Scopo della ricerca

La bibliografia corrente evidenzia un interesse sempre crescente verso lo studio delle strategie di selezione che migliorino gli aspetti produttivi, in particolare la qualità e la quantità di latte nei ruminanti.

L'obiettivo di migliorare la qualità del latte non è di facile realizzazione, poichè il concetto di qualità implica molti aspetti. Il latte infatti, può essere valutato per la sua sicurezza, per il contenuto in elementi fondamentali, per le caratteristiche tecnologiche e organolettiche, per le proprietà nutrizionali e funzionali. Tutte queste caratteristiche sono, in misura differente, sotto il controllo genetico (Pilla et al., 2006).

Il gene dell'ormone della crescita (GH), ormone omeoretico, presenta notevole variabilità genetica, soprattutto a livello dei cinque esoni di cui è composto. Nei ruminanti, con tecniche di genetica molecolare quali la PCR-SSCP, si è osservato che alcuni profili polimorfici sono associati a caratteristiche produttive. Questo tipo di indagine inizialmente condotta su specie lattifere economicamente più importanti, come la bovina, è stata diffusa alla specie ovina e caprina.

Per la capra Sarda, gli interventi selettivi applicati non tengono conto degli aspetti qualitativi del latte, indispensabili a valorizzare in

maniera più appropriata il prodotto, inoltre non esiste un programma di caratterizzazione genetica degli animali. In questo contesto, sarebbe opportuno uno studio approfondito sui geni candidati che influenzano la qualità e la produzione del latte.

Lo scopo che questo lavoro si prefigge è di identificare e caratterizzare la presenza di polimorfismi di sequenza nucleotidica a livello del GH e valutare se eventuali mutazioni possono influenzare variazioni nelle produzioni.

3. Materiali e metodi

Materiali e Metodi

La ricerca è stata condotta su 50 capre di razza Sarda, appartenenti ad un unico allevamento, dislocato nella zona del Sulcis. Sono state scelte con criterio casuale, capre pluripare in lattazione e sono stati monitorati i parametri produttivi relativi ad una intera lattazione. Da tutti gli animali sono stati prelevati un campione di sangue periferico e un campione di latte ed è stata misurata la produzione latte giornaliera. Su ciascuno dei campioni di latte sono state determinate: la quantità di grasso, la quantità di proteine, il pH, la conta delle cellule somatiche o CCS (Fossomatic), e il contenuto microbico totale o CMT (Bacto-Scan). Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti, ottenuti sottoforma di buffy coat dai campioni di sangue raccolti con Na₂EDTA come anticoagulante e centrifugati a 800 x g per 15 minuti, alla temperatura di 4°C. L'estrazione è stata realizzata mediante l'utilizzo del Puregene DNA isolation kit (GENTRA) secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il DNA così ottenuto è stato sottoposto a valutazione della concentrazione e purezza attraverso rispettivamente la determinazione spettrofotometrica dell'assorbanza a lunghezza d'onda $\lambda=260$ e la valutazione del rapporto fra l'assorbanza definita alla lunghezza d'onda di 260 e quella definita alla lunghezza d'onda di 280. I campioni di DNA estratti sono stati utilizzati come

DNA stampo nelle reazioni di polimerizzazione a catena della polimerasi (PCR) specifiche per i cinque esoni del gene GH. Ciascun prodotto di amplificazione è stato sottoposto alla analisi del polimorfismo conformazionale del singolo filamento (SSCP), previa valutazione dell'avvenuta amplificazione attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Genotipizzazione dei cinque esoni dell'ormone della crescita

La valutazione del polimorfismo nei cinque esoni del GH è stata condotta seguendo le indicazioni di Marques e collaboratori (2003) mediante la tecnica della PCR-SSCP. Tutti i riferimenti numerici a posizioni nucleotidiche, nel presente lavoro, sono relativi alla sequenza del gene GH pubblicata con accession number D00476.

La PCR relativa al primo esone prevede l'amplificazione di un frammento di 112 bp, localizzato tra i nucleotidi 360-471 comprendente 72bp della regione 5'-UTR (nt 360-431), 13 bp della regione esone 1 (nt 432-444) e 27bp dell'introne 1 (nt 432-471) mediante gli oligonucleotidi proposti dagli stessi autori:

Forward primer GH-1F: 5'-CAGAGACCAATTCCAGGATC 3'

Reverse primer GH-1R: 5'-TAATGGAGGGGATTTTTGTG-3'

La PCR relativa al secondo esone prevede l'amplificazione di un frammento di 202 bp, localizzato tra i nucleotidi 673-874 comprendente 18 bp dell'introne 1 (nt 673-690), 162 bp dell'esone 2 (nt 692-852) e 22 bp dell'introne 2 (nt 853-874), mediante gli oligonucleotidi proposti dagli stessi autori :

Forward primer GH-2F: 5'-CCTCCTGGTCTCTCCCTAGG- 3'

Reverse primer GH-2R: 5'-GACACATCTCTGGGGAGCTT-3'

La PCR relativa al terzo esone prevede l'amplificazione di un frammento di 157 bp, localizzato tra i nucleotidi 1063-1219 comprendente 17 bp dell'introne 2 (nt 1063-1079), 117 bp dell'esone 3 (nt 1080-1196) e 23 bp dell'introne 3 (nt 1197-1219), mediante gli oligonucleotidi proposti dagli stessi autori:

Forward primer GH-3F: 5'-GTGTGTTCTCCCCCAGGAG- 3'

Reverse primer GH-3R: 5'-CTCGGTCCTAGGTGGCCACT -3'

La PCR relativa al quarto esone prevede la determinazione di un frammento di 199 bp, localizzato tra i nucleotidi 1416-1614, comprendente 10 bp dell'introne 3 (nt 1416-1425), 162 bp dell'esone 4 (nt 1426-1587) e 27 bp dell'introne 4 (nt 1588-1614), mediante gli oligonucleotidi proposti dagli stessi autori.

Forward primer GH-4F: 5'-CTGCCAGCAGGACTTGGAGC- 3'

Reverse primer GH-4R: 5'-GAAGGGACCCAACAACGCCA -3'

La PCR relativa al quinto esone prevede la determinazione di un frammento di 287 bp, localizzato tra i nucleotidi 1856-2142, comprendente 8 bp dell'introne 4 (nt 1856-1863), 201 bp dell'esone 5 (nt 1864-2064) e 78 bp della regione 3'-UTR (nt 2065-2142), mediante gli oligonucleotidi proposti dagli stessi autori.

Forward primer GH-5F: 5'-CTTGGCAGGAGCTGGAAGAT- 3'

Reverse primer GH-5R: 5'-AAAGGACAGTGGGCACTGGA -3'

Le reazioni di amplificazione, relative a tutti e cinque gli esoni realizzate in un volume finale di 25 µl, prevedono le seguenti condizioni: 25-50ng di DNA genomico; 4-16 pmol di ogni primer per reazione (Tab.1); 1.5mM di MgCl₂; dNTPs 200µM; tampone 20mM Tris-HCl (pH 8,4) e 50mMKCl (Invitrogen); 1U Taq PlatinumDNA polimerase (Invitrogen) e H₂O mQ fino a volume considerato.

I programmi di amplificazione sono stati eseguiti su "Mastercycler ep gradientS" (Eppendorf) secondo il seguente schema:

una denaturazione iniziale a 94°C per 2,5 minuti, seguita da 30 cicli di 94°C per 20 secondi (denaturing), 57°C-62°C (Tab1) per 30 secondi (annealing) e 72°C per 30 secondi (extension), e una extension finale di 72°C per 5 minuti.

Ogni frammento amplificato è stato rivelato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% per gli esoni 1 e 3 e al 2% per tutti gli altri, colorazione con bromuro di etidio 0,5µg/ml e osservazione sotto una fonte di raggi UV.

Tabella 1. Parametri utilizzati nelle PCR degli esoni 1-5 del gene GH

Esone	Coppia di primer	Concentrazione Primers (pmol)	Temperatura di annealing (°C)	DNA (ng)
1	GH1-For/GH1-Rev	16	57	25
2	GH2-For/GH2-Rev	16	62	50
3	GH3-For/GH3-Rev	4	60	25
4	GH4-For/GH4-Rev	8	60	25
5	GH5-For/GH5-Rev	16	62	50

Analisi SSCP:

L'analisi SSCP è stata realizzata con un apparato per elettroforesi verticale D-CODE Universal Mutation Detection System (BioRad) collegato ad un refrigeratore esterno. Questo strumento ha permesso l'esecuzione delle elettroforesi in gel non denaturante in condizioni di temperatura e wattaggio costanti per il tempo impostato. Ogni prodotto di amplificazione nel volume di 5 o 10µl, è stato aggiunto a 15µl di soluzione denaturante, chiamata anche Stop Solution costituita da 95% di formamide, 10mM NaOH, 0,05% di xilene-cianolo e 0,05%

di blu di bromofenolo. Tutti i campioni sono stati sottoposti anche alla denaturazione con il calore alla temperatura di 95°C per 5 minuti e la conformazione del filamento denaturato è stata preservata con il mantenimento del campione in ghiaccio fino al caricamento del suo intero volume sul gel. I gel utilizzati sono stati preparati con poliacrilamide in concentrazione 8-12% (Tab.2) con un rapporto acrilammide/bis di 37,5:1 (Fluka) in tampone TBE 0,5-1x (Tab.2) e TEMED e ammonio persolfato come iniziatore e catalizzatore della polimerizzazione. Il tampone TBE alle concentrazioni di utilizzo è stato preparato a partire da un tampone TBE 5x costituito da 0,44M Tris base, 0,44M Acido borico e 0,01M acido etilendiaminotetracetico pH=8 (EDTA). Le condizioni di corsa sono state per tutti gli amplificati relativi a tutti e cinque gli esoni di 25W costanti per 4-8 ore (Tab.2) alla temperatura di 15-20°C (Tab.2). La visualizzazione delle bande relative a ciascun campione è stata eseguita attraverso una sorgente di raggi UV fornita dal transilluminatore, previa colorazione con il colorante fluorescente Sybr-Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) per 30 minuti. L'immagine dei gel è stata conservata attraverso un sistema di fotodocumentazione (UV-FotoDoc) collegato al transilluminatore. Dall'osservazione dei profili elettroforetici di ciascun esone è stato possibile individuare quelli polimorfici e

preparare un campione rappresentativo di ciascuno di essi per il sequenziamento.

Tabella 2. Condizioni utilizzate per le analisi SSCP dei cinque esoni del gene GH delle capre di razza sarda

Esone	T%	Concentrazione del tampone TBE	Temperatura di corsa (°C)	Tempo di corsa in ore
1	12	1 x	15	8
2	10	0,5 x	15	4:30
3	12	1 x	15	7:30
4	10	0,5 x	15	6:15
5	8	0,5 x	20	4

Sequenziamento e analisi di sequenza

I prodotti di DNA genomico amplificato, relativi agli esoni mostranti in SSCP profili polimorfici, sono stati preventivamente purificati con il kit Magna Rack (Invitrogen), secondo le istruzioni della ditta fornitrice allo scopo di allontanare i primers e piccoli frammenti di DNA interferenti, per un accurato sequenziamento. Questo è stato realizzato con un sistema automatico ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem). Ogni campione è stato analizzato nelle due direzioni, senso e antisenso.

L'analisi preliminare delle sequenze attraverso il programma di comparazione nucleotidica, NucleotideBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) che ha permesso il confronto con sequenze depositate, ha confermato l'appartenenza dei frammenti di DNA alle regioni genomiche investigate. Successivamente tutte le sequenze relative a ciascun esone sono state allineate fra loro e con la sequenza completa del GH di specie caprina (accession number: D00476) presa come riferimento. I programmi utilizzati per l'allineamento multiplo sono stati ClustalW (<http://align.genome.jp/>) e BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Il programma BioEdit è stato utilizzato anche per la traduzione "in silico" rispettando il frame di lettura, delle regioni codificanti polimorfiche e per l'analisi della presenza di siti di restrizione creati o annullati dalla comparsa della mutazione.

Clonaggio del gene GH

Il clonaggio del gene del GH ha permesso di ottenere informazioni dettagliate sull'aplotipo dell'intero gene. Per questa finalità è stato utilizzato il DNA genomico di 4 soggetti provenienti dall'allevamento considerato per la presente ricerca, scelti in base alla variabilità dei profili polimorfici relativi agli esoni analizzati.

L'intero gene è stato amplificato utilizzando in coppia i primers:

GH-1F: 5'- CAGAGACCAATTCCAGGATC - 3'

GH-5R: 5'- AAAGGACAGTGGGCACTGGA - 3'

La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 25 µl con le seguenti condizioni: 25-50 ng di DNA genomico; 16 pmol di ogni primer per reazione; 1.5mM di MgCl₂; dNTPs 200µM; tampone 20mM Tris-HCl (pH 8,4) e 50mM KCl (Invitrogen); 1U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) e H₂O mQ fino a volume considerato.

Il programma di amplificazione è stato eseguito su "Mastercycler ep gradientS" (Eppendorf) secondo il seguente schema:

una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di 94°C per 30 secondi (denaturing), 62°C per 30 secondi (annealing) e 72°C per 30 secondi (extension), e una extension finale di 72°C per 5 minuti. I prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8 % e osservazione sotto una fonte di raggi UV, previa colorazione con bromuro di etidio 0,5µg/ml. Il prodotto di amplificazione dell'intero gene del GH è stato clonato nel vettore pCR2.1 secondo le istruzioni del TA Cloning Kit (Invitrogen Life Technologies) e successivamente trasformato in *Escherichia coli* One Shot TOP10, competenti chimicamente (Invitrogen Life Technologies). I plasmidi ricombinanti sono stati

purificati con il kit Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) secondo le indicazioni della ditta produttrice. I plasmidi ricombinanti contenenti il gene del GH amplificato lungo circa 1780 bp sono stati sottoposti al sequenziamento diretto in entrambe le direzioni.

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati con il software Popgene32 (Yeh et al., 2000) per il computo delle frequenze alleliche.

L'analisi comparativa delle caratteristiche produttive delle cinquanta capre di razza sarda con i profili genomici derivati dall'analisi PCR-SSCP degli esoni del gene GH è stata eseguita con il metodo statistico Anova. I dati produttivi considerati nell'analisi sono stati raccolti in nell'arco di un anno e hanno interessato la quantità di latte giornaliera, la quantità di grasso, la quantità di proteine, il pH, la conta delle cellule somatiche o CCS e il contenuto microbico totale o CMT.

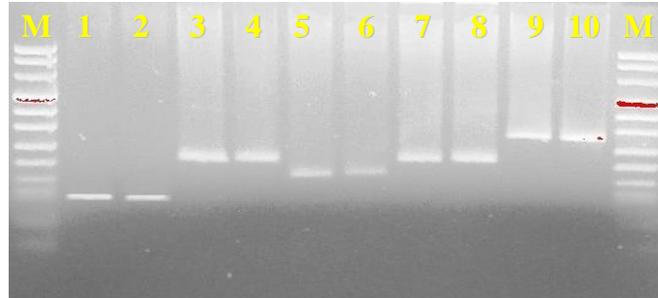
4. Risultati e discussione

Risultati e discussione

L'elevato polimorfismo riscontrato da diversi autori (Malviero et al., 2001; Marques et al., 2003; Marques et al., 2006) nel gene del GH nella specie ovina e caprina, unitamente alla rivelazione della associazione di alcuni alleli con determinati caratteri produttivi, è stato lo stimolo che ha indotto ad investigare il gene GH in capre di razza sarda. Finora, su questo argomento, non esistono lavori pubblicati in letteratura.

I frammenti di DNA amplificato, contenenti i cinque esoni del gene GH, sono stati analizzati mediante PCR-SSCP, procedimento che ha evidenziato, come illustrato in seguito, un elevato polimorfismo. Nella figura 2 viene rappresentato un tracciato elettroforetico, su gel di agarosio, del prodotto di amplificazione dei cinque esoni appartenenti al gene GH di *Capra hircus*. Le dimensioni dei frammenti corrispondono a quelle attese, in accordo con le posizioni dei primers costruiti da Malviero et al. (2001) sulla sequenza pubblicata con accession number D00476 (Kioka et al., 1989).

Fig. 2. Separazione elettroforetica su gel di agarosio degli esoni del gene GH amplificati mediante PCR.



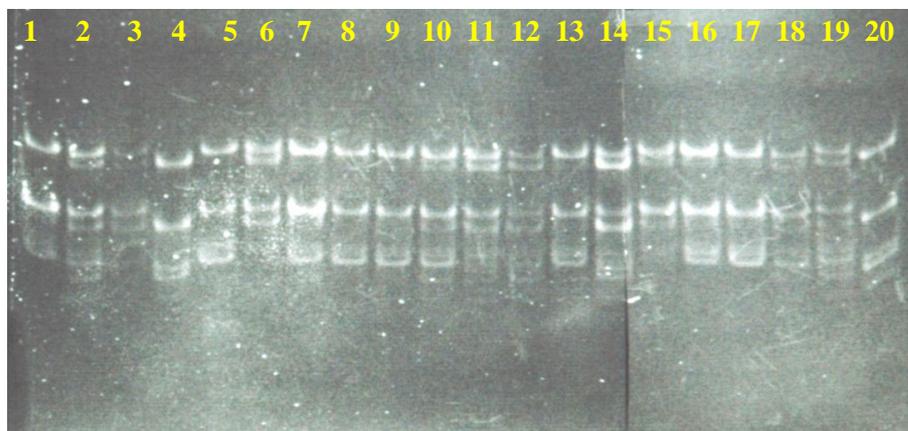
M: markerVIII (Roche); lane 1, 2: esone1 (112 bp);
Lane 3, 4: esone 2 (202 bp);
Lane 5,6: esone 3 (157bp);
Lane 7, 8: esone 4 (200 bp);
Lane 9, 10: esone 5 (287 bp).

Analisi PCR-SSCP

Le analisi relative al polimorfismo della conformazione del singolo filamento (PCR-SSCP) eseguite sui cinque amplificati PCR ha evidenziato diversi profili polimorfici.

In figura 3 sono mostrati i profili polimorfici relativi al frammento del gene GH contenente l'esone 1. Sono stati rivelati tre schemi principali di conformazione, facilmente individuabili per la presenza di due bande o di una sola di esse.

Figura 3. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 1

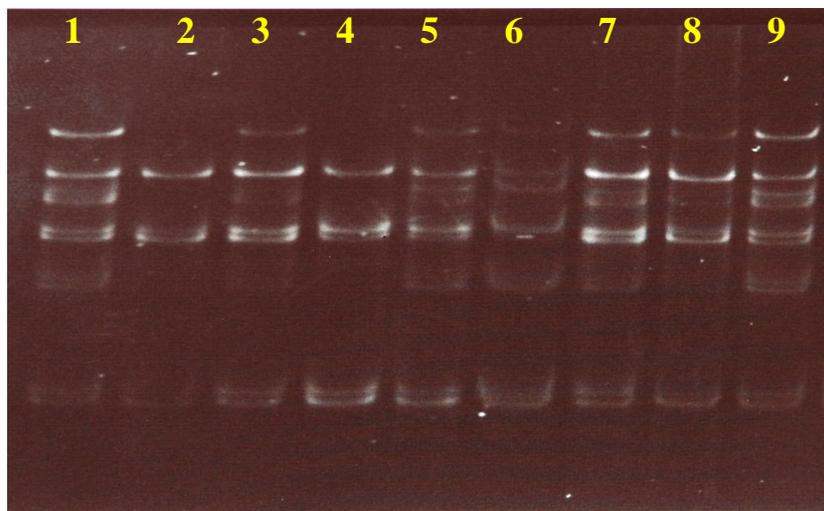


Lane 1, 5, 7, 8, 9, 13, 17: profiloI; lane 4, 20: profiloII; lane 2, 3, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19: profiloIII

In figura 4 sono rappresentati i profili polimorfici relativi all'esone 2. I campioni rappresentati indicano l'esistenza di due pattern di

conformazione, individuati da due e quattro bande. Le bande rappresentate nella parte inferiore in questo gel come nei successivi mostrati, corrispondono ai filamenti di DNA a doppio filamento e pertanto non sono da considerarsi informative.

Figura 4. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 2

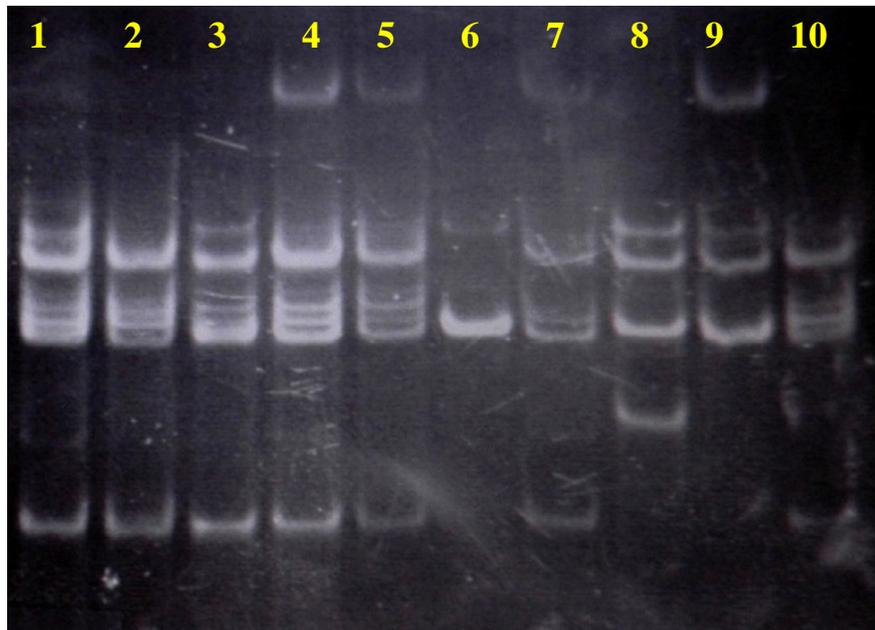


Lane 2, 4: profilo I; lane 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9: profilo II

Nelle Figure 5-9 sono mostrati i profili polimorfici degli esoni 3, 4 e 5 del gene GH. Risulta immediatamente evidente l'abbondante variabilità genetica in queste regioni di DNA, espressa visivamente dalla presenza di otto, dodici e sei pattern di conformazione, rispettivamente. La complessità che emerge da queste immagini può essere spiegata dalla presenza di più copie di geni GH, cioè dal polimorfismo definito *allelic copy number variation (CNV)*, già

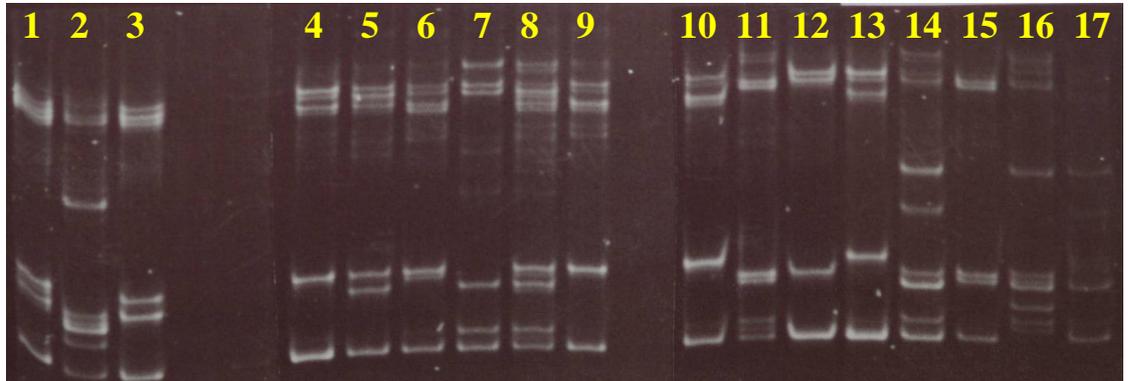
documentato, a questo locus, nelle specie ovina e caprina (Yamano et al., 1991). Infatti, ciascuno degli animali considerati potrebbe presentare da due a quattro geni GH per genoma diploide, a seconda che porti l'allele contenente una singola copia di GH (gGH1) o l'allele con il gene GH duplicato in tandem (gGH2 e gGH3).

Figura 5. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 3



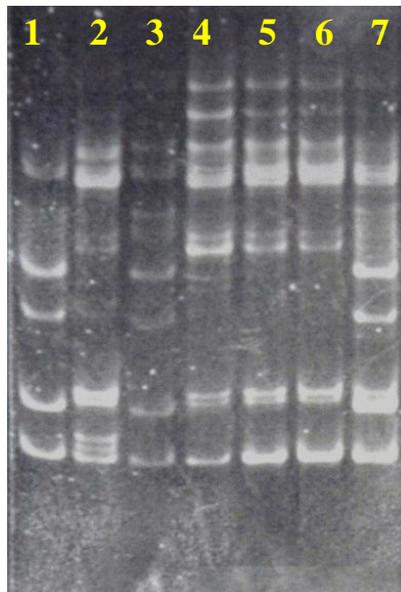
Lane 1, 3: profiloIII; lane 2: profiloVI ; lane 4, 5: profiloIV; lane 6: profilo I; lane 7: profilo V; lane 8: profilo II; lane 9: profilo VII; lane 10: profiloVIII

Figura 6. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 4



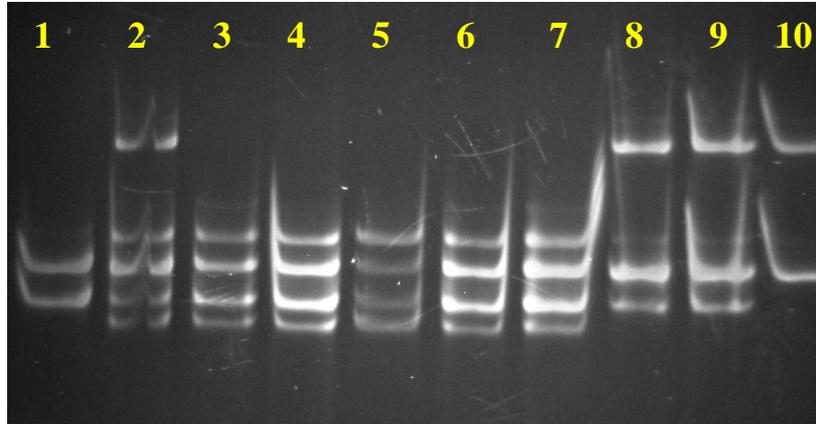
Lane 1, 3, 5: profilo IV; lane 2: profilo III; lane 4, 6, 9, 10, 13: profilo II; lane 7, 11: profilo V; lane 8: profilo VI; lane 12: profilo I; lane 14: profilo X; lane 15: profilo XI; lane 16: profilo VII; lane 17: profilo VIII

Figura 7. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 4



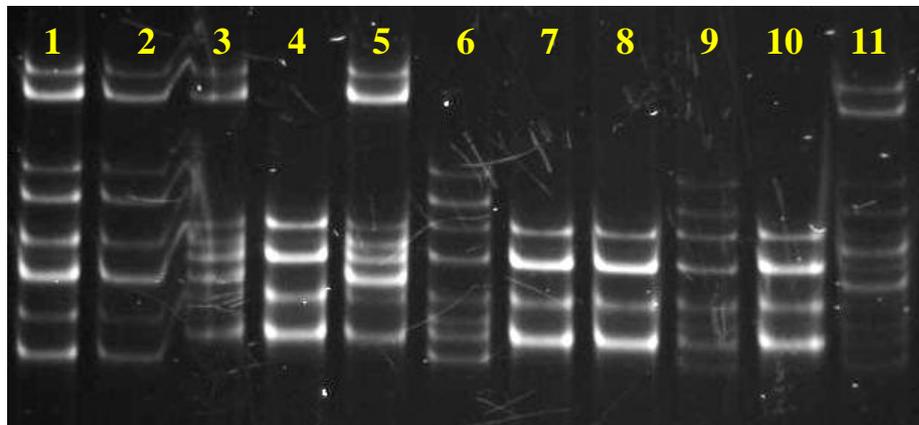
Lane 1: profilo VIII, lane 2: profilo V; lane 3: profilo XII; lane 4, 5, 6: profilo IX; lane 7: profilo X

Figura 8. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 5



Lane 1: profilo V; lane 2: profilo II; lane 3, 4, 5, 6, 7: profilo I; lane 8, 9: profilo III; lane 10: profilo IV

Figura 9. PCR-SSCP per la contemporanea rivelazione dei diversi genotipi al locus GH esone 5



Lane 1, 2: profilo VI; lane 4, 7, 8, 10: profilo I

Variazioni della sequenza nucleotidica

Il sequenziamento dei profili polimorfici riscontrati in SSCP ha permesso di tradurre la variabilità osservata in variazioni della sequenza nucleotidica. Le diverse mutazioni emerse da questa indagine sono descritte nella tabella 3.

Tabella 3. Polimorfismi nelle regioni codificanti e nel promotore del gene GH, e variazioni aminoacidiche presunte

	bp*	Variazione nt	Variazione aa		bp*	Variazione nt	Variazione aa
Estone 1	429	A→G		Estone 4	1442	G→A	Arg→His
					1532	A→G	Asp→Gly
Estone 2	693	G→C	Gly		1551	G→A	Leu
	702	G→C	Thr		1578	G→C	Ala
	781	G→A	Gly→Ser		1585	C→T	Arg→Trp
Estone 3	1121	G→A	Gln	Estone 5	1938	G→C	Arg
	1148	C→T	Ser		1956	G→C	Leu
	1160	G→A	Pro		2040	C→T	Phe
	1170	G→A	Gly→Ser		2049	G→C	Ala
	1178	T→C	Asn		2055	C→T	Cys
	1179	G→C	Glu→Gly		2058	G→C	Ala
					2094	C ins.	

* Le variazioni sono numerate in riferimento alla sequenza pubblicata con accession number D00476.

L'esone 1, che codifica per parte del peptide segnale, non ha presentato mutazioni. Tuttavia, il frammento amplificato contenente questo esone, analizzato in SSCP, ha permesso di rivelare una mutazione (A→G) nella regione promotore del gene, regione la cui sequenza è fondamentale per il corretto processo di trascrizione. È interessante notare che la variazione da noi riscontrata (G) differisce sia dalla sequenza caprina di riferimento (accession number D00476) che dalla sequenza bovina, in quanto entrambi presentano una A.

L'esone 2 codifica per gli aminoacidi della regione NH₂ terminale del peptide maturo. In base a studi effettuati sul GH umano (Juárez-Aguilar et al., 1999), è possibile ipotizzare che gli aminoacidi codificati da questo esone facciano parte di entrambi i siti strutturali di legame con il recettore del GH. La nostra indagine ha evidenziato l'esistenza di due mutazioni localizzate nei nucleotidi 693 e 702, che sono risultate silenti, e di una mutazione al nt 781 che provoca la sostituzione di una glicina con una serina (al nono aminoacido della proteina matura), presunta in base alla traduzione della sequenza nucleotidica. Questo potrebbe avere conseguenze importanti sulla funzionalità dell'ormone.

L'esone 3 presentava sei diversi SNPs, due dei quali sono responsabili di sostituzioni aminoacidiche, G→A al nt 1170, che porta alla

sostituzione Gly→Ser₈₉ e G→C (nt 1179) che determina la sostituzione Glu→Gly₉₂.

Anche nell'esone 4 è stato possibile attribuire la variabilità riscontrata nell'indagine SSCP a numerose variazioni della sequenza nucleotidica. Sono stati individuati 5 SNPs, uno dei quali (1578 G→C) era presente in tutti i campioni analizzati. Tre degli SNPs individuati determinano presumibilmente sostituzione aminoacidica, questi sono G→A (nt 1442), A→G (nt 1532) e C→T (nt 1585); le variazioni della struttura primaria dell'ormone della crescita ad essi associate sono Arg→His₁₀₃, Asp→Gly₁₃₃ e Arg→Trp₁₅₁, rispettivamente. La prima sostituzione aminoacidica non determina variazione della polarità della molecola, mentre le altre due possono alterare la carica elettrica del peptide determinandone una modificazione del comportamento.

Infine, il frammento di DNA contenente l'esone 5 presentava sei diverse mutazioni. Di queste, cinque si trovano all'interno dell'esone stesso, e non comportano variazioni aminoacidiche, mentre la sesta variazione è costituita dalla inserzione/delezione di una citosina 29 bp a valle dello stop codon.

Frequenze alleliche e genotipiche

Pur non essendo nota l'esatta organizzazione genomica dei geni del GH in ciascun individuo analizzato, e di conseguenza l'appartenenza di ciascuna mutazione ad uno specifico allele CNV (gGH1, gGH2, gGH3), abbiamo comunque ritenuto informativo calcolare la distribuzione delle frequenze alleliche relative ad alcune mutazioni rivelate all'interno della popolazione.

I genotipi sono stati attribuiti in base al sequenziamento di numerosi frammenti di DNA amplificato PCR e all'analisi SSCP; per l'analisi delle frequenze alleliche e genotipiche sono stati considerati solo i genotipi attribuiti con certezza. Le frequenze alleliche e genotipiche sono mostrate rispettivamente nelle tabelle 4 e 5.

Tabella 4. Frequenze alleliche al locus GH

Esone 1		Esone 2	
nt 429	n=49	nt 781	n=50
A	0.612	A	0.370
G	0.388	G	0.630

Esone 3									
nt 1121 n=37		nt 1148 n=37		nt 1160 n=37		nt 1170 n=37		nt 1178 n=31	
A	0.284	C	0.338	A	0.446	A	0.310	C	0.371
G	0.716	T	0.662	G	0.554	G	0.690	T	0.629

Esone 4							
nt 1442 n=45		nt 1532 n=45		nt 1551 n=45		nt 1585 n=40	
A	0.433	A	0.300	A	0.656	C	0.400
G	0.567	G	0.700	G	0.344	T	0.600

Esone 5					
nt 2040 n=50		nt 2055 n=50		2094 C indel n=47	
C	0.830	C	0.970	A	0.149
T	0.170	T	0.030	B	0.851

La Tabella 4 riassume la distribuzione delle frequenze alleliche, da questa si nota che gli alleli trovati sono fissati nella popolazione analizzata, nessuno infatti presenta frequenze inferiori al 5%, tranne la sostituzione C→T al nucleotide 2055 nell'esone 5 che ha una frequenza di 0.03.

Tabella 5. Frequenze genotipiche (%) al locus GH

Esone 1		Esone 2	
nt 429	n=49	nt 781	n=50
AA	26.53	AA	-
AG	69.39	AG	74.00
GG	4.08	GG	26.00

Esone 3									
nt 1121 n=37		nt 1148 n=37		nt 1160 n=37		nt 1170 n=37		nt 1178 n=31	
AA	-	CC	5.40	AA	43.25	AA	-	CC	-
AG	56.76	CT	56.76	AG	2.70	AG	62.16	CT	74.19
GG	43.24	TT	37.84	GG	54.05	GG	37.84	TT	25.81

Esone 4							
nt 1442 n=45		nt 1532 n=45		nt 1551 n=45		nt 1585 n=40	
AA	31.12	AA	2.22	AA	46.67	CC	2.50
AG	24.44	AG	55.56	AG	37.78	CT	75.00
GG	44.44	GG	42.22	GG	15.55	TT	22.50

Esone 5					
nt 2040 n=50		nt 2055 n=50		2094 C indel n=47	
CC	70.00	CC	96.00	AA*	4.25
CT	26.00	CT	2.00	AB	21.28
TT	4.00	TT	2.00	BB*	74.47

A*= presenza di una citosina (inserzione)

B*=assenza di una citosina (delezione)

La distribuzione dei genotipi è rappresentata in tabella 5. Da questa si evince che negli esoni 2 e 3 mancano alcuni dei genotipi omozigoti attesi, questo può essere dovuto al ridotto numero di soggetti considerati. La complessità dovuta al fenomeno della duplicazione genica impedisce di attribuire univocamente le mutazioni trovate al

singolo gene (allele CNV), quindi non è possibile dedurre informazioni sugli aplotipi più diffusi direttamente dalla analisi statistica dei genotipi.

Al fine di acquisire informazioni sull'aplotipo, è stato analizzato il DNA appartenente a quattro soggetti della popolazione in esame, attraverso il clonaggio del gene. Questo ha permesso di evidenziare l'esistenza delle associazioni rappresentate in tabella 6, in cui sono schematizzate soltanto quelle mutazioni che potrebbero esercitare un effetto sul comportamento dell'ormone in esame. Sono state considerate infatti tutte le variazioni presumibilmente responsabili di sostituzioni aminoacidiche, oltre alla sostituzione A→G nel promotore e alla in/del della citosina a valle dello stop codon, che potrebbero influenzare il livello di trascrizione del gene o la stabilità del mRNA, rispettivamente.

Tabella 6. rappresentazione schematica delle associazioni aplotipiche relative ad alcune variazioni nucleotidiche e relativa sequenza peptidica.

	esone 1	esone 2	esone 3		esone 4			esone 5
Aplotipo	nt 429 A→G	nt 781 G→A	nt 1170 G→A	nt 1179 G→C	nt 1442 G→A	nt 1532 A→G	nt 1585 C→T	nt 2094 C ins
1	G	G	G	G	A	G	T	-
2	G	G	G	G	-	A	C	C in
3	G	G	G	G	G	A	C	C in
4	A	G	A	G	G	G	T	C del
Struttura primaria gene GH								
1		Gly	Gly	Glu	His	Gly	Trp	
2		Gly	Gly	Glu	-	Asp	Arg	
3		Gly	Gly	Glu	Arg	Asp	Arg	
4		Gly	Ser	Glu	Arg	Gly	Trp	

Caratteri produttivi

Nelle tabelle mostrate in seguito si riportano le associazioni tra i profili polimorfici ottenuti dall'analisi SSCP e i valori medi dei parametri chimici, fisici e citologici del latte ed i livelli produttivi degli animali.

Tabella 7: Valori medi (\pm d.s.) dei parametri fisico-chimici del latte determinati in funzione dei diversi profili polimorfici

	ESONE 2 gene GH											
	Peso (g)		Grasso %		Proteine %		pH		CCS (n ³ /ml)		CMT (UFC ³ /ml)	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
Profilo I	686.9 ^b	302.9	5.93 ^b	0.96	4.35	0.43	6.64 ^B	0.080	5.75	0.57	4.28	0.46
Profilo II	597.0 ^a	261.8	5.58 ^a	1.24	4.36	0.47	6.59 ^A	0.089	5.69	0.57	4.21	0.47

Medie nella stessa colonna con differenti lettere minuscole indicano differenze significative ($P < 0.05$); differenti lettere maiuscole indicano differenze significative ($P < 0.01$)

Il test t di Student ha evidenziato differenze significative fra i profili polimorfici I e II dell'esone 2 (Tab. 7) per quanto riguarda la quantità di latte prodotto, maggiore per il profilo I e per la percentuale di grasso ($P < 0.05$). L'esone 3 (Tab. 8) presentava profili polimorfici che differivano significativamente per la percentuale in grasso ($P < 0.05$), il pH, CCS e CMT ($P < 0.01$).

Tabella 8: Valori medi (\pm d.s.) dei parametri fisico-chimici del latte determinati in funzione dei diversi profili polimorfici.

	ESONE 3 gene GH											
	Peso (g)		Grasso %		Proteine %		pH		CCS (n ³ /ml)		CMT (UFC ³ /ml)	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
Profilo I	609.7	282.0	5.49a	1.26	4.38	0.49	6.59 ^A	0.09	5.66 ^B	0.58	4.16 ^A	0.39
Profilo II	618.4	249.6	5.66ab	1.26	4.31	0.20	6.62 ^A	0.07	5.45 ^A	0.41	4.50 ^B	0.46
Profilo III	683.4	255.5	5.72ab	1.11	4.30	0.50	6.61 ^A	0.09	5.78 ^B	0.59	4.22 ^A	0.60
Profilo IV	700.3	285.2	5.42a	0.87	4.10	0.53	6.67 ^B	0.08	6.18 ^C	0.35	4.12 ^A	0.41
Profilo V	629.5	259.8	6.21b	0.90	4.57	0.29	6.63 ^{AB}	0.05	5.40 ^A	0.59	4.56 ^B	0.58
Profilo VI	601.0	150.8	6.28b	0.49	4.21	0.27	6.66 ^{AB}	0.06	5.84 ^{ABC}	0.14	3.98 ^A	0.16
Profilo VII	465.5	157.8	6.14b	1.10	4.38	0.22	6.58 ^A	0.09	5.85 ^{ABC}	0.49	4.28 ^A	0.37
Profilo VIII	618.63	421.7	6.38b	0.59	4.45	0.41	6.58 ^A	0.08	5.86 ^{ABC}	0.59	4.21 ^A	0.40

Medie nella stessa colonna con differenti lettere minuscole indicano differenze significative ($P < 0.05$); differenti lettere maiuscole indicano differenze significative ($P < 0.01$)

Per l'esone 4 (Tab. 9) sono state riscontrate differenze significative tra i profili polimorfici derivati dall'analisi SSCP per la quantità di latte prodotto, la percentuale di proteine, il pH e CCS ($P < 0.01$).

Tabella 9: Valori medi (\pm d.s.) dei parametri fisico-chimici del latte determinati in funzione dei diversi profili polimorfici

	ESONE 4 gene GH											
	Peso (g)		Grasso %		Proteine %		pH		CCS (n ³ /ml)		CMT (UFC ³ /ml)	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
Profilo I	641.3 ^{AB}	244.7	5.38	0.59	4.29 ^B	0.22	6.58 ^A	0.05	5.48 ^A	0.57	4.17	0.49
Profilo II	545.3 ^A	210.9	5.69	1.42	4.49 ^C	0.49	6.59 ^A	0.09	5.72 ^A	0.60	4.26	0.52
Profilo III	831.0 ^{BC}	289.2	5.35	0.33	4.27 ^B	0.27	6.62 ^{AB}	0.05	5.30 ^A	0.48	4.18	0.34
Profilo IV	510.0 ^A	185.4	5.91	1.12	4.30 ^B	0.27	6.57 ^A	0.08	5.57 ^A	0.48	4.36	0.45
Profilo V	685.0 ^B	264.3	5.98	0.99	4.47 ^{BC}	0.35	6.66 ^B	0.03	5.51 ^A	0.61	4.41	0.24
Profilo VI	481.0 ^A	159.0	4.96	1.52	4.29 ^B	0.13	6.62 ^{AB}	0.07	5.34 ^A	0.29	4.88	0.50
Profilo VII	885.0 ^C	354.3	5.83	0.69	4.34 ^B	0.19	6.63 ^{AB}	0.07	5.82 ^{AB}	0.54	4.07	0.24
Profilo VIII	688.4 ^B	333.3	5.74	1.20	4.21 ^B	0.63	6.61 ^{AB}	0.10	6.03 ^B	0.49	4.21	0.60
Profilo IX	654.7 ^{AB}	183.2	5.17	0.95	4.22 ^B	0.24	6.65 ^B	0.07	5.70A ^B	0.61	4.19	0.35
Profilo X	613.8 ^{AB}	192.9	5.83	0.89	4.39 ^{BC}	0.39	6.64 ^B	0.10	5.70A ^B	0.61	4.15	0.32
Profilo XI	601.0 ^{AB}	150.8	6.28	0.49	4.21 ^{ABC}	0.27	6.66 ^B	0.06	5.84A ^B	0.14	3.98	0.16
Profilo XII	1409.0 ^D	416.2	5.25	0.57	3.60 ^A	0.32	6.69 ^B	0.08	5.37A ^B	0.16	3.89	0.06

Medie nella stessa colonna con differenti lettere minuscole indicano differenze significative ($P < 0.05$); differenti lettere maiuscole indicano differenze significative ($P < 0.01$)

Tabella 10: Valori medi (\pm d.s.) dei parametri fisico-chimici del latte determinati in funzione dei diversi profili polimorfici

	ESONE 5 gene GH											
	Peso (g)		Grasso %		Proteine %		pH		CCS (n ³ /ml)		CMT (UFC ³ /ml)	
	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS	M	DS
Profilo I	541.4 ^A	205.9	5.66	1.33	4.41	0.44	6.60	0.08	5.69 ^B	0.57	4.31	0.50
Profilo II	751.8 ^B	305.0	5.93	1.22	4.40	0.54	6.60	0.10	6.16 ^C	0.50	4.18	0.60
Profilo III	810.2 ^B	365.5	5.55	0.63	4.19	0.34	6.58	0.08	5.43 ^A	0.49	4.08	0.28
Profilo IV	782.0 ^B	262.9	5.67	0.80	4.19	0.34	6.65	0.08	5.43 ^A	0.36	4.12	0.30
Profilo V	598.0 ^A	362.8	5.80	1.05	4.18	0.66	6.63	0.075	6.20 ^C	0.29	4.31	0.52
Profilo VI	488.5 ^A	124.4	5.64	0.99	4.40	0.44	6.63	0.14	5.60 ^{AB}	0.63	4.04	0.28

Medie nella stessa colonna con differenti lettere minuscole indicano differenze significative ($P < 0.05$); differenti lettere maiuscole indicano differenze significative ($P < 0.01$)

Nel quinto esone (Tab. 10) sono emerse differenze significative fra i profili polimorfici I, V e VI ed i rimanenti II, III e IV in relazione alle produzioni ed al CCS ($P < 0.01$). Come si vede, le produzioni medie registrate nel nostro campione sono, in alcuni casi, superiori agli 800 g/die, valore decisamente inferiore alle produzioni fornite da razze ad elevata attitudine lattifera.

Come già riscontrato in precedenti indagini svolte su questa razza (Vacca et al. 2003), la capra Sarda si contraddistingue per gli elevati tenori in grasso e proteine, rispettivamente pari al 5% e 4,1%. I dati

relativi ai lipidi, infatti, dimostrano come questi valori siano superiori a quelli riportati in letteratura per capre di razze maggiormente produttive (Pilla et al., 1980; Castagnetti et al., 1984; Pizzillo et al., 1994) e simile a quelli di altre capre rustiche (Casoli et al., 1985). Anche per il tenore in proteine, il confronto con le altre razze depone a favore della capra Sarda (Duranti et al., 1991; Casoli et al., 1986; Freschi 1992).

I valori della carica microbica totale, indicatore della situazione igienico-sanitaria delle aziende, segnalano buone condizioni di allevamento, nonostante la mungitura sia effettuata manualmente ed in condizioni di precarietà strutturale. La conta delle cellule somatiche presenta valori che possono sembrare elevati, se confrontati con altre specie domestiche, ma simili a quelli rilevati Morgan et al. (2003) in altre razze caprine e differenti realtà manageriali.

Mutazioni contenute nei profili polimorfici

Ai profili polimorfici relativi ad un determinato esone, differenti fra loro in SSCP, non sempre corrispondono genotipi diversi (Tab. 11). Ad esempio, nell'esone 3 i profili III, V, VII ed VIII, che mostrano un bandeggio differente nell'analisi elettroforetica, risultano identici dal punto di vista genotipico, in base alle mutazioni identificate. E' opportuno considerare a questo punto che allo stato attuale di conoscenze non si è in grado di valutare l'assetto genomico al locus GH, in quanto non esistono elementi che permettano di discriminare tra loro gli alleli CNV nella capra. Quindi, la maggiore eterogeneità dei pattern di conformazione SSCP rispetto alle combinazioni genotipiche può derivare dalla variabilità del numero di copie del gene in ciascun individuo.

Tabella 11. Mutazioni e relativi profili polimorfici

Estone 2						
	nt					
	781					
Profilo I	GG					
Profilo II	AG					
Estone 3						
	1121	1148	1160	1170	1178	1179
Profilo I	GA	TC	GG	AG	CT	GG
Profilo II	GA	TC	AG	AG	CT	GG
Profilo III	GG	TT	AA	GG	TT	GG
Profilo II	GG	CC	AA	AG	CT	
Profilo IV	GG	TT	AA	GG	TT	GG
Profilo VI	GA	TC	GG	AG	CT	GG
Profilo VII	GG	TT	AA	GG	TT	GG
Profilo VIII	GG	TT	AA	GG		
Estone 4						
	1442	1532	1551	1578	1585	
Profilo I	GA	GG	AA	CC	TT	
Profilo II	AA	GG	AA	CC	CT	
Profilo III	GG	GA	GA	CC	TT	
Profilo IV	GG	GA	GA	CC	CT	
Profilo V	GG	GA	GA	CC	CT	
Profilo VI	GA	GA	AA	CC	CT	
Profilo VII	GG	GA	GA	CC	CT	
Profilo VIII	GA	GA	GG	CC	CT	
Profilo IX	GG	GA	GA	CC	CT	
Profilo X	GG	GA	GA	-	-	
Profilo XI	GG	AA	GG	CC	CC	
Profilo XII	GG	GA	AA	CC	CT	
Estone 5						
	1938	2040	2049	2055	2058	2094
Profilo I	CC	CC	CC	CC	CC	BB
Profilo II	CC	CT	CC	CC	CC	AB
Profilo III	CC	CT	CC	CC	CC	AB
Profilo IV	CC	TT	CC	CC	CC	AA
Profilo V	CC	CC	CC	TT	CC	BB
Profilo VI	CC	CT	CC	CT	CC	AB

La variabilità del numero di copie geniche è un fenomeno molto diffuso nel genoma dei mammiferi. Benchè sia ancora in corso di studio, sembra probabile che, almeno negli umani, le varianti del numero di copie (CNVs) rendono conto di una sostanziale quantità di variazione genetica. Poichè molti CNVs includono geni che risultano in livelli differenziali di espressione genica, i CNVs possono rendere conto di una proporzione significativa della variazione fenotipica normale.

5. Conclusioni

Conclusioni

Questo studio è stato realizzato con la finalità di aumentare la conoscenza del patrimonio genetico delle capre appartenenti alla razza-popolazione Sarda, in relazione ai geni che codificano per il GH. Infatti, con l'utilizzo di una metodica facile da eseguire e non eccessivamente dispendiosa come la PCR-SSCP, supportata da una indagine di sequenziamento nucleotidico, si è riusciti a riscontrare in questo locus un notevole livello di variabilità genetica, in ciascuno dei cinque esoni analizzati. Si può affermare la variabilità è elevata ed è attribuibile sia a singole mutazioni nucleotidiche (SNPs) che alla variazione del numero delle copie geniche (CNVs). Nella regione del promotore e all'interno di ciascun esone sono state riscontrate mutazioni di vario genere, quali transizioni, transversioni, inserzione/delezione.

Alcune mutazioni possono essere considerate di importanza maggiore perchè comportano sostituzioni aminoacidiche a livello della regione codificata dagli esoni 2, 3 e 4. Poichè i siti di legame del GH al suo recettore coinvolgono porzioni codificate soprattutto dagli

esoni 2 e 4 del gene, si può supporre che tali sostituzioni possano avere un'influenza funzionale, anche se solo uno studio approfondito della struttura molecolare della proteina matura, contenente gli aminoacidi mutati, può dare informazioni in proposito.

Un altro dato che emerge dalla ricerca è che alcuni dei profili polimorfici osservati in SSCP sono risultati associati con variazioni significative dei caratteri produttivi. La correlazione, valutata con metodi statistici, ha evidenziato che esistono differenze significative tra i pattern polimorfici dell'esone 2 per le quantità di grasso % e la quantità di latte prodotta giornalmente, differenze significative esistono anche tra alcuni polimorfismi dell'esone 3 per la quantità di grasso %, il CCS e il CMT. Pattern di conformazione differiscono significativamente all'interno dell'esone 4 per la quantità di latte prodotto, il pH e % di proteine, mentre l'esone 5 mostra un'associazione con la quantità di latte prodotto giornalmente. In conclusione, si può affermare che è necessario estendere lo studio allo screening di un maggior numero di soggetti, per confermare quali dei polimorfismi fin qui caratterizzati e associati con caratteristiche produttive possono essere usati come marcatori molecolari.

6. Bibliografia

Bibliografia

1. Agellon LB, Davies SL, Chen IT, Powers DA.(1988) Structure of fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implication. Proc Natl Acad Sci USA 85:5136-5140.
2. Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. (1992) Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia-UTET.
3. Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanese E., Gorni C., Valentini A. Cicogna M. (2001). Animal Genetics, 32, 281-288.
4. Alsat J., Guibourdenche D., Luton F., Evain-Brion D. (1997). Human placental growth hormone. Am. J. Obst. Gynecol. 177: 1526–1534.
5. Angiolillo A., Amills M., Urrutia B., Doménech A., Sastre Y., BadaouiB., Jordana J. (2007). Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine Acyl-CoenzymeA; diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) gene. Journal of Dairy Research 74: 47-51.
6. ARA Sardegna (Associazione Regionale Allevatori della Sardegna) (2004). Banca dati www.ara.sardegna.it.

7. Attaie, R., Richter, R.L. (2000). Size distribution of fat globules in goat milk. *Journal of Dairy Science* 83: 940-944.
8. Awad S., Luthi-Peng Q.Q., Puhan Z. (1998). Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and beta-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4997-5007.
9. Bastos E., Cravador A., Azevedo J., Guedes-Pinto H. (2001). Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed Churra da Terra Quente. *Biotechnologie, Agronomie, Societè et Environnement* 5: 7-15.
10. Bauman D.E. (2000). Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. pag 311-328. *Ruminant Physiology, Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction Proceedings 9th International Symposium on Ruminant Physiology*. P.B. Cronje, ed. Commonwealth Agricultural Bureau International.
11. Bauman D.E., Vernon R.G. (1993) Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition* 13: 437-461

12. Bauman D.E., Currie W.B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeostasis. *Journal of Dairy Science*, 63: 1514-1529.
13. Baumann G. (1991). Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr. Rev.*, 12: 424-449.
14. Behncken S.N., Rowlinson S.W., Rowland J. E., Conway-Campbell B.L., Monks T.A., Waters M.J. (1997). Aspartate 171 is the major primate-specific determinant of human growth hormone. Engineering porcine growth hormone to activate the human receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 27077–27083.
15. Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.*, 73: 2804-2819.
16. Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2: 265-278.

17. Bittante, G., Andrighetto I., Ramanzin M. (2005).
Tecniche di produzione animale. Ed Liviana.
18. Bonnet M., Gourdou I., Leroux.C., Chilliard Y, Djiane J.(2002). Leptin expression in the ovine mammary gland : putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. J. Anim. Sci., 80: 723-728.
19. Branca A., Casu S. (1986). Profils génétiques visibles de la chèvre Sarde. Populations traditionnelles et premières races standardisées d'Ovicaprinae dans le bassin méditerranéen. Gontard/Manosque (France), 30 Juin – 2 Juillet, 1986. Ed. INRA, Paris, 1986 (Les Colloques de l'INRA, n° 47).
20. Brandano, P., Piras B. (1978). La capra Sarda: Nota I. I caratteri morfologici; Nota II. I caratteri riproduttivi e produttivi; Nota III. Le caratteristiche dell'allevamento. Studi sassarese-Ann. Fac. Agr. Dell'Università di Sassari, vol. XXVI.
21. Brookes J.A. (1999) The essence of SNPs. Gene 234 177–186.
22. Caro J.F., Poulos J., Ittoop O., Pories W.J., Flickinger E.G. Sinha M.K.(1988). Insulin-like growth factor I binding in

hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 81:976-981

23. Carta A., Casu S., Salaris S.(2008) Large Animal Review- Supplemento al N.4-Agosto 2008 ,Anno 14 - XVIII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. Trezzo sull'Adda(Mi) 17-20 settembre 2008

24. Carta A., Ligios S., Bitti P.L. (2001). La capra Sarda – *Sardegna Agricoltura*, 4: 17-20

25. Casu, S., Branca, A., Ledda, A., Podda, F.(1989). Caracteristiques du lait des chèvres sardes et des chèvres specialisées en liaison avec la production fromagère (Milk characteristics of sarda and specialized breeds of goat in relation to cheese roduction). In: *L'évaluation des ovins et des caprins méditerranéens*. EEC , Luxembourg, 329-334.

26. Chandan, R., Attaie T., Shahani K.M. (1992). Nutritional aspects of goat milk and its products: recent advances in goat production. V International conference of goats, New Delhi.

27. Chen E.Y., Liao Y-C.,Smith D.H.,Barrera-Saldana H.A., Gelinas R.E.,Seeburg P.H. (1989). The human growth

hormone locus : nucleotide sequenze, biology and evolution.

Genomics 4, 479-497 E.

28. Cherf B.D. (1995) World Watch List for Domestic Animal Diversity, 2nd edn. FAO, Rome

29. Chessa S., Castiglioni B., Caroli A.(2008) Aggiornamenti nell'ambito dei polimorfismi lattoproteici nei piccoli ruminanti. Supplemento Large Animal Review 2008; 14:107-109

30. Chessa S., Chiatti F., Ceriotti G., Caroli A., Consolandi C., Pagnacco G., Castiglioni B. (2007) - Development of a SNP genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms. Journal of Dairy Science 90:451-464.

31. Chianese L., Garro G., Nicolai M.A., Mauriello R., Laezza P., Ferranti P., Addeo F. (1996) - Occurrence of five α 1 casein variants in ovine milk.

32. Chilliard Y., Lamberet G. (2001). Biochemical characteristics of goat milk lipids and lipolytic system. A comparison with cow and human milk. Effects of lipid supplementation. IN : ITPLC(Ed), Recent advances on goat

milk quality, raw material for cheesemaking, ISBN 2-95114868-1-2, P 71-114.

33. Cotton RG.(1993) Current methods of mutation detection. *Mutat Res*;285:125–44.

34. Cowan C. Dentine M.R., Ax R.L., Schuler L.A.(1989) Restriction fragment length polymorphism associated with growth hormone and prolactin genes in Holstein bulls: evidence for a novel growth hormone allele; *Anim. Genetic.* 20,157-165

35. De Haan C., Steinfeld H. & Blackburn H. (1997) *Livestock and the environment: Finding a balance.* Directorate-General for Development, Commission of the European Community, Brussels, Belgium. 115 pp.

36. El-Agamy, E.I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68: 64–72.

37. Enrique Juárez-Aguilar, Federico Castro-Muñozledo, Norma E. Guerra-Rodríguez, Diana Reséndez-Pérez, Herminia G. Martínez-Rodríguez, Hugo A. Barrera-Saldaña and Walid Kuri-Harcuch (1999). Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *Journal of Cell Science* 112, 3127-3135.

38. Falaki M., Gengler N., Sneyers M. et al. (1996). Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein±Friesian bulls. *Journal of Dairy Science* 79, 1446-1453.
39. Falaschini A.F. (1996) *Zootecnica speciale Edagricole*, Bologna
40. Formigoni A, Cornil M-C, Prandi A, Mordenti A, Rossi A, Portetelle D, Renaville R. (1996) Effect of propyleneglycol supplementation around parturition on milk yield, reproduction performance and some hormonal and metabolic characteristics in dairy cows. *J Dairy Res*; 63:11–24.
41. Forsyth I.A., Wallis M. (2002). Growth Hormone and Prolactin—Molecular and Functional Evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(3):291-312
42. Freeman J.L., Perry G.H., Feuk L., Redon R., McCarroll S.A., Altshuler D.M. (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Res.*, 16: 949-961.
43. Fries R., Eggen A., Womack J.E. (1993). The bovine genoma map. *Mamm.Genome*,4,405.

44. Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA. (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*; 256:1677-1680
45. Golos TG, Durning M, Fisher JM & Fowler PD (1993). Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology* 133 1744–1752.
46. Gootwine E., Suttie J.M., McEwan J.C., Veenvliet B.A., Littlejohn R.P., Fennessy P.F., Montgomery G.W. (1998) The physiological effects of natural variation in growth hormone gene copy number in ram lambs. *Domestic Animal Endocrinology* 14,381-390
47. Grochowska, R., P. Sørensen, L. Zwierzchowski, M. Snochowski, P. Løvendahl (2001). Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. *J. Anim. Sci.* 79:450–476.
48. Halushka MK., Fan JB., Benkley K., Hsie L., Shen N., Weder A., Cooper R., Lipshutz R., Chakravarti A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate

genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet.*; 22(3): 239-47.

49. Hilbert P., Marcotte A., Schwers A., Hanset R., Vassart G., Georgens M. (1989) Analysis of genetic variation in the Belgian Blue Cattle breed using DNA sequence polymorphism at the growth hormone, low density lipoprotein receptor, α -subunit of glycoprotein hormones and thyroglobin loci. *Anim. Genet.* 20, 383-394.

50. Høj, S., Fredholm, M., Larsen, N.J., Nielsen, V.H. (1993). Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim. Genet.* 24, 91-96.

51. Hornick JL, Van Eenaeme C, Diez M, Minet V, Istasse L. (1998) Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue bulls: II. Plasma metabolites and hormones. *J Anim Sci*; 76:260-71.

52. Hunter N., Foster J.D., Goldmann W., Stear M.J., Hope J., Bostock C. (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* 141, 809-824.

53. Ikuta A., Takagi K., Wallace R.B., Itakura K., (1987) Nucleic Acid Reserch 15, 797-811
54. Ilondo MM, Damholt AB, Cunningham BA, Wells JA, Meyts PD, Shymko RM. (1994) Receptor dimerization determines the effects of growth hormone in primary rat adipocytes and culture human IM-9 lymphocytes. Endocrinology; 134: 2397-2403.
55. Jennes, R., Parkash, S. (1971). Lack of a fat globule clustering agent in goats' milk. Journal of Dairy Science, 54: 123-126.
56. Kim J.W., Rhoads R.P., Block S.S., Overton T.R., Franc S.J., Boisclair Y.R. (2004) Dairy cows experience selective reduction of the hepatic growth hormone receptor during the periparturient period. Journal of Endocrinology. 181: 281-290.
57. Krawczak M, Reiss J, Schmidtke J, Rosler U. (1989) Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. Nucleic Acids Res; 17: 2197-201.
58. Lacroix, M.C., Devinoy, E., Servely, J.L., Puissant, C., Kann, G. (1996). Expression of the growth hormone gene in

ovine placenta: detection and cellular localization of the protein. *Endocrinology* 137, 4886–4892.

59. Lagziel, A., Lipkin, E., Soller, M.(1996). Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics* 142, 945–951.

60. Lagziel, A., Soller, M.(1999). DNA sequence of SSCP haplotypes at the bovine growth hormone (bGH) gene. *Anim. Genet.* 30, 362–365.

61. Lander et International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860-921

62. Laude K., Gourdou I., Belair L., Keisler D.H., Djiane J.(1999) detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS letters*.463:194-198

63. Le Roith D., Bondy C., Yakar S., Liu J.L., Butler A. (2001) The somatomedin hypothesis. *Endocrine reviews*. 22:53-74.

64. Lee, B.K., Crooker, B.A., Hansen, L.B., Chester-Jones, H.(1994). Polymorphism in the third intron of somatotropin

(bST) gene and its association with selection for milk yield in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 1), 316

65. Lerman LS., Silverstein K.(1987). Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis . *Methods Enzymol* 155:482-501

66. Leury B.J., Baumgard L.H., Block S.S., Segole R.A., Ehrhardt, Rhoads R.P., Bauman D.E., Bell A.W., Boisclair Y.R. (2003). Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 285:R1107-1115

67. Li C.H., Dixon J.S.(1971) Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Arch Biochem Biophys.* 146(1):233-6.

68. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Clark JH, Bauman DE, Collier RJ. (1993) Variants of somatotropin cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest Anim Endocrinol* 10:325-333,.

69. Macciotta N.P.P., Cappio Borlino A., Steri R., Pulina G., Brandano P.(2002). Somatic variabilità of Sarda goat breed analysed by multivariate methods. *Livest. Prod. Sci.*, 75: 51-58

70. Malveiro, E., Pereira, M., Marques, P.X., Santos, I.C., Belo, C., Renaville, R., Cravador, A.(2001). Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the Algarvia goat: possible association with milk traits. *Small Rumin. Res.* 41, 163–170
71. Marcuzzi, G., Vannozi, A.,1981. L'origine degli animali domestici (The origin of domestic animals). Edagricole, Bologna. pp.178
72. Marques M.R., Santos, I.C.,Carolino N., Belo, C., Renaville, R., Cravador A.(2006). Effect of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. *Journal of Dairy Research* 73, (4):394-405
73. Marques P.X., Pereira M., Marques M.R., Santos I.C., Belo C., Renaville R., Cravador A. (2003) Association of milk traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone gene in the Serrana goat *Small Ruminant Research* 50 177–185
74. Martini M., Salari F., Scolozzi C., Chiatti F., Chessa S., Caroli A. (2006b) -Relationship between genetic polymorphism of alphas1-casein and physico-chemical and nutritional quality of goat milk. XIV Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum, Lugo, Spagna, 12-15 Luglio 2006 (CD).

75. Mehaia M.A: , Al-Kenehal M.A. (1992). Taurine and other free amino acids in milk of camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, 47: 351-353.
76. Millar P. (1986). The performance of cashmere goats. *Animal Breeding Abstracts* 54(3):181–199.
77. Miller W. L. and Eberhardt N. L. (1983). Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4:97–130.
78. Moioli B., D'Andrea M., Pilla F.(2007) Candidate genes affecting sheep and goat milk qualità. *Small Ruminant research* 68:179-192
79. Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS.(1985) Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acid Research* 13:3111-29
80. Nagamine CM, Chan K, Lau YF. A PCR (1989) artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet*;45:337–9.

81. Nataraj A., Isabelle Olivos-Glander, Noriko Kusukawa, W.Edward Highsmith,Jr (1999) Electrophoresis 20,1177-1185
82. Niall H.D. (1971) Revised primary structure for human growth hormone. Nat New Biol. 230(11):90-1
83. Nollau P., Wagener C. (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clinical Chemistry 43:7 1114–1128
84. Ofir R.,Gootwine E.(1997).Ovine growth hormone gene duplication-structural and evolutionary implications. Mamm.Genome 8,770-772.
85. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T.(1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U SA;86:2766–70.
86. Park, Y.W. (2000). Comparison of mineral and cholesterol composition of different commercial goat milk products manufactured in USA. Small Ruminant Research, 37: 115-124.
87. Park, Y.W. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 68: 73-87.

88. Pazzola M., Carcangiu V., Fanari U., Pisano B., Bini P.P., Vacca G.M. (2002). L'allevamento caprino in Sardegna: realtà e prospettive. Atti X Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum., Tunis 22-24 settembre 2002, Pubblicato su C.D..
89. Peterson D.G., Kelsey J.A., Bauman D.E. (2002) - Analysis of variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85: 2164-2172.
90. Pilla, F., Valentini, A., Lenstra, J.A., Martin, P., (2006). Animal genetics and functional foods; livestock farming systems; product quality based on local resources leading to improved sustainability. Wageningen Academic Publishers. EAAP Publications No. 118, pp. 49-59.
91. Radcliff R.P., McCormack.B.L., Crooker B.A., Lucy M.C.(2003). Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*.86:3933-3940.
92. Ramunno L., Pappalardo M., Cosenza G., Pastore N., Gallo D., Grimaldi G.,Rubino R., Calandrelli M., Rando A. (2000) - Caratterizzazione genetica ai loci delle caseine $\alpha 1$, β e

α 2 di una popolazione caprina allevata nella penisola sorrentina. XIV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 321-4.

93. Remeuf, F. (1992). Physico-chemical properties of goat milk in relation to processing characteristics. Proceedings of the National Symposium on Dairy Goat Production and Marketing, Oklahoma City, OK, pp. 98-110.

94. Remeuf, F., Lenoir, J., Duby, C. (1989). Etude des relations entre les caracteristiques physico-chimiques des laits de chevre et leur aptitude a la coagulation par la pression (Study of the relationships of physico-chemical characteristics of goat milk and aptitude for coagulation under pressure). Le Lait 69 : 499-518.

95. Renaville R., Hammadi M., Portetelle D. (2002) Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. Domestic Animal Endocrinology 23 (1-2) :351-360

96. Rowlinson SW, Barnard R, Bastiras S, Robins AJ, Brinlworth R, Waters MJ. (1995) A growth hormone agonist produced by targeted mutagenesis at binding site 1 : evidence that site 1 regulates bioactivity. J Biol Chem; 270: 16833-16839.

97. Russo V., Fontanesi L. (2001) Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e

prospettive della genetica molecolare. Zootecnia e nutrizione animale 27, 253-284

98. Sabour M.P., Lin C.Y., Smith C. (1997) Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. J. Anim. Breed. Genet. 114, 435-442

99. Sandrucci, M., Crosato, M., Zannino, L. 1980. Il latte di capra nell'alimentazione infantile. Prospettive. La rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione. Anno 9, n.1.

100. Santos I.C., Marques M.R., Belo C.C., Cravador A.(2004). Polymorphism analysis at the growth hormone gene in Merino da Beira Baixa ewes. Biotechnologie, Agronomie, Societè et Environnement 8, 40-41

101. Schlee, P., R. Graml, E. Schallenberger, D. Schams, O. Rottmann, A. Olbrich-Bludau, and F. Pirchner. (1994). Growth hormone and insulin-like growth factor. I. Concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. Theor. Appl. Genet. 88:497–500.

102. Scholz RB, Milde Langosch K, Jung R. (1993) Rapid screening for Tp53 mutations by temperature gradient gel

electrophoresis: a comparison with SSCP analysis. *Hum Mol Genet* 2:2155-8

103. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*; 16:325–32.

104. Sjogren K., Liu J.-L., Blad K., Skrtic S., Vidal O., Wallenius D., LeRoith D., Tornell J., Isaksson O.G.P., Jansson J.L., Ohlsson (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF I) is the principal source of IGF I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:7088-7092

105. Souza S.C., Frick G. P., Wang X., Kopchick J., Lobo R.B., Goodman H.M. (1995). A single arginine residue determines species specificity of the human growth hormone receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 92:959–963.

106. Spagnesi, M., Cagnolaro, L., Perco, F., Scala, C. (1986). *La Capra di Montecristo (Montecristo goat)*. Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina, pp.147.

107. Tanaka M, Hosokawa Y, Watahiki M, Nakashima K.(1992) Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112:235-239
108. Thomas M. J. (1998) The molecular basis of growth hormone action. *Growth Hormone and IGF Research*, 8: 3-11.
109. Trujillo, A.J., Guamis, B., Carretero, C. (1997). Hydrolysis of caprine κ -casein by plasmin. *Journal of Dairy Science*, 80: 2258–2263.
110. Ueki I., Ooi G.T., Tremblay M.L., Hurst K.R., Bach L.A., Boisclair Y.R.(2000) Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 6868-6873.
111. Usai M. G., Sechi T., Ligios S., Carta A.(2004). Indagine sul sistema della capra in Sardegna. *Atti XVI Congr. Naz. S.I.P.A.O.C., Siena, 29 Settembre-2 Ottobre 2004.*
112. Vacca G.M., Carcangiu V., Mura M.C., Dettori M.L., Bini P.P. (2005). Effect of parity and number of kids in yield and milk composition in Sarda goat. *Proc. 56th EAAP*, 274,

Uppsala, 5-8 June 2005.

113. Vacca, G.M., Chianese, L., Ghibellini, A., Carcangiu, V., Mauriello, R., Bini, P.P., (2003). α_{s1} -Casein genetic variants in Sarda breed goat. *Italian Journal of Animal Science*, 55-57.

114. Valinsky, A., Shani, M., Gootwine, E.(1990). Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Anim. Biotechnol.* 1, 135–144.

115. Van der Werf J.H., Verburg F.J., Garssen G.J. (1996) Evidence for a strong effect of the AluI polymorphism in the growth hormone gene on yield of dairy characteristics in dairy cattle. In: Proc.47th Meeting EAAP. Lillehammer, Norway 1:310 (abstr.)

116. Wallis M. (1969). The N-terminus of ox growth hormone. *Febs Letters* 3 (2): 118-120.

117. Wallis M. (1972) Carboxymethylation of methionine residues in bovine growth hormone .*Febs Letters*,vol 21,2:118-122.

118. Wallis M. (1989). Species specificity and structure–function relationships of growth hormone. In R. B. Heap, C. G.

Prosser, G. E. Lamming (eds.), *Biotechnology in Growth Regulation*, Butterworths, London, pp. 3–14

119. Wallis O. C. and Wallis M. (2002). Characterisation of the growth hormone gene cluster in a new world monkey, the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J. Mol. Endocrinol.* 29:89–97.

120. Wallis, M., Lioupis, A., Wallis, O.C.(1998). Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 1–5.

121. Warwick J.M.,Wallis O.C.,Wallis M. (1989) Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA for ovine pregrowth hormone. *Biochim Biophys Acta* 1008, 247-50.

122. Wells JA.(1996) Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 1-6.

123. Wenterges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.J. (1986) *Nucleic Acid Reserch* 14, 3773-3790

124. Winter A, Krämer W, Werner F. A. O, Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J. E., Thaller G., Fries R. (2002) - Association of a lysine-232 alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait

locus for milk fat content. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 99(14):9300-5.

125. Yakar S., Liu J.L., Stannard A., Butler A., Accili D., Sauer B., LeRoith D. (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96:7324-7329

126. Yakar S., Rosen C.J., Beamer W.G., Ackert-Bicknell C.L., Wu Y., Liu J.L., Ooi G.T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y.R., LeRoith D. (2002) Circulating levels of IGF I directly regulate bone growth and density. The Journal of Clinical Investigation. 110:771-781.

127. Yakar S., Setser J., Zhao H., Stannard B., Haluzik M., Glatt V., Bouxsein M.L., Kopchick J.J., LeRoith D. (2004) Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-I deficient mice. The Journal of Clinical Investigation. 113: 96-105.

128. Yamano, Y., Abe, M., Mikawa, S., Kioka, N., Manabe, E., Sakai, H., Komano, T., Utsumi, K., Iritani, A. (1991). Structural analysis of repetitive DNA sequences in the goat growth hormone gene region. Agric. Biol. Chem. 55, 633-639.

129. Yao, J., Aggrey, S.E., Zadworny, D., Hayes, J.F., Kuhnlein, U.(1996). Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics* 144, 1809–1816.
130. Zhang H. M., Maddock K.C., Brown D.R., Denise S.K., Ax R.L.(1993) A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR_RFLP analysis. *J. Anim. Sci.* 71, 2276
131. Zhang W, Kuhlers D.L., Rempel W.G. (1992) Halothane gene and swine performance *J Anim Sci*, 70(5): 1307-13.
132. Zhang, H.M., Brown, D.R., DeNise, S.K., Ax, R.L. (1992). Nucleotide sequence determination of a bovine somatotropin allele. *Anim. Genet.* 23: 578.
133. Zhou G. L., Hai Guo Jin, Chen Liu, Shan Li Guo, Qi Zhu, Yu Hou Wu (2005). Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *J.Biosci.*30, 5: 595-598.
134. Zhou G.L., Liu H.G., Liu C., Guo S.L., Zhu Q., Wu YH. (2005). Association of genetic polymorphism in GH gene

with milk production traits in Beijing Holstein cows. *J Biosci.*,
30(5): 595-8.

Ringraziamenti

Un sincero ringraziamento va ai professori G.M.Vacca, V.Carcangiu e P.P. Bini, e alla dott.ssa M.Luisa Dettori per il prezioso supporto scientifico offertomi nel corso di questi tre anni, per la fiducia accordatami per la conduzione di questo progetto e ai ricercatori, ai miei compagni di lavoro e al sig. Idini per la simpatia e l'affetto dimostratomi.