

LAR

Large Animal Review

Indicizzato su CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH

XVIII CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.

Società Italiana di Patologia ed
Allevamento degli ovini e dei caprini



Villa Cavenago - Trezzo sull'Adda (MI)
17-20 settembre 2008

Relazioni delle Tavole Rotonde
Comunicazioni Scientifiche



ISSN: 1124-4593



Società Italiana Veterinari per Animali da Reddito
Società Federata ANMVI

Individuazione e caratterizzazione di un microsatellite al locus LTF nella specie caprina



A. PAUCIULLO, G. COSENZA, L. COLIMORO, D. NICODEMO, D. DI BERARDINO, L. RAMUNNO

Dipartimento di Scienza del Suolo, della Pianta dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Parole chiave: capra, microsatellite, lattoferrina, genotipizzazione.

INTRODUZIONE - La lattoferrina è una proteina estremamente polifunzionale caratterizzata da un ampio spettro di attività biologiche (azione immunostimolante, attività antinfiammatoria, antitumorale, ecc.). La sua funzione più nota è senz'altro l'attività antimicrobica contro molte specie patogene (Naidu et al., 1990), esplicita sia attraverso meccanismi diretti che indiretti. È ormai noto che singoli polimorfismi a livello del gene LTF possono influenzare la funzionalità della proteina, modificandone la sua capacità battericida. Nella specie umana ad esempio, sono state individuate e caratterizzate due varianti che differiscono per l'attività battericida contro specie Gram-positive coinvolte in patologie periodontali (Vellyagounder et al., 2003). Nella specie caprina, un test condotto su *E. coli* O111 ha dimostrato che alcune capre originarie della Corea producono una lattoferrina con una maggiore attività antibatterica rispetto a quella di capre Saanen (Lee et al., 1997). Particolare attenzione pertanto va dedicata a tutti i marcatori che si ritrovano nei geni coinvolti nella resistenza alle infezioni, come microsatelliti (Borriello et al., 2006) e SNPs (Capparelli et al., 2008). Il presente lavoro riporta l'individuazione, nella specie caprina, di un microsatellite al locus della lattoferrina (LTF), e valuta la sua naturale variabilità in alcune popolazioni allevate nell'Italia meridionale.

MATERIALI E METODI - Un frammento di 435 bp comprendente il 13° introne del gene LTF caprino è stato amplificato mediante PCR utilizzando i seguenti primer: LTF13inF (5'-AAGAGCATCAATC-TATTGTC-3') e LTF13inR (5'-CTCAGAATTAGGAAGCC-3') ottenuti dal sequenziamento del gene. La reazione, in 50 µl di mix, è stata così composta: 100 ng di DNA genomico, 10X PCR Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 5 pmol di ciascun primer, 200 mM di ciascun dNTPs, 2.5 U di *Taq* DNA Polymerase (Promega). Il programma termico è stato: 95°C x 4 min, 32 cicli a 95°C x 45 s, 56°C x 45 s e 72°C x 45 s, completati da un ultimo ciclo a 72°C x 10 min. I prodotti di PCR sono stati purificati e sequenziati. La genotipizzazione è stata condotta digerendo ciascun prodotto di PCR con 10 U dell'endonucleasi *Dde* I e i prodotti di digestione sono stati evidenziati su gel di poliaccrilamide al 6%.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI - Un microsatellite polimorfo è stato individuato tra i nt 3543-3560 del 13° introne al locus LTF di capra (posizione rispetto all'esone 13 EMBL Acc. No. Z93399). Si tratta di una ripetizione tandem (CTG)_n, con n=6 o n=9, che si ritrova a monte di un elemento retroposonico messo in evidenza durante il sequenziamento del gene. Al fine di stabilire il livello di polimorfismo del microsatellite, si è proceduto ad una tipizzazione basata sulla PCR-RFLP. Il pattern di digestione è caratterizzato da 4 frammenti di restrizione, tre dei quali risultano monomorfi (4 bp, 152 bp e 192 bp) e uno di dimensioni variabili: 87 bp per gli individui portatori di 6 ripetizioni (CTG)₆, e 96 bp per i portatori di 9 ripetizioni (CTG)₉. L'indagine di popolazione condotta su 116 capre scelte a caso in differenti allevamenti dell'Italia meridionale, al momento ha messo in evidenza la presenza di soli due alleli (Fig. 1). Le distribuzioni genotipiche, le frequenze alleliche, il valore del χ^2 per tutte le popolazioni investigate sono riportate in Tabella 1. Le popolazioni sarda e nicastrese risultano essere in equilibrio con la legge di Hardy-Weinberg ($p=0.05$, $gdl=1$), a differenza delle capre siriane e girgentane.

La popolazione siriana inoltre si caratterizza per avere un eccesso di omozigoti osservati rispetto a quelli attesi. Questo dato potrebbe trovare una spiegazione in fenomeni di consanguineità, che potrebbero aver favorito l'incremento di omozigoti, oppure alla maggiore fitness degli omozigoti rispetto agli eterozigoti, o più semplicemente essere attribuito alla bassa numerosità del campione indagato. Lo studio della variabilità di tale microsatellite ha permesso di apportare un nuovo contributo alla conoscenza della struttura genetica al locus della lattoferrina, che appartenendo alla classe delle trasferrine, svolge un ruolo prioritario nei processi di difesa immunitaria. Resta pertanto da investigare se il polimorfismo evidenziato possa

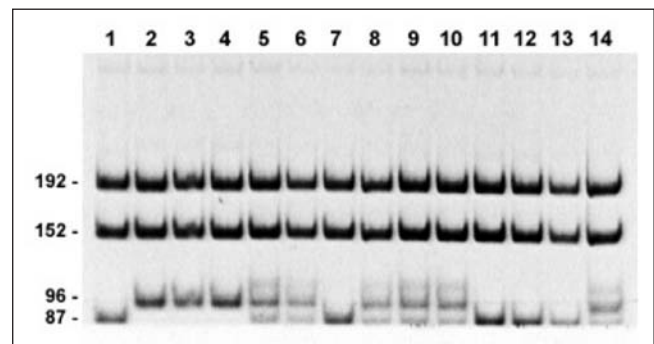


Figura 1 - Genotipi osservati dopo digestione con *Dde* I. Lanes 1, 7, 11, 12, 13: campioni omozigoti (CTG)₆. Lanes 2, 3, 4: campioni omozigoti (CTG)₉. Lanes 5, 6, 8, 9, 10, 14: campioni eterozigoti.

Tabella 1 - Distribuzione genotipica e frequenze alleliche al locus LTF di capra.

Razza	N.	Genotipi			χ^2	Frequenze	
		(CTG) ₆	(CTG) _{6/9}	(CTG) ₉		(CTG) ₆	(CTG) ₉
Sarda	46	15	22	9	0.03	0.57	0.43
Siriana	18	6	2	10	10.5	0.39	0.61
Nicastrese	24	8	12	4	0.02	0.58	0.42
Girgentana	28	6	20	2	5.88	0.57	0.43
TOT	116	35	56	25			

avere uno specifico collegamento con le funzioni biologiche della proteina (diversa attività antibatterica) tale da poter inserire questo marcatore nei programmi di MAS come già fatto per altri microsatelliti polimorfi (Borriello et al., 2006) presenti in geni di resistenza simili alla lattoferrina.

■ A polymorphic microsatellite at the goat lactoferrin locus (LTF)

Key words: goat, microsatellite, lactoferrin, genotyping.

Bibliografia

- Borriello G., Capparelli R., Bianco M., Fenizia D., Alfano F., Capuano F., Ercolini D., Parisi A., Roperto S., Iannelli D. (2006) - Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection Immunology* 74(4): 2115-20.
- Capparelli R., Parlato M., Amoroso M.G., Roperto S., Marabelli R., Roperto F., Iannelli D. (2008) - Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Immunogenetics* 60(3-4): 157-65.
- Lee T.H., Shimazaki K., Yu S.L., Nam M.S., Lee K.K., Yu D.Y. (1997) - Polymorphic sequence of corean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. *Animal Genetics* 28: 367-69.
- Naidu A.S., Miedzobrodzki J., Andersson M., Nilsson L.E., Forsgren A., Watts J.L. (1990) - Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 2312.
- Vellyagounder K., Kaplan J.B., Furgang D., Legarda D., Diamond G., Parkin R.E., Fine D.H. (2003) - One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infection and Immunology* 71: 6141-47.