

INFLUENZA DEL POLIMORFISMO GENETICO DELLE CASEINE CALCIO-SENSIBILI SU CARATTERISTICHE STRUTTURALI, NUTRIZIONALI, ATTITUDINE CASEARIA E PROPRIETÀ IPOALLERGENICHE DEL LATTE DI CAPRA

Luigi RAMUNNO^{1*}, Alfredo PAUCIULLO¹, Andrea MANCUSI²,
Gianfranco COSENZA¹, Primo MARIANI², Massimo MALACARNE³

INTRODUZIONE

Il latte occupa un posto di rilievo nell'alimentazione umana, sia tal quale, che in seguito alla sua trasformazione in formaggio ed in altri prodotti lattiero-caseari. Negli ultimi anni l'importanza della qualità del latte è cresciuta notevolmente in relazione alle mutate esigenze dei consumatori. In passato la qualità del latte si identificava principalmente con il contenuto in grasso, oggi il primo requisito qualitativo è rappresentato dal contenuto proteico. Il latte di capra, rispetto a quello bovino, si contraddistingue per la presenza di globuli di grasso molto piccoli con membrane protettive piuttosto fragili [1], caratteristica che determina una sensibilità spiccata alla lipolisi, fenomeno che porta alla liberazione di acidi grassi responsabili del forte e tipico odore e sapore ("iricino") dei formaggi di capra [2]. Tra le diverse frazioni costituenti il latte quella più complessa è rappresentata dalle sostanze azotate, che sono costituite essenzialmente da proteine e da una piccola quantità di azoto non proteico (ammoniacale, urea, creatina, etc.) [3].

Nel latte dei ruminanti sono presenti 6 principali frazioni proteiche ed in particolare 4 caseine (α_{s1} , β , α_{s2} e κ), codificate da 4 geni autosomici (rispettivamente *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* e *CSN3*) strettamente associati in un tratto di DNA di circa 250 kb del cromosoma 6 [4], e 2 sieroproteine: β -lattoglobulina (cromosoma 11) [5] ed α -lattalbumina (cromosoma 5) [6].

Le caseine rappresentano, per il lattante, la principale fonte di aminoacidi e svolgono un ruolo determinante nel trasporto del fosforo e del calcio in quantità sufficienti per le esigenze di sviluppo del tessuto osseo. In particolare, le caseine dei gruppi α_{s2} e α_{s1} , nell'ordine più ricche di fosforo, determinerebbero la capacità delle micelle di trasportare calcio e fosforo sotto forma colloidale [7].

*Corrispondenza ed estratti: luigi.ramunno@unina.it

¹ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Fiandra, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (NA).

² Sezione di Scienza e Tecnologie Lattiero Casearie, Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti, Università degli Studi, Via del Taglio 8, 43100 Parma.

I geni delle proteine sono espressi nelle cellule epiteliali secernenti della ghiandola mammaria e sono sotto il controllo di diversi ormoni [8]. La sintesi delle proteine del latte è regolata positivamente da insulina, prolattina, glucocorticoidi ed ormone tiroideo [9] ed è regolata negativamente dal progesterone [10]. La struttura primaria delle due principali proteine del siero (α -lattalbumina e β -lattoglobulina) e delle quattro caseine (α_1 , α_2 , β e κ) è stata individuata per la prima volta nel bovino nel corso degli anni settanta [11, 12]. Successivamente è stata chiarita la struttura primaria delle omologhe proteine caprine, sia direttamente, a partire dalla proteina stessa (α -lattalbumina: MacGillivray *et al* [13]) (β -lattoglobulina: Préaux *et al* [14]) (caseina α_1 : Brignon *et al* [15]) sia indirettamente, deducendola dalla sequenza nucleotidica del gene o del cDNA (caseina β : Roberts *et al*, [16]) (caseina α_2 : Bouniol [17]) (caseina κ : Coll *et al* [18]). A tutt'oggi è nota l'organizzazione genomica e la sequenza nucleotidica dei geni che codificano per tali frazioni proteiche.

Nei ruminanti le quattro caseine rappresentano circa l'80% della proteina grezza del latte. Esse sono caratterizzate da specifiche proprietà, quali una bassa solubilità a pH 4,6 e, in particolare, le caseine α_1 , α_2 e β precipitano in presenza di ioni calcio. Quest'ultime sono le frazioni proteiche più studiate, soprattutto nella specie caprina nella quale è stato evidenziato un notevole polimorfismo genetico quali-quantitativo

CASEINA α_1

Il gene *CSN1S1* caprino si estende su di un tratto di DNA di circa 16,7 kb che includono 1138 bp di regioni esoniche e 15647 bp di tratti intronici, con un rapporto introni/esoni di 1:13,75. La caratteristica principale di tale gene è la struttura estremamente frazionata essendo costituito da 19 esoni, la cui grandezza varia da 24 a 385 bp, e conseguentemente da 18 introni (da 90 a 1685 bp). Il primo esone (53 bp) non è codificante, il peptide leader ed i primi due amminoacidi della proteina matura (una fosfoproteina di 199 aa) sono codificati dall'esone 2 (63 bp), mentre lo stop codon (TGA) si realizza con l'unione degli ultimi due nucleotidi del 18° esone ed il primo nucleotide del 19° esone [19]. In generale, la struttura del gene *CSN1S1* di capra presenta un'organizzazione simile a quella dell'omologo gene nella specie bovina [20] fatta eccezione per differenze nella grandezza di alcuni introni come conseguenza di 3 extra elementi di origine retroposonica che caratterizzano la sequenza bovina [19]. Tali inserzioni, probabilmente, sono relativamente recenti e rappresentano utili marker filogenetici per lo studio di cluster dei ruminanti e per la messa a punto di protocolli per la rintracciabilità di prodotti di origine animale.

Il gene *CSN1S1* rappresenta da anni un modello eccellente per dimostrare come gran parte della variabilità osservata nel contenuto di caseina α_1 nel latte di capra sia dovuta alla presenza di alleli "quantitativi" ad un singolo locus strutturale. Fino ad oggi sono stati individuati almeno 17 alleli associati a 4 diversi livelli di sintesi di caseina α_1 (Tab. 1).

Tabella 1 - Livello di espressione degli alleli codificanti per la caseina α_{s1} del latte di capra.

Table 1 - Level of expression of the alleles coding for the α_{s1} -casein of goat milk.

Alleli al locus <i>CSN1S1</i> Alleles at the <i>CSN1S1</i> locus	g/L
A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, M	~ 3,5
I, E	~ 1,1
D, F, G	~ 0,45
01, 02, N	0

Un primo gruppo di alleli (A, B1, B2, B3, B4, C, H, L e M) è associato ad un normale contenuto di caseina α_{s1} (circa 3,5 g/L per allele), mentre gli alleli I ed E sono associati ad un contenuto intermedio (circa 1,1 g/L per allele) e gli alleli D, F e G sintetizzano per un basso livello di tale frazione proteica (circa 0,45 g/L). Infine, gli alleli 01, 02 e N rappresentano alleli "nulli" in quanto responsabili dell'apparente assenza di caseina α_{s1} nel latte [21-26].

La maggior parte degli eventi mutazionali responsabili della formazione di tali alleli sono stati identificati ed in particolare gli alleli associati ad un normale contenuto proteico si sono originati per singole sostituzioni nucleotidiche responsabili di singole sostituzioni amminoacidiche [21-23]. Mentre risulta ancora sconosciuta la mutazione che porta alla formazione dell'allele I [21], l'evento molecolare che caratterizza l'allele *CSN1S1* E è un'inserzione di un frammento di DNA di 457 bp realizzatasi tra i nucleotidi 124 e 125 del 19° esone. L'analisi dell'inserito ed il confronto con le sequenze presenti in database ha permesso di stabilire che il segmento inserito è un LINE (Long Interspersed Nuclear Element) di origine retroposizionale [24]. L'inserzione di un elemento di origine retroposizionale caratterizza anche l'allele G della caseina α_{s1} bovina. In questa specie l'inserzione si localizza nel 19° esone, ma tra i nt 58 e 59. Inoltre, la sequenza del frammento inserito nonché quella delle regioni fiancheggianti ha permesso di stabilire che il LINE che caratterizza l'allele *CSN1S1* G bovino è leggermente diverso da quello evidenziato nella capra. Infatti, il LINE bovino risulta costituito da 371 bp, è fiancheggiato da corte sequenze (11mero) ripetute in tandem e mostra una coda di poli T più corta [27]. La ridotta quantità di caseina α_{s1} associata agli alleli *CSN1S1* E caprino e *CSN1S1* G bovino sembra sia da attribuire a due fattori strettamente correlati al LINE inserito: a) presenza nella 3'UTR di sequenze A-U rich entro il LINE che sembrerebbero determinare una riduzione della stabilità nei messaggeri [28, 29]; b) gli mRNAs prodotti da tali alleli mostrano nella regione 3' UT una sequenza poli U (di origine

retroposizionale, corrispondente alla regione 5' del LINE) che crea una struttura estremamente stabile con la coda di poli A del messaggero. L'interazione della coda di poli A del messaggero con la sequenza poli U del LINE ostacolerebbe tale interazione con conseguente degradazione del messaggero [24].

Per gli alleli *CSN1S1* D e G, per i quali sono stati osservati mRNAs che mancano rispettivamente del 9° e del 4° esone, sembra essere chiamata in gioco un'alterazione dei meccanismi di splicing [30]. Mentre non è nota la base molecolare responsabile di questo errato splicing nell'allele D, la mutazione che caratterizza l'allele G è una transizione G→A nel primo nt del sito donatore di splicing dell'introne 4 [31]. L'allele F è, invece, caratterizzato dalla delezione di una citosina al 23° nucleotide del 9° esone e dall'inserzione di 11 bp e 3 bp nell'introne successivo [32]. Tali mutazioni sarebbero responsabili del ridotto contenuto di caseina α_1 nel latte di capra [32]. La quantità di mRNA trascritto dall'allele F è circa 6 volte inferiore rispetto a quella trascritta dall'allele A e sono almeno 9 le popolazioni di mRNAs prodotte, tra le quali, la più rappresentata si caratterizza per il mancato splicing degli esoni 9, 10 e 11, che porta alla traduzione di una proteina di 162 aa [32].

L'allele *CSN1S1* 01, il vero "allele nullo", è caratterizzato dalla delezione di un tratto di DNA di circa 8,5 kb che ha origine dal 182° nucleotide del 12° introne ed include gli ultimi 7 esoni e corrispondenti introni del gene [33], mentre una ampia inserzione, fino ad oggi non caratterizzata, è l'evento molecolare responsabile dell'allele *CSN1S1* 02 [22].

L'ultimo ad essere stato identificato in questo locus è l'allele *CSN1S1* N, anch'esso associato ad un contenuto apparentemente nullo della corrispondente frazione caseinica [26]. I dati di sequenza e di tipizzazione hanno dimostrato che l'allele N, analogamente a quanto osservato per l'allele F, si caratterizza per la delezione della citosina al 23° nucleotide del 9° esone, ma non presenta alcuna inserzione a livello dell'introne successivo [26]. Diretta conseguenza della singola delezione al 9° esone è un "frame shift" che conduce alla formazione di uno stop codon prematuro al 12° esone che sarebbe responsabile dell'apparente assenza di sintesi proteica [26]. È infatti da diversi anni ormai nota la correlazione tra blocco prematuro della traduzione e compromissione della sintesi proteica [34, 35].

Tuttavia, lo stesso evento molecolare, che caratterizza anche l'allele F, risulta associato ad un basso, ma pur presente, livello di sintesi di una forma delecta di caseina α_1 . Un confronto tra le sequenze genomiche degli alleli *CSN1S1* A, F e N ha messo in evidenza un totale di 118 siti polimorfici ed, in particolare, 6 mutazioni sembrerebbero specifiche dell'allele N. Nessuna di queste ultime sembrerebbe spiegare tale diverso livello di espressione [26].

Analisi condotte per mezzo di qPCR hanno evidenziato che la quantità di mRNA trascritto dall'allele N è circa il 33% di quello trascritto dall'allele F. Il confronto delle sequenze dei trascritti prodotti dagli alleli F e N ha mostrato una

rimarchevole variabilità di eventi di splicing alternativi (almeno 12 popolazioni di mRNA contro le 9 trascritte dall'allele F). In modo particolare, è stata osservata una maggiore percentuale di trascritti caratterizzati dall'outslicing degli esoni 9, 10 e 11 prodotti dall'allele F, rispetto all'allele N (circa il 60% contro il 21%) [26].

Gli eventi che conducono alla formazione di trascritti, ad opera di splicing non costitutivi, sia per l'allele N che F, potrebbero essere la diretta conseguenza di un delicato meccanismo di "sorveglianza dell'mRNA". Da un lato tale meccanismo opera nel tentativo di impedire la formazione di proteine tronche o totalmente inattive, come conseguenza di una rapida degradazione dell'mRNA ad opera della presenza di uno stop codon prematuro [35], dall'altro conferisce un vantaggio selettivo per la possibile traduzione di proteine delete, ma potenzialmente funzionali attraverso la trascrizione di mRNA con delezioni che ripristinano il frame di lettura alterato dalla mutazione.

È stato ipotizzato che le differenze osservate nell'espressione del gene *CSN1S1* di capra possa essere la diretta conseguenza di un sistema più elaborato di regolazione genica. Per verificare tale ipotesi è stato sequenziato il promotore (circa 2000 bp) degli alleli A, F e N ed il confronto delle sequenze ha messo in evidenza numerosi siti polimorfici. Tra le mutazioni investigate una in particolare (transizione G→A in posizione -653) sembrerebbe essere responsabile per l'allele F della creazione di un extra sito di legame per il fattore AP-1, che svolge un ruolo prioritario nel meccanismo di regolazione della trascrizione [35].

Questi risultati, e le differenze quantitative osservate a livello di mRNA, potrebbero, in parte, spiegare l'apparente assenza in SDS-PAGE di caseina α_1 nel latte di capre omozigoti per l'allele *CSN1S1* N.

Infine, in base ai dati molecolari acquisiti è possibile ipotizzare, analogamente a quanto riportato per l'allele *CSN1S1* M [23], che l'allele N possa essersi originato per un particolare fenomeno di ricombinazione interallelica [26].

Gli effetti del polimorfismo della caseina α_1 su produzione, composizione, struttura micellare, attitudine alla caseificazione e resa casearia del latte di capra sono stati ampiamente studiati nelle diverse razze ed i risultati possono essere così sintetizzati: 1) nessuna relazione è stata osservata tra genotipo e quantità di latte prodotto; 2) è stato evidenziato un significativo effetto sia sul diametro delle micelle che sul loro contenuto di calcio, che risultano inferiori nel latte di tipo A; 3) il latte di capra con un più elevato contenuto di caseina α_1 presenta una migliore composizione in termini di sostanza secca, proteina, fosforo ed un pH più basso rispetto al latte con un minor contenuto di tale frazione proteica; 4) è stato osservato un effetto significativo del polimorfismo genetico sul contenuto in grasso, il quale risulta più alto negli alleli associati ad un alto contenuto di caseina (*CSN1S1* A, B e C) [36]; 5) il latte di capre con genotipo *CSN1S1* A/A presenta un livello di azoto totale maggiore rispetto a quello prodotto da capre con genotipo O/O;

6) effetti significativi sono stati osservati anche per i parametri di coagulazione e sulla resa in formaggio, maggiore nel latte con più alto contenuto di caseina α_{s1} (ad es., *CSN1S1 F/F* ha una resa del 18,3%, mentre *CSN1S1 A/A* del 21,9%); è stata rilevata anche un'influenza sulle proprietà organolettiche: infatti, il formaggio ottenuto con latte ad alto contenuto di tale frazione proteica si caratterizza per un sapore ed un odore (iricino) meno intenso rispetto a quello ottenuto da capre omozigoti per alleli a minore capacità di sintesi per la caseina α_{s1} [37].

CASEINA β

La caseina β , dopo la caseina α_{s1} , è la componente proteica proporzionalmente più abbondante nel latte dei ruminanti. Generalmente, il latte di capra mostra un contenuto di caseina β pari a circa 6 g/L per allele [38]. È una fosfoproteina costituita da 207 residui amminoacidici. L'organizzazione del gene che codifica per la caseina β (*CSN2*) di capra, avente una lunghezza di circa 9 kb, è simile a quella osservata nelle altre specie. Il gene è costituito da 9 esoni di grandezza compresa tra 24 bp (esone 5) e 492 bp (esone 7) e trascrive un mRNA di 1088 nucleotidi costituito da una regione 5' UT di 60 nucleotidi (esone 1 e, in parte, esone 2), da una regione codificante di 669 nucleotidi e da una regione 3' UT di 359 nucleotidi (esoni 8 e 9). Gli esoni 2 e 8 contengono rispettivamente i segnali di inizio e fine traduzione; l'esone 2, come quello di tutte le altre specie, codifica anche per il peptide leader (15 residui amminoacidici) e per i primi 2 residui amminoacidici della proteina matura. Gli ultimi 4 codoni dell'esone 4 e il primo codone dell'esone 5 codificano per il sito di fosforilazione multiplo *SerSerSerGluGlu* riconosciuto da una specifica chinasi [39]. L'esone 7, che è il più lungo, codifica circa l'82% della proteina matura e corrisponde essenzialmente alla parte idrofoba della proteina stessa, mentre l'esone 8 (42 bp) codifica soltanto per l'ultimo codone (*Val*).

Analogamente a quanto osservato al locus *CSN1S1*, un polimorfismo qualitativo è stato evidenziato anche al locus *CSN2* di capra (Tab. 2). Le differenze individuali d'espressione nel contenuto di caseina β nel latte di capra sono determinate dalla presenza di almeno otto alleli: *CSN2 A* [16], *CSN2 A1* [40], *B* [41], *C* [42], *D* [43], *E* (Caroli, comunicazione personale), associati ad un normale contenuto di caseina β e *CSN2 0* [44] e *CSN2 01* [45] associati ad una apparente assenza di tale frazione proteica nel latte (Fig. 1).

Tabella 2 - Livello di espressione degli alleli codificanti per la caseina β del latte di capra.
Table 2 - Level of expression of the alleles coding for the β casein of goat milk.

Alleli al locus <i>CSN2</i>	g/L
Alleles at the <i>CSN2</i> locus	
A, A1, B, C, D, E	~ 5
0, 01	0

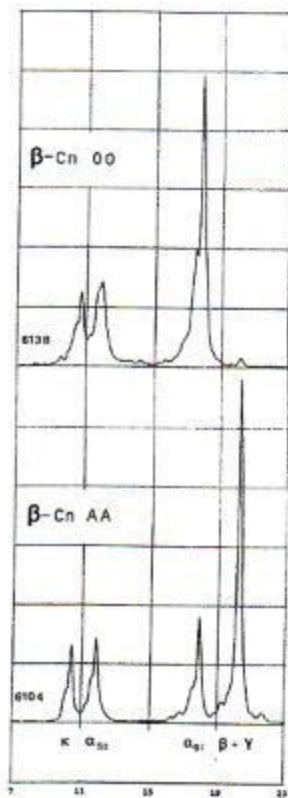


Figura 1 - Profili RP-HPLC di due caseine isoelettriche di capre con genotipo β -Cn 00 e β -Cn AA

Figure 1 - RP-HPLC profiles of two isoelectric caseins of goats with genotype β -Cn 00 and β -Cn AA.

Sono noti gli eventi molecolari responsabili della formazione della maggior parte degli alleli a questo locus. In particolare, considerando l'allele CSN2 A, la condizione ancestrale del gene, gli alleli C e 01 si caratterizzano entrambi per una singola sostituzione nucleotidica (transizione C→T) che si realizza rispettivamente al nt 407 [42] e al nt 373 [46] del 7° esone, mentre l'allele 0 si origina per la singola delezione di una delle 4 adenine presenti tra i nucleotidi 16 e 19 dello stesso esone [44]. La sostituzione che caratterizza l'allele C è responsabile per il cambiamento amminoacidico Ala→Val in posizione 177 della proteina matura [42], mentre l'evento molecolare che caratterizza l'allele CSN2 E è una transizione C→A responsabile del cambiamento a Ser¹⁸⁰→Tyr (Caroli, comunicazione personale). Per quanto riguarda l'allele CSN2 A1, la mutazione si realizza nella regione 3' UT e trattasi di una transizione (C→T) al 180° nucleotide del 9° esone, ad una distanza di 124 nucleotidi dal sito di poliadenilazione [47], mentre l'allele D si caratterizza per la sostituzione amminoacidica Val¹⁸⁰→Asn [43]. A tutt'oggi non è noto l'evento molecolare responsabile dell'allele CSN2 B.

Le mutazioni che caratterizzano i due alleli nulli, 0 e 01, sono responsabili della formazione di codoni di terminazione prematuri rispettivamente in posizione 58 [44] e 182 [46].

La frequenza dell'allele CSN2 01 è risultata pari a 0,074 nella razza Garganica, 0,059 nella razza Maltese, 0,103 nella razza Nicastrese allevata in Calabria e circa 0,200 nelle capre Creole. Nelle razze italiane questo allele è stato sempre osservato in cis con l'allele CSN1S1 A [48], e nelle capre Creole anche con l'allele CSN1S1 B [41].

L'analisi dei trascritti del gene *CSN2* di capra ha evidenziato che i livelli di sintesi degli mRNAs degli alleli 0 e 01 sono rispettivamente 10 e 100 volte più bassi di quello normale (allele *CSN2* A) [44, 46].

Dati preliminari sul frazionamento della caseina isoelettrica mediante RP-HPLC indicano che negli individui *CSN2* A/A la caseina β rappresenta circa il 53% della caseina totale, mentre negli individui *CSN2* 01/01 questa, identificata soltanto per il tempo di ritenzione, è circa l'1,6%, anche se tale frazione, in realtà, non sembrerebbe essere caseina β . L'analisi delle proprietà di coagulazione del latte con e senza caseina β ha, inoltre, dimostrato che il latte degli individui omozigoti per l'allele *CSN2* 01 ha tempi di coagulazione molto più lunghi (circa tre volte il valore normale) ed una consistenza del coagulo molto ridotta. Inoltre, la resa in formaggio (Caciotta) a 30 giorni, ottenuta dal latte dell'intera lattazione, è risultata 12,3%-11,7% e 10%, rispettivamente, per i genotipi *CSN2* A/A, *CSN2* 01/A e *CSN2* 01/01 [49, 50].

CASEINA α_s

Tra le caseine calcio sensibili, la caseina α_s è quella maggiormente fosforilata. È una fosfoproteina costituita da 208 amminoacidi. Nel bovino il gene della caseina α_s (*CSN1S2*) è costituito da 18438 nucleotidi ed è suddiviso in 18 esoni di dimensioni variabili tra 21 e 266 nucleotidi. L'organizzazione del gene al 5' e al 3' è molto simile a quella osservata nel gene codificante la caseina α_1 : il primo esone non è codificante e costituisce la 5'UTR; il secondo esone, di 63 nucleotidi, codifica per la sequenza altamente conservata di 15 amminoacidi del peptide leader, mentre gli ultimi due esoni contengono la maggior parte della 3'UTR del gene [51]. Nella capra è nota la sequenza del cDNA [17, 52] e la parziale sequenza genica [53, 54]. Il cDNA è lungo 1027 nucleotidi e mostra il 98,5% e 94,5% di omologia, rispettivamente, con le corrispondenti sequenze ovina [55] e bovina [56].

Negli ultimi anni anche a questo *locus* è stato evidenziato un peculiare polimorfismo quali-quantitativo. A tutt'oggi sono stati individuati e caratterizzati 7 alleli associati ad almeno 3 diversi livelli di sintesi della corrispondente proteina (Tab. 3); mentre gli alleli *CSN1S2* A, *CSN1S2* B, *CSN1S2* C, *CSN1S2* E e *CSN1S2* F sono associati ad un contenuto normale di caseina α_s [38, 52, 53, 57, 58], l'allele *CSN1S2* D è responsabile di un suo contenuto intermedio [54], mentre l'allele *CSN1S2* 0 è un allele "nullo" in quanto associato ad una apparente assenza di caseina α_s [54] (Fig. 2).

Riguardo all'allele D, l'analisi di campioni individuali di latte per mezzo di SDS PAGE ha messo in evidenza che la banda relativa a tale variante mostra una chiara riduzione di intensità se comparata con quella di altre varianti a questo *locus*. In accordo con questo risultato è stato stabilito che l'allele *CSN1S2* D sia associato ad un più basso (intermedio) livello di sintesi rispetto al normale [53]. Analisi per mezzo di SDS-PAGE, Urea-PAGE e RP-HPLC hanno, invece,

Tabella 3 - Livello di espressione degli alleli codificanti per la caseina α_{s2} del latte di capra.

Table 3 - Level of expression of the alleles coding for the α_{s2} -casein of goat milk.

Alleli al locus CSN2S2 Alleles at the CSN2S2 locus	g/L
A, B, C, E, F, G	~ 2,5
D	< 2,5
0	0

confermato l'apparente assenza di caseina α_{s2} nel latte di capre omozigoti per l'allele CSN2S2 0 [54].

A livello molecolare, gli alleli CSN2S2 A, B, C, E differiscono per singole sostituzioni nucleotidiche responsabili di singole sostituzioni amminoacidiche [52, 53, 58]. L'allele CSN2S2 D si caratterizza, invece, per una delezione di 106 nucleotidi e, in particolare, degli ultimi 11 nucleotidi dell'11° esone e i primi 95 nt dell'introne successivo [53], mentre la mutazione responsabile dell'allele nullo è una transizione (G→A) all'80° nt dell'11° esone responsabile della formazione di uno stop codon prematuro in posizione 110 [54]. Anche per l'allele CSN2S2 0, analogamente a quanto riportato per gli alleli CSN2S1 N e CSN2 0 e 01 la presenza di uno stop codon prematuro potrebbe essere responsabile dell'apparente assenza di caseina α_{s2} nel latte di capra.

A riprova di ciò, l'analisi per mezzo di Dot blot ha dimostrato che il livello di mRNA trascritto dall'allele CSN2S2 0 è circa il 10% del valore normale [53]. L'analisi per mezzo di RT-PCR degli mRNAs trascritti ha messo in evidenza la formazione di diverse popolazioni di mRNA per gli alleli CSN2S2 A, 0 e D. In particolare, gli alleli A e 0 trascrivono ciascuno sia un mRNA correttamente assemblato (rispettivamente 91,6% e 68,2%) che privo della regione codificante il 6° esone (rispettivamente 8,4% e 10,3%). Entrambe le popolazioni di mRNA prodotte dall'allele CSN2S2 0 si caratterizzano per uno stop codon prematuro, conseguenza della transizione G→A all'80° nt dell'11° esone. Questo allele produce, inoltre, almeno altri 3 trascritti deleti rispettivamente dell'11° esone (13,3%), dei primi 81 nt dell'11° esone (7,2%) e dal 6° all'11° esone (1,0%). Infine, per l'allele CSN2S2 D le tre popolazioni di mRNA osservate risultano delete dei seguenti esoni: 11° (82,1%), 6° ed 11° (13,4%), 6°, 8° ed 11° (4,5%). Quest'ultimo risultato lascerebbe ipotizzare che la variante proteica D sia deleva del peptide relativo all'intero esone 11 (167 aa vs 208). La molteplicità di trascritti assemblati in modo aberrante, probabilmente conseguenza di un'alterata capacità di splicing del trascritto primario, potrebbe essere, pertanto, responsabile della ridotta quantità di mRNA prodotto dall'allele CSN2S2 D, dando ragione del contenuto apparentemente più basso di caseina α_{s2} associato a tale allele [40].

Il fatto che esistano alleli deboli e nulli ai loci delle caseine calcio-sensibili offre opportunità uniche per la selezione nella specie caprina, finalizzata alla produzione di latte con proprietà ipoallergeniche, basso contenuto calorico e composizione simile al latte di donna. Questo, infatti, possiede particolari caratteristiche: è privo della frazione β -lattoglobulinica [59], contiene una quantità di sieroproteina che è circa doppia rispetto alla frazione caseinica [60], inoltre mostra un basso contenuto in caseina, in particolar modo assenza di caseina α_{s2} e tracce di caseina α_{s1} [61]. Appare, quindi, evidente che il latte di donna, se comparato a quello di altri mammiferi, risulta nel complesso un latte ipoproteico [62].

Dati recenti indicano come il principale allergene presente nel latte sia proprio la caseina α_{s2} [63]. I bambini allergici sottoposti a test hanno infatti sviluppato anticorpi specifici per questa proteina nel 90% dei casi, mentre solo nel 45% dei casi hanno prodotto anticorpi contro la β -lattoglobulina, ritenuta fino ad ora la principale responsabile delle reazioni allergiche al latte nei bambini [63].

Attualmente in Italia il latte di capra viene impiegato soprattutto nell'industria casearia. In altri paesi europei e non (Gran Bretagna, Stati Uniti, Nuova Zelanda, Australia, Sud Africa, Francia), oltre che per la trasformazione il latte di capra viene da alcuni anni anche proposto sul mercato come prodotto fresco per l'alimentazione. Recentemente anche in Italia si sta propo-

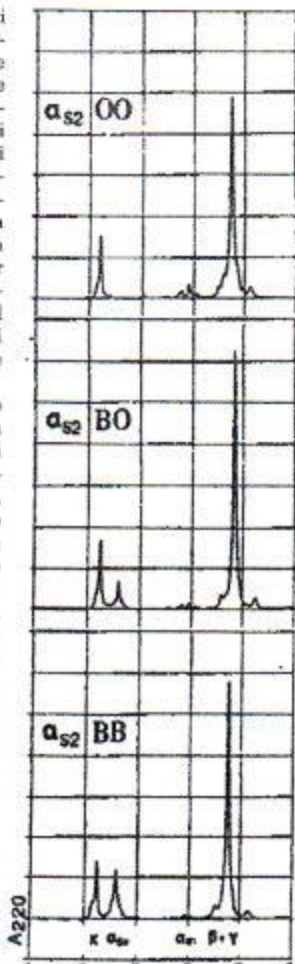


Figura 2 - Profili RP-HPLC della caseina isoelettrica di tre capre con genotipo: α_{s1} - CnB/O, α_{s2} - CnB/O, α_{s2} - CnB/B.

Figure 2 - RP-HPLC profiles of the isoelectric caseins of three goats with the following genotype: α_{s1} - CnB/O, α_{s2} - CnB/O, α_{s2} - CnB/B.

nendo latte di capra per consumo diretto, in polvere e a lunga conservazione, il quale, tuttavia è pur sempre caratterizzato da un contenuto normale di caseina α_2 . Pertanto, l'utilizzo di un latte privo di tale frazione caseinica potrebbe ridurre ulteriormente l'incidenza dei fenomeni di intolleranza.

RIASSUNTO - La presente rassegna si è occupata del polimorfismo genetico delle caseine calcio sensibili (α_1 , β , α_2) del latte di capra. Sono stati riportati gli eventi mutazionali, a livello di DNA, responsabili delle diverse forme alleliche. Vengono illustrati i possibili eventi molecolari responsabili del differente livello di espressione (normale, intermedio, nullo) che caratterizza le diverse forme alleliche di uno stesso gene e le relazioni tra polimorfismo genetico e caratteristiche strutturali, compositive e tecnologiche del latte di capra. Infine, la rassegna ha considerato il ruolo del polimorfismo genetico della caseina α_2 rispetto alle forme di intolleranza dei bambini al latte. Dati recenti, infatti, indicano come il principale allergene presente nel latte sia proprio la caseina α_2 . Pertanto, l'utilizzo di un latte privo di tale frazione caseinica potrebbe ridurre ulteriormente tali fenomeni di intolleranza.

Parole chiave: polimorfismo genetico, latte di capra, caseine

SUMMARY - *Influence of genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins on the structural and nutritional characteristics and on the dairy aptitude and hypoallergenic properties of goat milk.* - This review was focused on the genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins (α_1 , β , α_2) of goat milk. Mutational events characterising the different allelic variants were reported. The molecular events responsible for the different level of expression (normal, intermediate, null) that characterise the alleles of the same gene were reported. Furthermore, relations between genetic polymorphism and structural, compositional and technological characteristics of goat milk were considered. Finally, the role of genetic polymorphism of casein α_2 in allergic forms to milk for infants. In fact, recent research indicates that the casein α_2 is responsible for the onset of allergic forms, consequently, the use of a milk lacking this casein fraction could reduce this phenomenon of intolerance.

Keywords: genetic polymorphism, goat milk, caseins

BIBLIOGRAFIA

- 1) Chandan R, Attai T, Shahani KM (1992). *Nutritional aspects of goat milk and its products*. V Int. Conf. of Goats, New Delhi.
- 2) Desjeux JF (1993). *Valeur nutritionnelle du lait de chèvre*. Lait, 73, 573-580.
- 3) Mariani P (1992). *Il polimorfismo genetico delle proteine del latte*. La razza Bruna, 32(1), 21-28.
- 4) Rijnkles M (2002). *Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 7(3), 327-45.

- 5) Popescu CP, Long S, Riggs P, Womack J, Schmutz S, Fries R, Gallagher DS (1996). *Standardization of the cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype*. Cytogenet. Cell Genet., 74, 259-261.
- 6) Hayes H, Petit E (1993). *Mapping of the β -lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence in homologous cattle, sheep, and goat chromosomes*. Mamm. Genome, 4, 207-210.
- 7) Threadgill DW, Womack JE (1990). *Genomic analysis of the major bovine milk proteins genes*. Nucleic Acids Res., 18, 6935-6942.
- 8) Groenen MAM (1992). *XLIII Ann. Meet EAAP*, 1-18.
- 9) Topper YJ, Freeman CS (1980). *Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland*. Physiol. Rev., 60, 1049-1066.
- 10) Rosen JM, O'Neal DL, McHugh JE, Comstock JP (1978). *Progesterone-mediated inhibition of casein mRNA and polysomal casein synthesis in the rat mammary gland during pregnancy*. Biochem., 17, 290-297.
- 11) Brew K, Castellino FJ, Vanaman TC, Hill RL (1970). *The complete amino acid sequence of bovine alpha-lactalbumin*. J. Biol. Chem., 245, 4570-4582.
- 12) Mercier JC, Brignon G, Ribadeau-Dumas B (1973). *Primary structure of bovine kappa B casein. Complete sequence*. Eur. J. Biochem., 35, 222-235.
- 13) MacGillivray RT, Brew K, Barnes K (1979). *The amino acid sequence of goat alpha-lactalbumin*. Arch. Biochem. Biophys., 197, 404-414.
- 14) Préaux G, Braunitzer G, Schrank B, Stangl A (1979). *The amino acid sequence of goat beta-lactoglobulin*. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 360, 1595-604.
- 15) Brignon G, Mahé MF, Grosclaude F, Ribadeau-Dumas B (1989). *Sequence of caprine alphas1-casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level, alphas1-CnA, B and C*. Protein Seq. Data Anal., 2, 181-188.
- 16) Roberts B, Di Tullio P, Vitale J, Hehir K, Gordon K (1992). *Cloning of the goat β -casein gene and expression in transgenic mice*. Gene, 121, 255-262.
- 17) Bouziol C (1993). *Sequence of the goat alphas2-casein-encoding cDNA*. Gene, 125, 235-236.
- 18) Coll A, Folch JM, Sánchez A (1993). *Nucleotide sequence of the goat kappa-casein cDNA*. J. Anim. Sci., 71, 2833.
- 19) Ramunno L, Cosenza G, Rando A, Illario R, Gallo D, Di Bernardino D, Masina P (2004). *The goat alphas1-casein gene: gene structure and promoter analysis*. Gene, 334, 105-111.
- 20) Koezan D, Hobom G, Seyfert HM (1991). *Genomic organization of the bovine α_1 -casein gene*. Nucleic Acids Res., 19, 5591-5596.
- 21) Chianese L, Ferranti P, Garro G, Mauriello R, Addeo F (1997). *Occurrence of three novel alphas1-casein variants in goat milk*. Milk Protein Polymorphism FIL-IDF Palmerston North, New Zealand, 259-267.

- 22) Martin P, Ollivier-Bousquet M, Grosclaude F (1999). *Genetic polymorphism of casein: a tool to investigate casein micelle organization*. Int. Dairy J., 9, 163-171.
- 23) Bevilacqua C, Ferranti P, Garro G, Veltri C, Lagonigro R, Leroux C, Pietrolà E, Addeo F, Pilla F, Chianese L, Martin P (2002). *Interallelic recombination is probably responsible for the occurrence of a new alpha(s1)-casein variant found in the goat species*. Eur. J. Biochem., 269(4), 1293-1303.
- 24) Jansà-Perez M, Leroux C, Bonastre AS, Martin P (1994). *Occurrence of a Line sequence in the 3' UTR of the goat alpha_{s1}-casein E-encoding allele associated with reduced protein synthesis level*. Gene, 147, 179-187.
- 25) Angel P, Karin M (1991). *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation*. Biochim. Biophys. Acta, 1072, 129-157.
- 26) Ramunno L, Cosenza G, Rando A, Pauciuolo A, Illario R, Gallo D, Di Bernardino D, Masina P (2005). *Comparative analysis of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland*. Gene, 345, 289-299.
- 27) Rando A, Di Gregorio P, Ramunno L, Mariani P, Fiorella A, Senese C, Marletta D, Masina P (1998). *Characterization of the CSN1A^G allele of the bovine alpha_{s1}-casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element*. J. Dairy Sci., 81, 1735-42.
- 28) Caput D, Beutler E, Hartok K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A (1986). *Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1670-1674.
- 29) Jackson RJ (1993). *Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3' untranslated region*. Cell, 74, 9-14.
- 30) Grosclaude F, Ricordeau G, Martin P, Remeuf F, Vassal L, Bouillon J (1994). *Du gene au fromage: le polymorphisme de la caseine alpha_{s1} caprine, ses effets, son evolution*. INRA Prod. Ani., 7, 3-19.
- 31) Martin P, Leroux C (1994). *Characterization of a further alpha_{s1}-casein variant generated by exon-skipping*. XXIVth Int. Conf. on Anim. Genet., 25 (Suppl. 2), 86.
- 32) Leroux C, Mazure N, Martin P (1992). *Mutations away from splice site recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat alpha_{s1}-casein transcripts. Structural organization of the relevant gene*. J. Biol. Chem., 267, 6147-6157.
- 33) Cosenza G, Illario R, Rando A, Di Gregorio P, Masina P, Ramunno L (2003). *Molecular characterization of the goat CSN1S101 allele*. J. Dairy Res., 70, 237-240.
- 34) Dear IO, Maquat LE (1988). *Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation*. Mol. Cell. Biol., 8, 802-813.
- 35) Valentine CR (1998). *The association of nonsense mutation with exon skipping*. Mut. Res., 411, 87-117.

- 36) Mahé MF, Manfredi E, Ricordeau G, Piacere A, Grosclaude F (1994). *Effets du polymorphisme de la caseine α_1 sur les performances laitières: analyse intra-descendance de boucs de race Alpine*. Genet. Sél. Evol., 26, 151-157.
- 37) Remuef F (1993). *Influence du polymorphisme génétique de la caseine α_1 caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait*. Lait, 73, 549-557.
- 38) Grosclaude F, Mahé MF, Brignon G, Di Stasio L, Jeunet R (1987). *A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat alphas1-casein*. Genet. Sél. Evol., 19, 399-412.
- 39) Blackburn DE, Hobbs AA, Rosen JM (1982). *Rat beta casein cDNA: sequence analysis and evolutionary comparisons*. Nucleic Acids Res., 10, 2295-2307.
- 40) Cosenza G, Illario R, Riccio R, Di Rosa FP, Gallo D, Ramunno L (2002). *Analisi dei trascritti del gene della caseina α_1 di capra*. Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, 6 e 7 giugno, Portici (NA), 310.
- 41) Mahé MF, Grosclaude F (1993). *Polymorphism of β -casein in the Creole goat of Guadeloupe, evidence for a null allele*. Genet. Sél. Evol., 25, 403-408.
- 42) Neveu C, Mollé D, Moreno J, Martin P, Léonil J (2002). *Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: genetic variants and phosphorylation*. J. Prot. Chem., 21, 557-567.
- 43) Galliano F, Saletti R, Consolo V, Foti S, Marletta D, Bordenaro S, D'Urso G (2004). *Identification and characterization of a new beta-casein variant in goat milk by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid. Commun. Mass Spectrom., 18, 1972-1982.
- 44) Persuy MA, Printz C, Medrano JF, Mercier JC (1999). *A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat beta-casein null allele*. Anim. Genet., 30, 444-451.
- 45) Ramunno L, Rando A, Chianese L, Massari M, Di Gregorio P, Bordini A (1992). *Quantitative polymorphism of the goat β -casein*. Congr. Naz. S.I.P.A.O.C., 258.
- 46) Rando A, Pappalardo M, Capuano M, Di Gregorio P, Ramunno L (1996). *Two mutations might be responsible for the absence of β -casein in goat milk*. Anim. Genet., 27(Suppl. 2), 31.
- 47) Cosenza G, Pauciullo A, Gallo D, Di Berardino D, Ramunno L (2005). *A Sap I PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat CSN2 locus*. J. Dairy Res., 72, 456-459.
- 48) Ramunno L, Rando A, Di Gregorio P, Capogreco B, Masina P (1994). *Indagine di popolazione sui geni a effetto maggiore sul contenuto di caseina α_1 e β nel latte di capra*. Zoot. Nutr. Anim., 20, 107-111.

- 49) Chianese L, Garro G, Nicolai MA, Mauriello R, Ferranti P, Pizzano R, Capuccio U, Laezza P, Addeo F, Ramunno L, Rando A, Rubino R (1993). *The nature of β -casein heterogeneity in caprine milk*. Lait, 73, 533-547.
- 50) Ramunno L, Mariani P, Pappalardo M, Rando A, Capuano M, Di Gregorio P, Cosenza G (1996). *Un gene ad effetto maggiore sul contenuto di caseina β nel latte di capra*. Atti XI Congr. Naz. A.S.P.A., 185-186.
- 51) Groenen MAM, Dijkhof RJA, Verstege AJM, Van der Poel JJ (1993). *The complete sequence of the gene encoding bovine α casein-2*. Gene, 123, 187-93.
- 52) Bouniol C, Brignon G, Mahè MF, Printz C (1994). *Biochemical and genetic analysis of variant C of α casein-2*. Anim. Genet., 25, 173-177.
- 53) Ramunno L, Cosenza G, Pappalardo M, Longobardi E, Gallo D, Pastore N, Di Gregorio P, Rando A (2001a). *Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus*. Anim. Genet., 32, 264-268.
- 54) Ramunno L, Longobardi E, Pappalardo M, Rando A, Di Gregorio P, Cosenza G, Mariani P, Pastore N, Masina P (2001b). *An allele associated with a non detectable amount of α casein-2 in goat milk*. Anim. Genet., 32, 19-26.
- 55) Boissard M, Petrisant G (1985). *Complete sequence of ovine α casein messenger RNA*. Biochimie, 67, 1043-51.
- 56) Stewart AF, Bonsing J, Beattie CW, Shah F, Willis IM, Mackinlay AG (1987). *Complete nucleotide sequences of bovine α casein-2 and β casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species*. Mol. Biol. Evol., 4, 231-241.
- 57) Boulanger A, Grosclaude F, Mahè MF (1984). *Polymorphisme des castines α 1 et α 2 de la chèvre (Capra hircus)*. Genet. Sel. Evol., 16, 157-175.
- 58) Lagonigro R, Pietrola E, D'Andrea M, Veltri C, Pilla F (2001). *Molecular genetic characterization of the goat α casein-2 E allele*. Anim. Genet., 32, 391-393.
- 59) Wenner HA (1982). *The enteroviruses: recent advances*. Yale J. Biol. Med., 55, 277-82.
- 60) Polidori F (1994). *Il latte dietetico*. Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte". Torino, 83-93.
- 61) Conti A, Fabris C, Giunta C (1994). *Il latte umano come modello per la produzione di latti dietetici*. Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte". Torino, 140.
- 62) Ponzzone A., Ferrero G.B., Spada M., Dompè C., Ferraris S. (1994). *Utilizzazione del latte nella prima infanzia*. Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte". Torino, 99-104.
- 63) Natale M, Bissan C, Monti G, Peltran A, Perono Garoffo L, Valentini S, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A (2004). *Cow's milk allergens identification by two dimensional immunoblotting and mass spectrometry*. Mol. Nutr. Food Res., 48, 363-369.