



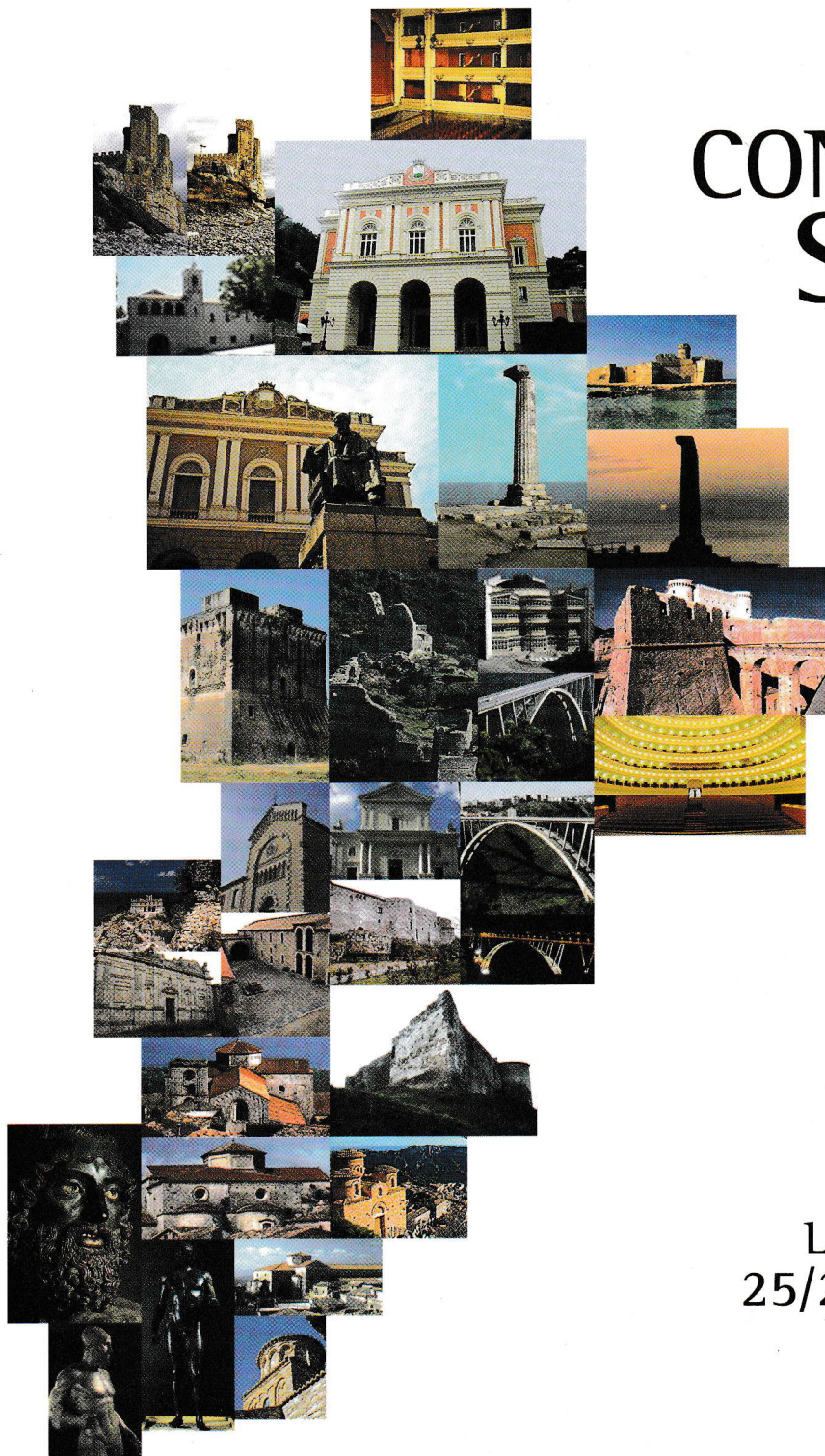
A.I.A. CZ-KR
Associazione Interprovinciale Allevatori
Catanzaro-Crotone



S.I.P.A.O.C.
Società Italiana di Patologia e
di Allevamento degli ovini e dei caprini



A.R.A. CALABRIA
Associazione Regionale Allevatori
Calabria



XVII CONGRESSO SIPAOC

Centro Servizi
Avanzati Ricerca,
Formazione, Sviluppo
Agroalimentare
della Calabria

Lamezia Terme (CZ)
25/28 Ottobre 2006

GENETICA E QUALITÀ DEL LATTE DI CAPRA

Ramunno L., Pauciullo A., Mancusi A., Cosenza G.

Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Portici (Na), Italy.

Parole chiave: Capra hircus, caseine Ca-sensibili, polimorfismo.

Il latte è il liquido secreto dalla ghiandola mammaria delle femmine in lattazione ed 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. Mentre in passato la qualità si identificava principalmente con il contenuto in grasso, oggi il primo posto nella scala dei requisiti qualitativi è rappresentato dal contenuto proteico. Il latte di capra, rispetto a quello bovino, si caratterizza, in particolare, per la presenza di globuli di grasso molto piccoli con membrane protettive piuttosto fragili (Chandan *et al.*, 1992), caratteristica che determina una sensibilità spiccata alla lipolisi, fenomeno che scinde i globuli di grasso in acidi grassi liberi responsabili del forte odore e sapore dei formaggi di capra (Desjeux, 1993). 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 (ammoniaca, urea, creatina etc.) (Mariani, 1992).

Come è noto, nel latte dei ruminanti sono presenti 6 principali frazioni proteiche ed in particolare 4 caseine (α_1 , β , α_2 e k), 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 (Rijnkles, 2002), e 2 siero proteine: β -lattoglobulina (cromosoma 11, Popescu *et al.*, 1996) ed α -lattoalbumina (cromosoma 5, Hayes *et al.*, 1993).

Le caseine rappresentano, per il lattante, la principale fonte di amminoacidi e svolgono un ruolo determinante nel trasporto di fosforo e calcio in quantità sufficienti per le esigenze di sviluppo del tessuto osseo. In particolare le caseine del gruppo α_s (α_1 e α_2) determinerebbero la capacità delle micelle di trasportare il calcio ed il fosforo colloidali (Threadgill e Womack, 1990).

I geni delle proteine del latte sono espressi durante la lattazione nelle cellule epiteliali della ghiandola mammaria e sono sotto il controllo di diversi ormoni (Groenen, 1992). La sintesi delle proteine del latte è regolata positivamente da insulina, prolattina, glucocorticoidi ed ormone tiroideo (Topper e Freeman, 1980) ed è regolata negativamente dal progesterone (Rosen *et al.*, 1978). La struttura primaria delle due principali proteine del siero (α -lattoalbumina e β -lattoglobulina) e delle quattro caseine (α_1 , α_2 , β e k) è stata individuata per la prima volta nel bovino nel corso degli anni settanta (Brew *et al.*, 1970; Mercier *et al.*, 1973). Successivamente è stata chiarita la struttura primaria delle omologhe proteine caprine, sia direttamente, a partire dalla proteina stessa (α -lattoalbumina: MacGillivray *et al.*, 1979; β -lattoglobulina: Préaux *et al.*, 1979; caseina α_1 : Brignon *et al.*, 1989) sia indirettamente, deducendola dalla sequenza nucleotidica del gene o del cDNA (caseina β : Roberts *et al.*, 1992; caseina α_2 : Bouniol, 1993; caseina k: Coll *et al.*, 1993). 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% delle proteine del latte. Esse sono caratterizzate da ben specifiche proprietà, quali una bassa solubilità a pH 4,6 e, in particolare, le caseine α_1 , β e α_2 precipitano in presenza di calcio. Quest'ultime sono, senza dubbio le frazioni proteiche più investigate, in particolar modo nella specie caprina nella quale è stato evidenziato un notevole polimorfismo 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 aminoacidi 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 (Ramunno *et al.*, 2004). In generale, la struttura del gene *CSN1S1* di capra presenta un'organizzazione simile a quella dell'omologo gene nella specie bovina (Koczan *et al.*, 1991) fatta eccezione per differenze nella grandezza di alcuni introni come conseguenza di 3 extra elementi di origine retroposonica che caratterizzano la sequenza bovina (Ramunno *et al.*, 2004). Tali inserzioni, probabilmente, sono relativamente recenti e rappresentano degli 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 dovuto alla presenza di alleli "quantitativi" ad un singolo locus strutturale. Fino ad oggi sono stati individuati almeno 17 alleli associati ad almeno 4 diversi livelli di sintesi di caseina α 1.

Un primo gruppo di alleli (A, B1, B2, B3, B4, C, H, L e M) sono associati ad un normale contenuto di caseina α 1 (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 O1, O2 e N rappresentano alleli "nulli" in quanto responsabili dell'apparente assenza di caseina α 1 nel latte (Chianese *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999; Bevilacqua *et al.*, 2002; Jansa-Perez *et al.*, 1994; Ramunno *et al.*, 2005).

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 aminoacidiche (Chianese *et al.*, 1997; Bevilacqua *et al.*, 2002; per una rassegna vedere Martin *et al.*, 1999). Mentre risulta ancora sconosciuta la mutazione che porta alla formazione dell'allele I (Chianese *et al.*, 1997), 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 (Jansa-Perez *et al.*, 1994). L'inserzione di un elemento di origine retroposizionale caratterizza anche l'allele G della caseina α 1 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 (Rando *et al.*, 1998). La ridotta quantità di caseina α 1 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 (Caput *et al.*, 1986; Jackson, 1993); b) gli mRNAs prodotti da tali alleli mostrano nella regione 3' UT una sequenza poliU (di origine retroposizionale, corrispondente alla regione 5' del LINE) che crea una struttura estremamente stabile con la coda di poliA 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 (Jansa-Perez *et al.*, 1994).

Per gli alleli *CSN1S1* D e G, per i quali sono stati osservati mRNA che mancano rispettivamente del 9° e 4° esone, sembra essere chiamato in gioco un'alterazione dei meccanismi di splicing (Grosclaude *et al.*,

1994). Mentre non è nota la base molecolare responsabile di questo errato splicing nell'allele D, la mutazione che caratterizza invece l'allele G è una transizione G→A nel primo nt del sito donatore di splicing dell'introne 4 (Martin e Leroux, 1994). L'allele F è, invece, caratterizzato dalla delezione di una citosina al 23° nucleotide del 9° esone e dall'inserzione di 11bp e 3 bp nell'introne successivo (Leroux *et al.*, 1992). Tali mutazioni sarebbero responsabili del ridotto contenuto di caseina α s1 nel latte di capra (Leroux *et al.*, 1992). 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 mRNA prodotte, tra le quali la più rappresentata si caratterizza per il mancato splicing degli esoni 9, 10 e 11 e che porta alla traduzione di una proteina di 162 aa (Leroux *et al.*, 1992).

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 (Cosenza *et al.*, 2003), mentre una ampia inserzione, fino ad oggi non caratterizzata, è l'evento molecolare responsabile dell'allele *CSN1S1* 02 (Martin *et al.*, 1999).

L'ultimo ad essere stato identificato a tale locus è l'allele *CSN1S1* N, anch'esso associato ad un contenuto apparentemente nullo della corrispondente frazione caseinica (Ramunno *et al.*, 2005). 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 (Ramunno *et al.*, 2005). 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 (Ramunno *et al.*, 2005). È, infatti, da diversi anni ormai nota la correlazione tra terminazione prematura della traduzione e compromissione di sintesi proteica (Daar e Maquat, 1988; Valentine, 1998).

Tuttavia, lo stesso evento molecolare caratterizza anche l'allele F, associato ad un basso, ma pur presente livello di sintesi di una forma deleta di caseina α s1. 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 quest'ultime sembrerebbe spiegare tale diverso livello di espressione (Ramunno *et al.*, 2005).

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 stato osservato 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%) (Ramunno *et al.*, 2005).

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 (Valentine, 1998), 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 (Angel *et al.*, 1991).

Tali 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 nella stessa specie (Bevilacqua *et al.*, 2002), che l'allele N si possa essere originato per un particolare fenomeno di ricombinazione interallelica (Ramunno *et al.*, 2005).

Gli effetti del polimorfismo della caseina α 1 di capra sul prodotto e la composizione del latte, la struttura micellare, la caseificazione e la resa casearia sono state ampiamente studiate 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 in calcio che risultano più bassi nel latte di tipo A; 3) il latte di capra con un più alto contenuto di caseina α 1 presenta una migliore composizione in termini sostanza solida, 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) (Mahè *et al.*, 1994); 5) il latte di capre con genotipo *CSN1S1* A/A presenta livelli di azoto totale maggiori rispetto a quello prodotto da capre con genotipo 0/0; 5) effetti significativi sono stati osservati anche sui parametri di coagulazione, sulla resa in formaggio, maggiori in latte con più alto contenuto di caseina α 1 (ad es., *CSN1S1* F/F ha una resa del 18,3%, mentre *CSN1S1* A/A del 21,9%); 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 (ircino) meno intenso rispetto a quello ottenuto da capre omozigoti per alleli difettivi (Remuef, 1993).

Caseina β

La β -caseina è la componente proteica quantitativamente più abbondante del latte dei mammiferi. Generalmente, il latte di capra mostra un contenuto di β -caseina pari a circa 6 g/l per allele (Grosclaude *et al.*, 1987) che è una fosfoproteina costituita da 207 residui aminoacidici. 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, 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 aminoacidici) e per i primi 2 residui aminoacidici 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 (Blackburn *et al.*, 1982). 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 quali-quantitativo è stato evidenziato anche al *locus CSN2* di capra. Le differenze individuali d'espressione nel contenuto di caseina β nel latte di capra sono determinate dalla presenza di almeno otto alleli: *CSN2* A (Roberts *et al.*, 1992), *CSN2* A1 (Cosenza *et al.*, 2005), B (Mahè e Grosclaude, 1993), C (Neveu *et al.*, 2002), D (Galliano *et al.*, 2004), E (Caroli A, comunicazione personale), associati ad un normale contenuto di caseina β e *CSN2* 0 (Persuy *et al.*, 1999) e *CSN2* 01 (Ramunno *et al.*, 1992) associati ad una apparente assenza di tale frazione proteica nel latte.

Sono noti gli eventi molecolari responsabili della formazione della maggior parte di tali alleli a tale *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 (Neveu *et al.*, 2002) e 373 (Rando *et al.*, 1996) 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 (Persuy *et al.*, 1999). La sostituzione che caratterizza l'allele C è responsabile per il cambiamento aminoacidico Ala → Val in posizione 177 della proteina matura (Neveu *et al.*, 2002), mentre l'evento molecolare che caratterizza l'allele CSN2 E è una tranversione C→A responsabile del cambiamento aa Ser¹⁶⁶→Tyr (Caroli A, comunicazione personale). Per quanto riguarda l'allele CSN2 A1, la mutazione si realizza nella regione UT e trattasi di una transizione (C→T) al 180° nucleotide del 9° esone, ad una distanza di 124 nucleotidi dal sito di poliadenilazione (Cosenza *et al.*, 2005), mentre l'allele D si caratterizza per la sostituzione aminoacidica Val²⁰⁷→Asn (Galliano *et al.*, 2004). 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 (Persuy *et al.*, 1999) e 182 (Rando *et al.*, 1996).

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 tale allele è stato sempre osservato in *cis* con l'allele CSN1SI A (Ramunno *et al.*, 1994), mentre nelle capre Creole anche con l'allele CSN1SI B (Mahé e Grosclaude, 1993).

L'analisi dei trascritti del gene CSN2 di capra ha evidenziato che i livelli di sintesi degli mRNA degli alleli 0 e 01 sono rispettivamente 10 e 100 volte più bassi di quello normale (allele CSN2 A) (Persuy *et al.*, 1999; Rando *et al.*, 1996).

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 della 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 del latte dell'intera lattazione è risultata del 12,3%, 11,7% e 10% rispettivamente per il genotipi CSN2 A/A, CSN2 01/A e CSN2 01/01 (Chianese *et al.*, 1993; Ramunno *et al.*, 1995).

Caseina *cs2*

Tra le caseine calcio sensibili, la caseina *cs2* è quella maggiormente fosforilata. È una fosfoproteina costituita da 208 aminoacidi. Nel bovino il gene della caseina *cs2* (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 nei geni codificanti la caseina *cs1*: il primo esone non è codificante e costituisce la 5'UTR; il secondo esone, lungo 63 nucleotidi, codifica per la sequenza altamente conservata di 15 aminoacidi del peptide leader, mentre gli ultimi due esoni contengono la maggior parte della 3'UTR del gene (Groenen *et al.*, 1993). Nella capra è nota la sequenza del cDNA (Bouniol, 1993; Bouniol *et al.*, 1994) e la parziale sequenza genica (Ramunno *et al.*, 2001a; Ramunno *et al.*, 2001b). Il cDNA è lungo 1027 nucleotidi e mostra il 98,5% e 94,5% di omologia rispettivamente con la corrispondente sequenza ovina (Boisnard e Pètrissant, 1985) e bovina (Stewart *et al.*, 1987).

Negli ultimi anni anche a tale *locus* è stato evidenziato un peculiare polimorfismo quali-quantitativo. A tutt'oggi sono stati individuati e caratterizzati almeno 7 alleli associati ad almeno 3 diversi livelli di sintesi della corrispondente proteina: mentre gli alleli CSN1S2 A, CSN1S2 B, CSN1S2 C, CSN1S2 E e CSN1S2 F sono associati ad un contenuto normale di caseina *cs2* (Boulanger *et al.*, 1984; Grosclaude *et al.*, 1987; Bouniol *et al.*, 1994; Lagonigro *et al.*, 2001; Ramunno *et al.*, 2001a), l'allele CSN1S2 D è responsabile di un suo contenuto intermedio (Ramunno *et al.*, 2001a), mentre l'allele CSN1S2 0 è un allele "nullo" in quanto associato ad una apparente assenza di caseina *cs2* (Ramunno *et al.*, 2001b).

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 dell'intensità se comparata con

quella di altre varianti a tale *locus*. In accordo a tale risultato è stato stabilito che l'allele *CSN1S2 D* sia associate ad un più basso (intermedio) livello di sintesi rispetto al normale (Ramunno *et al.* 2001a). Analisi per mezzo di SDS-PAGE, UREA-PAGE e RP-HPLC hanno, invece, confermato l'apparente assenza di caseina α_2 nel latte di capre omozigoti per l'allele *CSN1S2 0* (Ramunno *et al.* 2001b).

A livello molecolare, gli alleli *CSN1S2 A*, *B*, *C*, *E* differiscono per single sostituzioni nucleotidiche responsabili di single sostituzioni aminoacidiche (Bouniol *et al.*, 1994; Lagonigro *et al.*, 2001; Ramunno *et al.*, 2001a). L'allele *CSN1S2 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 (Ramunno *et al.* 2001a), 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 (Ramunno *et al.*, 2001b). Anche per l'allele *CSN1S2 0*, analogamente a quanto riportato per gli alleli *CSN1S1 N* e *CSN2 0* e *01* la presenza di uno stop codon prematuro potrebbe essere responsabile dell'apparente assenza di caseina α_2 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 *CSN1S2 0* è circa il 10% del valore normale (Ramunno *et al.* 2001b). L'analisi per mezzo di RT-PCR degli mRNA trascritti ha messo in evidenza la formazione di diverse popolazioni di mRNA per gli alleli *CSN1S2 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 *CSN1S2 0* si caratterizzano per uno stop codon prematuro, conseguenza della transizione G→A all'80° nt dell'11° esone. Tale 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 *CSN1S2 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 deleta 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 *CSN1S2 D*, dando ragione del contenuto apparentemente più basso di caseina α_2 associato a tale allele (Cosenza *et al.*, 2002).

Il fatto che esistano alleli deboli e nulli ai *loci* delle caseine calcio-sensibili offre opportunità uniche per la selezione nella specie caprina, per la produzione di latte con proprietà ipoallergeniche, basso contenuto calorico e composizione simile al latte umano. Il latte di donna possiede particolari caratteristiche: è privo della frazione β -lattoglobulinica (Wenner, 1982), contiene una quantità di α -lattoalbumina che circa il doppio rispetto alla frazione caseinica (Polidori, 1994), inoltre mostra un basso contenuto in caseina, in particolar modo assenza di caseina α_2 e tracce di caseina α_1 (Conti *et al.*, 1994). Appare, quindi, evidente che il latte di donna, se comparato a quello di altri mammiferi, risulta nel complesso essere un latte ipoproteico (Ponzzone *et al.*, 1994).

Dati recenti indicano come il principale allergene presente nel latte sia proprio la caseina α_2 (Natale *et al.*, 2004). 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 -lattoalbumina, ritenuta fino ad ora la principale responsabile delle reazioni allergiche al latte nei bambini (Natale *et al.*, 2004).

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 proponendo 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 tali fenomeni di intolleranza.

BIBLIOGRAFIA

- Angel P., Karin M. (1991). *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157.
- Bevilacqua C., Ferranti P., Garro, G. Veltri, C. Lagonigro R., Leroux C., Pietrolà E. Addeo F., Pilla F., Chianese L., Martin P. (2002). *Eur. J. Biochem.*, **269**(4), 1293-1303.
- Blackburn D.E., Hobbs A.A., Rosen J.M. (1982). *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2295-2307.
- Boisnard M., Petrisant G. (1985). *Biochimie*, **67**, 1043-51.
- Boulanger A., Grosclaude F., Mahè M.F. (1984). *Genet. Sel. Evol.*, **16**, 157-175.
- Bouniol C. (1993). *Gene*, **125**, 235-6.
- Bouniol C., Brignon G., Mahè M.F., Printz C. (1994). *Anim. Genet.*, **25**, 173-7.
- Brew K., Castellino F.J., Vanaman T.C., Hill R.L. (1970). *J Biol Chem*, **245**, 4570-82.
- Brignon G., Mahe M.F., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B. (1989). *Protein Séq Data Anal.*, **2**, 181-8.
- Caput D., Beutler B., Hartok K., Thayer R., Brown-Shimer S. e Cerami A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1670-1674.
- Chandan R., Attaie T., Shahani K.M. (1992). *V Int. Conf. of Goats, New Delhi*.
- Chianese L., Garro G., Nicolai M.A., Mauriello R., Ferranti P., Pizzano R., Capuccio U., Laezza P., Addeo F., Ramunno L., Rando A., Rubino R. (1993). *Le Lait*, **73**, 533-547.
- Chianese, L., Ferranti, P., Garro, G., Mauriello, R., Addeo, F. (1997). *Milk Protein Polymorphism FIL-IDF Palmerston North, New Zeland*, 259-267.
- Coll A., Folch J.M., Sánchez A. (1993). *J. Anim. Sci.*, **71**, 2833.
- Conti A., Fabris C., Giunta C. (1994). *Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte". Torino*, 140.
- Cosenza G., Illario R., Rando A., Di Gregorio P., Masina P., Ramunno L. (2003). *J. Dairy Res.*, **70** (2), 237-240.
- Cosenza G., Illario R., Riccio R., Di Rosa F.P., Gallo D., Ramunno L. (2002). *Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita*, 6 e 7 giugno, 310.
- Cosenza G., Pauciullo A., Gallo D., Di Berardino D., Ramunno L. (2005). *J. Dairy Res.*, **72**, 456-459.
- Daar I. O., Maquat L. E. (1988). *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 802-13.
- Desjeux J. F. (1993). *Le Lait*, **73**, 573-580.
- Galliano F., Saletti R., Consolo V., Foti S., Marletta M., Bordonaro S., D'Urso G. (2004). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1972-1982.
- Groenen M.A.M. (1992). *XLIII Ann. Meet EAAP*, 1-18.
- Groenen M.A.M., Dijkhof R.J.A., Verstege A.J.M., Van der Poel J.J. (1993). *Gene*, **123**, 187-93.
- Grosclaude F., Mahé M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. (1987). *Genet. Sel. Evol.*, **19**, 399-412.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J. (1994). *INRA Prod. Ani.*, **7**, 3-19.
- Hayes H., Petit E. (1993). *Mamm. Genome*, **4**, 207-210.
- Jansà-Perez M., Leroux C., Bonastre A.S., Martin P. (1994). *Gene*, **147**, 179-187.
- Koczan D., Hobom G., Seyfert H.M. (1991). *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5591-6.
- Lagonigro R, Pietrola E, D'Andrea M, Veltri C, Pilla F. (2001). *Anim Genet.*, **32**, 391-3.
- Leroux C., Mazure N., Martin P. (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 6147-57.
- MacGillivray R.T., Brew K., Barnes K. (1979). *Arch Biochem Biophys.*, **197**, 404-14.
- Mahè M.F., Grosclaude F. (1993). *Genet. Sel. Evol.*, **25**, 403-408.
- Mahè M.F., Manfredi E., Ricordeau G., Piacere A., Grosclaude F. (1994). *Genet. Sel. Evo.*, **26**, 151-157.
- Mariani P. (1992). *La Razza Bruna*, **1**, 21-28.
- Martin P., Leroux C. (1994). *XXIVth Int. Conf. on Anim. Genet.*
- Martin P., Ollivier-Bousquet M., Grosclaude F. (1999). *Int. Dairy J.*, **9**, 163-71.

- Mercier J.C., Brignon G., Ribadeau-Dumas B. (1973). *Eur J Biochem.*, **35**, 222-35.
- Natale M., Bisson C., Monti G., Peltran A., Perono Garoffo L., Valentini S., Fabris C., Bertino E., Coscia A., Conti A. (2004). *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**, 363-369.
- Neveu C., Mollé, Moreno J., Martin P., Léonil J. (2002). *Journal of Protein Chemistry*, **21**, 557-567.
- Persuy M.A., Printz C., Medrano J.F., Mercier J.C. (1999). *Anim. Genet.*, **30**, 444-51.
- Polidori F. (1994). *Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte"*. Torino, 83-93.
- Ponzone A., Ferrero G.B., Spada M., Dompè C., Ferraris S. (1994). *Atti del convegno su "Biotecnologie e Produzione del latte"*. Torino, 99-104.
- Popescu C.P., Long S., Riggs P., Womack J., Schmutz S., Fries R., Gallagher D. S. (1996). *Cytogenet Cell Genet.* **74**, 259-261 Jackson R.J. (1993). *Cell*, **74**, 9-14.
- Préaux G., Braunitzer G., Schrank B., Stangl A. (1979). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **360**, 1595-604.
- Ramunno L., Cosenza G, Pappalardo M, Longobardi E, Gallo D, Pastore N, Di Gregorio P, Rando A. (2001a). *Anim. Genet.*, **32**, 264-8.
- Ramunno L, Longobardi E, Pappalardo M, Rando A, Di Gregorio P, Cosenza G, Mariani P, Pastore N, Masina P. (2001b). *Anim. Genet.*, **32**, 19-26.
- Ramunno L., Cosenza G., Rando A., Illario R., Gallo D., Di Bernardino D., Masina P. (2004). *Gene*, **334**, 105-11.
- Ramunno L., Cosenza G., Rando A., Pauciullo A., Illario R., Gallo D., Di Bernardino D., Masina P. (2005). *Gene*, **345**, 289-99.
- Ramunno L., Mariani P., Pappalardo M., Rando A., Capuano M., Di Gregorio P., Cosenza G. (1995). *Atti XI Cong. Naz. A.S.P.A.*, 185-186.
- Ramunno L., Rando A., Chianese L., Massari M., Di Gregorio P., Bordi A. (1992). *Cong. Naz. S.I.P.A.O.C.*, 258.
- Ramunno L., Rando A., Di Gregorio P., Capogreco B., Masina P. (1994).
- Rando A., Di Gregorio P., Ramunno L., Mariani P., Fiorella A., Senese C., Marletta D., Masina P. (1998). *J Dairy Sci.*, **81**, 1735-42.
- Rando A., Pappalardo M., Capuano M., Di Gregorio P., Ramunno L. (1996). *Anim. Genet.*, **27**(Suppl. 2), 31.
- Remuef F. (1993). *Lait*, **73**, 549-557.
- Rijnkles M. (2002). *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **7** (3), 327-45. Review.
- Roberts B., Di Tullio P., Vitale J., Hehir K., Gordon K. (1992). *Gene*, **121**, 255-262.
- Rosen J.M., O'Neal D.L., McHugh J.E., Comstock J.P. (1978). *Biochem.*, **17**, 290-297.
- Stewart A.F., Bonsing J., Beattie C.W., Shah F., Willis I.M., Mackinlay A.G. (1987). *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 231-41.
- Threadgill D.W., Womack J.E. (1990). *Nucleic Acids Res*, **18**, 6935-42.
- Topper Y.J., Freeman C.S. (1980). *Physiol Rev*, **60**, 1049-106. Review.
- Valentine C.R. (1998). *Mut. Res.*, **411**, 87-117.
- Wenner H.A. (1982). *Yale J Biol Med.*, **55**, 277-82. Review.