FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE

ATTI DELLA 2ª CONFERENZA NAZIONALE SU:

STATO DELL'ARTE DELLE RICERCHE ITALIANE NEL SETTORE DELLE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE

a cura di: Giorgio Poli, Gianfranco Panina, Mara Rocchi, Luigi Bonizzi, Paola Dall'Ara

Università di Milano. 22 Aprile 1994

EDITO A CURA DELLA FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA 2ª CONFERENZA NAZIONALE SU:

STATO DELL'ARTE DELLE RICERCHE ITALIANE NEL SETTORE DELLE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
13 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
14 - 1985 5° Simposio Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino.
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1983 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986.
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni Alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del Suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1994 Argomenti di patologia veterinaria

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE
Via A. Bianchi 1, 25125 Brescia - Tel. 030/223244-2420569

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA
Via A. Bianchi 7, 25125 Brescia - Tel. 030/22901

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE
SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE
Via Celoria 10, 20133 Milano - Tel. 02/2361521-2363544

STATO DELL'ARTE DELLE RICERCHE ITALIANE NEL SETTORE DELLE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE

a cura di: Giorgio Poli, Gianfranco Panina,
Mara Rocchi, Luigi Bonizzi, Paola Dall'Ara

Giornata di studio dedicata al Prof. Giuseppe Aureli
nel 10° anniversario della scomparsa

ATTI DELLA 2ª CONFERENZA NAZIONALE
Università di Milano, 22 aprile 1994
Facoltà di Medicina Veterinaria

Moderatori:
Severino Ronchi, Camillo Secchi, Gianfranco Panina, Antonio Zanella,
Antonio Lauria, Eraldo Seren, Vittorio Barbieri, Giuseppe Rognoni

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, 1995

Tipolitografia La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia, 1995

COMITATO SCIENTIFICO

Prof. Giorgio Poli
Prof. Gianfranco Panina
Dott.ssa Mara Rocchi
Dott. Luigi Bonizzi
Dott.ssa Paola Dall'Ara

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

Sig. Gianfranco Spalenza
Sig.na Barbara Rancati

TECNICO AUDIOVISIVI

Sig. Antonio Corchia

INDICE

PRESENTAZIONE DEL VOLUME (G. Poli) . . . . . pag. 9
APERTURA DELLA GIORNATA (P. Mantegazza - G. Ruffo) . . . . » 13
TAVOLA ROTONDA: PROSPETTIVE DELLE BIOTECNOLOGIE (moderatore G. Poli - Milano)
G. Poli - Introduzione all'argomento . . . . . » 17
R. Marabelli - Biotecnologie e normativa della Comunità Europea . . . » 18
A. Macrí - Compiti dell'Istituto Superiore di Sanità e biotecnologie innovative . » 19
A. Belloli - La Sanità Pubblica Veterinaria e i vantaggi delle biotecnologie . » 20
A. Pecorelli - La Fondazione e il suo impegno per le biotecnologie . . » 21
E. Lodetti - L'Istituto Zooprofilattico leader nella diagnostica biotecnologica . » 22
G. Rognoni - In ricordo del Prof. Giuseppe Aureli . . . . . » 23
L. Alberghina - Biotecnologie e formazione superiore . . . . . » 23
L. Masotti - I Consorzi Interuniversitari . . . . . » 24
A. Albertini - La ricerca biotecnologica italiana e i finanziamenti CEE . » 25
L. Vingiani - Industria e innovazione biotecnologica . . . . . » 25
M. Gellini - Industria e joint-venture con i Centri di ricerca universitari . » 26

LETTURA MAGISTRALE
C. Bordignon - Terapia genica: attualità e prospettive . . . . . » 31

I SESSIONE
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA BIOLOGIA ANIMALE
(*moderatori:* S. Ronchi - Milano, C. Secchi - Milano) . . . . . » 41
F.G. Ranucci, G. Marconi, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli - Modelli animali transgenici per lo studio del sistema immunitario . . . . . » 43
T. Simonic, A. Negri, S. Duga, M. Mortarino, S. Ronchi - Mutagenesi sito-diretta della L-Aspartato ossidasi, enzima coinvolto nella biosintesi de novo della vitamina PP . . . . . » 45
C. Bandi, G. Damiani, L. Sacchi, B. Di Sacco, M.G. Bardin, M. Sironi, R. Fani, L. Magrassi - Caratterizzazione molecolare e identificazione di simbionti intracellulari . . . . . » 53
C. Rossetti, A. Teruzzi, I. Gilli, P.A. Martino - Determinazione della carica batterica totale nel latte per via amperometrica . . . . . » 59

II SESSIONE
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA SANITÀ ANIMALE
(*moderatori:* G. Panina - Brescia, A. Zanella - Milano) . . . . . » 67
C. Berneri, M. Amadori, E. Lodetti, M.R. Oggioni, M.R. Manganelli, G. Pozzi - Prospettive per l'uso in medicina veterinaria di streptococchi commensali ricombinanti come vettori di vaccini . . . . . » 69
M. Longeri, M. Polli, C. Rivolta, G. Ceriotti, M. Zanotti - Geni di istocompatibilità di classe II ed effetto nella risposta immunitaria nei confronti di Mycobacterium bovis . . . . . » 77
M.L. Pacciarini, M.L. Savio, P. Fusi, S. Tagliabue - Applicazione di metodi molecolari nella diagnosi di Leptospirosi . . . . . » 85
A. Laddomada, A. Caccia, C. Patta, G. Puggioni, A. Oggiano, A.Q. Carboni, A. Cattina - Utilizzo di metodiche diagnostiche innovative nell'ambito del piano di eradicazione della peste suina africana dalla Sardegna . » 97
S. Gaudi, L. Giavedoni, T. Simonic, T. Yilma - Formazione di particelle simili al virus (VLPs) contenenti IFN-γ: un possibile vaccino ricombinante per HIV (Human Immunodeficiency Virus) . . . . . » 105

W. Ponti, L. Montermini, E. Bolzani, M. Rocchi, M. Polli, M. Zanotti, M. Longeri, S. Russo, A. Agresti, G. Poli - Influenza dei polimorfismi BoLA sull'infezione prenatale e neonatale da BLV (Bovine Leukemia Virus) . . » 117
G. Sironi - Alterata espressione del tumor suppressor gene P53 in neoplasie di alcune specie domestiche: indagini immunoistochimiche . . . . . » 125

III SESSIONE
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE
(*moderatori:* A. Lauria - Milano, E. Seren - Bologna) . . . . . » 137
M. Mattioli, B. Barboni, P. Lucidi, L. Gioia - Monitoraggio dello stato di capacitazione del seme per l'ottimizzazione delle tecniche di fecondazione assistita » 139
F. Gandolfi, T.A.L. Brevini, S. Modina, L. Passoni, A.M. Luciano, A. Lauria - Fattori di crescita di origine tubarica: possibile ruolo nelle prime fasi dello sviluppo embrionale . . . . . » 147
L. Zicarelli, R. Boni, R. Di Palo, G. Campanile, L. Esposito, S. Roviello, V. Barbieri - Tecnologie innovative applicate alla riproduzione della bufala allevata in Italia . . . . . » 153
S. Naitana, S. Ledda, P. Loi, P. Cappai - Le nuove tecnologie riproduttive per la tutela del muflone sardo/corso . . . . . » 163
M.S.L. Rocchi, S. Cerolini, F. Pizzi, P. Dall'Ara - Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) per la valutazione qualitativa del seme bovino . . . . . » 169

IV SESSIONE
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA ZOOTECNIA
(*moderatori:* V. Barbieri - Napoli, G. Rognoni - Milano) . . . . . » 183
L. Ferretti, P. Leone, Y. Zhang, L. Redaelli, S. Comincini, F. Pilla, T. Gliozzi, B. Castiglioni, A. Mezzelani, G. Pagnacco, G. Rognoni - Applicazione dei marcatori molecolari per la caratterizzazione genetica dei bovini . . . . » 185
I. Cappuccio, A. Valentini, M. Bagliacca - Fonti alternative di DNA per evidenziare polimorfismi RAPD in specie di interesse zootecnico . . . . . » 195
L. D'Aiuto, G. Ragone, M.R. Lipsi, S. Massari, G. Vonghia, S. Ciccarese - Analisi ed espressione di geni γ/δ del *T-CELL receptor* negli ovini » 203
M.G. Bardin, M. Sironi, G. Gandini, P. Bolla, A. Caroli, R. Clementi, G. Damiani - Utilizzazione dei marcatori del DNA per stimare le relazioni di parentela . . . . . » 215
G. Savoini, V. Chiofalo, A. Zumbo, V. Dell'Orto - Effetto della somministrazione di somatotropina bovina ricombinante (rbST) in pecore da latte alimentate con diete a differente degradabilità ruminale dei carboidrati . » 225
L.P. Scordamaglia, C. Renieri, F. Valfrè - Biotecnologie applicate al riconoscimento ed alla valutazione dei parametri di qualità delle carni: variabilità fenotipica e genetica delle proteine muscolari . . . . . » 235
M.G. Bardin, C. Bandi, G. Damiani - Stima della struttura genetica di alcune popolazioni bovine mediante l'analisi di campioni costituiti dall'unione di DNA individuali . . . . . » 243
A. Caroli, P. Bolla, M.G. Bardin, R. Rizzi, G. Damiani, G. Rognoni - Variabilità delle produzioni e marcatori ad effetto maggiore . . . . » 251
F. Pilla, P. Leone, Y. Zhang, L. Redaelli, L. Ferretti, S. Comincini, F. Napolitano, B.M. Moioli, S. Puppo - Applicazione di marcatori microsatelliti alla tipizzazione di un nuovo tipo genetico . . . . . » 259
C.A. Sgoifo Rossi, E.M. Senatore, G. Savoini, F. Fantuz, F. Polidori - Effetti della somatotropina bovina ricombinante (rbST) e dei saponi di calcio sulla produzione e composizione di latte di bufala (Bubalus bubalis) . » 265
P. White, K.A. Burton, D. Cattaneo, A.P. Harrison, M.J. Dauncey - Applicazione di biotecnologie nello studio delle interazioni fra stato nutrizionale e accrescimento . . . . . » 271

PRESENTAZIONE

Dopo il successo della 1ª Conferenza nazionale, realizzata nell'aprile 1993 presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano, abbiamo aderito anche per il 1994 all'iniziativa promossa dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) nell'ambito della 4ª settimana della Cultura Scientifica Italiana, organizzando la 2ª Conferenza Nazionale sullo Stato dell'Arte della Ricerca Italiana nel settore delle Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche.

Enorme successo hanno poi riscosso gli atti della 1ª Conferenza, pubblicati nel volume n° 35 della prestigiosa collana edita a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, grazie soprattutto alla disponibilità e lungimiranza del segretario generale, Dr. Angelo Pecorelli.

Pertanto, vista la rilevanza di questa seconda iniziativa e visto l'interesse che ha suscitato a livello della comunità scientifica italiana, si è reso indispensabile allestire gli atti della 2ª Conferenza, al fine di raccogliere in modo organico sia le relazioni presentate nella tavola rotonda introduttiva sulle «Prospettive delle biotecnologie», sia i numerosi e qualificati interventi scientifici di settore, presentati al Convegno in forma di relazioni orali o di posters.

Nel ringraziare ancora la Fondazione e tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo volume, mi auguro che l'iniziativa diventi un punto di riferimento per tutti coloro che a livello organizzativo ed esecutivo sono interessati seriamente allo sviluppo delle biotecnologie innovative applicate o applicabili al settore veterinario e zootecnico.

Giorgio Poli

APERTURA DELLA GIORNATA

Intervento del Magnifico Rettore dell'Università di Milano *(Prof. Paolo Mantegazza).*

Dopo un caloroso saluto ai partecipanti, il Magnifico Rettore si congratula con il Preside della Facoltà e con gli organizzatori dell'iniziativa. Sottolinea quindi l'importanza della tematica proposta, anche alla luce dell'imminente attivazione del corso di laurea in Biotecnologie presso l'Ateneo milanese.

Intervento del Preside della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano *(Prof. Gianfranco Ruffo).*

La Facoltà ha, con grande sensibilità, ritenuto di dedicare questa giornata alla memoria del Prof. Giuseppe Aureli, il quale, in qualità di docente, Direttore dell'Istituto di Anatomia degli animali domestici con Istologia ed Embriologia, e Preside, ha dato prestigio e un forte impulso alla Scuola Veterinaria Milanese.

Esattamente 10 anni fa, l'amico e collega Aureli veniva improvvisamente a mancare. Non ne ricorderò in questa sede la figura, compito a suo tempo assolto in modo più consono dai suoi collaboratori e allievi. Mi preme qui sottolineare una caratteristica importante del suo frenetico e infaticabile impegno: l'aspetto anticipatore di alcune sue iniziative a livello operativo, culturale e organizzatore della ricerca:

— la ristrutturazione della didattica attraverso un ampio disegno da lui ideato e realizzato in vista di un'espansione della richiesta, avvenuta poi ben oltre i limiti previsti e prevedibili;

— la realizzazione di iniziative di contenuti culturali, degne dell'Ateneo milanese e della nostra Scuola, che affonda le radici nei 200 anni di storia;

— l'apertura al dibattito con il mondo operativo e con le molteplici figure professionali con le quali una Facoltà di scienze applicate si deve di continuo interrogare e confrontare.

L'idea anticipatrice del Prof. Aureli a livello di ricerca scientifica e di applicazioni della ricerca è sicuramente legata alle biotecnologie, segnatamente al settore della riproduzione animale. Di qui il mio richiamo iniziale sulla sensibilità della Facoltà che ha dedicato alla sua memoria questa giornata.

Profondo conoscitore dei problemi della biologia della riproduzione, maturata alla scuola del grande maestro Prof. Carlo Bignardi, proiettato verso le esigenze e le aspettative del mondo operativo, ha affrontato con intuizioni pionieristiche il problema del trasferimento degli embrioni nel settore animale che, in ambito veterinario, si iniziava a realizzare nel nostro Paese e ha subito intuito che sarebbe naufragato se non sostenuto da un'adeguata ricerca di base.

Ha concretamente contribuito, anche in veste di componente del Comitato di biologia e medicina del CNR, all'impostazione di indagini di avanguardia che garantivano sempre risvolti culturali e tecnologici su basi interdisciplinari.

Si è subito impegnato nella formazione di allievi sullo specifico progetto, dotandoli di strutture e attrezzature idonee.

L'impostazione del Prof. Aureli ha, nel tempo, ampiamente corrisposto all'aspettativa, portando oggi la Scuola a livelli di preminenza, i cui risultati scientifici e applicativi sono largamente apprezzati nel contesto internazionale, convalidati dalla collaborazione con le scuole più prestigiose e dal recente conferimento, motivato

proprio su queste ricerche, della laurea honoris causa al suo allievo, Prof. Antonio Lauria, da parte del collegio veterinario dell'Università di Cracovia.

L'idea e la cultura delle biotecnologie seminate in Facoltà hanno subito trovato fertile terreno e concrete risposte nei molteplici settori della biologia, della sanità e della zootecnia, le cui più recenti acquisizioni scientifiche e applicative saranno oggetto di indicazioni e di confronto in questa seconda giornata nazionale sullo stato dell'arte della ricerca italiana, che la Facoltà, per il secondo anno consecutivo, ha riservato al settore delle biotecnologie innovative applicate alle scienze veterinarie e zootecniche.

Le biotecnologie hanno trovato una loro precisa collocazione didattica e professionale nella recente proposta del corso di laurea in biotecnologie, contraddistinto da un biennio comune e da 5 indirizzi, uno dei quali veterinario.

L'importanza e la cultura di queste nuove discipline si è ormai consolidata in molti e importanti settori della veterinaria e della zootecnica. La Facoltà di Milano, che è sede del Dottorato di ricerca in Biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche, è in grado di recepire e sostenere, per conoscenze e competenze, i compiti didattici e di ricerca del nuovo corso di laurea, già richiesto in due piani triennali e in quello più recente di programmazione regionale.

Ringrazio tutti coloro che, con la loro attiva partecipazione, danno prestigio e autorità scientifica alla manifestazione, e un particolare grazie ai colleghi del Collegio dei Docenti del Dottorato in Biotecnologie che hanno coordinato i lavori delle sezioni specialistiche, i cui contenuti avranno sicure ricadute in termini scientifici e applicativi.

TAVOLA ROTONDA

PROSPETTIVE DELLE BIOTECNOLOGIE

Moderatore: G. Poli
Relatori: R. Marabelli
A. Macrì
A. Belloli
A. Pecorelli
E. Lodetti
G. Rognoni
L. Alberghina
L. Masotti
A. Albertini
L. Vingiani
M. Gellini

G. POLI
Coordinatore dottorato di biotecnologie veterinarie - **Introduzione all'argomento**

La partecipazione a questa tavola rotonda delle più qualificate personalità che rappresentano il mondo accademico italiano, le istituzioni centrali e periferiche del Servizio Sanitario Nazionale Veterinario, gli Enti di ricerca pubblici e privati, nonché l'Industria farmaceutica interessata al settore, consente di affrontare, non solo a livello conoscitivo ma soprattutto a livello propositivo e operativo, tutte le tematiche connesse allo sviluppo delle biotecnologie innovative applicate o applicabili al settore veterinario e zootecnico in tutte le sue molteplici sfaccettature.

Grazie alle diversificate competenze qui rappresentate dagli oratori, sarà possibile approfondire tematiche cruciali per un corretto e organico sviluppo delle biotecnologie innovative a tutti i livelli e in tutti i settori di possibile intervento. Qui di seguito ne proporrò alcune fra le più significative, quali:

— La diversa interpretazione che viene data dagli Stati Uniti e dall'Europa sui rischi legati alla commercializzazione di alimenti di origine animale prodotti con tecniche di ingegneria genetica, con conseguenti ricadute anche sulla normativa per la registrazione dei farmaci, per uso veterinario, cosiddetti «ingegnerizzati».

— Nel nostro Paese qual è l'atteggiamento nei confronti delle biotecnologie innovative veterinarie e zootecniche, soprattutto in relazione a linee strategiche che riguardano la razionalizzazione e il coordinamento dei progetti in corso e futuri, al fine soprattutto di un loro controllo da parte delle strutture sanitarie che operano sul territorio nazionale?

— Per quali problematiche contingenti la Sanità Pubblica Veterinaria si aspetta delle soluzioni dalle biotecnologie innovative?

— Alla luce della ristrutturazione degli Istituti Zooprofilattici vi può essere ancora un loro ruolo anche in quei settori sanitari, ai quali sono applicabili le biotecnologie, ma che non prospettano profitti per le imprese private? E la prestigiosa Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche quale ruolo può giocare in questo contesto?

— Come viene affrontata l'impellente richiesta di una formazione superiore dei giovani per adeguarsi alla continua e rapida evoluzione della tecnologia attraverso i nuovi percorsi formativi già attivati o in attivazione: Scuole di specializzazione, Dottorati, Corsi di laurea, Diplomi universitari? Come è possibile conciliare queste esigenze con i vincoli derivanti dall'entità delle risorse disponibili e dagli sbocchi professionali offerti?

— Ricerca e innovazione: come è possibile valorizzare e potenziare la ricerca italiana del settore (sia essa fondamentale, applicata o di sviluppo), soprattutto in un momento di oggettiva limitazione delle risorse disponibili? È forse necessario prevedere un ruolo più forte e incisivo delle strutture pubbliche di ricerca e incentivare la creazione di specifici Consorzi Interuniversitari?

— Come si inseriscono le ricerche italiane di settore nei programmi finanziati dalla CEE? È recente il varo del 4° programma quadro della CEE per le biotecnologie.

— Industria e innovazione: come si può ovviare alla notevole carenza italiana nel processo di «intensificazione della ricerca» fra industria e strutture pubbliche di ricerca (Università, CNR, Istituti Zooprofilattici)? Quali sono le richieste prioritarie che l'industria farmaceutica veterinaria sarebbe disposta a finanziare, anche attraverso la creazione di centri di ricerca e studio specifici, attivabili presso gli Atenei italiani?

R. MARABELLI
Direttore Generale Servizi Veterinari, Ministero della Sanità - Roma
Sintesi dell'intervento su: **Biotecnologie e normativa della Comunità Europea**

La ricerca e lo sviluppo biotecnologico sono attualmente concentrati, anche se non limitati, alle tre principali aree geografiche: Stati Uniti, Giappone ed Europa; altri Paesi industrializzati come Australia, Canada e Israele presentano al riguardo delle capacità significative, e molti Paesi di recente industrializzazione, in particolare Corea del Sud, Taiwan, Singapore, Brasile, India, Cina e recentemente anche Cuba, considerano fortemente prioritario lo sviluppo biotecnologico.

Le autorità comunitarie hanno provveduto a emanare direttive specifiche di carattere orizzontale, rivolte in particolare alla protezione dell'ambiente e della salute dei lavoratori nell'ambiente di lavoro, e di carattere verticale, riferite a settori e prodotti specifici delle biotecnologie, quali i prodotti farmaceutici. In particolare, nell'unione europea le norme di carattere orizzontale riguardano la direttiva del consiglio n° 90/679 sulla protezione dei lavoratori dai rischi dovuti all'esposizione ad agenti biologici sui luoghi di lavoro, la direttiva del consiglio n° 90/220 sull'emissione nell'ambiente di microrganismi geneticamente modificati, e la direttiva 90/219 sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati. La normativa fondamentale di carattere verticale nel settore dei medicinali veterinari è invece la direttiva 87/22, che prevede una procedura di concertazione comunitaria per la valutazione delle domande di autorizzazione all'immissione in commercio di medicinali veterinari derivati da procedimenti biotecnologici; tali procedimenti armonizzano, in particolare, le tecnologie del DNA ricombinante, l'espressione controllata di geni codificanti per proteine biologicamente attive in procarioti ed eucarioti e le metodiche che prevedono l'uso di ibridomi e di anticorpi monoclonali. Va detto che l'esame dei medicinali veterinari ottenuti con procedimenti biotecnologici, a partire dal 1° gennaio 1995, sarà compito specifico dell'Agenzia europea per la valutazione dei medicinali, attraverso la cosiddetta procedura centralizzata. Il parere espresso dall'Agenzia nell'ambito della procedura centralizzata sarà vincolante per tutti i Paesi membri della CEE. In considerazione del valore che acquisirà il parere dell'Agenzia, il regolamento 2309 del 1993 che la istituisce ha ampliato le categorie di medicinali ottenuti con le biotecnologie con l'inclusione dei medicinali veterinari, compresi gli stimolatori di crescita e di produttività.

In vista dell'entrata in attività dell'Agenzia, si può trarre un primo sintetico bilancio dei risultati ottenuti a seguito dell'applicazione della direttiva 87/22. Il giudizio può essere certamente positivo: attraverso la procedura introdotta dalla 87/22, i Paesi membri hanno potuto studiare insieme complessi fascicoli relativi a prodotti di varia natura derivati dalle biotecnologie, ma fondamentalmente riconducibili a vaccini e a proteine (es. somatotropina bovina). Il livello tecnico-scientifico delle discussioni nei gruppi specifici e nel comitato dei medicinali veterinari è stato sempre molto elevato e ha portato alla formulazione di pareri da parte dello stesso comitato, cui tutti i Paesi membri hanno fornito il loro contributo. Questo breve quadro indica un approccio al medicinale da biotecnologia certamente accorto da parte dell'unione europea, consapevole del carattere innovativo di questi prodotti e preoccupata sostanzialmente di verificare il rispetto delle norme di qualità, di sicurezza e di efficacia definite per tutti i medicinali e di quelle relative all'impatto ambientale degli organismi geneticamente modificati.

La posizione italiana in questo settore, trattandosi di una materia fortemente armonizzata, coincide con quella europea. L'amministrazione sanitaria, tuttavia, si aspetta un adeguato sviluppo e partecipazione nell'ambito dell'istituenda Agenzia europea del farmaco, che valorizzi le risorse scientifiche e tecnologiche italiane, assicurando il necessario equilibrio tra il medicinale per uso umano e il farmaco veterinario.

A. MACRÍ

Direttore Lab. Medicina Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità - Roma

Sintesi dell'intervento su: **Compiti dell'Istituto Superiore di Sanità e biotecnologie innovative**

La sanità animale è il primo punto di riferimento per le biotecnologie. L'Istituto Superiore di Sanità ha sempre manifestato molto interesse per questo settore: vorrei ricordare un prodotto biotecnologico particolare, che forse è stato il primo ad avere un impatto sull'opinione pubblica in modo molto rilevante: le cosiddette bioproteine. Una ventina di anni fa si iniziò la produzione di queste proteine e si affrontarono per la prima volta i problemi legati alle biotecnologie: problemi di sanità animale e problemi di natura ambientale, questi ultimi legati al rilascio nell'ambiente dei microrganismi modificati.

L'Istituto Superiore di Sanità si occupa, fra le altre cose, del controllo dei vaccini. Il nostro laboratorio controlla tutti i vaccini per uso veterinario nella fase preregistrazione: su ogni vaccino in fase di registrazione eseguiamo controlli di innocuità, efficacia e sicurezza. Questo tipo di controllo può sembrare una prassi normale: in realtà, con il passare del tempo le problematiche sono aumentate e attualmente abbiamo a che fare con vaccini vivi modificati, con delle ripercussioni ambientali non previste. Soltanto di recente la CEE si è preoccupata di studiare l'impatto ambientale dei microrganismi geneticamente modificati. Quando si vaccina un allevamento di suini contro qualsiasi malattia con un vaccino vivo, si ha un'enorme immissione nell'ambiente di microrganismi. Non conosciamo ancora esattamente quali possano essere le conseguenze: molto probabilmente i rischi sono nulli, ma non abbiamo i mezzi per poter chiarire quello che realmente succede.

Esistono anche altre problematiche: una di queste è legata alla somatotropina. A differenza dell'Europa, negli Stati Uniti è già stato autorizzato l'uso dell'ormone della crescita per le vacche in lattazione; in Italia non si può escludere un uso illegale di questa sostanza, per cui l'Istituto Superiore di Sanità deve lavorare e mettere a punto delle metodologie che consentano di controllare questi eventuali usi illegali. Questa è un'attività che stiamo portando avanti con impegno: penso siano già stati ottenuti risultati abbastanza rilevanti per poter avere questo genere di controllo sul territorio.

Altro aspetto importante che sta emergendo è legato all'uso di kits diagnostici, che vanno dalla ricerca di agenti biologici, a quella di agenti chimici, di residui di farmaci e così via. La nostra normativa ci impone, come Ente istituzionale autorizzato, di validare tutti questi kits prima della loro messa sul mercato: se così non fosse, infatti, in caso di contestazione questi prodotti diagnostici potrebbero non avere alcun significato dal punto di vista legale.

Altro aspetto importante è quello degli animali transgenici: tale settore ha notevoli ripercussioni sulla zootecnia e potrebbe anche avere riflessi importanti in medicina

umana, se si considera la possibilità di ottenere in questo modo organi animali utilizzabili nell'uomo. A questo proposito, occorre veramente un sistema di controllo efficace, considerando anche quello che sta accadendo con le nuove norme sulla sperimentazione animale.

Un'ultima considerazione: è vero che vi sono Paesi europei industrializzati che operano attivamente nel settore delle biotecnologie, ma è pur vero che l'Italia ha un gap su certe biotecnologie particolari; penso che questo gap lo paghiamo caro: prendendo ad esempio i kits diagnostici, non so quanti sono quelli prodotti in Italia e quanti quelli che invece dobbiamo importare e che utilizziamo in larga scala. Questo è quindi un altro aspetto che merita la nostra attenzione e che va valutato attentamente.

Per concludere, ritengo sia necessaria un'organizzazione di base, con un'attività di ricerca possibilmente preordinata. Ho accolto con molto piacere la notizia dell'istituzione di corsi di laurea specifici per le biotecnologie, di attivazione di scuole di specializzazione e così via. Sarebbe però opportuno che ci organizzassimo tutti insieme, istituti scientifici universitari e istituti zooprofilattici sperimentali, con un grossa potenzialità di ricerca.

A. BELLOLI

Responsabile Servizi Veterinari, Regione Lombardia - Milano

Sintesi dell'intervento su: **La Sanità Pubblica Veterinaria e i vantaggi delle biotecnologie**

In primo luogo consentitemi di porgere il saluto del Servizio Veterinario della Regione Lombardia al Preside della Facoltà e a tutti i presenti ed esprimere un ringraziamento per aver voluto invitare il nostro Servizio a questa manifestazione. Occasione questa che consente di esprimere l'attenzione e il costante interesse che la Sanità Pubblica ha ai vari livelli istituzionali e, pertanto, anche a livello regionale per tutte le ricerche condotte nel settore delle biotecnologie in vari settori, dalla biologia alla sanità animale, dalla riproduzione alla zootecnia. In modo particolare, però, mi preme sottolineare alcuni aspetti: in particolare i prodotti immunizzanti innovativi, ma ancora di più lo studio di nuovi reagenti e di metodi diagnostici innovativi. In un momento come questo, caratterizzato dalla volontà del legislatore comunitario di innalzare il livello sanitario, sia nel campo della sanità animale sia in quello del controllo degli alimenti di origine animale, risulta indispensabile poter contare su tecnologie innovative per meglio contenere il rischio elevato, per lo meno in taluni territori. Tutti sappiamo che la politica agraria comunitaria dal punto di vista sanitario in questi ultimi anni si è spostata da un orientamento di controllo, di vaccinazione, verso una politica di non vaccinazione, di eradicazione. Così, tutti i trattamenti immunizzanti, che negli ultimi anni avevano contraddistinto l'attività delle profilassi pianificate, sono andati via via cessando: è stata sospesa la vaccinazione contro la peste suina classica e contro l'afta epizootica e si sta spingendo moltissimo per eliminare anche la vaccinazione contro la brucellosi. In condizioni come queste, e soprattutto in certi territori, come quello italiano e in particolare lombardo, il rischio risulta elevatissimo, per il notevole flusso di importazione e per l'introduzione di centinaia di migliaia di capi. È quindi necessario attivare tutti quegli strumenti, quali appunto i piani di emergenza, per limitare il più possibile la comparsa e la diffusione di alcune malattie.

In queste condizioni, per l'«Autorità Sanitaria» è fondamentale poter contare sul supporto di Istituti, di laboratori all'avanguardia, di sistemi diagnostici rapidi, affida-

bili, sicuri, specifici e sensibili, tali cioè da consentire l'applicazione immediata delle misure di Polizia veterinaria in tempi brevissimi. I riflessi applicativi pratici sono rilevanti e all'ordine del giorno.

Da rilevare poi l'importanza del riconoscimento di determinate varianti antigeniche, possibile mediante l'uso di anticorpi monoclonali opportunamente caratterizzati, con conseguente importante salto qualitativo dal punto di vista dell'indagine epidemiologica, non più limitata a dati limitati alla semplice comunicazione dei focolai, ma in grado di fornire elementi di altissima precisione, con tutti i comprensibili riflessi anche per eventuali contenziosi a livello comunitario o internazionale.

Analogo discorso può essere fatto facendo riferimento al metodo dell'amplificazione degli acidi nucleici, la PCR, ad esempio nel caso dell'afta epizootica.

Sempre per quanto riguarda gli aspetti diagnostici, occorre sottolineare l'interesse delle biotecnologie innovative applicate alla diagnosi di determinate malattie che rientrano nei piani di bonifica sanitaria del bestiame, quali la leucosi bovina enzootica. Dai dati del 1993 relativi al territorio della Regione Lombardia, la percentuale di allevamenti infetti è pari al 7-8 % circa, valore estremamente più basso rispetto ai dati dell'84-85, ma ancora elevato, viste le difficoltà incontrate. A fronte di altre malattie, quali tubercolosi e brucellosi, che fanno parte di questi interventi di bonifica sanitaria, il risanamento della leucosi bovina enzootica è quello che costa di più in rapporto ai risultati ottenuti. Per l'autorità sanitaria sarebbe importantissimo poter disporre di sistemi diagnostici estremamente precoci, sensibili e specifici, tali da potere, anche in questo caso, fare un salto qualitativo volto alla qualifica di territorio ufficialmente indenne nei confronti di questa malattia.

Un ultimo accenno, per restare ai problemi pratici vissuti in questi ultimi periodi con riflessi pratico-applicativi concreti, deve essere rivolto anche alle tecniche immunoistochimiche, che consentono di mettere in evidenza gli antigeni presenti in sezioni istologiche. Mi riferisco all'esempio di grande collaborazione tra organi istituzionali, Regione, USSL, Istituti Zooprofilattici e Facoltà di Medicina Veterinaria, volta alla lotta contro la pleuropolmonite essudativa del bovino.

In sostanza, quindi, grande interesse, grande attenzione da parte del Servizio Veterinario della Regione Lombardia nei confronti di queste ricerche e di tali tecnologie innovative nei vari settori, proprio per i potenziali riflessi pratico-applicativi volti alla risoluzione di importanti problemi di Sanità Pubblica Veterinaria.

A. PECORELLI

Segretario Gen. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia

Sintesi dell'intervento su: **La Fondazione e il suo impegno per le biotecnologie**

Nel 1954, quarant'anni fa, abbiamo voluto creare un'istituzione dedicata esclusivamente alla cultura veterinaria e zootecnica: si voleva cioè costituire un ente autonomo di diritto privato, che potesse accompagnare le iniziative scientifiche e favorire la ricerca, la sperimentazione applicata, la formazione professionale, e in modo particolare l'assistenza veterinaria agli allevatori. È nata così la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche.

Credo che gli scopi che ci eravamo prefissati siano stati in parte raggiunti, dato che la Fondazione è in simbiosi continua e costante con un Istituto di grande presti-

gio per la ricerca e per l'attività nel settore veterinario, quale l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, del quale ci sentiamo, sotto un certo aspetto, un po' figli.

La Fondazione ha sempre cercato di dare il massimo aiuto possibile alla ricerca scientifica, d'intesa con le autorità veterinarie, dalla Direzione Generale dei Servizi Veterinari, alla Regione, all'Istituto Zooprofilattico di Brescia, che certamente nel settore delle biotecnologie ha fatto molte cose importanti, soprattutto nei riguardi della diagnostica . La Fondazione si è inoltre qualificata nella preparazione, nella formazione e nell'informazione dei giovani laureati, in particolare in veterinaria. Nel 1992 ha svolto 16 corsi di aggiornamento; circa 3.000 sono state le ore di lezione, oltre 300 i docenti impegnati, 700 i partecipanti.

Per quanto riguarda in modo specifico le biotecnologie, abbiamo istituito borse di studio riservate a giovani veterinari e biologi , che frequentano i laboratori di biotecnologie avanzate dell' l'Istituto Zooprofilattico. Nel 1993 le borse elargite sono state 25, riservate a coloro che intendono dedicarsi alla ricerca scientifica , in particolare nel campo dell'innovazione biotecnologica.

Un altro settore in cui si è operato attivamente è la pubblicazione di quaderni scientifici: proprio lo scorso anno sono stati dati alle stampe gli atti della prima Conferenza Nazionale sulle Biotecnologie Veterinarie, svoltasi qui a Milano lo scorso anno; le 2.000 copie di tali atti sono letteralmente andate a ruba! Siamo convinti di portare in questo modo un contributo concreto a queste iniziative così importanti e, soprattutto, di fornire pubblicazioni che servano a riflettere e a considerare il lavoro svolto dalle varie istituzioni scientifiche.

E. LODETTI

Direttore Istituto Zooprofilattico Sperim. della Lombardia e dell'Emilia - Brescia

Sintesi dell'intervento su: **L'Istituto Zooprofilattico leader nella diagnostica biotecnologica**

Voglio ricollegarmi al discorso del Dr. Belloli sui brillanti risultati conseguiti in campo grazie a reagenti diagnostici prodotti mediante biotecnologie innovative.

Da circa 10 anni l'Istituto Zooprofilattico di Brescia ha in attività un laboratorio di biotecnologie, che conformemente ai compiti degli Istituti Zooprofilattici, si occupa dell'applicazione in campo veterinario di metodiche innovative diagnostiche e di prevenzione, basate sull'allestimento e sull'impiego di reagenti di nuova concezione.

Come Istituto stiamo operando in almeno 3 aree di intervento.

La prima è quella che riguarda la creazione di una banca di anticorpi monoclonali, che in pratica hanno sostituito i sieri policlonali, e l'allestimento di tests immunologici altamente specifici che hanno sostituito le reazioni sierologiche tradizionali che venivano impiegate fino a pochi anni fa.

Un'altra area di intervento consiste nella possibilità di sfruttare la proprietà posseduta da un filamento di acido nucleico, la cosiddetta sonda, di riconoscere il filamento complementare presente in un campione in esame. Abbinando questa proprietà alla possibilità di amplificare filamenti di acidi nucleici mediante la tecnica PCR, è possibile identificare agenti eziologici in modo estremamente specifico e rapido.

La terza area di intervento che ci proponiamo, e che in parte è già in corso di attuazione, è la messa a punto di reagenti diagnostici innovativi preparati con

la tecnica del DNA ricombinante. Questo metodo biotecnologico consente di avere a disposizione materiale antigenico privo di infettività, sicuro, affidabile e in quantità sufficiente senza grossi problemi di produzione. La stessa metodica permette inoltre la preparazione di antigeni da utilizzare per l'allestimento di vaccini di nuova generazione.

È anche compito degli Istituti Zooprofilattici proporre alternative all'uso degli animali da esperimento. Noi abbiamo iniziato a operare in questo campo già da anni sviluppando tecniche biotecnologiche adeguate; sicuramente continueremo anche su questa strada.

G. ROGNONI

Coordinatore dell'area-problema 3.1 del P.F. CNR-RAISA («Biotecnologie innovative per il miglioramento degli animali in produzione zootecnica»)

In ricordo del Prof. Giuseppe Aureli

Porgo i saluti alle Autorità e agli intervenuti all'iniziativa, in rappresentanza del Direttore del Progetto Finalizzato CNR-RAISA, Prof. Enrico Porceddu.

Esprimo in particolare il desiderio del Prof. Porceddu: ricordare con immenso rimpianto l'amico Giuseppe Aureli, cui è dedicata questa Giornata di Studio.

Giuseppe Aureli ha portato un contributo sostanziale nell'elaborazione e nello sviluppo dei progetti finalizzati del CNR ed è stato un prezioso collaboratore del Prof. Porceddu nella definizione delle tematiche relative alle ricerche avanzate (biotecnologiche) per innovazioni nel sistema agricolo.

L. ALBERGHINA

Direttore Scuola di Specializzazione in Applicazioni Biotecnologiche - Milano

Sintesi dell'intervento su: **Biotecnologie e formazione superiore**

Le vie per arrivare a una formazione biotecnologica sono e possono essere molteplici. Gli esempi sono vari e credo che siamo tutti d'accordo sul fatto che le biotecnologie, quali uso progettuale dei sistemi biologici, richiedono una capacità di analisi e di intervento sperimentale. Sono multidisciplinari: un ricercatore biotecnologo si distingue dal ricercatore delle bioscienze in genere, in quanto è più rivolto alla capacità applicativa.

Negli anni '80 abbiamo istituito la Scuola di Specializzazione in Applicazioni biotecnologiche dell'Università di Milano: utilizzando le competenze e il desiderio di collaborazione di molti ricercatori, tra i quali alcuni anche della Facoltà di Veterinaria, abbiamo costituito un corpo docenti estremamente valido e abbiamo allestito laboratori attrezzati. Questa scuola è molto apprezzata in ambito scientifico e i nostri diplomati hanno tutti trovato una giusta collocazione nel mondo del lavoro.

Ma lo strumento più innovativo dal punto di vista della configurazione accademica di cui ci stiamo dotando è la laurea in biotecnologie. Questa laurea ha avuto un iter un po' lungo, ma ormai si è arrivati a una tipologia che mi sembra molto

equilibrata e molto interessante: i 5 anni di corso, un biennio comune e un certo numero di indirizzi portano alla formazione di ricercatori in biotecnologie con conoscenze rivolte a diversi settori professionali (industriale, farmaceutico, medico, veterinario e agrario). Il merito di questo corso di laurea è la partecipazione di Facoltà diverse e la presenza di un biennio formativo comune da cui si diramano poi i diversi indirizzi. La tipologia nazionale sta per essere pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale: quindi le diverse sedi universitarie, sia quelle che nei precedenti piani triennali avevano fatto richiesta, sia quelle che si stanno attivando per il prossimo piano triennale, potranno, in tempi brevi, attivare questo corso di laurea.

L'Università di Milano partirà con quanto previsto dal piano triennale '90-'93, cioè il corso di laurea in biotecnologie presso la Facoltà di Scienze per gli indirizzi industriali e presso le Facoltà di Medicina e di Farmacia per l'indirizzo farmaceutico. Per cominciare a dipanare le molte questioni e soprattutto per utilizzare appieno le molte potenzialità dell'Università di Milano, è stata costituita una commissione che sta cominciando i lavori secondo quanto richiesto dalla stessa Gazzetta Ufficiale. È chiaro che se altre Facoltà sono interessate, come quella di Veterinaria, da parte nostra vi è la volontà di collaborare e di fare in modo che la laurea in biotecnologie costituisca, per tutta l'Università di Milano, un'occasione proficua per uscire un po' fuori da schemi a volte limitativi e per utilizzare al meglio le risorse disponibili; sarà così possibile dare, in modo compatto ed efficace, una valida formazione in un settore che potrebbe e dovrebbe essere molto importante per l'aumento della competitività internazionale del nostro Paese.

L. MASOTTI
Direttore Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie - Trieste
Sintesi dell'intervento su: **I Consorzi Interuniversitari**

È già operativo da alcuni anni un Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie (C.I.B.), costituito da 18 Università e che ha i seguenti obiettivi:

— incrementare il coinvolgimento delle Università nella tecnologia avanzata
— incoraggiare l'interazione delle Università tra di loro e con l'Industria
— supportare il trasferimento di conoscenza scientifica in settori applicativi
— costruire un network di laboratorio in biotecnologia.

A tali fini sono stati stanziati 4.5 miliardi per l'acquisto di strumentazione e la creazione di centri specializzati di ricerca in alcune Università. Inoltre si sono creati corsi specializzati e finanziate borse di studio per la formazione di giovani ricercatori.

Inoltre, il piano di programmazione triennale di recente pubblicazione del Ministero dell'Università della Ricerca Scientifica e Tecnologica, per un settore fondamentale come quello del 40%, non solo presenta per i prossimi 3 anni una riduzione dei finanziamenti per la ricerca ad un mezzo rispetto agli anni '80, ma prevede che questa ricerca venga maggiormente finalizzata e quindi intravede nei Consorzi il modo in cui questa finalizzazione possa avvenire.

Un altro indirizzo che la ricerca sta prendendo in questo tipo di piano è la legittimazione dei cambiamenti scientifici e tecnologici avvenuti.

Quindi i Consorzi sono una delle risposte che il Paese si deve dare se vuole che i finanziamenti della ricerca, che non sono tanti, vengano utilizzati per le potenzialità di mercato.

A. ALBERTINI
Delegato Italiano Comitato Biotecnologie CEE - Brescia
Sintesi dell'intervento su: **La ricerca biotecnologica italiana e i finanziamenti CEE**

Nella competizione europea è determinante la capacità di lavorare insieme, di creare massa critica e poi di stabilire buoni collegamenti con gli altri Paesi.

Una tendenza tipica degli Italiani a livello internazionale è quella di porre grande attenzione alla collaborazione con centri di ricerca del Nord America (in particolare Stati Uniti), dove le opportunità di crescere culturalmente e di conoscere ricercatori «importanti» sono maggiori rispetto ad un laboratorio europeo. Ma, purtroppo, un giovane che non svolge il suo training post-doc in Europa rischia di perdere l'opportunità di ricevere finanziamenti in futuro.

Nel settore specifico delle Biotecnologie, e in particolare per quanto riguarda i temi veterinari, l'impegno della Comunità Europea nell'ultimo Programma Quadro (Terzo), che sta concludendosi, ha riguardato soprattutto la sequenza e la mappatura di genomi di diversi organismi viventi e quindi la caratterizzazione genetica e la classificazione degli organismi viventi in natura attraverso tecniche di ingegneria genetica. In particolare i finanziamenti hanno riguardato tecnologie di screening genetico, una banca pan-europea per le risorse genetiche e le tecnologie di crioconservazione e il sequenziamento di genoma di lievito, di Bacillus subtilis e di Arabidopsis. Inoltre, sempre nel settore delle biotecnologie animali, ci sono progetti di studio di geni di Pesci, volti sia a migliorare le qualità dell'acquacoltura, sia ad individuare precocemente specifiche patologie.

Per quanto riguarda le prospettive del Quarto Programma Quadro, esso presenta un incremento del finanziamento (980 miliardi solo per le Biotecnologie) di circa quattro volte rispetto al Terzo Programma Quadro, indicando la vivacità dell'attenzione della Comunità Europea sulle Biotecnologie. Con tale disponibilità economica, quindi, le biotecnologie rappresentano una possibilità notevole anche per gruppi italiani. Purtroppo l'Italia non è mai riuscita a vincere bandi per più del 9% dell'intero budget a causa della presenza di competitori notevoli quali Inghilterra, Germania e Francia e, più recentemente, Svezia, Norvegia, Austria e Finlandia.

L. VINGIANI
Direttore AISA-Associazione Industria Salute Animale-Federchimica - Milano
Sintesi dell'intervento su: **Industria e innovazione biotecnologica**

L'industria della salute animale si trova ad operare in un sistema sempre più competitivo, in un ambiente economico e sociale in profonda evoluzione, che richiede nuove risposte ad esigenze e problemi sempre nuovi.

Uno dei fattori-chiave dal quale l'impresa può ottenere vantaggi è la ricerca e sviluppo.

L'industria della salute animale è un settore basato sulla ricerca, i cui prodotti mirano a salvaguardare salute e benessere di animali e uomini. L'innovazione è la sua forza-guida e quindi ricerca e sviluppo costituiscono il reale punto di forza nel determinare la competitività di un'impresa.

Purtroppo i costi di produzione di nuovi farmaci per la salute animale sono cresciuti notevolmente negli ultimi 30 anni: oggi per ricerca e sviluppo di un nuovo prodotto occorrono da 100 a 200 miliardi di lire e anni di lavoro. Inoltre, mentre i 10 farmaci ad uso umano più diffusi nel mondo fatturano ciascuno oltre 2000 miliardi di lire, solo 6 prodotti veterinari al mondo superano i 200 miliardi di lire. Queste cifre mostrano il dramma dell'industria della salute animale: costi simili a quelli dell'industria farmaceutica umana per ricerca e sviluppo di nuovi prodotti e mercati 10 volte più piccoli. Non solo, ma negli ultimi tre anni, i costi di ricerca e sviluppo si sono raddoppiati. Oggi gli investimenti sono circoscritti solo a pochi mercati, e in particolare soprattutto a scopo terapeutico.

Infine c'è un altro problema che interferisce con i progetti di ricerca innovativa in Veterinaria e Zootecnia: l'incertezza sia normativa che politica in cui devono essere prese le decisioni, in quanto non è prevedibile quale sarà la situazione allorché i prodotti saranno immessi sul mercato. Il caso della somatotropina bovina testimonia questi rischi: provata di sicura qualità ed efficacia da esperti della CEE e dichiarata tale dal Comitato Europeo dei Farmaci Veterinari, è stata più volte fatta oggetto di provvedimenti specifici di moratoria.

Nonostante tutto ricerca e innovazione costituiscono una necessità per un'impresa di questo settore anche in Italia, rimasta un po' in retroguardia rispetto agli altri Paesi europei a causa delle dimensioni medio-piccole delle aziende nazionali e della scarsa cultura biotecnologica dei medio-piccoli imprenditori italiani, della carenza di centri nei quali svolgere ricerca e sviluppo in forma associativa e conto terzi e della povertà dei progetti di ricerca nazionali. Per migliorare la situazione occorre mettere più al centro, nella politica economica del nostro Paese, il fattore ricerca, incentivare progetti che promuovano e sostengano lo sviluppo dell'innovazione e che abbiano caduta industriale, riorganizzare la funzionalità delle strutture di ricerca esistenti ed attuare collegamenti con l'industria.

M. GELLINI
Presidente Vetindustria - Roma
Sintesi dell'intervento su: **Industria e joint-venture con i Centri di ricerca universitari**

Le industrie hanno sempre guardato con estremo interesse all'applicazione delle nuove molecole derivate dalla biotecnologie: siamo convinti che queste rappresentino i prodotti del domani. Purtroppo la nostra ricerca si è sempre arrestata davanti a un grosso scoglio, cioè i costi elevati e le difficoltà di reperire degli esperti in queste discipline: per portare avanti la ricerca biotecnologica servono delle strutture, dei laboratori e delle équipes di ricercatori specializzati che sono molto difficili da trovare sul mercato e che attualmente sono patrimonio dell'università. Riteniamo quindi che potrebbe essere molto valida una collaborazione tra le università e le industrie private, che permetterebbe a queste ultime di poter investire cifre più adeguate alla potenzialità economica delle aziende, in particolar modo di quelle a carattere nazionale. Ci auspichiamo una collaborazione di questo genere, purché orientata alle reali necessità del mercato italiano. Crediamo sia necessario un chiarimento, e cioè dare il via a un progetto congiunto tra università e industria per la ricerca

di nuove molecole derivate dalle biotecnologie, ma ciò pone il problema dell'appartenenza della proprietà industriale delle eventuali scoperte ottenute dalla ricerca: resteranno cioè dell'università o dell'industria o verranno ripartite equamente?

Questa chiarezza è quindi indispensabile per permettere di conoscere il ritorno degli investimenti. La nostra proposta è quella di nominare un comitato di studi che, in collaborazione con gli esperti universitari e delle industrie farmaceutiche, possa esaminare in che maniera possono essere ripartiti questi costi e stabilire la titolarietà finale della scoperta.

Veniamo ai Centri di ricerca e studio, attivabili presso le Università, che, a parere nostro, sono molto importanti, e che potrebbero fungere da controlli ufficiali per tutti i prodotti nuovi e importati da altri Paesi per la commercializzazione in Italia; un controllo a questo livello sarebbe a nostro giudizio una notevole garanzia per tutti gli utilizzatori del prodotto finale.

Se veramente vi sarà la volontà da parte dello Stato e da parte del privato, si potrà riuscire a fare delle joint-venture che potrebbero essere di utilità per tutti.

LETTURA MAGISTRALE

C. BORDIGNON

TERAPIA GENICA: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

Programma di Terapia Genica
Istituto Scientifico H.S. Raffaele, Milano

INTRODUZIONE

Gli sviluppi della ricerca di base, biologia molecolare e virologia, hanno fornito nuovi strumenti per tentare un approccio alle malattie a carattere genetico, attraverso un intervento diretto sulla causa molecolare della patologia. Invece di intervenire sulle anomalie somatiche secondarie al difetto genetico, si è progettato di correggere il difetto mediante l'introduzione del gene normale. Hanno così assunto consistenza sperimentale e, di recente, applicazione clinica protocolli di terapia genica su cellule somatiche. Il valore delle implicazioni etiche legate all'impiego terapeutico di queste procedure è stato affrontato da altri, qui ci si limiterà alla descrizione schematica di quegli studi sperimentali che hanno verificato fattibilità, efficacia terapeutica e sicurezza di queste tecniche, permettendo così l'approvazione dei primi protocolli clinici.

Per terapia genica si intende, in senso stretto, l'uso a scopo terapeutico di alcune tecniche di trasferimento del DNA e, mediante queste, l'inserimento di geni funzionanti in cellule alterate dell'organismo, così ricostituendo la funzione normale. Inizialmente la terapia genica è stata sviluppata per il trattamento di malattie a carattere ereditario. In questo contesto l'obiettivo è rappresentato dall'isolamento, identificazione, clonaggio del gene la cui alterazione è alla base della malattia genetica. In questo settore la terapia genica ha già trovato applicazione clinica sperimentale in alcune gravi malattie ereditarie come le immunodeficienze congenite e la fibrosi cistica. Una rapida espansione in questo settore deve essere attesa per i prossimi anni. Enormi sforzi vengono diretti verso lo sviluppo di modelli preclinici di terapia genica per la distrofia muscolare, per le malattie da accumulo che colpiscono il sistema nervoso centrale (come il morbo di Gaucher), per le emoglobinopatie (la talassemia).

Vettori retrovirali per l'applicazione a patologie congenite di tecniche di trasferimento genico

I vettori retrovirali rappresentano il metodo di scelta per introdurre sequenze di DNA esogeno all'interno di cellule di diversi tessuti. Inoltre, per le loro caratteristiche di alta efficienza di integrazione e di bassa tossicità della procedura di infezione, i vettori retrovirali sono l'unico tipo di veicolo utilizzato estesamente per inserire nuovo materiale genico in cellule somatiche murine (1-4). Risultati non altrettanto soddisfacienti sono stati ottenuti su cellule umane o con altri modelli animali non murini (5, 6); in generale, significativi livelli di espressione del gene trasferito con un vettore retrovirale sono stati ottenuti solo in un numero limitato degli studi che

hanno utilizzato progenitori ematopoietici coltivati *in vitro* (7, 8) o animali ricostituiti a lungo termine (2, 9).

Di recente, tuttavia, una prima serie di esperimenti di trasferimento genico è stata condotta *in vivo*, nell'uomo, grazie ad una collaborazione tra i due gruppi di W.F. Anderson e S.A. Rosenberg (10); in questa serie di pazienti, trattati al NIH, il vettore retrovirale veniva usato come marcatore nucleare del DNA di cellule LAK o TIL, senza affrontare alcun problema di espressione del gene trasdotto (10). W.F. Anderson e M. Blaese hanno di recente proposto per l'approvazione un protocollo per terapia genica in pazienti affetti da immunodeficienza grave da carenza di adenosina deaminasi (ADA), protocollo che è stato approvato anche grazie alla disponibilità dei risultati sperimentali riportati qui di seguito.

La deficienza di ADA è causata da un difetto congenito del gene strutturale che codifica per questo enzima. L'alterazione, di solito una piccola delezione o una sostituzione puntiforme, provoca una variante della sindrome SCID (severe combined immunodeficiency), un disordine letale del sistema immune generalmente trattato con il trapianto di midollo. Un obiettivo a lungo termine dei nostri studi, così come di quelli del gruppo di Anderson e Blaese, è lo sviluppo di un sistema efficiente per l'introduzione del gene dell'ADA umano in cellule del sistema emolinfopoietico ottenute da pazienti affetti da ADA-SCID. Per questo motivo abbiamo sviluppato una serie di vettori di espressione, derivati dal vettore N2 (11). Il capostipite di questi vettori, contenenti il cDNA del gene ADA umano, è stato chiamato SAX. Mediante questo vettore è stato possibile trasdurre il gene umano dell'ADA in linee linfoidi derivate da un paziente affetto da deficienza di ADA (12). Tuttavia, quando questo vettore è stato utilizzato per trasdurre *in vivo* cellule di midollo di un primate, i livelli di trasferimento genico sono stati molto bassi e l'espressione di ADA umana solo transitoria (13). Per migliorare l'efficienza di trasferimento genico e incrementarne i livelli di espressione, una serie di modificazioni sono state introdotte sia nei protocolli di infezione, sia nel design dei vettori retrovirali (14). I risultati ottenuti grazie a queste modifiche dei protocolli classici di terapia genica dimostrano che efficienti livelli di trasferimento genico possono essere ottenuti utilizzando cicli multipli di infezione, con preparazioni del vettore contenenti alte concentrazioni di particelle virali, con alti rapporti tra il numero di particelle virali e il numero di cellule da infettare e con vettori di nuova concezione costruttiva, raggiungendo così ottimi livelli di espressione del gene umano ADA in cellule costitutivamente carenti.

La struttura schematica di tre vettori retrovirali codificanti per l'espressione dell'ADA umana, utilizzati in questi studi, è mostrata nella figura 1. Il cDNA del gene umano ADA (14) è stato introdotto nel vettore N2 basato sul virus della leucemia murina di Moloney che contiene anche il gene di selezione per la resistenza alla Neomicina (NeoR). Nel costrutto denominato SAX, il cDNA dell'ADA è stato fuso con il promotore early del virus SV40 e inserito a valle del gene NeoR (12). Il costrutto di AAX è simile a SAX con l'eccezione del promotore di SV40 che in AAX è sostituito con un frammento di DNA di 540 bp contenuto tra i siti di restrizione *Xho* I-Nco I del promotore dell'ADA umano (14), formando così un vettore contenente il minigene umano dell'adenosindeaminasi.

In questi tipi di vettori, detti a promotore interno, si ha l'espressione di due geni diversi:

— il gene NeoR che codifica per la fosfotransferasi specifica, che conferisce resistenza alla neomicina e al suo analogo G418; questo gene viene trascritto sotto il controllo delle sequenze-promotore presenti nel LTR virale 5';

— il gene che codifica per l'ADA umana, elemento che rappresenta un'unità trascrizionale autonoma ed è costituito dal cDNA del gene umano ADA fuso con un promotore interno.

Questi costrutti ricombinanti mancano di numerose sequenze virali che sono state rimosse per far posto ai geni di nostro interesse; per poter essere assemblati in particelle virali infettanti essi devono essere transfettati in una linea packaging anfotropica, in grado di fornire *in trans* le componenti virali mancanti al vettore e permettere così la produzione di particelle retrovirali infettanti (14).

Di recente è stato prodotto un vettore retrovirale di concezione strutturale innovativa, contenente due copie del minigene ADA, denominata DCA (double-copy ADA) (15). Questo vettore sfrutta la proprietà intrinseca dei retrovirus di duplicare in modo fedele in 5', al momento dell'integrazione nel genoma cellulare, l'intera regione LTR in 3', costituendo così due regioni LTR identiche. Pertanto in questo vettore il minigene umano dell'ADA è stato inserito nella regione U3 del LTR 3' di N2 e di conseguenza, nelle cellule infettate, il minigene viene duplicato (15). Questi vettori sono stati utilizzati per trasferire il gene umano dell'ADA in cellule ADA deficienti di midollo umano mantenute in coltura a lungo termine per l'analisi *in vitro* dell'efficienza di trasferimento genico e di espressione genica. Inoltre, campioni ottenuti da queste colture sono stati utilizzati per ricostituire topi immunodeficienti (16, 17) e analizzarne le funzioni immuni *in vivo*.

Analisi in vitro dell'efficienza di trasduzione del gene esogeno

Cellule di midollo ematopoietico sono state ottenute sia da individui normali che da pazienti affetti da immunodeficienza congenita grave da carenza di adenosina deaminasi. Le cellule ematopoietiche sono state infettate con preparazioni di particelle virali contenenti i diversi costrutti virali. Dal momento che la bassa frequenza di infezione è stata uno dei problemi che sistematicamente hanno limitato il successo dei modelli di terapia genica in cellule di primati (13), in questo studio sono state introdotte una serie di modifiche miranti a migliorare tale frequenza. In particolare, sono state utilizzate preparazioni del vettore ad alta concentrazione di particelle virali, alti rapporti tra il numero totale di particelle infettanti e il numero di cellule da infettare, cicli multipli di infezione a intervalli di 8-24 ore, oltre all'utilizzo di fattori di crescita ematopoieica ricombinanti per aumentare il numero di cellule proliferanti. È da tempo noto, infatti, che la frequenza di trasferimento genico mediante vettori retrovirali è fortemente aumentata in cellule in attiva replicazione cellulare in confronto a cellule di identica origine ma in fase quiescente.

Inizialmente, l'efficienza del trasferimento genico è stata testata utilizzando il gene della resistenza alla neomicina (NeoR). Questo gene codifica per una fosfotrasferasi specifica che conferisce resistenza *in vitro* alla G418, un analogo della neomicina. Il gene NeoR è contenuto in tutti i vettori utilizzati ed è quindi un marker di semplice utilizzo per il riconoscimento di cellule infettate dal vettore. La frequenza di cellule positive è stata definita mediante la determinazione della frequenza

di colonie ematopoietiche granulo-macrofagiche (CFU-GM) e di colonie ematopoietiche multipotenti (CFU-GEMM) (6) resistenti a concentrazioni di G418 tossiche per le cellule normali. Si è così potuto notare che ripetuti brevi cicli di infezione aumentavano proporzionalmente l'efficienza di trasferimento genico fino ad un totale di 5 cicli di infezione, come indicato dal numero di colonie resistenti alla G418. Benché la frequenza di infezione fosse aumentata, questa non poteva essere incrementata oltre il 30-40% in tutti i campioni di midollo studiati, indipendentemente dal numero di cicli di infezione utilizzati. In modo simile, un aumento proporzionale di attività ADA è stato osservato dopo ogni ciclo di infezione, quando il midollo utilizzato era stato ottenuto da pazienti ADA deficienti.

In tutti questi esperimenti, il recupero di cellule nucleate e di precursori ematopoietici era superiore al 90% dopo ogni ciclo di infezione, confermando la bassa tossicità di questa procedura di trasferimento genico in cellule di midollo.

Per aumentare ulteriormente l'efficienza di trasferimento genico, abbiamo utilizzato una combinazione di fattori di crescita ematopoietica (rh-G-CSF, rh-GM-CSF, rh-IL-3), in grado di accrescere il numero di precursori ematopoietici e di cellule staminali in ciclo cellulare. Cellule di midollo pretrattate *in vitro* con diverse combinazioni dei fattori sopra indicati hanno mostrato un marcato aumento della frequenza di infezione che in alcuni esperimenti ha raggiunto l'80-90% di colonie CFU-CM resistenti a concentrazioni tossiche di G418.

I risultati descritti fino ad ora sono stati ottenuti su precursori ematopoietici già relativamente differenziati, al fine di analizzare la capacità di questi approcci di aumentare l'efficienza di trasferimento genico e l'espressione a lungo termine dell'enzima ADA in precursori più immaturi e in cellule staminali, ed utilizzato il metodo di coltura a lungo termine, originariamente descritto da Dexter, secondo la modifica di Gartner e Kaplan (18). Per questa serie di esperimenti sono stati utilizzati campioni di midollo ottenuti da quattro diversi pazienti affetti da ADA-SCID. Dopo ogni ciclo di infezione, le cellule di midollo venivano poste nel sistema di coltura a lungo termine. Questa tecnica di coltura midollare è in grado di sostenere la replicazione di progenitori capaci di differenziarsi nei diversi lineages ematopoietici. Inoltre, in questo sistema di coltura è stata documentata la produzione di diverse citochine ematopoietiche (19), potenzialmente capaci di aumentare l'efficienza del trasferimento genico (14). La presenza del DNA del vettore è stata dimostrata nella progenie di queste cellule mediante l'analisi in Southern (20). Di rilievo il fatto che i livelli di produzione di ADA di queste cellule aumentavano progressivamente con il numero di cicli di infezione e con il progredire della coltura. In particolare, in alcuni di questi campioni i livelli di espressione di ADA derivata dal vettore raggiungevano valori simili a quelli di cellule normali.

Per analizzare la specificità di lineage dell'espressione di ADA derivata dal vettore, le cellule mantenute a lungo termine sono state ulteriormente coltivate in sistemi destinati a promuovere in maniera selettiva la crescita di cellule linfoidi, mieloidi e fibroblasti. Questi diversi sistemi colturali ci hanno altresì permesso di identificare il tipo di costrutto retrovirale più adatto al modello di terapia genica da noi utilizzato.

In particolare, è stato possibile determinare che il costrutto del gene dell'ADA umano, trascritto sotto il controllo del promotore virale (SAX), era più adatto all'espressione in cellule di natura fibroblastoide, mentre il vettore contenente il minige-

ne ADA privilegiava l'espressione in cellule della linea linfoide. Dal momento che questa malattia colpisce in maniera selettiva le cellule proliferanti della linea T, tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti con questo tipo di vettore. In particolare, DCA, con le sue due unità trascrizionali, è risultato essere il vettore più efficiente ed è stato utilizzato per tutti gli esperimenti successivi.

È noto che cellule ADA deficienti mancano completamente della capacità di rispondere a stimoli quali interleuchina-2 e PHA, tuttavia, dopo efficace trasduzione di queste cellule con vettori contenenti il gene ADA, cellule linfocitiche ottenute mediante rosettazione da colture di midollo a lungo termine (LTMC) di pazienti ADA deficienti acquisivano la capacità di rispondere a stimoli proliferativi appropriati. Come indicato nella tabella 1, livelli di espressione dell'enzima nel range dal 10 al 30% di controlli normali sono in grado di ricostituire risposte proliferative a PHA e IL-2.

Analisi della ricostituzione immunitaria dopo trasferimento genico

Allo scopo di analizzare la capacità di ricostituire funzioni immuni *in vivo* da parte di cellule umane ADA deficienti, infettate con un vettore contenente il minigene umano dell'ADA, è stato utilizzato un modello di recente descritto (16, 17) che sfrutta la possibilità di ricostituire topi immunodeficienti con cellule umane e analizzare così la loro funzionalità *in vivo*.

In una modifica di questo modello topi immunodeficienti portatori delle mutazioni omozigoti per i caratteri bg/nu/xid (BNX) sono stati ricostituiti con cellule umane ADA deficienti dopo trasduzione con il vettore retrovirale DCA descritto in precedenza. Dopo un periodo variabile da 2 a 8 settimane gli animali sono stati analizzati per la presenza di cellule umane, mediante analisi dei markers di superficie contro il CD3 e CD20 umani (21). Cellule umane sono state identificate a bassa frequenza sia nel sangue periferico che nella milza dei topi riceventi. La presenza di sequenze umane è stata anche dimostrata grazie all'individuazione di sequenze «*alu*» nel DNA estratto dalla milza di questi animali (21). È noto che queste sequenze ripetute sono rigorosamente specifiche del DNA umano. Nella milza di alcuni riceventi è stato anche possibile dimostrare la produzione di ADA umana, separabile elettroforicamente da quella murina (21).

Più importante, queste cellule sono state in grado di produrre attività immunitarie funzionali dal momento che è stato possibile dimostrare sia la produzione di IgG umane sia la risposta anticorpale specifica alla stimolazione con tossoide tetanico (21); naturalmente nessuna produzione di immunoglobulina umana è stata riscontrata nel sangue periferico di riceventi ricostituiti con cellule umane ADA deficienti non trasdotte con il vettore contenente il minigene ADA.

Una serie di cloni sono stati ottenuti dalla milza di questi animali, mediante la tecnica di limiting dilution. L'analisi citofluorimetrica ha permesso di confermare la natura umana di queste cellule; l'analisi mediante PCR e l'analisi biochimica in Cellogel hanno evidenziato la presenza di enzima prodotto dal vettore retrovirale al loro interno (21).

Questi dati suggeriscono che l'efficiente espressione dell'enzima mancante è in grado di ricostituire una serie di funzioni immuni in cellule umane ADA deficienti.

L'assunzione ci ha permesso di realizzare una serie di interventi in pazienti ADA-SCID, con risultati al momento giudicabili come promettenti.

Terapia genica di patologie neoplastiche

Il trasferimento delle tecniche di terapia genica alle malattie acquisite in generale, ed ai tumori in particolare, sta crescendo parallelamente. Benché diversi geni coinvolti nella progressione neoplastica siano noti, un approccio terapeutico diretto a questi bersagli non ha oggi grandi probabilità di successo. Questo, almeno in parte, per la necessità di trasdurre tutte le cellule tumorali, affinché l'intervento possa avere efficacia eradicante. I diversi sistemi vettore oggi disponibili non sembrano ancora in grado di offrire questo livello di efficienza.

Tuttavia, diverse altre possibilità terapeutiche per le patologie tumorali possono essere prodotte mediante l'uso di tecniche di trasferimento genico. Una valutazione diretta dei diversi esempi di cellule e geni utilizzati per la terapia genica delle neoplasie può realizzarsi attraverso l'analisi dei protocolli di applicazione clinica in questo settore della medicina sperimentale.

Un primo protocollo clinico prevede il reclutamento e l'attivazione di cellule del sistema immunitario contro il tumore. Il gene attivatore non viene tuttavia inserito in queste cellule, ma nelle cellule del tumore stesso, dopo che il tumore, o una sua parte, è stato rimosso dal paziente chirurgicamente. Il gene inserito modifica la natura della cellula tumorale rendendola bersaglio del sistema immunitario.

Diversi geni e diversi sistemi di trasferimento genico sono stati utilizzati in esperimenti preclinici o proposti in protocolli clinici. Il primo gene trasferito in cellule tumorali è stato quello del «*tumor necrosis factor*» (TNF): le cellule tumorali sono rimosse chirurgicamente, vengono ingegnerizzate a secernere TNF (o in alternativa il gene dell'interleuchina-2, irradiate per non poter attecchire e produrre nuovi tumori, quindi vengono reinoculate localmente nel paziente. Viene teorizzato che queste cellule tumorali ingegnerizzate mediante trasferimento genico siano in grado di stimolare il sistema immunitario in modo più vigoroso di quanto avvenga in vivo nei pazienti portatori di tumore. La natura delle cellule del sistema immunitario coinvolte nel riconoscimento delle cellule neoplastiche e della loro eliminazione dipende dalla natura del gene stesso. Ad esempio, l'interleuchina-2 (IL-2), un fattore di attivazione dei linfociti T, induce il richiamo di questi effettori immuni presso il sito del tumore; in tumori ingegnerizzati per secernere il fattore di crescita dei granulociti neutrofili (G-CSF) il G-CSF è in grado di attirare queste cellule presso il sito tumorale e di attivarne l'attività tumoricida. In realtà molte di queste molecole stimolatorie hanno in vivo funzioni assai complesse, rendendo questo modello terapeutico più complesso da analizzare di quanto inizialmente previsto.

Un approccio diverso è stato di recente introdotto per la terapia genica di alcuni tumori del sistema nervoso. Questa strategia si basa sulla proprietà unica dei vettori retrovirali di integrarsi solo nelle cellule in divisione. In questo contesto, le cellule tumorali in attiva proliferazione, quali i gliomi, si sviluppano all'interno di cellule e tessuti che per la loro natura non vanno incontro a divisione cellulare, quali i neuroni normali. Pertanto l'iniezione stereotassica di vettori retrovirali codificanti per geni ad attività citotossica in queste lesioni porta all'assunzione del gene solo

da parte delle cellule tumorali. Una specifica applicazione di questa strategia prevede l'uso di geni «suicidi», quali il gene per la timidina-kinasi dell'herpes virus. Questi geni permettono la specifica eliminazione delle cellule che lo contengono mediante la somministrazione al paziente di un farmaco non tossico per tutte le altre cellule dell'organismo.

Infine, è importante ricordare una scoperta degli ultimissimi tempi che ha in sè il potere di modificare l'approccio della terapia genica alle patologie tumorali: l'identificazione e il clonaggio dei geni codificanti per gli antigeni tumore-associati. Questi geni, identificati in prima battuta nei melanomi, sono ora riconosciuti anche in una serie di neoplasie di altro istotipo. Il loro trasferimento in appropriate cellule del sistema immunitario, quali le cellule dendritiche, o altre cellule in grado di svolgere la funzione di «*professional antigen presenting cells*», potrà produrre efficaci vaccini specifici per la cellula tumorale.

PROSPETTIVE FUTURE

In alcuni lavori pubblicati in precedenza (13, 14) abbiamo descritto un efficiente metodo di trasferimento genico basato sull'utilizzo di vettori retrovirali per l'introduzione del gene della ADA umano in cellule ottenute da pazienti affetti dalla variante ADA deficiente della «*severe combined immunodeficiency*» (SCID). Utilizzando il sistema di coltura a lungo termine che promuove la crescita continua di cellule ematopoietiche, capaci di differenziazione *multilineage*, noi abbiamo dimostrato che vettori retrovirali possono essere introdotti in una quota importante di progenitori mieloidi e linfoidi e che il gene ADA può essere espresso a livelli quasi fisiologici in cellule coltivate, raggiungendo livelli di attività enzimatica collocabili nel range di efficacia terapeutica. I nostri studi inoltre suggeriscono che l'efficienza di trasferimento genico e di espressione dei geni derivati dal vettore può essere migliorata grazie ad una serie di modificazioni del protocollo di infezione che includono l'utilizzo di cicli multipli, l'utilizzo di fattori di crescita ematopoietici e l'impiego di vettori di nuovo design. Infatti l'utilizzo di cicli multipli di infezione ha sistematicamente comportato l'aumento nella frequenza di cellule infettate, suggerendo che nelle diverse fasi della coltura le cellule bersaglio presentino diversa suscettibilità alla penetrazione da parte del vettore retrovirale. L'utilizzo di nuovi vettori ha comportato non solo un'aumentata efficienza dell'espressione del gene di interesse, ma anche permesso di ottenere una selettiva produzione dell'enzima nelle cellule che più specificatamente sono colpite dalla carenza di ADA: i linfociti T in attiva proliferazione.

Una serie di dati funzionali ha anche confermato che linfociti derivati dal sangue periferico o dal midollo di pazienti ADA deficienti possono ricostituire la loro capacità di risposta proliferativa a stimoli quali IL-2 e PHA quando la produzione di ADA viene rigenerata grazie all'introduzione di un vettore retrovirale trascrizionale efficace. Questi dati, uniti alla produzione di immunoglobuline umane in animali immunodeficienti da parte di cellule di pazienti SCID trasdotte col vettore retrovirale contenente il minigene ADA, suggeriscono un probabile ruolo fisiologico di queste procedure di trasferimento genico, per la ricostituzione di soggetti affetti da immunodeficienze letali.

In questo senso è di recente pubblicazione la notizia che il gruppo di M. Blaese e W. F. Anderson al NIH ha iniziato l'applicazione clinica di questa procedura di terapia genica, che è così divenuta parte della pratica clinica. Ci si può ora attendere una progressiva applicazione di queste tecniche ad una serie di patologie congenite, ma anche a patologie di più ampia diffusione come alcune neoplasie ed alcune gravi patologie infettive.

Negli ultimi due anni particolare attenzione è stata rivolta alla potenziale applicazione della terapia genica nel trattamento dell'AIDS. Teoricamente, ogni momento della replicazione virale potrebbe essere obiettivo di un intervento terapeutico (22).

L'immunizzazione intracellulare verso HIV ha già mostrato risultati preliminari promettenti per alcuni geni potenzialmente efficaci (23). Tra questi i geni codificanti per: mutanti dominanti negative delle proteine strutturali o regolatorie di HIV (rev, gag, tat); RNA antisenso; elementi «*decoy*» (TAR, RRE, psi) capaci di competere con le proteine regolatorie della trascrizione di HIV e con l'assemblaggio delle particelle HIV; ribosomi specifici per RNAs HIV-specifici (22).

Queste ed altre strategie, sole o in combinazione, potranno in futuro rappresentare uno strumento importante per il trattamento di pazienti con infezioni HIV in atto. Il successo della terapia genica nel trattamento dell'AIDS e nelle strategie anticancro, sarà il terreno dove si giocherà il futuro dell'applicazione su larga scala della terapia genica in medicina.

Tabella 1 - Risposte proliferative alla stimolazione con rIL-2 e PHA di linfociti umani (E+) ADA deficienti ottenuti da colture a lungo termine di midollo (LTMC) infettate con i vettori SAX e AAX.

Origine delle cellule stimolate	ADA	PHA	Medium
Linfociti non infettati	1.7%	4599	360
Cellule E+LTMC non infettate	4.7%	17512	602
Cellule E+LTMC infettate con SAX	11.1%	52093	498
Cellule E+LTMC infettate con AAX	28.2%	71112	309
Cellule E+LTMC infettate con DCA	78.5%	112578	612
Linfociti normali (ADA+) non infettati	81.0%	70610	822

L'espressione di attività enzimatica è stata misurata come conversione del substrato [^{14}C]adenosina al prodotto [^{14}C]inosina da parte del lisato cellulare di 50.000 cellule dei vari campioni indicati.

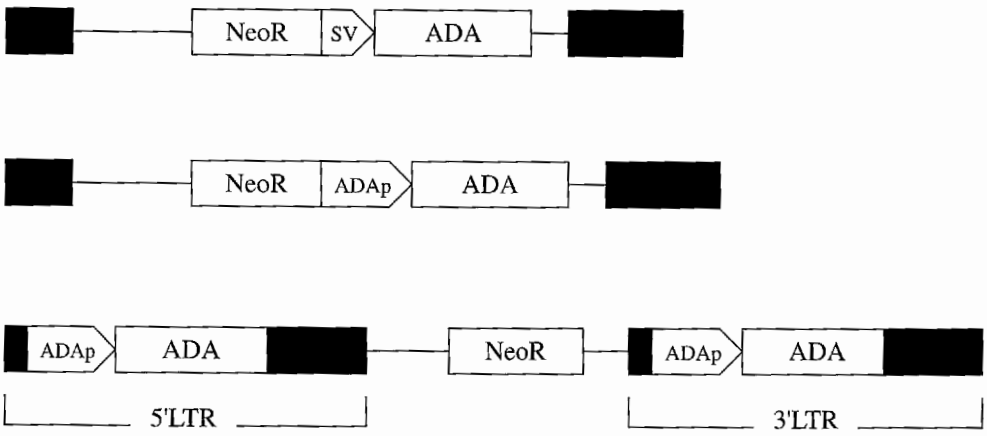


Figura 1 - Struttura dei tre vettori retrovirali che esprimono il gene umano dell'adenosina deaminasi. In alto il vettore SAX, al centro il vettore AAX, in basso il vettore DCA. Nelle frecce sono indicati i rispettivi promotori: SV (promotore early del virus SV 40) e ADAp (promotore del gene umano ADA).

BIBLIOGRAFIA

1) Dick J.E., Magli M.C., Huszar D., Philips R.A., Bernstein A. (1985) Cell *42*, 71-79.
2) Keller G., Paige G., Gilboa E., Wagner E.F. (1985) Nature *318*, 149-154.
3) Lemischka I.R., Raulet D.H., Mulligan R.C. (1986) Cell *45*, 917-927.
4) Eglitis M.A., Kantoff P.W., Gilboa E., Anderson W.F. (1985) Science *230*, 1395-1398.
5) Kwok W.W., Schuening F., Stead R.B., Miller D.A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83*, 4552-4555.
6) Miller A.D., Hoch R.A. (1986) Nature *320*, 275-277.
7) Belmont J.W., Henkel-Tigges J., Chang S.M.W., Wager-Smith K., Kellems R.E., Dick J.E., Magli M.C., Philips R.A., Bernstein A., Caskey C.T. (1986) Nature *322*, 385-387.
8) Williams D.A., Orkin S.H., Mulligan R.C. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci USA *83*, 2566-2570.
9) Belmont J.W., MacGregor G.R., Wager-Smith K., Fletcher F.A., Moore K.A., Hawkins D., Villalon D., Chang S.M.W., Caskey C.T. (1988) Mol. Cell. Biol. *8*, 5116-5125.
10) Kaisid A., Morecki S., Aebersold P., Corbetta K., Culver K., Freeman S., Director E., Lotze M.T., Blaese R.M., Anderson W.F., Rosenberg S.A. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 473-477.
11) Armentano D., Yu S.F., Kantoff P.W., von Ruden T., Anderson W.F., Gilboa E. (1987) J. Virol. *61*, 1647-1650.
12) Kantoff P.W., Kohn D.B., Mitsuya H., Armentano D., Sieberg M., Zwiebel J.A., Eglitis M.A., McLachlin J.R., Wiginton D.A., Hutton J.J., Horowitz S.D., Gilboa E. Blaese R.M., Anderson, W.F. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *83*, 6563-6567.
13) Kantoff P.W., Gillio A.P., McLachlin J.R., Bordignon C., Eglitis M.A., Kernan N.A., Moen R.C., Kohn D.B., Yu S.F., Karson E., Karlsson S., Zwiebel J.A., Gilboa E., Blaese R.M., Nienhuis A.E., O'Reilly R.J., Anderson W.F. (1987) J. exp. Med. *166*, 219-234.
14) Bordignon C., Yu S.F., Smith C.A., Hantzopoulos P., Ungers G., Keever C.A., O'Reilly R.J., Gilboa E. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 6748-6752.
15) Hantzopoulos P., Sullenger B.A., Ungers G., Gilboa E. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 3519-3523.
16) Mosier D.E., Gulizia R.J., Baird S.M., Williams D.B. (1988) Nature *335*, 256-259.
17) Kamel-Reid S., J.E. Dick (1988) Science *242*, 1706-1709.
18) Gartner S., Kaplan H.S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*, 4756-4759.
19) Gordon M.Y., Riley G.P., Watt S.M., Greaves M.F. (1987) Nature *326*, 403-405.
20) Southern E.M. (1975) J. Mol. Biol. *98*, 503-517.
21) Ferrari G., Rossini S., Giavazzi R., Maggioni D., Nobili N., Soldati M., Ungers G.E., Mavilio F., Gilboa E., Bordignon C. (1991) Science *251*, 1263-1366.
22) Mitsuya H., Yarchoan R., Broder S. (1990) Science *249*, 1533-1542.
23) Sullenger B.A., Gallardo H.F., Ungers G.E., Gilboa E. (1990) Cell *63*, 601-608.

I SESSIONE

BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA BIOLOGIA ANIMALE

Moderatori
S. Ronchi - C. Secchi

Atti della 2ª Conferenza Nazionale su:
Stato dell'arte delle ricerche
italiane nel settore delle
biotecnologie applicate alle
scienze veterinarie e zootecniche

F.G. RANUCCI, G. MARCONI, M. RESCIGNO, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI

MODELLI ANIMALI TRANSGENICI PER LO STUDIO DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Centro per lo studio delle infrastrutture cellulari del CNR - Milano

RIASSUNTO

I meccanismi preposti alla regolazione e all'omeostasi del sistema immunitario sono ancora per lo più sconosciuti, per la carenza di modelli animali utili a saggiare specifici quesiti.
Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un modello animale transgenico in cui è stato espresso, nei linfociti T, un recettore TCR specifico che riconosce un determinante nel dominio per l'allotipo situato nella regione CH3 della porzione costante delle immunoglobuline γ2a di allotipo b.
L'analisi degli animali trangenici ha fino ad ora dimostrato che le cellule T transgeniche sono selezionate positivamente nei topi Igh-Ib e inducono una drastica diminuzione nel siero delle immunoglobuline $\gamma 2a^b$ mentre tutti gli altri isotipi rimangono invariati. Negli animali transgenici immunizzati con Salmonella si nota, nella cinetica della risposta secondaria, un lieve incremento della risposta anticorpale $\gamma 2a^b$ che tuttavia rimane 10 volte inferiore rispetto ai controlli non transgenici immunizzati con lo stesso antigene. Inoltre, in concomitanza con l'inibizione della produzione di $\gamma 2a^b$ si osserva un forte incremento delle IgE. Questo risultato suggerisce che i linfociti B, nel corso del loro differenziamento, appena cominciano a sintetizzare anticorpi $\gamma 2a^b$ possono presentare vari epitopi degli stessi, compreso quello riconosciuto dai linfociti T transgenici; non appena la cellula B presenta tali epitopi è in grado di interagire con le cellule T transgeniche che verosimilmente inducono un successivo switch ad IgE, l'unico possibile, visto che nell'organizzazione genomica delle regioni che codificano per i vari isotipi delle immunoglobuline, le γ2a si trovano immediatamente a monte delle ε. Si può quindi ipotizzare che il meccanismo di azione dei linfociti T transgenici consista in una induzione di uno switch di classe nelle immunoglobuline γ2a e che questo meccanismo potrebbe essere un meccanismo fisiologico di regolazione della risposta immunitaria.

Parole chiave: sistema immunitario, animali transgenici.

T. SIMONIC, A. NEGRI, S. DUGA, M. MORTARINO, S. RONCHI

MUTAGENESI SITO-DIRETTA DELLA L-ASPARTATO OSSIDASI, ENZIMA COINVOLTO NELLA BIOSINTESI DE NOVO DELLA VITAMINA PP

Istituto di Fisiologia Veterinaria e Biochimica - Facoltà di Medicina Veterinaria -
Via Celoria, 10 - 20133 Milano

RIASSUNTO

L'*E. coli* rappresenta l'organismo modello per eccellenza per lo studio di vie metaboliche ancora poco caratterizzate. Tra queste, la via che porta alla biosintesi *de novo* dei precursori della niacina (vitamina PP) e dei coenzimi piridinici, da essa derivanti, assume una particolare importanza. Infatti gli animali superiori per il loro fabbisogno dipendono completamente dall'assunzione della vitamina prodotta dai microrganismi. Inoltre, essendo questa via metabolica assente negli organismi superiori, gli enzimi che ne fanno parte possono rappresentare il bersaglio ideale per farmaci specifici a probabile bassa tossicità.

L'enzima oggetto della presente comunicazione è la L-aspartato ossidasi. Questa proteina, che contiene il FAD come coenzima, catalizza il primo passaggio nella biosintesi *de novo* dei coenzimi piridinici in *E. coli*. Nel nostro laboratorio è in corso la caratterizzazione di questo enzima dal punto di vista biochimico, con particolare riguardo al legame tra apoenzima e coenzima flavinico. Allo scopo di aumentare la stabilità di questo legame, sono state introdotte sostituzioni di aminoacidi opportuni, mediante mutagenesi sito-diretta, nel tentativo di produrre le condizioni adatte alla formazione di un legame covalente tra proteina e cofattore.

Parole chiave: L-aspartato ossidasi - flavoproteine - mutagenesi sito-diretta - niacina - vitamina PP - NAD.

SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF L-ASPARTATE OXIDASE, AN ENZYME INVOLVED IN THE DE NOVO BIOSYNTHESIS OF VITAMIN PP

SUMMARY

E. coli is considered a model organism for the study of unknown metabolic pathways. The one leading to the *de novo* biosynthesis of precursors of niacine (vitamin PP) and pyridinic coenzymes is particularly interesting. In fact, higher animals depend completely from the vitamin produced by microrganisms. In addition, since this metabolic pathway is not present in higher animals, the enzymes involved in such pathway represent an ideal target for specific, and probably non toxic, drugs.

This paper deals with L-aspartate oxidase. This protein, wich contains FAD as coenzyme, catalyses the first step in the *de novo* biosynthesis of pyridinic coenzymes

in *E. coli*. We are characterizing the biochemical properties of this flavoenzyme. In particular, we are studying the binding of the coenzyme to the apoenzyme, to give the active holoenzyme. In order to increase the strength of such complex, we introduced, by site-directed mutagenesis, amino acid residues in a specific region of LASPO wich should allow the formation of a covalent bound between apo- and coenzyme.

Key words: L-aspartate oxidase - flavoproteins - site-directed mutagenesis - niacine - vitamin PP - NAD.

La L-aspartato ossidasi (LASPO) da *E. coli* è una flavoproteina che catalizza la prima tappa della via biosintetica *de novo* della vitamina PP, precursore dei coenzimi piridinici (NAD, NADH, NADP, NADPH) (Figura 1). Questa via è presente in numerosi batteri, tra cui diverse specie patogene per gli animali, nei funghi, ed in alcune piante ed è attiva sia in aerobiosi che in anaerobiosi (5). La biosintesi dei coenzimi piridinici è regolata a livello di trascrizione, tramite un meccanismo probabilmente simile a quello delucidato in *S. typhimurium* (6). Gli animali superiori non sono in grado di ottenere la vitamina PP a partire da precursori semplici e dipendono completamente, per il loro fabbisogno, dai microrganismi che la producono.

Lo studio di questo enzima, oltre all'importanza sul versante speculativo, ha un duplice interesse dal punto di vista applicativo. Infatti, in primo luogo rappresenta un ottimo bersaglio per l'azione di inibitori specifici che possono funzionare da agenti terapeutici molto selettivi ed a probabile bassa tossicità, in quanto tale attività enzimatica non è presente negli animali; in secondo luogo sarebbe molto vantaggiosa la sua utilizzazione per la produzione biotecnologica del NAD, coenzima molto usato anche in saggi chimico clinici, e che oggi è ottenibile solamente per estrazione da fonti naturali per mezzo di procedimenti molto costosi. Gli esperimenti qui descritti si riferiscono proprio a quest'ultimo aspetto applicativo.

Il gene *nadB* di *E. coli* che codifica per la LASPO è stato clonato ed ha consentito di conoscere la sequenza della proteina. La LASPO consiste di 540 aminoacidi, per un peso molecolare di 60 kDa e contiene quale coenzima una molecola di FAD (flavin adenina dinucleotide) legata in modo non covalente (4). La successiva espressione del gene *nadB* ha permesso di ottenere per estrazione una quantità di enzima sufficiente a consentirne lo studio (9).

La LASPO catalizza in vitro l'ossidazione dell'L-aspartato che, in mancanza dell'enzima chinolinato sintasi che nell'ambiente cellulare lo utilizza immediatamente (Figura 1), viene idrolizzato ad ossalacetato ed ammoniaca (NH_3). Il coenzima ridotto (FADH2) è prontamente riossidato dall'ossigeno molecolare (O_2) con produzione di perossido d'idrogeno (H_2 O_2). Il fattore responsabile della riossidazione dell'enzima in condizioni fisiologiche non è noto, ma certamente, in condizioni anaerobiche, non può essere l'O_2.

Il sistema di espressione originale propagato nel ceppo batterico ospite NK6042s (9) portava alla produzione di una proteina attiva ma in parte proteolizzata e quindi non adatta allo studio delle sue proprietà. L'identificazione della proteasi di *E. coli* responsabile del taglio a livello del residuo di arginina 127, ovvero il prodotto del

gene *ompT*, ed il successivo trasferimento del sistema di espressione in un ceppo batterico ospite (BL21) carente di tale proteasi, ha portato all'ottenimento dell'enzima integro.

La caratterizzazione funzionale della proteina ha evidenziato che il suo comportamento è per alcuni aspetti simile a quello di altre ossidasi flaviniche, mentre per altri aspetti ricorda il comportamento di enzimi appartenenti ad una differente classe di flavoproteine, quali la fumarato riduttasi (FRD) e la succinato deidrogenasi (SDH) (8). Questi enzimi sono composti da molte subunità e sono associati a membrane; infatti, entrambi fanno parte della catena respiratoria e sono presenti e funzionano rispettivamente in condizioni anaerobiche ed aerobiche (1). I risultati ottenuti hanno portato quindi alla conclusione che la LASPO di *E. coli* è una flavossidasi atipica.

Una conferma di tale conclusione è venuta anche dalla constatazione che la struttura primaria della proteina è significativamente simile alle subunità flavoproteiche della FRD e della SDH (31% di identità), mentre non è apprezzabilmente simile a nessuna delle altre ossidasi flaviniche conosciute. Tra le zone in cui la sequenza della LASPO si discosta da quella della FRD e della SDH è di interesse un corto tratto nella regione N-terminale, corrispondente agli aminoacidi 43-48, che risulta conservatissimo nell'ambito delle proteine confrontate con la LASPO (Figura 2). La ragione di questa conservazione dipende dal fatto che uno degli aminoacidi componenti, in particolare l'istidina (H), è direttamente responsabile del legame covalente fra proteina e coenzima in SDH e FRD (1). Da questa osservazione è nato il tentativo di rendere la LASPO di *E. coli* adatta al suo sfruttamento biotecnologico mediante la modificazione del tratto di sequenza di cui si è appena discusso, in modo da farlo diventare simile a quello presente nelle proteine capaci di legare covalentemente il FAD. Infatti l'enzima nativo si è rivelato inadeguato a tale scopo in quanto il legame non covalente tra proteina e coenzima (FAD) è piuttosto debole (Kd = 6 x 10-7 M) e comporta una tendenza alla perdita di FAD durante la preparazione dell'enzima purificato.

Al fine di stabilizzare il legame fra proteina e FAD la sequenza nucleotidica del gene *nadB* è stata modificata tramite esperimenti di mutagenesi sito-diretta, eseguiti seguendo il metodo di Kunkel (7). In tal modo sono stati ottenuti quattro diversi mutanti (Figura 3). Due di questi, R (43) e H (45) hanno determinato l'espressione di due forme della proteina in cui vi è la sostituzione di un solo amminoacido, rispettivamente arginina al posto del glutammato (43) e istidina al posto della serina (45). Il mutante H (45) è stato utilizzato come base per ottenere una terza forma della proteina, modificata anche nell'intorno a monte dell'istidina e denominata RSH (43-45), da cui è stata infine costruita l'ultima forma del gene *nadB*, chiamato mutante C (43-48). La corrispondente proteina è la LASPO C (43-48) in cui la sostituzione di 5 amminoacidi in una sequenza di sei residui ha reso la zona interessata identica a quella di molte FRD e SDH. Un esperimento di questo genere non è mai stato riportato per una flavoproteina, perciò non esisteva la possibilità di anticiparne gli effetti.

Le proteine mutate vengono prodotte, nel sistema di espressione, in quantità paragonabili a quella che si ottiene per la proteina nativa (8mg/l di coltura batterica) e risultano integre. Anche se indagini dettagliate sulle loro proprietà sono ancora in corso, risultano tuttavia evidenti differenze rispetto al comportamento dell'enzima nativo.

L'attività ossidasica viene seriamente compromessa dalla sostituzione del glutammico 43 con l'arginina, tanto che la velocità di reazione catalizzata dalla LASPO R (43) è diminuita di 10 volte rispetto a quella dell'enzima nativo. In tutti gli altri mutanti l'attività enzimatica sembra essere completamente assente.

Tutte le forme mutate della LASPO sono in grado di incorporare il FAD, ma il legame è ancora più labile di quello presente nella proteina naturale.

Questi primi risultati dimostrano innanzitutto che la regione della LASPO attorno alla serina 45 è coinvolta nel legame con il coenzima, ed inoltre che la sostituzione della sequenza amminoacidica nelle posizioni 43-48 della proteina nativa con quella presente in molte FRD e SDH non è sufficiente per determinare la formazione di un legame covalente con il FAD. I dati riportati non sono comunque conclusivi, in quanto è noto che la presenza di una sequenza amminoacidica adatta è una condizione necessaria, ma può non essere sufficiente per ottenere il legame covalente con il coenzima. Questo concetto è derivato da studi di ricostruzione dell'oloenzima (proteina + coenzima) a partire dall'apoenzima e dal coenzima (FAD) in due casi di flavoproteine che presentano il legame covalente (2,3). Gli esperimenti di ricostruzione effettuati hanno dimostrato che non si tratta di un processo semplice, poichè avviene solo in condizioni molto specifiche ed è essenziale la presenza di molecole che funzionano da effettori, peraltro diversi nei due casi riportati.

È quindi necessaria una seconda fase di indagini da condurre sulle LASPO mutate allo scopo di identificare le condizioni specifiche ed in particolare gli effettori richiesti per la formazione di un legame covalente tra proteina e coenzima. Un risultato positivo potrebbe risolvere il problema di disporre di un oloenzima stabile e perciò adatto alla sua utilizzazione biotecnologica.

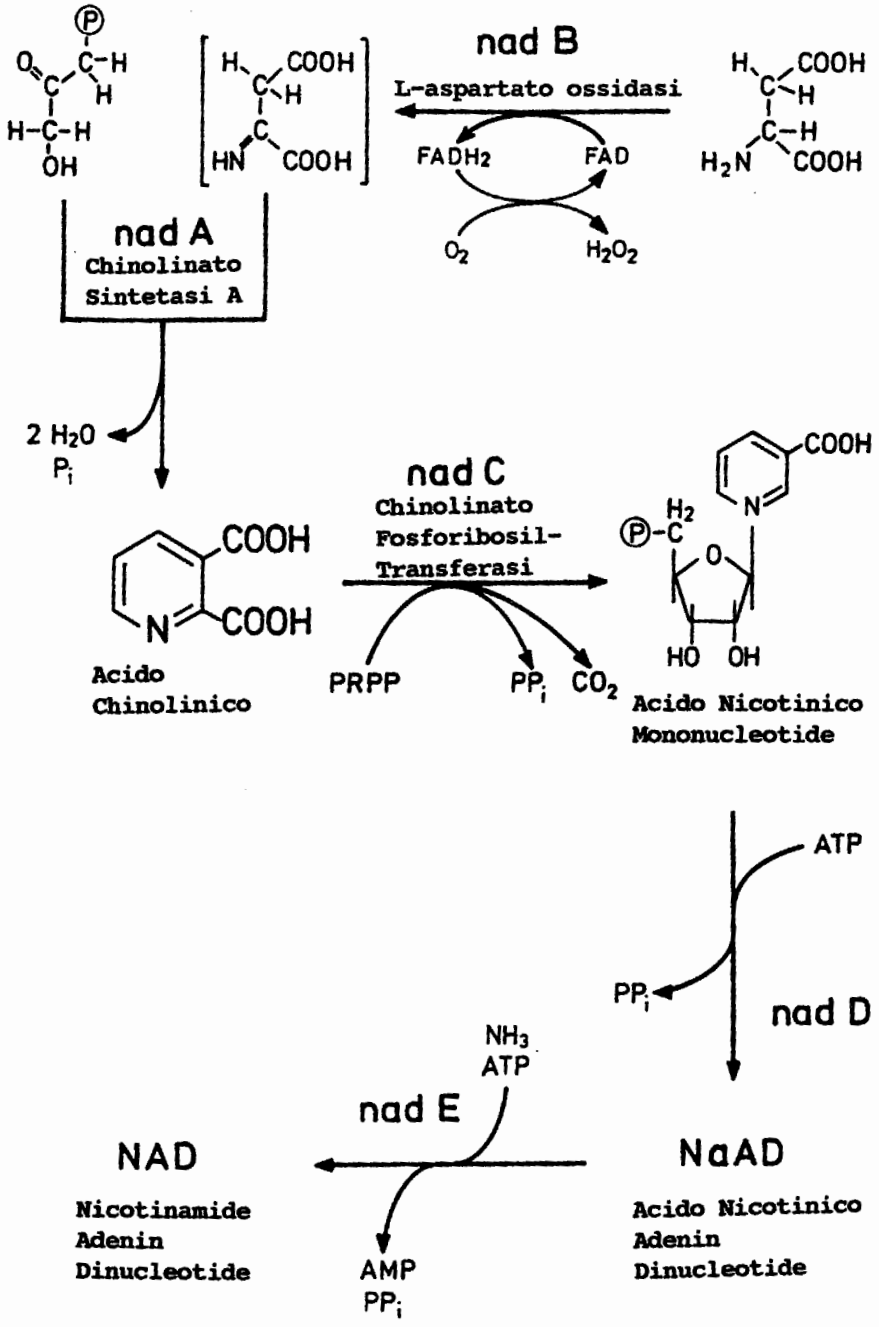


Figura 1 - Biosintesi *de novo* dei nucleotidi piridinici in *E. coli*.

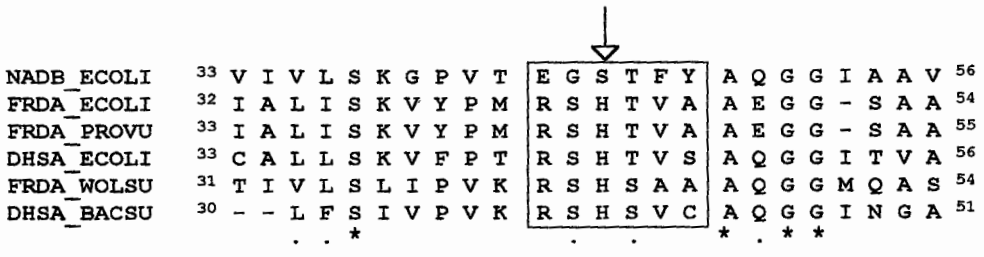


Figura 2 - Allineamento della regione N-terminale della LASPO di *E. coli* con le corrispondenti regioni di FRD e SDH dello stesso e di altri organismi. La sequenza bersaglio della mutagenesi sito-diretta è evidenziata nel riquadro; la freccia indica il residuo di istidina responsabile del legame covalente con il FAD. FRDA, fumarato riduttasi; DHSA, succinato deidrogenasi; ECOLI, *Escherichia coli*; PROVU, *Proteus vulgaris*; WOLSU, *Wolinella succinogenes*; BACSU, *Bacillus subtilis*.

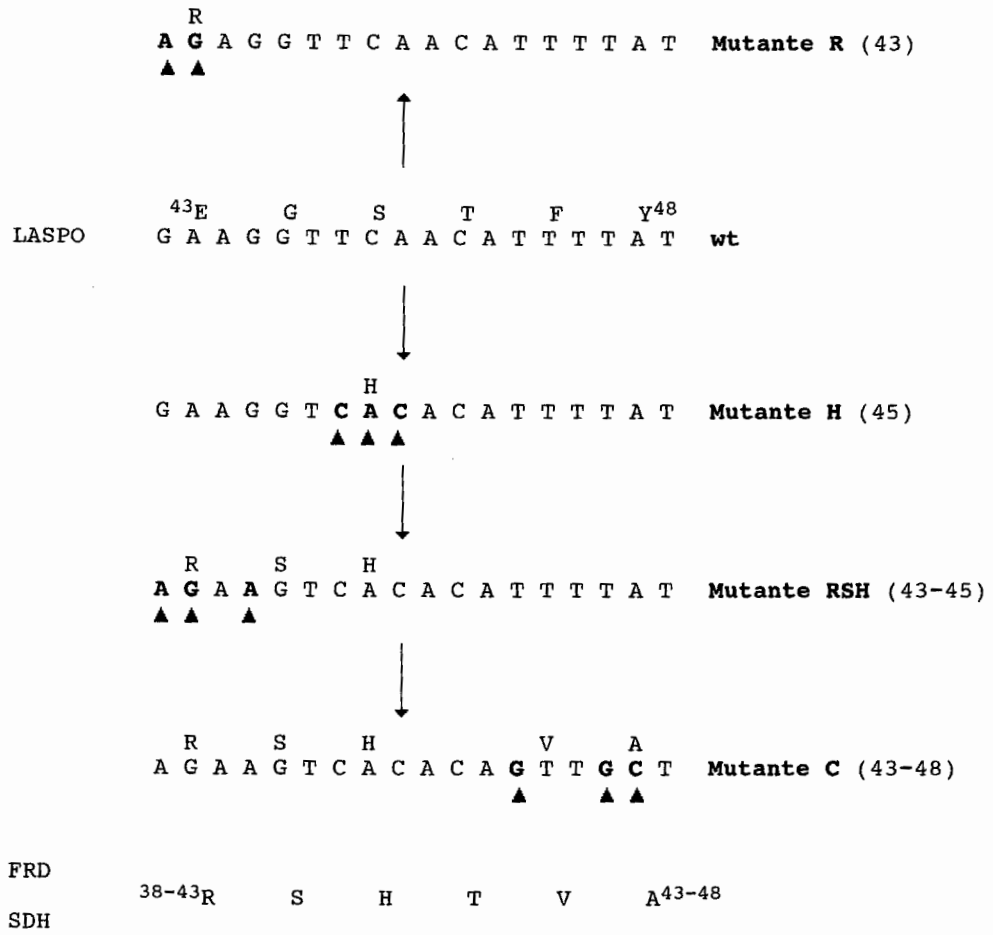


Figura 3 - Sequenze nucleotidiche della zona bersaglio della mutagenesi sito-diretta del gene *nadB* nativo (wt) e delle forme modificate e corrispondenti sequenze aminoacidiche della LASPO nativa e delle forme mutate. Le frecce indicano le sostituzioni ottenute in ogni reazione di mutagenesi e gli aminoacidi risultanti.

BIBLIOGRAFIA

1) ACKRELL B. A., JOHNSON M. K., GUNSALUS R. P. AND CECCHINI G. (1991) In: '*Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*' (Muller, F. ed.), CRC Press, pp. 229-297.

2) BRANDSH R., BICHKLER V., SCHIDT M. AND BUCHNER J. (1992) J. Biol. Chem. *267*, 20844-20849.

3) BRANDSH R. AND BICHLER V. (1989) Eur. J. Biochem. *182*, 125-128.

4) FLACHMANN R., KUNZ N., SEIFERT J., GUTLICH M., WIENTJES F. J., LAUFER A. AND GASSEN H. G. (1988) Eur. J. Bichem. *175*, 221-228.

5) FOSTER J. W. AND MOAT A. G. (1980) Microbiol. Rev. *44*, 83-105.

6) FOSTER J. W., PARK Y. K., PENFOUND T., FENGER T. AND SPECTOR M. P. (1990) J. Bacteriol. *172*, 4187-4196.

7) KUNKEL T. A., ZAKOUR R. A., (1987) Methods Enzymol. *154*, 367-382.

8) NEGRI A., MORTARINO M., SIMONIC,T., TEDESCHI G., RONCHI S., AND GASSEN H. G. (1994) In: '*Flavins and Flavoproteins*' (Yagi K. ed.) in stampa.

9) SEIFERT J., KUNZ N., FLACHMANN R., LAUFER A., JANY K. D. AND GASSEN H. G. (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler *371*, 239-248.

C. BANDI, G. DAMIANI, L. SACCHI*, B. DI SACCO,
M.G. BARDIN, M. SIRONI, R. FANI°, L. MAGRASSI°°

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E IDENTIFICAZIONE DI SIMBIONTI INTRACELLULARI

Istituto di Patologia Generale Veterinaria e ** ID.V.G.A.-C.N.R., via Celoria 10, 20133 Milano,
* Dipartimento di Biologia Animale, piazza Botta 9, 27100 Pavia
° Dipartimento di Chirurgia, sezione di Neurochirurgia, Piazzale Golgi 2, 27100 Pavia

RIASSUNTO

Uno dei principali ostacoli alla caratterizzazione dei simbionti intracellulari risiede nelle difficoltà che si incontrano nell'isolamento in coltura di tali organismi. Un approccio efficace per superare questo problema consiste nell'amplificazione e sequenziamento dei geni codificanti per gli RNA ribosomali, utilizzando come inneschi oligonucleotidi complementari a regioni geniche evolutivamente conservate. I dati di sequenza così ottenuti possono essere impiegati per lo sviluppo di metodi identificativi basati su oligonucleotidi di sequenza specifica, disegnati sulla base delle regioni geniche variabili. In questa sede presentiamo un protocollo rapido per l'amplificazione ed il sequenziamento dei geni codificanti per l'RNA della subunità ribosomale minore (16S rDNA). Il metodo descritto èstato utilizzato nei nostri laboratori per la classificazione di simbionti intracellulari e di altri batteri associati ad artropodi. Il risultato principale delle nostre ricerche èstato l'assegnazione di una linea filetica di simbionti intracellulari al gruppo dei flavobatteri. Ricerche di carattere ultrastrutturale e tassonomico-molecolare sono attualmente in corso sui simbionti intracellulari di *Dirofilaria immitis*.

Parole chiave: simbiosi intracellulare, 16S rDNA, PCR, tassonomia microbica

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF INTRACELLULAR SYMBIONTS

SUMMARY

A major drawback to a deeper phylogenetic knowledge of intracellular symbionts derives from our inability to grow them on cell-free media. To circumvent this problem, a useful approach is the amplification and sequencing of the genes encoding for the ribosomal RNAs. This can be achieved by using universal primers targeted toward conserved stretches of the rDNAs. The obtained sequences are useful in designing diagnostic oligonucleotides targeted toward the rDNA or rRNA variable regions. Here we present a quick method for the amplification and sequencing of the small subunit ribosomal DNA (16S rDNA). This method has been used in our laboratories for the classification of uncultured arthropod intracellular symbionts

and other arthropod-associated bacteria. The main result of our studies was the identification of a phyletic line of intracellular symbiont as belonging to the flavobacteria. Ultrastructural and molecular studies are in progress on the intracellular symbionts of *Dirofilaria immitis*.

Key words: intracellular symbiosis, 16S rDNA, PCR, microbial taxonomy

INTRODUZIONE

Le cellule eucariotiche rappresentano l'*habitat* apparentemente esclusivo di una varietà di batteri refrattari all'isolamento in cultura. Tali batteri non sono necessariamente associati a manifestazioni patologiche (7). Infatti, accanto ad importanti patogeni quali *rickettsiae* e *chlamydiae*, numerosi batteri intracellulari vengono descritti come simbionti mutualistici (3). L'importanza sanitaria, ecologica ed evolutiva dei simbionti intracellulari èstata riconosciuta solo recentemente. Inoltre, solo nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate metodologie molecolari per la caratterizzazione ed identificazione di tali organismi. La strategia seguita dalla tassonomia molecolare per la caratterizzazione e classificazione dei batteri intracellulari può essere così schematizzata: a) amplificazione *in vitro* (PCR) e sequenziamento dei geni codificanti per gli RNA ribosomali (16S rDNA; 23S rDNA); b) allineamento con le sequenze di rDNA depositate nelle banche dati; c) analisi filogenetica e tassonomico-numerica. La prima fase della ricerca (amplificazione e sequenziamento dei ribosomali di un batterio di incerta collocazione tassonomica) viene effettuata attraverso l'impiego dei cosiddetti oligonucleotidi universali (4). La seconda e terza fase si avvalgono dei servizi offerti alla comunità scientifica dalla EMBL Data Bank (SSU rRNA *compilation*) e dal *Ribosomal Data Base Project* (5, 6). Sulla base dei risultati ottenuti (dati di sequenza; allineamento con sequenze procariotiche ed eucariotiche; collocazione tassonomica), è possibile disegnare oligonucleotidi specifici per l'organismo preso in esame, per mezzo dei quali effetuare test diagnostici di applicabilità routinaria, basati sulla PCR o sull'ibridazione *in situ*. In questa sede viene riportato un protocollo rapido per l'amplificazione e sequenziamento del 16S rDNA a partire da batteri non coltivabili presenti nei tessuti animali.

MATERIALI E METODI

Estrazioni grezze di DNA sono state ottenute da embrioni di 5 specie di scarafaggio (*Blattella germanica, Periplaneta americana, Periplaneta australasiae, Nauphoeta cinerea, Pycnoscelus surinamensis*) e campioni di utero di filaria (*Dirofilaria immitis*; 0.001-0.005 g). Sia gli embrioni che i campioni di utero sono stati sospesi in 50 µl di 10 mM Tris-HCl pH 7.5, scaldati a 90°C per 10 min., trattati con proteinasi K (100µg/ml) a 48°C per 2 ore e scaldati nuovamente a 90°C for 10 min. Il 16S rDNA batterico èstato amplificato in volumi di 20 µl contenenti 2 µl dell'estratto grezzo ottenuto come descritto, 1 µM di ciascuno degli oligonucleotidi 27f (5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'), 2 µl di tampone 10x (Promega), 200 µM di ciascun dNTP, ed 1 unità

di Taq DNA polimerasi (Promega). Le condizioni di PCR in un apparecchio MJ PTC100 consistevano in: 94°C per 30 sec, temperatura di *annealing* per 30 sec, 72°C per 4 min (temperatura di *annealing*: 60°C per i primi 5 cicli, 55°C per i seguenti 5 cicli e 50°C gli ultimi 20 cicli). I prodotti di amplificazione sono stati risolti su gel di 1% agarosio *low-melting* in tampone TAE con etidio bromuro e visualizzati in luce UV ad alta lunghezza d'onda. Le porzioni di gel contenenti le bande desiderate sono state recuperate, congelate (in azoto liquido) e scongelate (in acqua a 40°C) per quattro volte e succesivamente centrifugate a 15.000 g per 2 min. Il sequenziamento diretto dell'amplificato presente nel supernatante (8.5 µl per ciascun oligonucleotide) èstato effettuato per mezzo degli oligonucleotidi 27f, 704f (5'-GTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'), 765r (5'-CTGTTTGCTCCCCACG-CTTTC-3'), e 1495r utilizzando il kit «Circum VentTM DNA Sequencing Kit» (New England Biolabs, Beverly, MA), seguendo le istruzioni del produttore. Tre corse separate sono state effettuate su un apparecchio di sequenza di dimensioni standard, permettendo di risolvere circa 500 posizioni a partire da ciascun oligonucleotide. Gli oligonucleotidi 519r (4) e BBf (2) sono stati impiegati in alcune occasioni, al fine di ottenere i dati di sequenza a partire da entrambe le eliche di DNA. Le sequenze ottenute sono state successivamente allineate con le sequenze del 16S rDNA di rappresentanti delle principali linee filetiche eubatteriche, al fine di identificare le regioni ribosomali variabili. Oligonucleotidi di sequenza specifica sono stati selezionati sulla base di tali regioni, ed utilizzati in PCR (come descritto precedentemente), o in esperimenti di ibridazione *in situ* (realizzata essenzialmente come descritto da Zarda (8), dopo essere stati marcati con digoxigenina. Oligonucleoti universali complementari agli rRNA ed rDNA eubatterici e mitocondriali sono stati impiegati per verificare la presenza e l'accessibilità degli rRNA ed rDNA dei controlli negativi (costituiti da cellule di batteri a vita libera e da vari tessuti animali).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Diversi metodi vengono utilizzati per il sequenziamento dei 16S rRNA ed rDNA batterici. Uno degli approcci di scelta consiste nell'impiego della trascrittasi inversa per la generazione di molecole di DNA complementari all'RNA ribosomale (cDNA); il sequenziamento viene quindi effettuato sul cDNA (4). Per lo studio dei batteri intracellulari, tale metodica risulta di difficile applicabilità, sia per la massiccia presenza dei tessuti dell'ospite, sia per l'esiguo numero di cellule batteriche di cui si dispone, non potendo effetuare la cultura in *medium* acellulare. La caratterizzazione del 16S dei batteri intracellulari viene di conseguenza effettuata a partire dal DNA per mezzo della PCR. Si passa generalmente attraverso tre tappe: amplificazione *in vitro* (PCR); clonazione; sequenziamento (1). Il principale limite di tale approccio deriva dagli errori di incorporazione commessi dalla Taq polimerasi nel corso dell'amplificazione *in vitro*: il sequenziamento di un solo clone di molecole non garantisce l'attendibilità dei dati di sequenza in quanto il clonaggio potrebbe aver selezionato una molecola contenente errori di incorporazione. Una strategia alternativa consiste nel sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione (evitando quindi il clonaggio e la conseguente scarsa attendibilità delle sequenze ottenute).

Il protocollo presentato in questo lavoro consente: 1) di ottenere un'amplificazione selettiva ed efficiente del 16S rDNA batterico anche a partire da preparazioni grezze di DNA ed in presenza dei tessuti dell'ospite; 2) di sequenziare il 16S rDNA amplificato con solo 4-6 oligonucleotidi (generalmente vengono utilizzati 8 oligonucleotidi). Inoltre, la preparazione dell'amplificato per il sequenziamento consiste in una semplice purificazione su gel *low-melting* seguita da alcuni cilcli di congelamento e scongelamento. La semplicità della procedura consente la rapida acquisizione dei dati di sequenza. In alcuni casi è auspicabile escludere la possibilità che le sequenze ottenute derivino da batteri contaminanti. Le sequenze prodotte vanno quindi allineate con quelle disponibili nelle banche dati, al fine di individuare regioni di sequenza specifica, generalmente poste nelle regioni variabili del 16S rDNA. Queste informazioni vengono utilizzate per la sintesi di oligonucleotidi che, ibridandosi selettivamente al 16S rDNA o rRNA di cui si èottenuta la sequenza, verranno utilizzati nell'ibridazione *in situ* o in PCR specifiche. I medesimi oligonucleotidi potranno eventualmente essere impiegati per una rilevazione routinaria del microorganismo oggetto di studio.

La procedura descritta è stata applicata allo studio di alcuni simbionti intracellulari la cui collocazione tassonomica risultava indeterminata (i simbionti del corpo grasso degli scarafaggi ed i *dense bodies* di *Dirofilaria immitis*). Per quel che riguarda gli endosimbionti degli scarafaggi, si è dimostrato che tali microorganismi costituiscono una unica linea filetica, appartenete al gruppo dei flavobatteri-batteroidi (2). Il simbionte intracellulare di *Dirofilaria immitis* è risultato invece ascrivibile alla sottodivisione alfa dei proteobatteri. Inoltre, la semplicità della protocollo di sequenziamento qui presentato ha consentito la sua applicazione in una ricerca sull'epidemiologia della borrelliosi.

BIBLIOGRAFIA

1) AMANN R., SPRINGER N., LUDWIG W., GÖRTZ H.D., SCHLEIFER K.H. (1991) *Identification in situ and phylogeny of uncultured endosymbionts. Nature 351*, 161-164.

2) BANDI C., DAMIANI G., MAGRASSI L., GRIGOLO A., FANI R., SACCHI L. (1994) *Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches.* Proc. R. Soc. B (in stampa).

3) BUCHNER P. (1965) *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms.* John Wiley & Sons.

4) LANE D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In «*Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*» (E.Stackebrandt, M.Goodfellow, eds.), John Wiley & Sons, pp. 115-175.

5) LARSEN N., OLSEN G.J., MAIDAK B.L., MCCAUGHEY M.J., OVERBEEK R., MACKE T.J., MARSH T.L., WOESE C.R. (1993) *The ribosomal database project.* Nucleic Acids Res. *21*, 3021-3023.

6) NEEFS J.M., VAN DE PEER Y., DE RIJK P., CHAPELLE S., DE WACHTER R. (1993) *Compilation of small ribosomal subunit RNA structures.* Nucleic Acids Res. *21*, 3025-3049.

7) WEISBURG W.G. (1989) *Polyphyletic origin of bacterial parasites.* In «Intracellular parasitism» (J. W. Moulder, ed.), CRC Press, pp 1-15.

8) ZARDA B., AMANN R., WALLNER G., SCHLEIFER K.H. (1991) *Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides.* J. Gen. Microbiol. *137*, 2823-2830.

C. ROSSETTI, A. TERUZZI, I. GILLI, P.A. MARTINO*

DETERMINAZIONE DELLA CARICA BATTERICA TOTALE NEL LATTE PER VIA AMPEROMETRICA

Dipartimento di Scienze Ambientali e del Territorio,
Facoltà di Scienze Ambientali, via Emanueli 15, Milano e
* Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,
via Celoria, 10 - 20133 Milano

RIASSUNTO

La possibilità di determinare la carica batterica totale, in un campione, per via amperometrica è già stata validata in diversi settori, quali quello industriale e ambientale.

Attualmente stiamo valutando la possibilità di applicare tale metodo anche nel campo alimentare, soprattutto nel settore lattiero caseario.

L'aspetto innovativo di tale determinazione è rappresentato dal fatto che la misura viene effettuata in tempi rapidi, nell'ordine di dieci minuti. Campioni che presentano un elevata carica batterica, come ad esempio lo yoghurt, possono essere analizzati direttamente, mentre campioni aventi una carica più bassa, come il latte, necessitano di una fase di incubazione a 37°C della durata di cinque ore.

La misura della carica batterica viene effettuata tramite un sensore amperometrico, i cui principali componenti sono la cella elettrochimica e il circuito fluido dinamico. All'interno della cella l'elettrodo di lavoro è mantenuto ad un valore di potenziale di +400 mV rispetto all'elettrodo di riferimento, costituito da un elettrodo in Ag/AgCl protetto da una membrana *cut-off*. La cella è inserita nel circuito fluido dinamico in cui una soluzione di mediatore è mantenuta nello stato di ossidazione. Il mediatore viene ridotto dall'interazione con il potere riducente interno dei batteri del campione, e poi riossidato all'elettrodo di lavoro della cella. In questo modo viene rilevata una corrente proporzionale al numero di batteri.

La sostanza utilizzata come *carrier* elettronico tra i batteri e la cella, definita genericamente mediatore, è una molecola liposolubile, il benzochinone (potenziale redox +400 mV), in grado di interagire con co-fattori batterici quali il NADH o il NADPH.

Parole chiave: latte - carica batterica - sensore amperometrico - DMSO.

DETERMINATION OF THE TOTAL BACTERIAL COUNT IN THE MILK BY AN AMPEROMETRIC SENSOR

SUMMARY

The possibility to determine the total bacterial charge in a sample, by using an amperometric sensor, has been validated in different fields, such as the industrial

and enviromental applications. At the present time we are evalueting the possibility to apply this method to the alimentary field, especially for what concerns the milk analysis. The innovation of the method is the quickness of the measurement, that could be done in ten minutes. Samples with a high bacterial contamination can be directly analysed, while samples with a low contamination, such as raw milk, require a preincubation time of 5 hours at 37°C.

The total bacterial count is carried out by an amperometric sensor whose main components are the electrochemical cell and the fluid dynamic circuit. The electrochemical cell contains a working electrode (syntherized graphite) and a reference electrode (Ag/AgCl). The cell is inserted in the circuit, where a mediator solution is kept in the oxidation state. The mediator is reduced by the interaction with the bacteria of the sample and oxidized again to the working electrode of the cell, giving an electrical signal proportional to the number of the bacteria.

Key words: milk - bacterial count - amperometric sensor - DMSO.

INTRODUZIONE

I metodi attualmente in uso per la determinazione della carica batterica totale nei diversi tipi di campione, si basano sulla capacità dei batteri di crescere su terreni colturali specifici sino a formare colonie visibili; questo comporta l'impossibilità di ottenere risultati prima di 24-48 ore.

Abbiamo sviluppato un sensore di tipo amperometrico in grado di effettuare la misura della carica batterica totale in pochi minuti; questa tecnologia è stata validata in diversi settori quali le acque superficiali e degli impianti di depurazione, gli olii lubrorefrigeranti, le acque utilizzate nella produzione della carta, i fermentatori (1,2). L'applicazione di questo sensore al settore lattiero caseario è in corso di sperimentazione: a differenza di altri tipi di campione, nel caso specifico del latte, i tempi necessari per ottenere i valori di conta risultano allungati da una fase di incubazione del campione antecedente l'analisi vera e propria.

MATERIALI E METODI

La misura della carica batterica viene effettuata mediante un sensore che utilizza un trasduttore amperometrico: questo misura la corrente, proporzionale al numero di batteri presenti nel campione, generata tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento di una cella elettrochimica. Il trasferimento elettronico avviene grazie ad un «mediatore»: questo è una sostanza liposolubile in grado di permeare attraverso le membrane cellulari e funzionare da trasportatore tra il potere riducente interno delle cellule batteriche e gli elettrodi della cella elettrochimica.

Gli elementi principali del sensore sono la cella elettrochimica e il circuito fluido dinamico (Fig.1). La cella di misura è costituita da un elettrodo di lavoro in grafite sinterizzata, mantenuto a + 400 mV rispetto all'elettrodo di riferimento in Ag/AgCl, protetto da una membrana *cut-off* di 80 Å. Tale cella è inserita in un circuito chiuso percorso dalla soluzione del mediatore; quest'ultima, mediante una multivalvola,

può essere convogliata sul ramo comprendente l'alloggiamento per un filtro su cui siano stati concentrati i batteri del campione, oppure su un ramo parallelo che serve per mantenere il mediatore allo stato ossidato. Quando il mediatore entra in contatto con i batteri trattenuti sul filtro, viene ridotto dal potere riducente interno a questi, ed è riossidato poi all'elettrodo di lavoro della cella, generando un segnale di corrente proporzionale al numero di batteri stessi.

È importante osservare che la risposta registrata può essere determinata non solo dai batteri, ma anche da altre sostanze, rimaste sul filtro, in grado di cedere elettroni al mediatore e generare quindi una risposta non differenziabile da quella prodotta dai batteri.

Per ovviare a ciò, si procede quindi ad una successiva misura di bianco sullo stesso campione, dopo che i batteri sono stati inattivati da una soluzione con attività biocidante. Questa seconda misura viene sottratta alla precedente per dare il valore netto della misura della carica batterica (3).

La procedura operativa prevede inizialmente una diluizione del campione di latte crudo con PCA liquido in rapporto 1:5, 1:10 e 1:50 e una fase di incubazione a 37°C per 5 h; successivamente si effettua la filtrazione di 1ml di campione attraverso il filtro che viene poi inserito nell'apposito alloggiamento dello strumento.

Nell'analisi finale dei dati viene tenuto conto delle diluizioni effettuate sul campione.

RISULTATI

Dal momento che la quantità di batteri necessaria per ottenere una risposta è di circa 107 batteri sul filtro, per poter applicare questa metodica all'analisi del latte, è stata introdotta la fase di incubazione del campione. In Fig. 2 sono riportati i risultati delle conte su Petrifilm effettuate prima e dopo la fase di incubazione: sull'asse delle x sono riportati i valori delle conte effettuate sui campioni di latte tal quale, sull'asse delle y il rapporto tra la conta batterica dopo 5 h e la conta sul latte tal quale. Successivamente lo stesso tipo di prova è stato eseguito su latte cui è stato precedentemente aggiunto il tensioattivo DMSO a concentrazioni diverse: in Fig. 3 sono riportati i risultati ottenuti utilizzando DMSO allo 0.5% v/v; in Fig. 4 i risultati relativi ad una concentrazione pari a 0.05% v/v.

In Fig. 5 sono illustrati i valori in μA ottenuti con il sensore analizzando campioni di latte incubati a 37°C per 5 h trattati con DMSO 0.05% v/v.

DISCUSSIONE

Il sensore amperometrico è già stato applicato in diversi settori caratterizzati dal presentare un'elevata contaminazione batterica. Per quanto riguarda l'analisi del latte è stato necessario introdurre una fase di incubazione del campione in modo che la carica batterica raggiungesse dei valori leggibili dallo strumento. Per prima cosa quindi abbiamo voluto verificare che il valore di carica batterica letto dopo 5 h fosse riconducibile al valore iniziale: per fare questo abbiamo confrontato il rapporto carica finale/carica iniziale rispetto alla carica iniziale. Come si vede dalla Fig. 2, non è stato riscontrato un andamento omogeneo tra tale rapporto e la carica

iniziale. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i batteri tendono ad aggregarsi nelle particelle di grasso, determinando una sottostima nella conta iniziale. Aggiungendo il tensioattivo DMSO 0.5% v/v (Fig. 3) il rapporto carica finale/carica iniziale cresce proporzionalmente al valore di carica iniziale nel range 10^4-10^7 U.F.C./ml; pertanto il DMSO sembra favorire la disgregazione delle particelle di grasso con conseguente miglioramento della sospensione delle cellule batteriche. Abbiamo anche rilevato che, in presenza di cariche maggiori di 107 U.F.C./ml, il rapporto carica finale/carica iniziale tende a diminuire probabilmente a causa di una minore disponibilità di substrati nutritizi che limita la crescita dei microorganismi.

Successivamente, nell'ipotesi che il DMSO allo 0.5% v/v potesse influire sulla risposta amperometrica sostenuta dai batteri, abbiamo ridotto tale concentrazione a 0.05% v/v, anche se la carica batterica iniziale aumenta in modo meno omogeneo nelle 5 ore di incubazione (Fig. 4).

Le analisi con il sensore amperometrico sono state eseguite in queste condizioni sperimentali (DMSO 0.05% v/v, 5 h di incubazione a 37°C) allo scopo di correlare la carica batterica iniziale, ottenuta con la conta in piastra, con i valori in μA. Con i primi campioni analizzati abbiamo ottenuto una retta avente equazione:

$$y(\mu A/ml) = 3.8\ 10\text{-}4x(ufc/ml) + 87.7 \qquad R = 0.69.$$ (Fig. 5)

Scopo della sperimentazione in corso è quello di definire una curva di correlazione μA - U.F.C./ml in modo da poter risalire, con i valori in μA ottenuti dall'analisi del campione, al valore in U.F.C./ml iniziale. In questo modo, dopo 5 ore, si potrebbe stabilire la lavorazione a cui deve essere sottoposto il campione di latte.

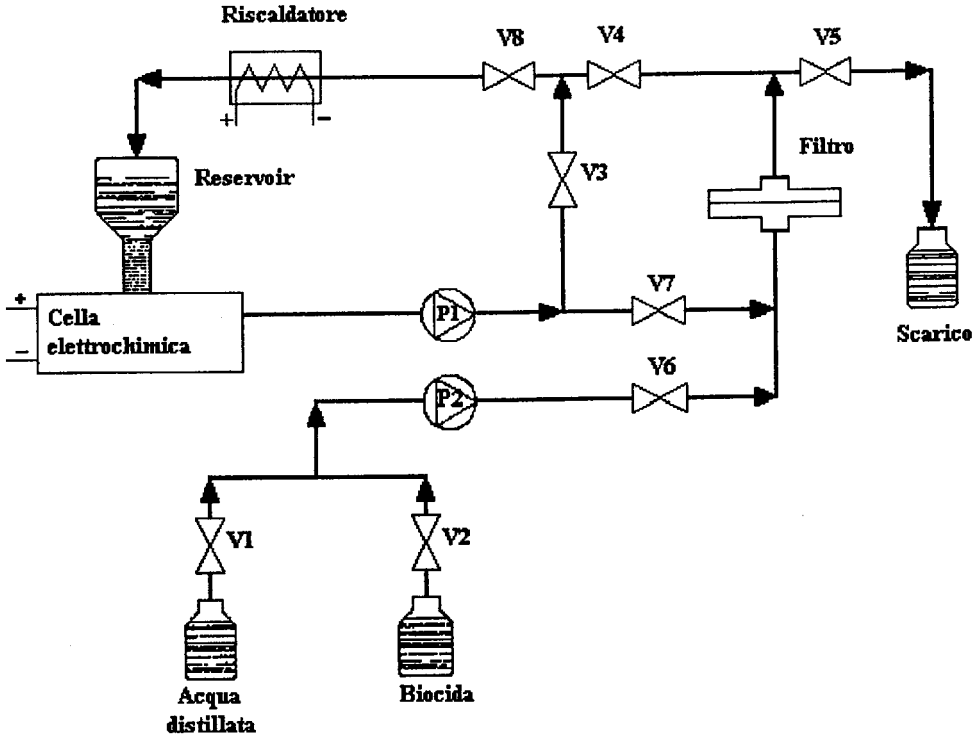


Figura 1 - Schema della cella elettrochimica e del circuito fluido dinamico.

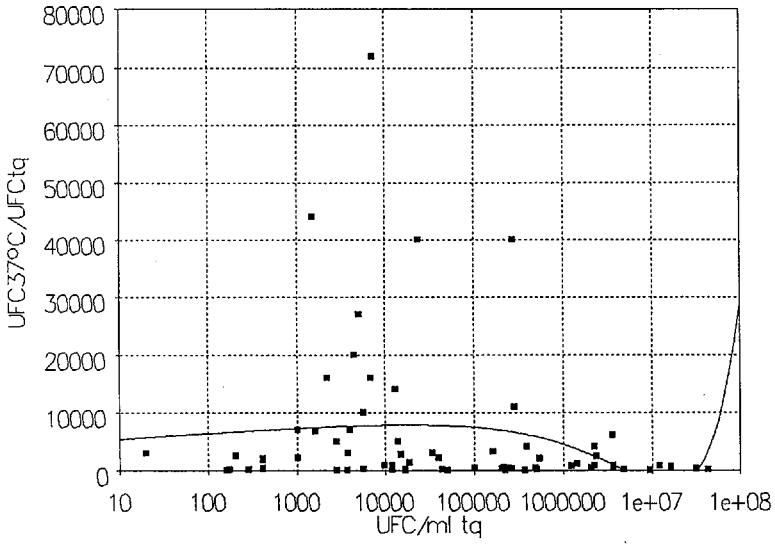


Figura 2 - Conte effettuate sul latte crudo prima e dopo la fase di incubazione: sull'asse delle x sono riportati i valori delle conte prima della fase di incubazione; sull'asse delle y il rapporto tra la conta batterica dopo 5h e la conta sul latte tal quale.

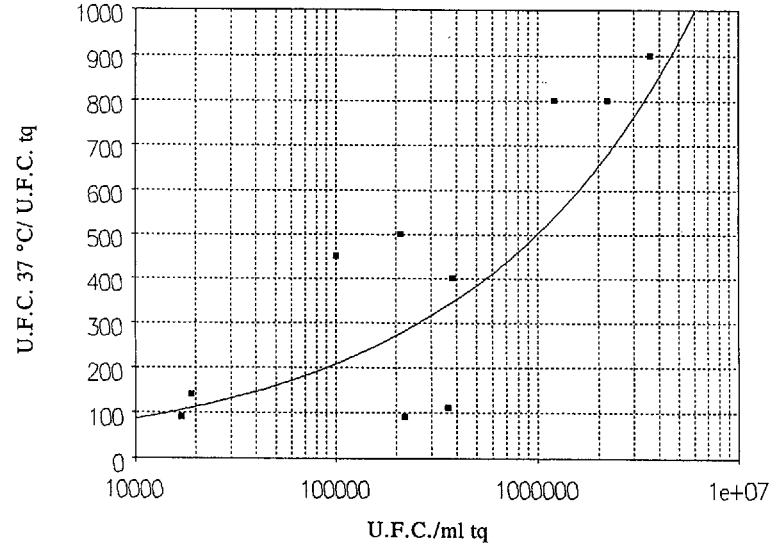


Figura 3 - Conte effettuate sul latte crudo prima e dopo la fase di incubazione con DMSO 0.5% v/v: sull'asse delle x sono riportati i valori delle conte prima della fase di incubazione; sull'asse delle y il rapporto tra la conta batterica dopo 5h e la conta sul latte tal quale.

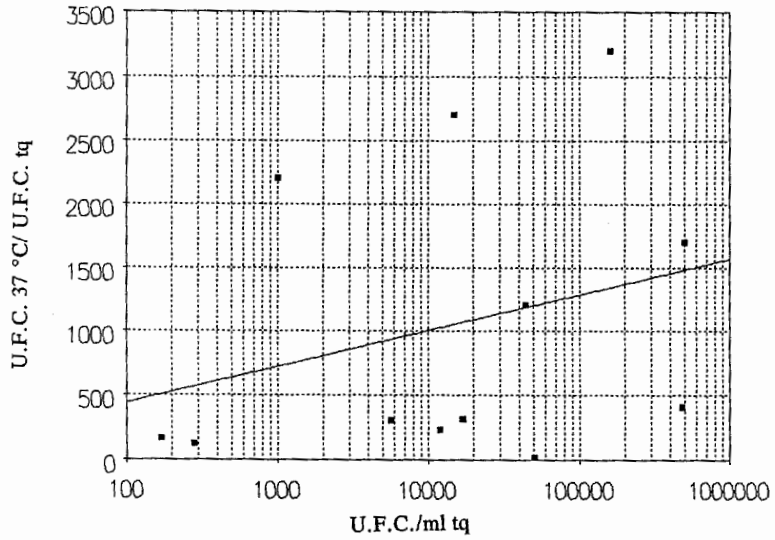


Figura 4 - Conte effettuate sul latte crudo prima e dopo la fase di incubazione con DMSO 0.05% v/v: sull'asse delle x sono riportati i valori delle conte prima della fase di incubazione; sull'asse delle y il rapporto tra la conta batterica dopo 5h e la conta sul latte tal quale.

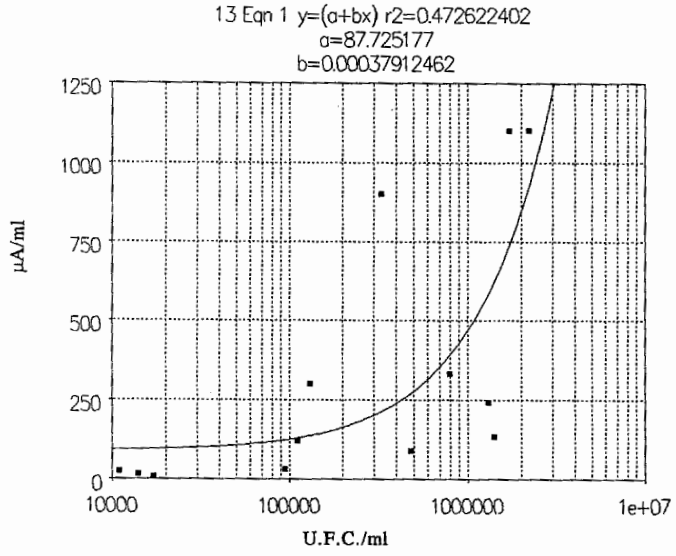


Figura 5 - Curva di correlazione tra la risposta in µA dello strumento, ottenuta da campioni di latte crudo incubati per 5h a 37°C con DMSO 0.05% v/v, e la conta in piastra effettuata sui campioni di latte tal quale.

BIBLIOGRAFIA

1) C. Rossetti, I. Gilli, A. Teruzzi, P. Martino (1994) *Determination of the total bacterial count in waste water treatment plants with a biosensor.* Life Chemistry Reports *10*, in press.

2) C. Rossetti, I. Gilli, A. Teruzzi, P. Martino (1994) *A new sensor for the rapid determination of the total bacterial charge in fluid sample.* Life Chemistry Reports *10*, in press.

3) C. Rossetti. *La tecnologia dei biosensori applicata alla determinazione della carica batterica.* Ed. Biosensori S.p.A.

II SESSIONE

BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA SANITÀ ANIMALE

Moderatori
G. Panina - A. Zanella

C. BERNERI, M. AMADORI, E. LODETTI,
M.R. OGGIONI*, M.R. MANGANELLI*, G. POZZI*

PROSPETTIVE PER L'USO IN MEDICINA VETERINARIA DI STREPTOCOCCHI COMMENSALI RICOMBINANTI COME VETTORI DI VACCINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, via A. Bianchi n. 7, 25124 Brescia e
* Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Biologia Molecolare,
Università di Siena, via Laterina, 53100 Siena

RIASSUNTO

In questa relazione ci proponiamo di discutere la possibile applicazione a problematiche di tipo veterinario di un nuovo approccio sviluppato nel campo dei vettori vivi di vaccini ricombinanti. È stato recentemente sviluppato un sistema genetico che consente l'espressione di antigeni eterologhi sulla superficie di streptococchi commensali. Questi batteri ricombinanti possono essere usati per colonizzare le superfici mucose di un ospite, al fine di indurre una risposta sistemica e locale contro gli antigeni eterologhi espressi sulla superficie batterica.

Parole chiave: batteri commensali, streptococchi, espressione di superficie, colonizzazione delle mucose, vaccini vivi ricombinanti

PROSPECTS FOR THE USE OF RECOMBINANT COMMENSAL STREPTOCOCCI AS VACCINE VECTORS IN VETERINARY MEDICINE

SUMMARY

In this work we aim at discussing a new approach to prophylaxis in veterinary medicine. This approach is based upon live vectors for recombinant vaccines. A genetic system was recently developed, which yields the expression of heterologous antigens on the surface of commensal streptococci. These recombinant bacteria can be used to colonize mucosal surfaces of animals, thus inducing systemic and local responses against the heterologous antigens expressed on the bacterial surface.

Key words: commensal bacteria - streptococci - surface expression - colonization of mucosal surfaces - live recombinant vaccines

INTRODUZIONE

Diversi sistemi batterici ricombinanti in grado di esprimere antigeni eterologhi sono stati proposti come potenziali vettori per vaccini vivi. *Salmonella* (1-11), *Esche-*

richia coli (12-15), *Vibrio cholerae* (16), *Mycobacterium bovis* BCG (15,17-19), *Streptococcus gordonii* (20-22), *Staphylococcus xylosus* (23,24) e *Lactococcus lactis* (25,26) possono infatti essere utilizzati per veicolare antigeni eterologhi al sistema immunitario dell'ospite. Questi vettori batterici non patogeni possono essere raggruppati essenzialmente nei gruppi (i) patogeni attenuati, (ii) batteri compatibili per uso alimentare e (iii) microrganismi commensali. L'approccio proposto prevede l'utilizzo di batteri Gram positivi commensali come vettori vivi per vaccini. Questi batteri, in grado di colonizzare le superfici mucose, possono essere ingegnerizzati per esprimere antigeni eterologhi ed andare ad occupare una nicchia nell'ecosistema microbico dell'ospite, stimolando una risposta immunitaria, soprattutto a livello delle mucose (20-22). Il modello batterico prescelto per la espressione degli antigeni eterologhi é quello dello *Streptococcus gordonii*, ceppo «Challis», un commensale della cavità orale umana naturalmente competente per la trasformazione genetica (27-29). La capacità di questo ceppo di colonizzare stabilmente la mucosa orofaringea del topo dopo una singola inoculazione intranasale rafforza la validità del modello. L'approccio alla manipolazione genetica degli streptococchi, e di altri batteri Gram positivi, é stato di integrare le molecole di DNA ricombinante nel cromosoma batterico (30-32). Ciò ha permesso la costruzione di ceppi ricombinanti stabili. La caratteristica principale del sistema proposto é che i costrutti genetici vengono ottenuti per ricombinazione in vivo.

ESPRESSIONE DI ANTIGENI ETEROLOGHI IN *S. GORDONII*

Il sistema genetico per la espressione di antigeni eterologhi sulla superficie di *S. gordonii* é basato sulla costruzione di una fusione genica traduzionale con il gene della proteina M6 (22,33,34). L'M6 é una proteina fibrillare di superficie di *Streptococcus pyogenes*, ancorata alla cellula batterica tramite la sua porzione C terminale (35). Le fusioni geniche vengono costruite in *Escherichia coli*, usando vettori plasmidici capaci poi di integrare i nuovi costrutti sul cromosoma di *S. gordonii*. I vettori ricombinanti di integrazione vengono quindi usati come donatori in esperimenti di trasformazione ove il ricevente è costituito da un ceppo di *S. gordonii* appropriatamente ingegnerizzato. Vengono quindi scelti quei trasformanti nei quali la fusione genica con la M6 é integrata a valle di un forte promotore cromosomico. Questo sistema é stato utilizzato per esprimere immunogeni eterologhi di differente grandezza (da 15 a 296 aminoacidi) da virus animali (HPV-1, HIV-1, FIV, morbillo), ed allergeni (Ag 5.2) dal veleno di vespa.

S. GORDONII COME VETTORE VIVO DI VACCINI

È stato definito un modello topo in cui il commensale umano *S. gordonii* é in grado di colonizzare la mucosa orofaringea del topo, inducendo nell'ospite una risposta sistemica e locale specifica per gli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti usati per la colonizzazione. I risultati ottenuti sotto questo aspetto possono essere così riassunti: (i) i topi possono essere colonizzati con un singolo inoculo intranasale/orale di *S. gordonii*; (ii) i ceppi ricombinanti non differi-

scono, per capacità di colonizzare, dal ceppo di campo; (iii) due mesi dopo l'inoculo i tamponi orofaringei dell'83.3% degli animali era ancora positivo per l'isolamento di *S. gordonii*; (iv) lo *S. gordonii* ricombinante isolato da tali tamponi é sempre risultato positivo per la espressione degli antigeni eterologhi; (v) i batteri ricombinanti responsabili della colonizzazione sono in grado di indurre una risposta sistemica. I sieri dei topi colonizzati sono infatti risultati positivi alla ricerca di IgG specifiche per le proteine eterologhe espresse; (vi) si sono repertate IgA specifiche sia nella saliva che nei lavaggi polmonari degli animali colonizzati; (vii) le risposte osservate sono state indotte dalla colonizzazione ad opera dei batteri vivi, in quanto l'inoculo di batteri morti non é stato in grado di indurre alcuna risposta.

CONSIDERAZIONI SULLE CARATTERISTICHE DEL SISTEMA

Dalla sia pur breve e schematica descrizione della linea di ricerca sviluppata, emergono alcuni punti innovativi di particolare interesse. Questi riguardano due principali aspetti: (a) strategia delle costruzioni genetiche; (b) scelta di batteri commensali come riceventi dei costrutti preparati.

Per quanto concerne al punto (a), 'ancorare' la nuova informazione genetica tramite la integrazione delle fusioni geniche sul cromosoma della cellula ricevente, consente di ottenere ceppi ricombinanti particolarmente stabili; la costruzione delle fusioni sulla base del gene della proteina M6 di *S. pyogenes*, oltre a fornire un valido *chaperon* per la espressione di superficie, conferisce al sistema una alta flessibilità di progettazione relativa alla varietà di antigeni che possono essere espressi; la costruzione di trasposoni coniugativi ricombinanti permette infine di sfruttare le proprietà di questi elementi genetici mobili per allargare lo spettro d'ospite a specie microbiche diverse, compresi quei microrganismi incapaci di trasformazione naturale.

Altrettanto importanti appaiono le implicazioni che comporta la scelta (b) di ingegnerizzare batteri commensali. Sulla base di quanto esposto precedentemente, la espressione in superficie degli antigeni eterologhi, la capacità dei batteri ricombinanti di colonizzare le mucose dell'ospite, la stabilità di questo evento nel tempo, le indicazioni sperimentali circa l'effettiva capacità di questi microrganismi di indurre una risposta immunitaria specifica contro gli antigeni eterologhi, insieme con la possibilità di trasferire le fusioni geniche in un ampio spettro di microrganismi riceventi, rendono le specie microbiche commensali ideali per la veicolazione di antigeni di interesse.

PROSPETTIVE PER VACCINI DI USO VETERINARIO

L'approfondimento delle conoscenze relative ai meccanismi di patogenicità dei microrganismi responsabili delle sintomatologie di rilievo, ed un'altrettanto rapida crescita nella comprensione delle dinamiche della risposta immunitaria (36-42), hanno permesso, nell'ultimo decennio, di ridisegnare strategie di profilassi più attuali. Di pari passo, la ricerca biotecnologica per lo sviluppo di presidi immunizzanti di tipo innovativo, capaci di conseguire gli obiettivi prefissati, ha risposto a queste nuove esigenze, proponendo diversi possibili approcci al problema della loro prepa-

razione. Nonostante l'enorme sforzo profuso in questo settore, i preparati che sono giunti alla fase di produzione commerciale sono in realtà ben pochi. Le ragioni principali di questo fatto possono essere imputate al sussistere di due problemi ancora irrisolti: (1) vaccini a subunità e/o sintetici: scarso potere immunogeno di molti dei preparati testati, i cui costi sono peraltro ancora elevati; (2) vaccini vivi deleti e/o ricombinanti: superamento di barriere sia etiche che scientifiche al rilascio nell'ambiente di microrganismi geneticamente modificati (43,44).

Se da un lato un approfondito studio per la identificazione di immunogeni protettivi (37,41,45,46), insieme con lo sviluppo di molecole *carrier* e/o di opportune sostanze adiuvanti (47-51), possono permettere di risolvere alcune limitazioni dell'approccio subunitario e/o sintetico, resta pur sempre attuale il problema dei costi comportati sia dalle strategie produttive che di applicazione in campo di prodotti di questo tipo.

Molto più interessanti appaiono invece le prospettive offerte dall'impiego di vaccini vivi. I vantaggi e gli svantaggi correlati con l'uso di vaccini vivi sono ben noti, sia dal punto di vista immunologico che di utilizzo applicativo. Gli approcci alla progettazione e produzione di questi vaccini sono sostanzialmente di due tipi. Il più vecchio si basa sull'uso di microrganismi a patogenicità attenuata, e si fonda sulle esperienze condotte da Pasteur, poi sviluppate ed «aggiornate», grazie alle tecniche di manipolazione degli acidi nucleici, che hanno portato allo sviluppo di vaccini vivi deleti e/o metabolicamente attenuati; il secondo prevede la costruzione di sistemi vivi di espressione di proteine eterologhe, ove i ceppi microbici ricombinanti costituiscono vettori vivi per vaccini.

Nel primo caso si tratta per lo più di agenti patogeni che, naturalmente o per intervento biotecnologico, presentano patogenicità attenuata nei confronti delle specie ospite (36,37,52). Il maggiore problema per il loro utilizzo in campo é legato alla possibile rivirulentazione dei ceppi vaccinali in seguito a complementazioni geniche (36,37,52).

Nel secondo caso, invece, il vettore vaccinale é costituito da un microorganismo di per sé apatogeno, in grado di produrre immunogeni eterologhi riferibili all'agente(i) eziologico della malattia contro cui si vaccina. Appare cruciale, in questo caso, la scelta del microrganismo da ingegnerizzare; tale tipo di strategia, oggi tecnicamente percorribile grazie alle conoscenze acquisite sui meccanismi di ricombinazione e di scambio genico, rende disponibili alle manipolazioni genetiche un ampio spettro di specie microbiche.

Lo studio per la ingegnerizzazione di batteri commensali comporta interessanti implicazioni in campo veterinario per lo sviluppo di vettori vaccinali di questo tipo. A fronte della totale assenza di patogenicità residua, infatti, microrganismi ricombinanti in grado di colonizzare le mucose dell'ospite costituiscono un prodotto immunizzante che ben si adatta alle specifiche esigenze della profilassi veterinaria (52).

Le ricerche qui sommariamente descritte sono state finanziate in parte dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (P.F. Ingegneria Genetica), e dall'Istituto Superiore di Sanità (Progetto AIDS), e dalla European Economic Community (Biotechnology).

BIBLIOGRAFIA

1) CARDENAS L. AND J.D. CLEMENTS (1993) *Development of mucosal protection against heat-stable enterotoxin (ST) of Escherichia coli by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector.* Infect. Immun. *61*, 4629-4636.

2) CARDENAS L. AND J.D. CLEMENTS (1993) *Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors.* Vaccine *11*, 126-135.

3) CHARBIT A., P. MARTINEAU, J. RONCO, C. LECLERC, R. LO-MAN, V. MIRCHELL, D O'CALLAGHAN, AND M. HOFNUNG (1993) *Expression and immunogenicity of the V3 loop from the envelope of human immunodeficiency virus type 1 in an attenuated aroA strain of Salmonella typhimurium upon genetic coupling to two Escherichia coli proteins.* Vaccine *11*, 1221-1228.

4) CHATFIELD S.N., I.G. CHARLES, A.J. MAKOFF, M.D. OXER, G. DOUGAN, D. PICKARD, D. SLATER, AND N.F. FAIRWHEATER (1992) *Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous in Salmonella oral vaccine strains: development of single-dose oral tetanus vaccine.* Bio/Technology *10*, 888-892.

5) DOGGETT T.A. (1992) *Attenuated Salmonella as delivery systems for mucosal vaccine.* Vaccine Research *1*, 249-256.

6) DOGGETT T.A., E.K. JAGUSZT-KRYNICKA, AND R. CURTISS, III. (1993) Immune response to Streptococcus sobrinus surface protein antigen A expressed by recombinant Salmonella typhimurium. Infect. Immun. *61*, 1859-1866.

7) DOUGAN G., C.E. HORMAECHE, AND D.J. MASKELL (1987) *Live oral salmonella vaccines: Potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system.* Parasite Immunol. *9*, 151-160.

8) FAIRWEATHER N.F., S.N. CHATFIELD, A.J. MAKOFF, R.A. STRUGNELL, J. BESTER, D.J. MASKELL, AND G. DOUGAN. (1990) *Oral vaccination of mice against tetanus by use of live attenuated Salmonella carrier.* Infect. Immun. *58*, 1323.

9) HACKETT J. (1992) SALMONELLA-BASED VACCINES. Vaccine *8*, 5-11.

10) NEWTON S.M.C., C.O. JACOB, AND B.A.D. STOCKER. (1989) *Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin expression and live-vaccine potential.* Science *244*, 70.

11) POIRIER T.P., M.A. KEHOE, AND E.H. BEACHEY (1988) *Protective immunity evoced by oral administration of attenuated aroA Salmonella typhimurium expressing cloned streptococcal M protein.* J. Exp. Med. *168*, 25-32.

12) CHARBIT A., A. MOLLA, J. RONCO, J.M. CLEMENT, V. FAVIER, E.M. BAHRAOUI, L. MONTAGNIER, A. LEGUERN, AND M. HOFNUNG (1990) *Immunogenicity and antigenicity of conserved peptides from the envelope of HIV-1 expressed at the surface of recombinant bacteria.* AIDS *4*, 545-551.

13) CHARBIT A., E. SOBCZAK, M.L. MICHEL, A. MOLLA, P. TIOLLAIS, AND M. HOFNUNG (1987) *Presentation of two peptides of the preS2 region of Hepatitis B virus on live recombinant bacteria.* J. Immunol. *139*, 1658-1664.

14) LECLERC C., A. CHARBITT, A. MOLLA, AND M. HOFNUNG (1989) *Antibody response to a foreign epitope expressed on the surface of recombinant bacteria: importance of the route of immunization.* Vaccine *7*, 242-248.

15) WINTER, N., M. LAGRANDERIE, J. RAUZIER, J. TIMM, C. LECLERC, B. GUY, M.P. KIENY, M. GHEORGHIU, AND B. GICQUEL (1991). Expression of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. Gene *109*, 47-54.

16) BUTTERTON J.R., S.A. BOYKO, AND S.B. CALDERWOOD (1993) *Use of the Vibrio cholerae irgA gene as a locus for insertion and expression of heterologous antigens in cholerae vaccine strains.* Vaccine *11*, 1327-1335.

17) CONNELL N.D., E. MEDINA-ACOSTA, W.R. MCMASTER, B.R. BLOOM, AND D.G. RUSSEL (1993) *Effective immunization against leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-*

Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 11473-11477.

18) LAGRANDERIE M., A. MURRAY, B. GICQUEL, C. LECLERC, AND M. GHEORGHIU (1993) *Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen.* Vaccine *11*, 1283-1290.

19) STOVER, C.K., V.F. DE LACRUZ, T.R. FUERST, J.E. BURLEIN, L.A. BENSON, L.T. BENNETT, G.P. BANSAL, J. YOUNG, F.M.H. LEE, G.F. HATFULL, S.B. SNAPPER, R.G. BARLETTA, W.R. JACOBS JR., AND B.R. BLOOM (1991) *New use of BCG for recombinant vaccines.* Nature *351*, 456-460.

20) FISCHETTI V.A., D. MEDAGLINI, M.R. OGGIONI, AND G. POZZI (1993) *Expression of foreign proteins on Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery.* Curr. Op. Biotech. *4*, 603-610.

21) POZZI G. (1992) *Streptococci as live vectors of recombinant vaccines, p. 197-199.* In G. Orefici (ed.), New perspectives on Streptococci and Streptococcal infections. Zbl. Bakt. Suppl. 22 Gustav Fisher, Stuttgart.

22) POZZI G., M. CONTORNI, M.R. OGGIONI, R. MANGANELLI, M. TOMMASINO, F. CAVALIERI, AND V.A. FISCHETTI (1992) *Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci.* Infect. Immun. *60*, 1902-1907.

23) HANSSON M., S. STAHL, T.N. NGUYEN, T. BACHI, A. ROBERT, H. BINZ, A. SJOLANDER, AND M. UHLEN (1992) *Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium Staphilococcus xilosus.* J. Bacteriol. *174*, 4239-4245.

24) NGUYEN T.N., M. HANSSON, S. STAHL, T. BACHI, A. ROBERT, W. DOMZIG, H. BINZ, AND M. UHLEN (1993) *Cell-surface display of heterologous epitopes on Staphilococcus xilosus as a potential delivery system for oral vaccination. Gene 128*, 89-94.

25) WELLS J.M., P.W. WILSON, P.M. NORTON, M.J. GASSON, AND R.W.F. LEPAGE (1993). *Lactococcus lactis: high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge.* Mol. Microbiol. *8*: 1155-1162.

26) WELLS, J.M., P.W. WILSON, P.M. NORTON,AND R.W.F. LEPAGE (1993) *A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in Lactococcus Lactis.* Appl. Environ. Microbiol. *59*, 3954-3959.

27) MACRINA F.L., P.H. WOOD, AND K.R. JONES (1980) *Genetic transformation of Streptococcus sanguis (Challis), with criptic plasmids from Streptococcus ferus.* Infect. Immun. *28*, 692-697.

28) PAKULA R., Z. FLUDER, E. HULANIKA, AND W. WALCZAK (1958) *Studies on transformation of streptococci.* Bull. Acad. Polon. Sci. ser. Sci. Biol. *6*, 319-323.

29) POZZI G., R. A. MUSMANNO, P.M.J. LIEVENS, M.R. OGGIONI, P. PLEVANI, AND R. MANGANELLI (1990) *Method and parameters for genetic transformation of Streptococcus sanguis.* Res. Microbiol. *141*, 659-670.

30) POZZI G., AND W.R. GUILD (1985) *Modes of integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of Streptococcus pneumoniae.* J. Bacteriol. *161*, 909-912.

31) POZZI G., R.A. MUSMANNO, E.A. RENZONI, M.R. OGGIONI, AND M.G. CUSI (1988) *Host-vector system for integration of recombinant DNA into chromosomes of transformable and nontransformable streptococci.* J. Bacteriol. *170*, 1969-1972.

32) POZZI G., M.R. OGGIONI, R. MANGANELLI, AND P. PLEVANI (1991) *Genetic manipulation of streptococci by chromosomal integration of recombinant DNA, p. 59-61.* In G.M. Dunny , P.P. Cleary and L.L. McKay (eds.), Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci. American Society for Microbiology, Washington, DC..

33) OGGIONI M.R., D. MEDAGLINI, M CONTORNI, F. CAVALIERI, AND G. POZZI (1993) *Expression of fusion proteins in the naturally transformable Streptococcus gordonii (Streptococcus sanguis) Challis*, p. 235-240. In E. Balla, G. Berencsi, and A. Szentirmai (eds.), DNA Transfer and Gene Expression in Microorganisms. Intercept Ltd., Andover.

34) Pozzi G., M.R. Oggioni, R. Manganelli, D. Medaglini, V.A. Fischetti, D. Fenoglio, M.T. Valle, A. Knunkl, and F. Manca (1994) *Recognition by human T helper cells of an immunodominant epitope of HIV-1 gp120 expressed on the surface of Streptococcus gordonii.* Vaccine, in press.

35) Fischetti V.A., V. Pancholi, and O. Schneewind (1990) *Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins of Gram-positive cocci.* Mol. Microbiol. *4*, 1603-1605.

36) Norrby E. (1983) *Viral vaccines: the use of currently avalaible products and future developments.* Arch. Virol. *76*, 163-177.

37) Norrby E. (1987) *Towards new viral vaccines for man.* Adv. Virus Res. *32*, 1-34.

38) Brown F. (1984) *Syntetic viral vaccines.* Annu. Rev. Microbiol. *38*, 221-235.

39) Winther M.D., G. Dougan (1984) *The impact of new technologies on vaccine development.* Biotechnol. Genet. Eng. Rev. *2*, 1-39.

40) Mitchell G.F. (1988) *The way ahead for vaccines and vaccination: symposium summary.* Vaccine *6*, 200-205.

41) Biggs P.M. (1990) *Vaccines and vaccination - past, present and future.* Br. Poult. Sci. 31, 3-22.

42) Wray C., M.J. Woordward (1990) *Biotechnology and veterinary science: production of veterinary vaccines.* Rev. Sci. Tec. OIE *9 (3)*, 779-794.

43) Joseph P.I., D.A. Espeseth, G.P. Shibley, C.G. Gay (1988) *Environmental consideration for field testing and licensing of live genetically-engineered veterinary biologics.* Rev. Sci. Tec. OIE *7 (2)*, 285-291.

44) Glosser J.W. (1988) *Regulation and application of biotechnology products for use in veterinary medicine.* Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epiz. *7 (2)*: 223-237.

45) Hilleman M.R. (1985) *Newer directions in vaccine development and utilization.* J. Infect. Dis. 151 (3), 407-419.

46) Hopp T.P. (1986) *Protein surface analysis. Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites.* J. Immunol. Methods. *88*, 1-18.

47) Altman A., F.J. Dixon (1989) *Immunomodifiers in vaccines.* In Bittle J.L., F.A. Murphy (eds.). Vaccine biotechnology. S. Diego. Acad. Press 301-343. (Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 33).

48) Audibert F. (1986) *Carriers and adjuvants for the development of syntetic vaccines.* Ann. Inst. Pasteur Virol. *137e*, 514-518.

49) Chedid L., C. Carelli, and F. Audibert (1986) *Use of adjuvants, antigens, and carriers in syntetic veterinary vaccines.* p. 51-58. In Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics. R.M.Nervig, P.M. Gough, M.L. Kaeberle, C.A. Whetstone (eds). The Iowa State University Press. Ames, Iowa.

50) Garcon N.M.J., and R. Six Howard (1991) *Universal vaccine carrier: Liposomes that provide T-dependent help to weak antigens.* J. Immunol. *146 (11)*, 3697-3702.

51) Etlinger H.M., and R. Knorr. (1991) *Model using a peptide with carrier function for vaccination against different pathogens.* Vaccine 9, 512-514.

52) Pellerin J.L. (1991) *Evolution des vaccins veterinaires: 1ere partie.* Le Point Veterinaire *23 (140)*, 65-75.

M. LONGERI, M. POLLI, C. RIVOLTA, G. CERIOTTI, M. ZANOTTI

GENI DI ISTOCOMPATIBILITA' DI CLASSE II ED EFFETTO NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DI MYCOBACTERIUM BOVIS

Istituto di Zootecnica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

47 vitelli di razza Frisona sono stati sensibilizzati con una sospensione di *M. bovis* ucciso e tipizzati per il polimorfismo delle regioni MHC BoLA-A (test di microlinfocitotossicità) e BoLA-D (RFLP). Per la valutazione della risposta immunitaria agli antigeni di *M. bovis* sono stati utilizzati i test di proliferazione linfocitaria e di attività fagocitaria.

Tra le due regioni MHC è stata evidenziata una stretta associazione e i dati relativi all'effetto del loro polimorfismo sulla linfoproliferazione *in vitro* sono concordanti. In particolare si è registato un effetto significativo e positivo degli aplotipi 18A (BoLA-D) e A10 (BoLA-A), in stretto *linkage*, sul parametro considerato.

Un'analisi più approfondita dei dati ottenuti ha confermato il maggior coinvolgimento degli antigeni di classe II, rispetto a quelli di classe I nella risposta immunitaria cellulo mediata a *M. bovis*.

Parole chiave: istocompatibilità, resistenza alle malattie, tubercolosi bovina.

CLASS II HYSTOCOMPATIBILITY GENES AND EFFECT ON IMMUNE RESPONSE TO MYCOBACTERIUM BOVIS

SUMMARY

47 Holstein Friesian calves have been sensitized with a suspension of killed *Mycobacterium bovis* and typed for BoLA-A (microlymphocytotoxicity test) and BoLA-D (RFLPs) MHC polymorphism. To evaluate the immuno response to *M. bovis* Lymphocyte Stimulation and Phagocytic Activity tests have been performed.

A strong *linkage* has been found between the two regions and data on their effect on immuno response are in agreement. A positive and significative effect of A10 (BoLA-A) and 18A (BoLA-D), closely linked together, on lymphocyte proliferation has been found. By a comparison of the data, class II polymorphism has a stronger effect than class I in cell mediated immuno response to *M. bovis*.

Key words: histocompatibility, disease resistance, bovine tuberculosis

INTRODUZIONE

L'eradicazione della tubercolosi bovina in Italia è ancora un problema attuale, in quanto, soprattutto al nord, esistono molti focolai attivi che determinano delle considerevoli perdite economiche, sia per i danni dovuti all'infezione, sia per i costi di eradicazione.

Una certa suscettibilità di tipo genetico per gli antigeni dei Micobatteri è stata segnalata per l'uomo, il topo e i polli. (1,2,3). In particolare è stata dimostrata un'influenza del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) (4) e degli antigeni HLA-DR (5) sulla patogenesi, sull'evoluzione e sulla suscettibilità a diverse forme di Lebbra e di Tubercolosi nell'uomo.

Negli animali domestici non sono disponibili dati al riguardo. Karakoz e coll. (3) hanno identificato nel pollo una differenza nella suscettibilità al test tubercolinico influenzata da geni del locus B di istocompatibilità.

L'identificazione di marcatori genetici capaci di conferire una migliore difesa immunitaria nei confronti di questa patologia potrebbe essere di fondamentale importanza per l'eradicazione della tubercolosi bovina e per poter selezionare animali più resistenti immunologicamente. Dal momento che il Complesso Maggiore di Istocompatibilità si è dimostrato di fondamentale importanza per i processi immunitari, ed in particolare per la presentazione ai linfociti T degli antigeni estranei, abbiamo voluto studiare nel bovino l'effetto degli antigeni di istocompatibilità nei riguardi della risposta immunitaria a *M. bovis*. Abbiamo pertanto analizzato gli antigeni di Istocompatibilità di classe I e di classe II in un campione di vitelli sensibilizzati sperimentalmente con *M. bovis*, ed abbiamo valutato l'efficienza immunitaria specifica come proliferazione linfocitaria e attività fagocitaria.

MATERIALI E METODI

Animali

47 vitelli di razza Frisona, non imparentati, allevati nelle medesime condizioni ambientali in un unico allevamento, tutti di sesso maschile e della stessa età sono stati scelti in base all'aplotipo BoLA di classe I per la sensibilizzazione. Nel campione erano rappresentati uniformemente 9 degli aplotipi più frequenti.

Tipizzazione degli antigeni di istocompatibilità

Gli antigeni di classe I sono stati determinati prima della sensibilizzazione su campioni di sangue periferico mediante il test di microlinfocitotossicità (6) usando un pannello di 95 reagenti capace di identificare 20 specificità antigeniche riconosciute internazionalmente. (A2, A3, A5, A6, A6.18, A6.19, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A20, A21, A22, A30, A34). I reagenti sono stati prodotti in parte mediante sieri di primipare opportunamente purificati, in parte mediante appositi impianti di cute.

Gli aplotipi di classe II sono stati identificati mediante la tecnica degli RFLP. Il DNA genomico è stato estratto da linfociti di sangue periferico e digerito con

gli enzimi di restrizione TaqI e PvuII. I frammenti sono stati separati su gel di agarosio e trasferiti mediante *Southern-blot* su filtri di *nylon*. Successivamente è stata effettuata l'ibridizzazione con le sonde molecolari specifiche per i loci DQA, DQB e DRB (7,8).

Sensibilizzazione immunitaria

I vitelli sono stati sensibilizzati all'età di 10 settimane con una sospensione di *M. bovis* ucciso al calore, per via sottocutanea nella regione della giogaia per due volte a giorni alterni (10).

Test immunitari

La proliferazione linfocitaria è stata valutata *in vitro* usando mononucleati da sangue periferico prelevato in ACD a 21 giorni dalla stimolazione e stimolando con PPD bovina proveniente dallo stesso ceppo usato per la sensibilizzazione. Dopo 4 giorni di incubazione in atmosfera di CO2 alle colture è stato aggiunto 5-*125*-iododesossiuridina trifosfato e dopo 8 ore le cellule sono state raccolte su filtro e l'emanazione del radioattivo incorporato contato al *counter*. I dati sono espressi come indice di stimolazione: (IS = c.p.m. campione stimolato/c.p.m. controllo negativo).

L'attività fagocitaria dei mononucleati è stata effettuata sia prima che a 21 giorni dalla stimolazione utilizzando un kit commerciale Phagotest (ORPEGEN) con corpi uccisi di *Mycobacterium bovis* coniugati con isotiocianato di fluorescina. La lettura delle cellule fagocitanti è stata effettuata al citofluorimetro con un sistema di analisi computerizzato. I dati sono espressi come % di cellule fagocitanti sul totale dei PBM.

Analisi statistica

Le medie, le deviazioni *standard* ed i coefficienti di variabilità dei diversi parametri immunitari in base ai gruppi genetici sono stati calcolati utilizzando la procedura MEAN del pacchetto SAS (9). L'effetto dei singoli aplotipi BoLA sui parametri immunitari è stato valutato mediante la procedura REG del pacchetto SAS, ponendo come condizione che la somma di tutti i coefficienti di regressione fosse = 0. Per la fagocitosi i dati prima della stimolazione sono stati posti come covariata. In questo modo sono stati valutati gli effetti dei singoli aplotipi BoLA sui parametri considerati rispetto alla media del campione.

RISULTATI

Nel campione si sono identificati 9 aplotipi di classe I (A6, A10, A11, A14, A15, A16, A19, A26, A30). Per la classe II è stata evidenziata una maggiore variabilità. In particolare sia per la sottoregione DQA che per la sottoregione DQB sono stati evidenziati 20 aplotipi, mentre per la sottoregione DRB ne sono stati evidenziati 22. È stato possibile definire tra le specificità di queste tre sottoregioni i gruppi di *linkage* (DH) tra cui 13 riconosciuti a livello internazionale (tabella 1).

Analizzando il linkage tra BoLA-A e BoLA-D sono stati definiti 11 aplotipi di cui 9 riconosciuti internazionalmente (11).

La media e la deviazione *standard* dell'I.S. e della fagocitosi sono risultate rispettivamente 10.5813.01 e 28.836.21.

Tra i diversi antigeni di classe I (BoLA-A) solo A10 ha mostrato un effetto significativo e positivo in risposta alla proliferazione, mentre A11 ha mostrato un effetto negativo e significativo sulla fagocitosi (grafico 1).

Il polimorfismo di classe II (BoLA-D) ha confermato i dati della classe I. L'aplotipo DH-18A, che normalmente è in *linkage* con A10, è risultato significativo e positivo per la proliferazione. Oltre a questo influisce negativamente e significativamente sulla proliferazione linfocitaria il DH-15B, mentre 22B e 24A influiscono negativamente sulla fagocitosi (grafico 2). In entrambi i test, per le sottoregioni DQA e DQB risultano significativi gli alleli che fanno parte degli stessi DH. Per la sottoregione DRB, dove nel DH-18A esistono due alleli 5C e 5B, sull'I.S. solo l'allele 5C presenta un effetto positivo e altamente significativo uguale a più di tre deviazioni *standard* del parametro considerato (grafico 3).

DISCUSSIONE

Il polimorfismo del Complesso Maggiore di Istocompatibilità pare influire in modo significativo sulla risposta immunitaria cellulo-mediata alla stimolazione con *M. bovis*. L'effetto degli antigeni di istocompatibilità di classe I viene confermato da quello degli aplotipi di classe II, come del resto ci si aspettava dato il *linkage disequilibrium* esistente tra queste due regioni. Per la proliferazione linfocitaria gli antigeni A10 (BoLA-A di classe I) e 18A (BoLA-D di classe II) sembrano determinare una più vivace reattività. L'effetto maggiore è stato stimato per la regione D ed in particolare per la sottoregione DRB tanto che si può pensare che questo locus codifichi per un gene maggiore e che sia particolarmente coinvolto nella presentazione dell'antigene per la risposta proliferativa. Per quanto riguarda la fagocitosi i dati di classe I confermano solo in parte quelli di classe II. Ciò può essere dovuto ai differenti gruppi di *linkage*: il DH-24A è in *linkage* sia con l'allele A11 che con l'allele A19 di classe I; il DH-22B invece è in *linkage* con l'allele A15 di classe I, che non è risultato significativo probabilmente perchè compare anche in molti altri gruppi di *linkage* DH. Analogamente non abbiamo segnalato alcuna significatività per l'allele DRB-11A, che fa parte del DH-22B, perchè compare anche in molti altri aplotipi.

Anche in questo caso la stima dell'effetto sulla proliferazione degli antigeni di classe II è superiore a quella degli antigeni di classe I, per cui possiamo affermare un maggior coinvolgimento delle molecole di classe II nel favorire o, come nel nostro caso, sfavorire l'attività fagocitaria.

L'approfondimento di questi studi permetterà di dare maggior consistenza all'ipotesi di aver identificato un gene maggiore per la resistenza alle malattie che possa aiutare a migliorare l'efficienza immunitaria nelle nostre popolazioni animali.

Si ringraziano la Dott.ssa Mara Rocchi e la Prof.ssa Wilma Ponti dell'Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano per aver effettuato il test di valutazione dell'attività fagocitaria

Lavoro eseguito con un contributo del CNR, nell'ambito del PF RAISA, sottoprogetto 3, pubblicazione n° 1662.

Tabella 1 - Aplotipi di classe II (RFLP): Gruppi di linkage internazionalmente riconosciuti (DH*) e identificati per la prima volta (MI).

DH	DQA	DQB	DRB	Classe I
* 22C	11A	11A	11A/M5	A18
* 16A	11A	11C	11A	A12/A26
MI 1	11B	11D/E	11A	
* 7A	2	2	2A	A16/A19
* 11A	3A	3A	1G/3D	A14
MI 3	3B	3B	3H	
* 22A	3C	3C	3I	A32
* 28A	7A	7A	7A	A9
MI 4	13A	13A	13A	
* 18A	5	5	5B	A10
* 18A	5	5	5C	A10
* 22B	9B	9B	11A	A15
* 11C	9A	9A	9B	A30
* 3A	10	10	10	A10/A15
MI 5	6A	6A	6/1G	
* 24A	1A	1	1A	A19/A11
* 15B	1E	1	1E	A32
* 27A	1B	1	1B	A16
Tot. 18				

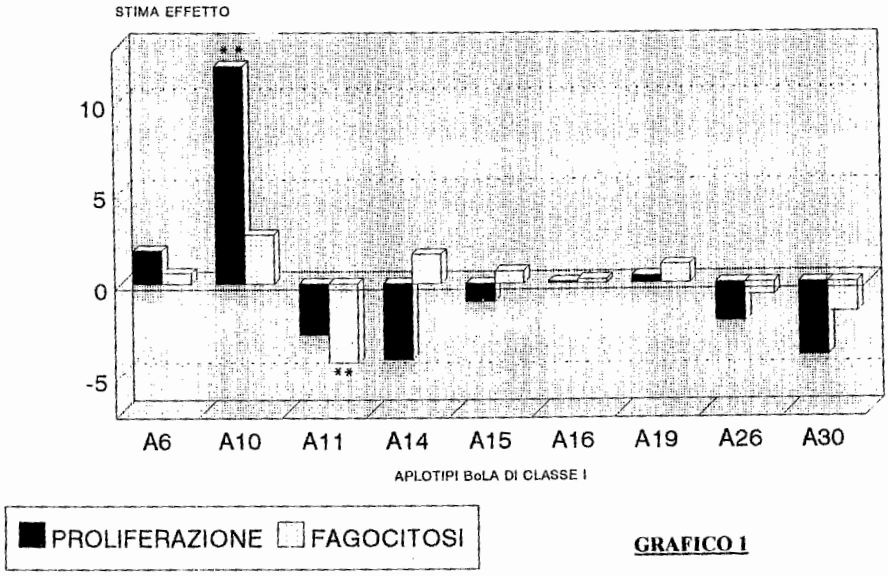


Grafico 1: Proliferazione linfocitaria e attività fagocitaria dopo stimolazione con PPDbv; stima dell'effetto degli aplotipi BoLA di classe I.

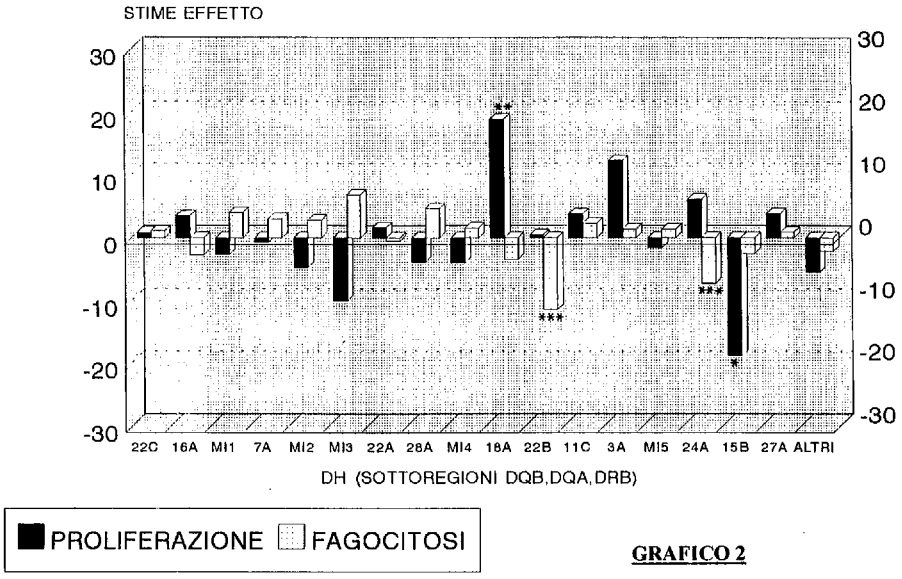


GRAFICO 2

Grafico 2: Proliferazione linfocitaria e attività fagocitaria dopo stimolazione con PPDbv; stima dell'effetto degli aplotipi (DH) BoLA di classe II.

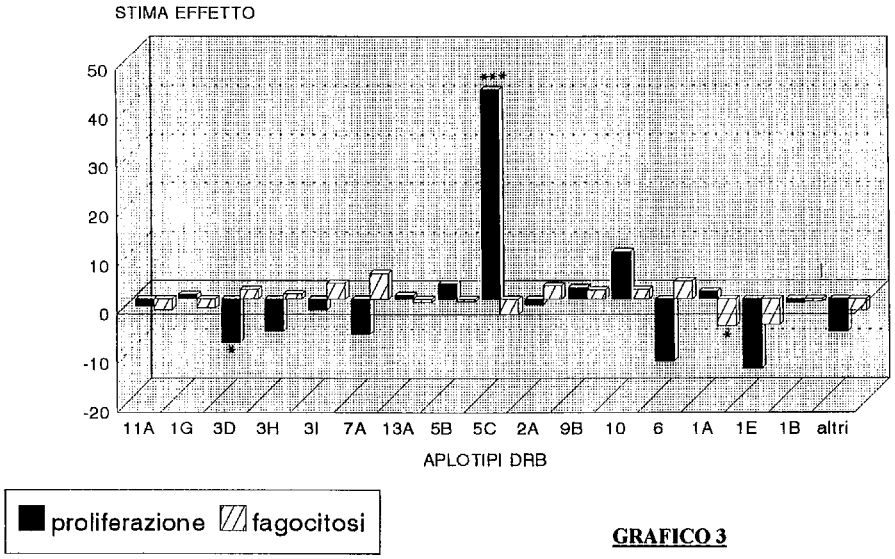


GRAFICO 3

Grafico 3: Proliferazione linfocitaria e attività fagocitaria dopo stimolazione con PPDbv; stima dell'effetto degli aplotipi BoLA di classe II, sottoregione DRB.

BIBLIOGRAFIA

1) Buschman E., Apt A.S., Nickonenko B.V., Moroz A.M., Averbakh M.M., Skamene E. (1988) *Genetic aspects of innate resistance and acquired immunity to Mycobacteria in inbred mice.* In: Immunology of Mycobacterial disease . P.J. Lachmann, J. Ivanji, eds Springer Semin. Immunopath. *10*, 319-336.

2) Zwilling B.S. (1989) *MHC class II glycoprotein expression and resistance to Mycobacterial growth.* Res. Immunol. *140*, 806-809.

3) Karakoz I., Krejci J., Hala K., Blaszczyk B., Hraba T., Pekarek J. (1974) *Genetic determination of tuberculin hypersensitivity in chicken inbred lines.* Eur. J. Immunol. *4*, 545-548.

4) De Vries R.R.P. (1989) *Biological significance of the MHC.* In: *Improving genetic disease resistance in farm animals.* A.J. Van Der Zijpp, W. Sybesma eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 6-12.

5) Van Schooten W.C.A., Elferik D.G., Van Embden J., Anderson D.C., De Vries R.R.P. (1989) *DR3 restricted T cells from different HLA-DR3 positive individuals recognize the same peptide of the Mycobacterial 65-kDa heat-shock protein.* Eur. J. Immunol. *19*, 2075-2079.

6) Spooner R.L., Oliver R.A., Sales D.L. (1979) *Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes.* Anim. Blood Groups Biochem. Genet. *10* ,63-86.

7) Mariani P., Rivolta C., Polli M., Zanotti Casati M. (1992) *Tipizzazione di tori di razza Frisona Italiana per gli antigeni di istocompatibilità di classe II.* Atti SISVet *46*, 1653- 1657.

8) Sigurdardottir S., Mariani P., Groenen M.A.M., Van Der Poel J.J., Andersson L. (1991) *Organization and polymorphism of bovine Major Histocompatibility Complex class II genes as revealed by genomic hybridization with bovine probes.* Animal Genetics *22*, 465-475.

9) Sas Institute Inc. (1987) Cary, NC, USA.

10) Longeri M., Zanotti M., Paltrinieri S., Scanziani E. (1992) *Valutazione nel bovino della sensibilizzazione con corpi uccisi di Mycobacterium bovis.* Veterinaria Italiana *27 (5)*, 8-16.

11) Davies C.J., Joosten I., Andersson L., Arriens M.A.,Bernoco D., Byrns G., Bissumbhar B., Van Eijk M.J.T., Ellegren H., Kristensen B., Lewin H.A., Morgan A.L.G., Muggli-Cockett N.E., Nilsson P.R., Oliver R.A., Park C.A., Van Der Poel J.J., Polli M., Spooner R.L., Stewart J.A. (1994) Polymorphism of bovine MHC class II genes. Joint report of the fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) workshop, Interlaken, Switzerland, 1 august 1992. European J. of Immunogenetics (in stampa).

M.L. PACCIARINI, M.L. SAVIO, P. FUSI, S. TAGLIABUE

APPLICAZIONE DI METODI MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI DI LEPTOSPIROSI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, via A. Bianchi 7, 25125 Brescia

RIASSUNTO

Riportiamo una sintesi del lavoro svolto dal laboratorio di biotecnologie di Brescia sull'applicazione di metodi molecolari alla diagnosi di leptospirosi. Il lavoro include: a) sviluppo di saggi PCR (*Polymerase Chain reaction*) capaci di amplificare frammenti specifici di DNA delle specie *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii*; b) sviluppo di saggi bastati sull'ibridazione in piastrina dei prodotti PCR per un rapido rilevamento dei campioni positivi; c) identificazione delle sierovarianti di Leptospira mediante analisi di restrizione dei prodotti amplificati.

Parole chiave: tecniche diagnostiche, *Leptospira*, PCR (*Polymerase Chain reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

MOLECULAR APPROACH TO THE DIAGNOSIS OF *LEPTOSPIRA SPP*

SUMMARY

We describe the application of molecular methods to the diagnosis of leptospirosis. The work includes the following: a) development of Polymerase Chain Reaction (PCR) assay capable of amplifying specific deoxyribonucleic acid fragments from serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*; b) development of a microtitre-based assay for rapid detection of PCR-positive samples; c) characterization of *Leptospira* serovars throughrestriction endonuclease analysis of PCR products.

Key words: diagnostic techniques, *Leptospira*, PCR (*Polymerase Chain reaction*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

INTRODUZIONE

La leptospirosi è una malattia causata dall'agente patogeno *Leptospira interrogans* tassonomicamente suddiviso in più di duecento sierovarianti. Studi di omologia del DNA genomico hanno mostrato una enorme eterogeneità genetica all'interno di questa specie che ha portato ad una sua recente riclassificazione (4, 5, 9) in sette neospecie diverse: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. weilii*, *L. inadai* ed *L. noguchi*.

La diagnosi convenzionale di questo microorganismo, basata su metodi sierologici e sull'isolamento culturale, non è in grado di identificare efficientemente animali portatori asintomatici ed è troppo complessa per una rapida caratterizzazione della sierovariante di appartenenza, necessaria per una accurata sorveglianza epidemiologica.

Varie tecniche sono state esplorate nel tentativo di migliorare la diagnosi di leptospirosi sia in campo immunologico che biologico-molecolare: in particolare lo sviluppo degli anticorpi monoclonali e l'applicazione di tecniche quali REA (*restriction endonuclease analysis*), *Southern blot*, *dot blot* ed ibridazione *in situ*, hanno migliorato grandemente l'identificazione e la caratterizzazione delle leptospire. Tuttavia, la bassa sensibilità, l'uso di isotopi e la quantità di lavoro richiesto, rendono difficile una loro applicazione routinaria nei laboratori diagnostici.

Recentemente la ricerca di metodi alternativi si è focalizzata sulla reazione di amplificazione enzimatica o PCR che ha dimostrato di essere rapida, sensibile ed applicabile anche in laboratori non particolarmente attrezzati. Studi precedenti hanno descritto saggi PCR o per il rilevamento di una o poche sierovarianti di *Leptospira* (1, 7, 8), o per il rilevamento di tutte le leptospire incluse le non patogene (2).

Noi abbiamo sviluppato un test PCR alternativo, basato sulla selezione di coppie di *primers*, ciascuna in grado di rilevare un gruppo geneticamente omogeneo di leptospire, corrispondente ad una delle sette specie proposte dalla nuova classificazione.

Questo approccio ha richiesto una notevole quantità di lavoro preliminare che possiamo riassumere nei seguenti punti:

1) Generazione di librerie genomiche dalle sierovarianti tarassovi ed hardjoprajitno, appartenenti rispettivamente alle specie *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*.

2) Selezione di cloni contenti sequenze ripetute.

3) Sequenziazione di frammenti di DNA dei cloni selezionati dalle due librerie genomiche; questo allo scopo di scegliere primers specifici per i saggi PCR.

4) Sviluppo di saggi di ibridazione in piastrina per un rapido screening dei campioni positivi alla PCR.

5) Identificazione della sierovariante di appartenenza mediante analisi di restrizione dei prodotti PCR.

RISULTATI

Selezione e caratterizzazione dei cloni contenenti sequenze ripetute

Nella prima fase del nostro lavoro abbiamo costruito due librerie genomiche: una della sierovariante della sierovariante hardjoprajitno appartente alla specie *L. interrogans*, ed una della sierovariante tarassovi appartenente alla specie *L. borgpetersenii*. Da ognuna delle due librerie, dopo un'accurata selezione, abbiamo scelto un clone specifico, pL590 dalla libreria di hardjoprajitno (3) e pT126 dalla libreria di tarassovi, che contenesse sequenze ripetute. Questa scelta è stata fatta sia per ottenere una maggior sensibilità dei nostri saggi PCR, sia per avere maggiori probabilità di trovare polimorfismi nelle analisi successive del nostro prodotto amplificato (PCR/RPLP).

Prima di allestire saggi PCR, abbiamo valutato la presenza di queste sequenze ripetute in 16 sierovarianti di *Leptospira*: il DNA genomico di australis, bratislava,

hardjoprajitno, pomona, patoc, icterohaemorragiae, tarassovi, castellonis, javanica, grippotyphosa, shermani, batavie, zanoni, mini, canicola e saxkoebing è stato digerito con l'enzima di restrizione BgIII e ibridato con i cloni pL590 e pT126.

Si può notare dalla figura 1 che pL590 ibridizza estensivamente con il DNA di tutte le sierovarianti di *L. interrogans*: australis, bratislava, hardjoprajitno, pomona, icterohaemorragie, batavie, zanoni, canicola, e con hardjiobovis e tarassovi appartenenti alla neospecie *L. borgpetersenii*. Risultati opposti li otteniamo saggiando la sonda pT126 sulle 16 sierovarianti elencate precedentemente (figura 2).

Sulla base di questi risultati abbiamo suddiviso le nostre sierovarianti in tre gruppi:

un primo gruppo caratterizzato da un forte segnale di ibridazione con il clone pL590 che include le sierovarianti australis, bratislava, pomona, hardjoprajitno, icterohaemorrhagiae, bataviae, zanoni, canicola, hardjiobovis e tarassovi, tutte appartenenti alla specie *L. interrogans* con l'eccezione di hardjiobovis e tarassovi.

Un secondo gruppo caratterizzato da un forte segnale d'ibridazione con il clone pT126 che include tutte le sierovarianti della specie L. borgpetersenii: castellonis, tarassovi, javanica, tarassovi, mini, saxkoebing ed hardjobovis.

Infine un terzo gruppo che mostra un segnale di ibridazione debole o assente con entrambe le sonde e che comprende le sierovarianti shermani e grippotyphosa appartenenti rispettivamente alle specie *L. santarosai* e *L. kirschneri*.

Allestimento dei saggi di PCR

Sulla base di questi studi abbiamo cominciato a sviluppare due saggi PCR, uno utilizzando dei *primers* selezionati dalla libreria di hardjoprajitno (6) ed uno con *primers* selezionati dalla libreria tarassovi.

Inizialmente è stato messo a punto il saggio PCR con i *primers* del clone pL590 derivato dalla libreria di hardjoprajitno: un frammento di 622 bp, corrispondente ad una porzione di un elemento ripetuto, è stato sequenziato e due oligonucleotidi selezionati per l'amplificazione (6).

Come previsto dai precedenti studi di ibridazione, questo saggio è in grado di amplificare DNA delle sierovarianti di *L. interrogans*: australis, bratislava, hardjoprajitno, pomona, bataviae, icterohaemorrhagiae, zanoni, canicola, ed inoltre tarassovi e hardjiobovis (*L. borgpetersenii*). Non si ottiene alcuna amplificazione dal DNA delle sierovarianti castellonis, javanica, mini, saxkoebing grippotyphosa, shermani, da leptospire non patogene (sierovarianti patoc e adamana), da altre specie batteriche (*Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus uberis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella trachomatis*, e *Pseudomonas aeruginosa*) e da cellule eucariote (PK15, IBRS, BHK21) (6).

In un secondo tempo abbiamo sviluppato un altro saggio PCR usando primers derivati da una sequenza di 850 bp (corrispondente ad una porzione di un elemento ripetuto del clone T126). La dimensione del frammento amplificato è di 400 bp. La reazione di PCR applicata ad 1 ng di DNA delle sedici 16 sierovarianti di *Leptospira* ha dato i seguenti risultati: amplificazione debole o assente per tutte le sierovarianti di *L. interrogans* (con eccezione delle sierovarianti zanoni e icterohaemorragie) e per grippotyphosa e shermani, ed una forte banda di amplificazione per tutte le sierovarianti di *L. borgpetersenii* (figure 3 e 4). Anche in questo caso non si ha alcuna amplificazione dal DNA delle sierovarianti non patogene patoc e andamana, dal DNA di altre specie batteriche e di linee celluleri bovine e suine.

Entrambi i saggi PCR arrivano a rilevare 5-10 leptospire (6) dopo ibridazione con la sonda specifica.

Se consideriamo la nuova classificazione di *Leptospira* spp., i nostri saggi non sono strettamente specie-specifici, ma entrambi sono in grado di rilevare solo leptospire patogene e quasi tutte le sierovarianti esaminate, con l'eccezione di grippotyphosa e shermani.

Questo problema potrà venire risolto selezionando nuovi *primers* specifici per le altre specie di *Leptospira* di interesse diagnostico.

Rilevamento del prodotto PCR

Uno dei problemi relativi all'uso della PCR per la diagnosi di malattie infettive è la necessità di ibridare i prodotti PCR con un *probe* specifico per evitare di rilevare prodotti amplificati aspecifici, come può occasionalmente succedere analizzando campioni biologici.

Ci sono diversi problemi coinvolti nella applicazione routinaria della PCR in un laboratorio diagnostico; in particolare l'uso di isotopi e il ritardo di qualche giorno richiesto dalla procedura di ibridazione.

Per superare questi problemi, noi abbiamo sviluppato un saggio in piastrina ELISA per il rilevamento delle sequenze di DNA di *Leptospira* amplificate mediante PCR.

In questo saggio, *primers* derivati dalla sequenza del clone pL590 vengono marcati con biotina all'estremità 5' terminale ed incorporati nel corso della reazione PCR. Dopo l'amplificazione, una aliquota del prodotto PCR viene denaturato ed ibridato ad un oligonucleotide *capture* covalentemente immobilizzato nel pozzetto della piastrina. La sequenza dell'oligonucleotide *capture* è complementare alla porzione della sequenza amplificata dei due *primers*, cosi che vengono rilevati solo prodotti specifici amplificati dal DNA di *Leptospira*. Il DNA ibridato è poi rilevato con una reazione colorimetrica usando il coniugato streptavidina-perossidasi e tetrametilbenzidina come substrato.

Per verificare la sensibilità e la specificità del test, lo abbiamo saggiato sul rilevamento di reazioni PCR di diluizioni seriali di DNA di hardjoprajitno (fino a 10^{-2} pg), e di molti controlli negativi.

I risultati mostrano che il test è altamente specifico (non è stato trovato *background* per DNA di cellule eucariote e per leptospire non patogene), ed ha la stessa sensibilità del gel di agarosio che arriva a rilevare fino a 10^{-1} pg di DNA corrispondenti a 100 genomi di *Leptospira* (figura 5).

Identificazione di sierovarianti mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del DNA amplificato.

I saggi PCR descritti sono capìaci di rilevare la maggior parte delle sierovarianti di *Leptospira*, ma non sono in gardo di identificarle. A tale scopo abbiamo aggiunto uno *step* di digestione con enzimi di restrizione del prodotto amplificato.

In questo test dopo la reazione PCR, che può essere fatta sia su DNA purificato che direttamente su campioni biologici, i prodotti amplificati vengono digeriti con enzimi di restrizione ed i frammenti così ottenuti separati con una elettroforesi in gel di agarosio.

Noi abbiamo analizzato i prodotti PCR, ottenuti con i primers selezionati dalla libreria di hardjoprajitno (6), delle sierovarianti australis, bratislava, lora, pomona, icterohaemorragie, copenhageni, bataviae, canicola, hardjoprajitno, hardjobovis e tarassovi con diversi enzimi di restrizione (Alu I, Hae III, Sau I, Sau 3A, Mbo I, Mbo II, Afl II, BspH I, Fok I, Hinf I e Dde I), scelti sulla base dell'analisi di restrizione della sequenza di 622 bp del clone pL590 (6). *Patterns* polimorfici specifici sono stati ottenuti per la maggior parte delle sierovarianti con gli enzimi di restrizione Hinf I e Dde I (figure 6 e 7). Tuttavia non si è trovata alcuna variazione polimorfica tra sierovarianti geneticamente molto simili come lora e bratislava od icterohaemorragie e copenhageni.

Infine abbiamo saggiato il nostro test PCR/RFLP su 25 isolati di pomona precedentemente identificati con ibridazioni *Southern blot* ed anticorpi monoclonali. I risultati mostrano che i *patterns* di restrizione ottenuti con Hinf I e Dde I sono esattamente identici a quelli del ceppo di referenza della sierovariante pomona Mezzano I, confermando la riproducibilità ed attendibilità del metodo (Figura 8 *a* e *b*).

CONCLUSIONI

L'applicazioni di saggi qualiibridazione in piastrina per il rilevamento dei prodotti PCR e digestione con enzimi di restrizione dei prodotti amplificati per l'identificazione della sierovariante in esame, aprono prospettive reali per una applicazione routinaria della PCR nella diagnosi di leptospirosi. Si tratta di tecniche tuttora in fase di sviluppo che richiedono ancora del lavoro prima di poter essere applicate in un laboratorio diagnostico. In particolare:

1) Sviluppo di nuovi test PCR per rilevare leptospire appartenenti ad altre specie di interesse diagnostico.

2) Ottimizzazione della sensibilità del test per il rilevamento della PCR in piastrine ELISA.

3) Identificazione di nuovi enzimi di restrizione per rilevare *patterns* polimorfici specifici da prodotti PCR di sierovarianti di *Leptospira* geneticamente molto simili.

Gli autori desiderano ringraziare per la loro collaborazione il Dr. A. Lavazza, il Dr. C. Rossi ed il Dr. M. Dovis. Si ringrazia inoltre L. Tonioli per l'assistenza tecnica e G. Bonatti per le fotografie e le diapositive.

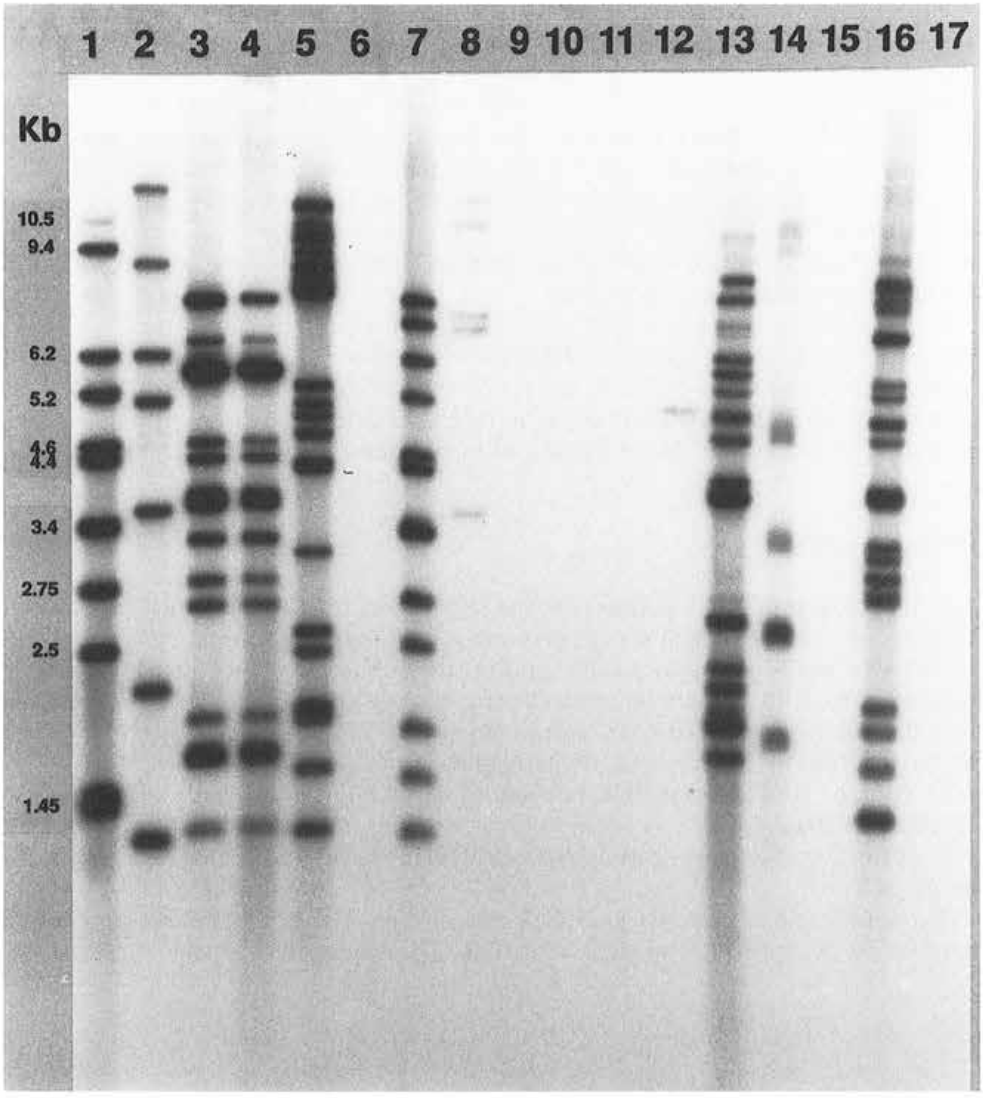


Figura 1-2: DNA genomico delle sierovarianti: 1) australis, 2) bratislava, 3) hardjoprajitno (ceppo fornito dal Prof. R. Farina, Pisa), 4) hardjoprajitno, 5) pomona, 6) patoc, 7) icterohaemorrhagiae, 8) tarassovi, 9) castellonis, 10) javanica, 11) zanoni, 12) shermani, 13) bataviae, 14) zanoni, 15) mini, 16) canicola, 17) saxkoebing, digerito con l'enzima di restrizione BglII ed ibridato con il clone pL590 (Fig. 1) e con il clone pT126 (Fig. 2). I pesi molecolari sono stati calcolati per la sierovariante australis sulla base dei pesi molecolari del DNA del marcatore lambda digerito con l'enzima di restrizione HindIII.

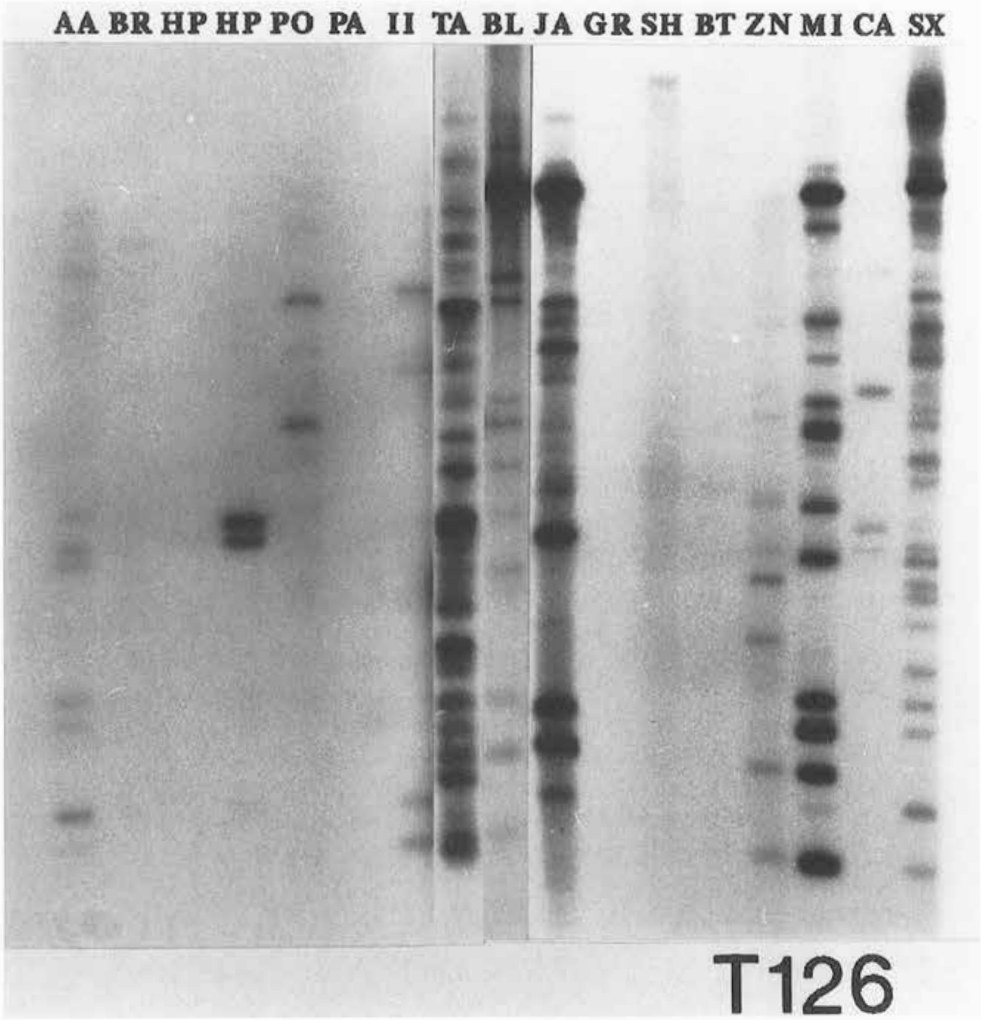


Figura 2 -

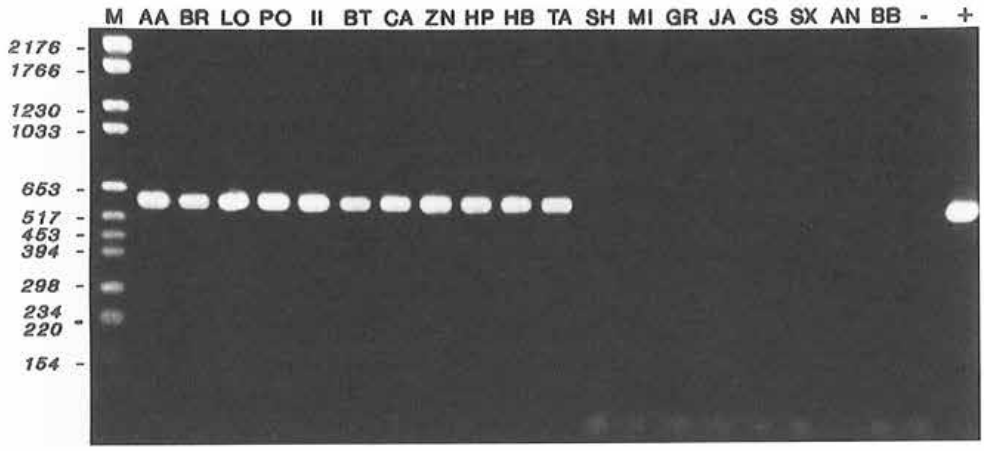


Figura 3 - Gel d'agarosio (1.5%) di prodotti PCR, ottenuti utilizzando primers selezionati dal clone pL 590 (libreria hardjoprajitno), da 1 ng di DNA genomico delle sierovarianti: (AA) australis, (BR) bratislava, (LO) lora, (PO) pomona, (II) icterohaemorrhagiae, (BT) bataviae, (CA) canicola, (ZN) zanoni, (HP) harjoprajitno, (HB) hardjobovis, (TA) tarassovi, (SH) shermani, (MI) mini, (GR) grippotyphosa, (JA) javanica, (CS) castellonis, (SX) saxkoebing, (AN) andamana e da 1 ng della spirocheta *Borrelia burgdorferi* (BB). (-) campione non contenente DNA (+) campione contenente 1 ng del clone pL590.
M, marcatore di peso molecolare (Marker VI, Boehringer).

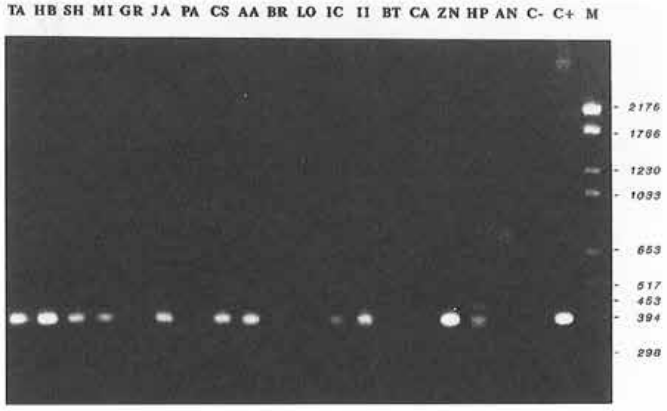


Figura 4 - Gel d'agarosio (1.5%) di prodotti PCR ottenuti utilizzando primers selezionati dal clone pT126 (libreria tarassovi), da 1 ng di DNA delle sierovarianti: (TA) tarassovi, (HB) hardjobovis, (SH) shermani, (MI) mini, (GR) grippotyphosa, (JA) javanica, (PA) patoc, (CS) castellonis, (AA) australis, (BR) bratislava, (LO) lora, (IC) icterohaemorrhagiae, (BT) bataviae, (CA) canicola, (ZN) zanoni, (HP) hardjoprajitno, (AN) andamana, (C-) campione non contenente DNA, (C+) campione contenente 1 ng del clone T126.
M, marcatore di peso molecolare (Marker VI, Boehringer).

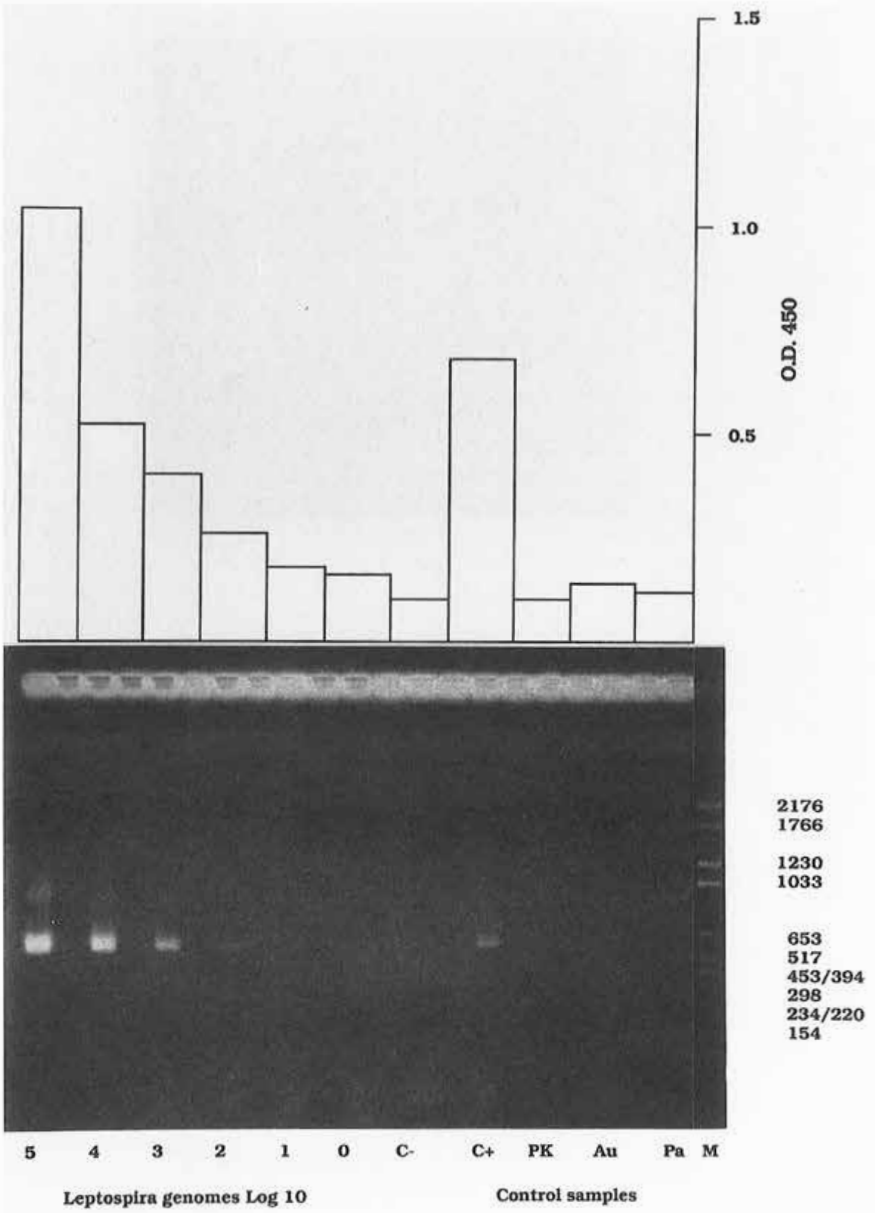


Figura 5 - Analisi dei prodotti ottenuti dopo amplificazione di diluizioni seriali di DNA della sierovariante hardjoprajitno da 10^3 pg (corrispondenti approssimativamente a 10^5 genomi) fino a 10^{-2} pg (corrispondenti a meno di 5 genomi), DNA della linea cellulare suina PK15 (PK), DNA della linea cellulare bovina Aubek (Au), DNA della sierovariante non patogena patoc (PA).
M: marcatore di peso molecolare (Marker VI, Boehringer).
In alto i valori ottenuti con il saggio in micrometodo; in basso i risultati della elettroforesi in gel d'agarosio.
OD 450 nm: assorbanza a 450 nm.

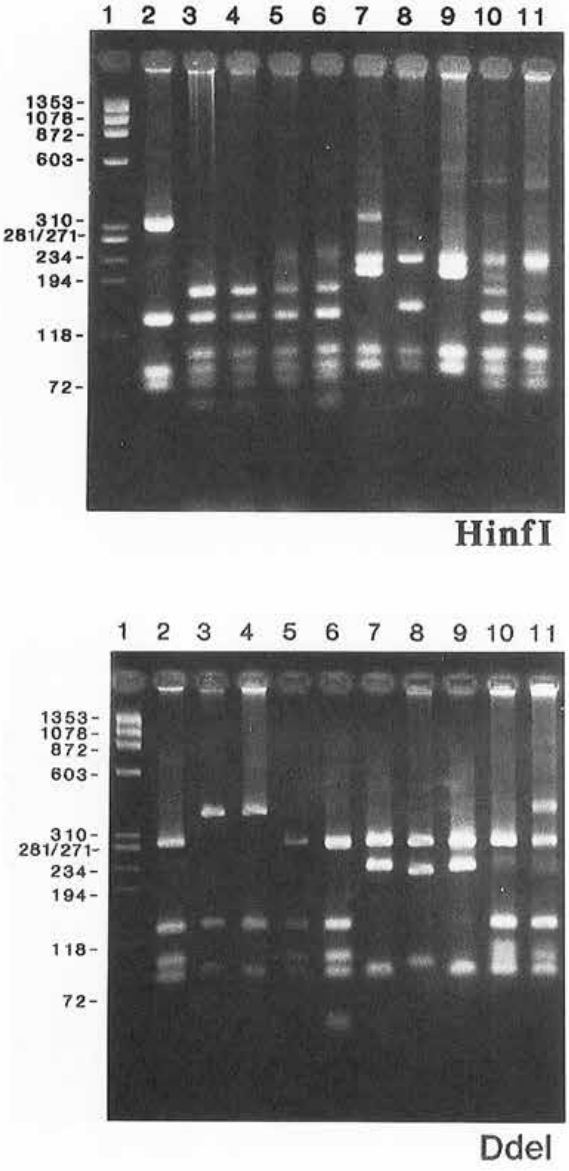
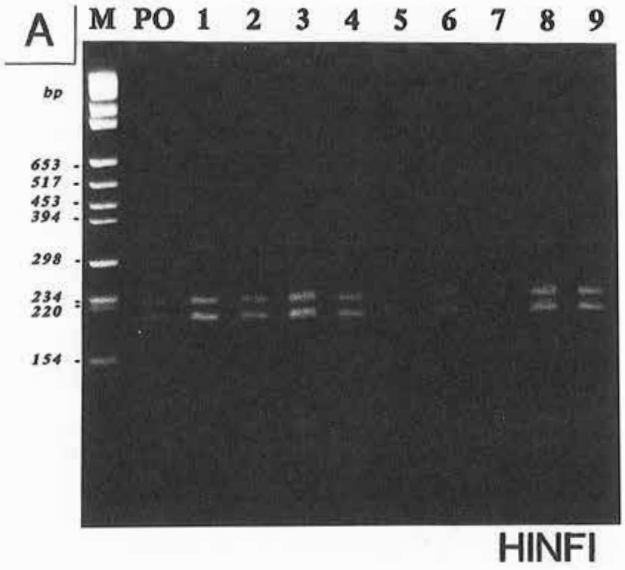


Figura 6-7 - Elettroforesi su gel d'agarosio al 4% (Nusieve, FMC) dei prodotti PCR dalle sierovarianti: (2) australis, (3) bratislava, (4) lora, (5) icterohaemhorrhagiae, (6) copenhageni, (7) pomona, (8) bataviae, (9) canicola, (10) zanoni, (11) hardjoprajitno digeriti con l'enzima di restrizione HinfI (Fig. 6) e con l'enzima di restrizione DdeI (Fig. 7).
(1) Marker di peso molecolare: DNA del fago X174 digerito con l'enzima di restrizione HaeIII (Promega).



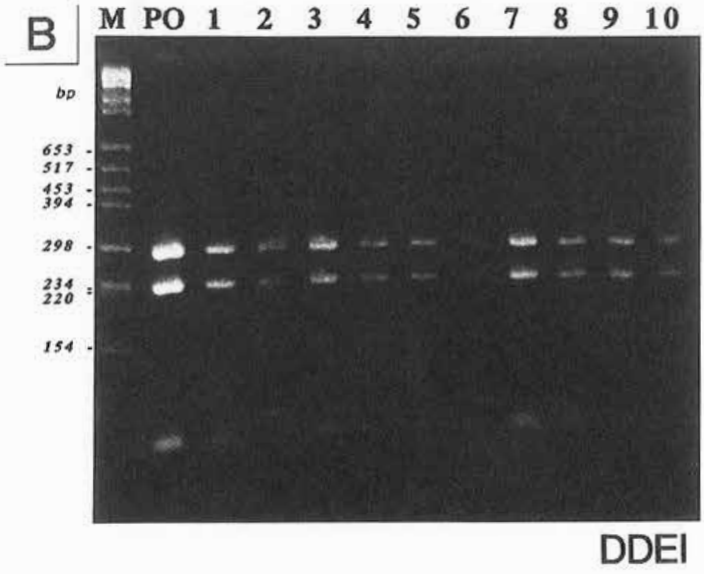


Figura 8 (A-B) - Gel elettroforesi di prodotti PCR del DNA di isolati di pomona (da 1 a 9) e del DNA del ceppo di referenza Mezzano I (PO) digeriti con l'enzima di restrizione HinfI (A) e con l'enzima di restrizione DdeI (B).
M: Marker di peso molecolare: DNA del fago X174 digerito con l'enzima di restrizione HaeIII (Promega).

BIBLIOGRAFIA

1) GRAVEKAMP G., KEMP H. V. D., CARRINNGTON D., VAN EYES G. J. J. M., EVERARD C. O R., TERPSTRA W. J. (1990) *Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with copenhageni-infections.* In: Y. Kobayashi (ed.), Proceedings of the Leptospirosis Conference, Ehime, Japan, 24 to 26 September 1990. Hokusen-Sha, Ehime, Japan.

2) MERIEN F., AMOURIAUX P., PEROLAT P., BARANTON G., SAINT-GIRONS I. (1992) *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples.* J. Clin. Microbiol. *30*, 2219-2224.

3) PACCIARINI M.L., SAVIO M.L., TAGLIABUE S., ROSSI C. (1992) *Repetitive sequences cloned from Leptospira interrogans serovar hardjo genotype hardjoprajitna and their application to serovar identification.* J. Clin. Microbiol. *30*, 1243-1249.

4) RALPH D., MCCLELLAND M., WELSH J., BARANTON G., PEROLAT P. (1993) *Leptospira species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR)-amplified rRNA genes.* J. Bacteriol. *175*, 973-981.

5) RAMADASS, P., JARVIS B. D. W., CORNER R. J., PENNY D., MARSHALL R. B. (1992) *Genetic characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization.* Int. J. Syst. Bacteriol. *42*, 215-219.

6) SAVIO M.L., ROSSI C., FUSI P. TAGLIABUE S., PACCIARINI M.L. (1994) *Detection and identification of Leptospira interrogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amlpified DNA.* J. Clin. Microbiol. *32*, 935-941.

7) VAN EYS G. J. J. M., GRAVEKAMP C., GERRITSEN M.J., QUINT W., CORNELISSEN M. T. E., TER SCHEGGET J., TERPSTRA W. J. (1989) *Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction.* J. Clin. Microbiol. *27*, 2258-2262.

8) WOODWARD M. J., SULLIVAN G. J., PALMER N. M. A., WOOLLEY J. C., REDSTONE J.S. XXXX. *Development of a PCR test specific for Leptospira hardjo genotype bovis.* Vet. Rec. *128*, 282-283.

9) YASUDA P. H., STEIGERWALT A. G., SULZER K. R., KAUFMANN A. F., ROGERS F., BRENNER D. J. (1987) *Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new* Leptospira *species.* Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 407-415.

A. LADDOMADA, A. CACCIA*, C. PATTA, G. PUGGIONI,
A. OGGIANO, A.Q. CARBONI, A. CATTINA

UTILIZZO DI METODICHE DIAGNOSTICHE INNOVATIVE NELL'AMBITO DEL PIANO DI ERADICAZIONE DELLA PESTE SUINA AFRICANA DALLA SARDEGNA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari

RIASSUNTO

Il recente avvio del Piano di eradicazione della peste suina africana dalla Sardegna ha consentito di verificare la validità dell'utilizzo nella routine di laboratorio di alcune metodiche innovative di diagnosi della malattia.

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifica una regione altamente conservata del genoma virale. Il prodotto viene evidenziato mediante elettroforesi e la specificità della reazione viene verificata tramite l'utilizzo di *nested primers* e di sonde marcate con digossigenina. Nel nostro laboratorio la PCR si èrivelata particolarmente utile per evidenziare il genoma virale in campioni di organi suini recapitati in laboratorio in cattivo stato di conservazione ed in organi di soggetti clinicamente sani ma abbattuti perchè sieropositivi. La PCR, inoltre, è stata utilizzata per la amplificazione di alcune regioni variabili del genoma virale ai fini della distinzione di ceppi virali di diversa origine.

L'*immunoblotting* consente di evidenziare anticorpi specifici per alcune delle proteine virali maggiormente immunogene. Questo test viene attualmente utilizzato routinariamente nei nostri laboratori, con eccellenti risultati, quale test di conferma dei campioni risultati positivi all'ELISA.

Parole chiave: PCR - Immunoblotting - Peste suine africana.

NEW DIAGNOSTIC TESTS FOR THE ERADICATION OF AFRICAN SWINE FEVER IN SARDINIA

SUMMARY

In Sardinia the recent implementation of the eradication plan of African swine fever (ASF) has allowed to verify the usefulness of some new tests for the diagnosis of this infection.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifies an highly conserved region of the viral genome. The specificity of the reaction is tested by using nested primers and a digoxigenin labelled probe. This test has allowed to detected ASF virus DNA in poor quality samples from suspected pigs and in organs of apparently healty seropositive pigs. Moreover PCR is used to amplify variables regions of ASFV genome and to characterize different isolates.

The immunoblotting assay allows to detect antibodies specific for single viral proteins. It has been used with excellent results as a confirmatory test for serum samples found positive at the ELISA.

Key words: PCR - Immunoblotting - African swine fever.

INTRODUZIONE

Il virus della Peste suina africana (PSA) è un virus icosaedrico a DNA bicatenario che replica nel citoplasma della cellula ospite. I suoi ospiti naturali sono i suini domestici e selvatici e alcuni artropodi della famiglia *Argasidae*, genere *Ornithodorus*. Nel suo ambiente naturale in Africa il virus presenta un ciclo replicativo tra *Ornithodorus moubata* ed il facocero. Esso è pertanto l'unico arbovirus — termine generico che indica i virus che replicano sia in artropodi che in vertebrati — il cui materiale genetico è costituito da DNA. In Europa il principale ospite del virus della PSA è il suino domestico, in cui causa una tra le pió gravi malattie infettive di questa specie, per cui non è disponibile alcun vaccino e nel corso della quale, a fronte di una risposta anticorpale intensa e persistente, non si verifica la produzione di immunoglobuline dotate di attività neutralizzante.

Il genoma virale è costituito da una molecola lineare formata da 170-180.000 coppie di basi, le cui estremità presentano alcune analogie con il genoma dei Poxvirus, quali la presenza di *hairpin loops* e di ripetizioni terminali invertite. Il virione è costituito da almeno 34 differenti proteine strutturali ed il genoma codifica per non meno di 100 proteine. La disposizione dei geni finora identificati lungo la molecola, tuttavia, non trova analogie con nessun altro virus conosciuto. Tra i diversi ceppi virali isolati in svariate aree dell'Africa ed in Europa, inoltre, sussiste una elevatissima variabilità genetica, con differenze delle dimensioni del genoma perfino superiori alle 10.000 coppie di basi.

Per via delle sue numerose singolarità biologiche il virus della PSA è considerato come a sè stante da un punto di vista tassonomico, unico appartenente ad una famiglia la cui istituzione non è ancora stata formalizzata (3, 5, 8, 14, 15, 16). La PSA è presente da oltre quindici anni in Sardegna, dove è diffusa allo stato endemico in alcune aree della Provincia di Nuoro caratterizzate dalla pratica del pascolo brado del suino (6). La malattia è causa di gravi danni economici all'intero comparto suinicolo isolano e costituisce una seria minaccia per gli allevamenti della Penisola. A partire dal 1.6.93 è stato pertanto avviato un Piano di eradicazione della malattia basato su una serie di accurati controlli sanitari, sull'abbattimento dei suini presenti negli allevamenti con malattia in atto, sulla attuazione di controlli sierologici in tutte le aziende e sulla conseguente eliminazione dei singoli capi sieropositivi, potenziali portatori del virus (5). Nell'ambito del Piano abbiamo avuto occasione di verificare, nelle condizioni della routine di laboratorio, la utilità e la affidabilità di alcuni tests diagnostici innovativi che ci consentissero di affrontare e risolvere adeguatamente ogni problema diagnostico. Nel presente lavoro riportiamo i risultati pió significativi delle attività di laboratorio finora svolte.

IL TEST DI IMMUNOBLOTTING NELLA DIAGNOSTICA SIEROLOGICA DELLA PESTE SUINA AFRICANA

In assenza di un test di neutralizzazione, la diagnostica sierologica della PSA è basata principalmente su un test ELISA estremamente sensibile (10), che utilizza come antigene una proteina virale semipurificata, la VP 73, o una miscela di proteine ottenute da cellule MS infette, trattate con NP-40, EDTA e beta-mercaptoetanolo (12, 13). Il test ELISA, la cui validità è stata concretamente dimostrata nel corso dell'attuazione dei Piani di eradicazione attuati in Spagna e Portogallo, presenta, indipendentemente dall'antigene utilizzato, alcuni limiti di specificità legati alla qualità del campione in esame e alla possibilità che componenti aspecifiche dell'antigene, quali la sieroalbumina bovina, possano essere rivelati da immunoglobuline sieriche originatesi presumibilmente a seguito di ripetute vaccinazioni o di alimentazione con i residui della caseificazione del latte bovino. Il test di immunofluorescenza indiretta (1), tuttora utilizzato da alcuni laboratori quale test di conferma, presenta il grave inconveniente del giudizio soggettivo alla lettura, che rende scarsamente riproducibili i risultati ottenuti in presenza di sieri-problema (10). Gli inconvenienti dei tests anzidetti hanno indotto alcuni Autori spagnoli alla messa a punto di un test di *immunoblotting* (IB) che consente di individuare anticorpi specifici per singole proteine virali e di valutare oggettivamente la specificità della risposta al test ELISA. La metodica utilizzata per l'IB riprende quella descritta da Pastor (9), da noi modificata ricorrendo al metodo *semi-dry* per il *blotting* delle proteine (Transblot SD Semidry, BIO-RAD).

Tale metodica utilizza come antigene la medesima miscela di proteine in uso per la reazione ELISA e consente di rivelare principalmente anticorpi specifici per proteine virali dal p.m. compreso tra 23,5 e 35 Kd (foto 1), anche in campioni debolmente positivi all'ELISA.

Considerata la necessità di individuare con la massima precisione i singoli capi sieropositivi, nel corso degli esami sierologici attuati nell'ambito del Piano di eradicazione abbiamo ritenuto opportuno testare all'IB tutti i campioni risultati positivi all'ELISA. Su un totale di 70.491 campioni di siero suino analizzati al 10.4.94, provenienti da oltre 7.000 allevamenti sparsi in tutta la Sardegna, 1139 campioni sono risultati positivi all'ELISA. Tra questi ultimi 348 campioni provenienti da 96 allevamenti sono risultati positivi anche all'IB. 791 campioni (pari a circa l'1% del totale dei campioni testati) sono risultati positivi al test ELISA ma negativi all'IB. Tali campioni «falsi positivi» hanno dato luogo a tre tipi di risposte all'IB: a) colorazione uniforme della stiscia senza evidenziazione di bande (risposta presumibilmente indicativa di campioni di cattiva qualità); b) evidenziazione di bande non specifiche, generalmente di peso molecolare vicino ai 66 Kd (sieroalbumina bovina); c) assenza di qualsiasi banda o colorazione (sieri aspecificamente «appiccicosi» all'ELISA).

Da rilevare inoltre che 423 campioni «falsi positivi» provenivano da soli 6 allevamenti di tipo intensivo di grandi dimensioni in cui viene fatto un largo uso di vaccini per la profilassi di numerose infezioni del suino ed in cui, considerate la situazione sanitaria riscontrata e le peculiarità epidemiologiche della infezione in Sardegna, la peste suina africana era sicuramente assente. Al contrario, i campioni riscontrati positivi all'IB provengono, nella stragrande maggioranza dei casi (94 allevamenti

su 96), da allevamenti «a rischio» dell'area endemica; anche nei due allevamenti positivi localizzati al di fuori di detta area le indagini epidemiologiche condotte hanno consentito di ritenere totalmente attendibile l'esito dei tests sierologici.

Considerato la elevata sensibilità dell'IB (9), l'insieme dei risultati da noi ottenuti indica la assoluta validità di questa prova quale test di conferma nella diagnostica sierologica routinaria della infezione.

LA PCR NELLA DIAGNOSTICA VIROLOGICA DELLA PSA

La diagnostica virologica della PSA si basa sulla individuazione degli antigeni virali tramite il test di immunofluorescenza, sull'isolamento del virus in colture di leucociti — dove è causa del fenomeno dell'emoadsorbimento (prova di Malmquist) — e nella trasmissione sperimentale della infezione in suini (10). In caso di materiale proveniente da allevamenti in cui la malattia è in atto in forma tipica tale diagnosi non presenta generalmente particolari difficoltà e il referto diagnostico, grazie all'immunofluorescenza, può spesso essere emesso in 2-3 ore, essendo il virus presente a titolo elevato negli organi dei capi venuti a morte. Esistono, tuttavia, alcune situazioni in cui la diagnosi virologica della PSA è problematica: a) in caso di materiale in esame in stato di putrefazione, che rende inattendibile il test di immunofluorescenza e che è causa di effetto citotossico su colture cellulari; b) in caso di virus presente a basso titolo (soggetti portatori); c) in caso di prodotti di salumeria, per i quali il test di immunofluorescenza è impraticabile ed in cui è possibile che si verifichino effetti citotossici nelle colture di leucociti. In queste circostanze l'unico test che offra adeguate garanzie di sensibilità è la prova biologica sul suino, che presenta una serie di inconvenienti economici e pratici e che contrasta con la tendenza ad utilizzare metodi alternativi alla sperimentazione sugli animali.

Al di fuori delle aree ove la malattia è presente, inoltre, la possibilità di manipolare il virus della PSA è ristretta ad un numero assi limitato di laboratori dotati di sistemi di sicurezza tali da garantire contro ogni eventuale immissione di virus nell'ambiente. Ciò rende spesso impraticabile l'attuazione di tests diagnostici che richiedano l'utilizzo di virus infettante (isolamento su colture di leucociti e prova biologica sul suino).

La *Polymerase Chain Raction* (PCR) è un test che, per via delle sue ben note doti di sensibilità e specificità, potrebbe rivelarsi di ausilio in tutti i casi-problema sopra indicati ed utilizzabile anche in laboratori dove non è possibile manipolare il virus in forma infettante, in quanto richiede come controlli segmenti del DNA virale sprovvisti di qualsiasi capacità replicativa.

Nei nostri laboratori abbiamo utilizzato la PCR per la amplificazione di un frammento altamente conservato del genoma del virus della PSA, secondo una metodica già descritta (2, 11). I frammenti così ottenuti vengono evidenziati mediante elettroforesi e la specificità della reazione può successivamente essere verificata con una seconda amplificazione *nested* — che consente una ulteriore amplificazione di un segmento genomico compreso all'interno del prodotto precedentemente ottenuto — e di sonde marcate con digossigenina (foto 2 e 3).

I risultati finora ottenuti, su un totale di 254 campioni esaminati, indicano che la PCR può risolvere efficacemente alcuni casi problema. Nelle condizioni della pra-

tica, infatti, in due circostanze in cui sono pervenuti al laboratorio organi in avanzato stato di putrefazione, provenienti da suini sospetti, si è pervenuti alla diagnosi di PSA in assenza di un risultato attendibile del test di immunofluorescenza ed in tempi assai piú rapidi (24 ore) rispetto alla prova di isolamento. Siamo riusciti altresì ad evidenziare frammenti del genoma virale da due campioni di milza di suini abbattuti perchè sieropositivi, in assenza di positività ai tests virologici tradizionali. Sono in corso, inoltre, prove tese a stabilire la sensibilità del metodo nella evidenziazione del DNA virale in prodotti di salumeria.

I nostri risultati indicano, pertanto, che, nonostante gli elevati costi dell'esame suggeriscano un suo utilizzo solo in casi limitati, la PCR può risultare estremamente utile in una serie di situazioni diagnostiche.

LA PCR NELLA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI DIVERSI ISOLATI DI VIRUS DELLA PSA

Il virus della PSA presenta un elevato grado di variabilità genetica. In particolare in ceppi con origini assai diverse tra loro sono state evidenziate almeno 8 regioni altamente variabili del DNA virale. Tra i ceppi isolati in Sardegna, tuttavia, la variabilità è assai minore, sebbene analisi attuate con l'ausilio di enzimi di restrizione abbiano consentito di evidenziare 4 differenti genotipi virali (6).

Considerato che la caratterizzazione genetica degli isolati può risultare di grande importanza per stabilire l'origine di un focolaio, oltre che per studiare l'evoluzione virale nelle diverse aree geografiche, in alcuni studi condotti in collaborazione con il dr. P.J. Wilkinson del Laboratorio di Pirbright (Woking, Surrey, U.K.) abbiamo verificato la possibilità di utilizzare la PCR per la amplificazione e lo studio di regioni variabili del genoma. Gli studi finora condotti su due differenti segmenti del DNA virale non hanno consentito di rilevare nessuna variazione tra i ceppi virali isolati in Sardegna (4, 7). La PCR, tuttavia, si è dimostrata valida allo scopo, come si rileva nella foto 4, che indica che uno dei ceppi virali analizzati, di origine portoghese, presenta rispetto ai ceppi sardi una rilevante differenza di dimensioni del segmento genomico amplificato. In futuro pertanto è possibile ipotizzare un utilizzo sempre pió proficuo di tale metodica per una precisa caratterizzazione genetica dei diversi isolati e per indagini di epidemiologia molecolare che possono rivelarsi particolarmente utili nelle attività di eradicazione della malattia.

I colleghi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna dedicano questo lavoro alla Dott.ssa Anna Caccia, recentemente scomparsa, della quale ricordano con affetto le doti umane e professionali.

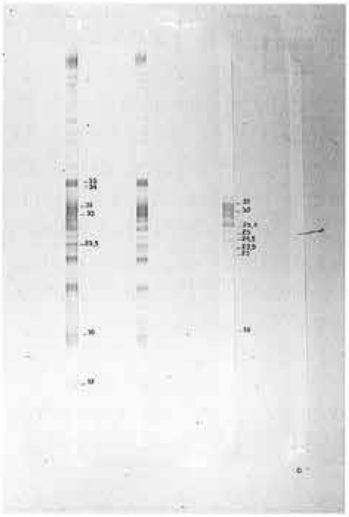


Foto 1 - *Immunoblotting*: tre campioni positivi (sulla sinistra) ed un campione negativo (sulla destra). Tutti i campioni positivi rivelano proteine di p.m. compreso tra 23,5 e 35 kd. I primi due campioni sulla sinistra hanno presentato un valore di D.O. all'ELISA più elevato e hanno rivelato proteine virali di p.m. sia inferiore che superiore ai 23,5-35 Kd.

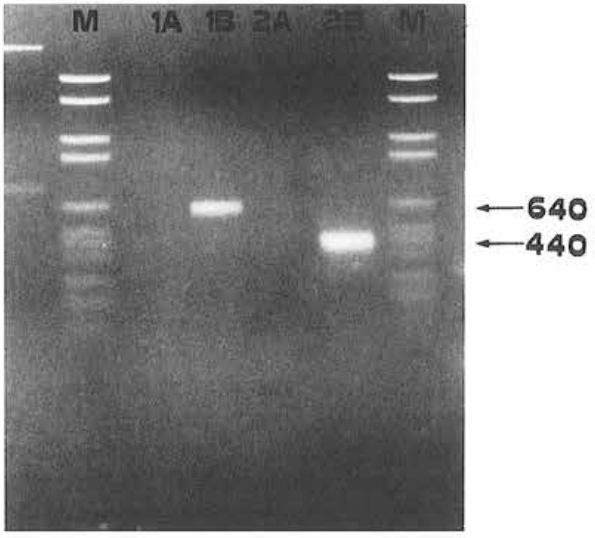


Foto 2 - Elettroforesi dei prodotti della PCR utilizzata a scopo diagnostico. M = markers di peso molecolare; 1A e 2A = campioni negativi; 1B = campione positivo ottenuto dalla prima amplificazione (640 bp); 2B = campione positivo ottenuto dalla amplificazione nested (440 bp).

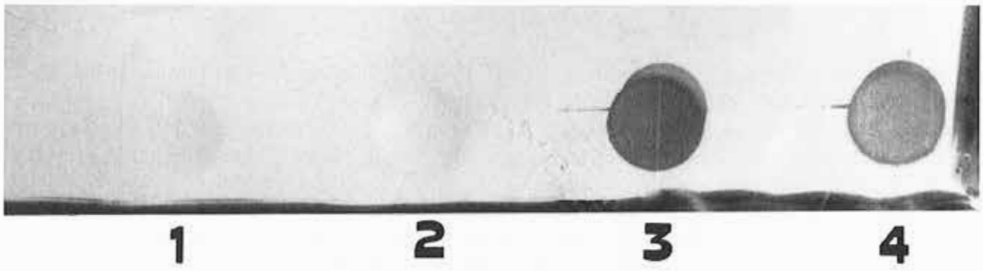


Foto 3 - Identificazione del prodotto PCR mediante ibridazione *dot-blot*. La sonda utilizzata è costituita dal prodotto della amplificazione nested di campioni sicuramente positivi marcata con digossigenina. 1 e 2 = campioni negativi; 3 e 4 = campioni positivi.

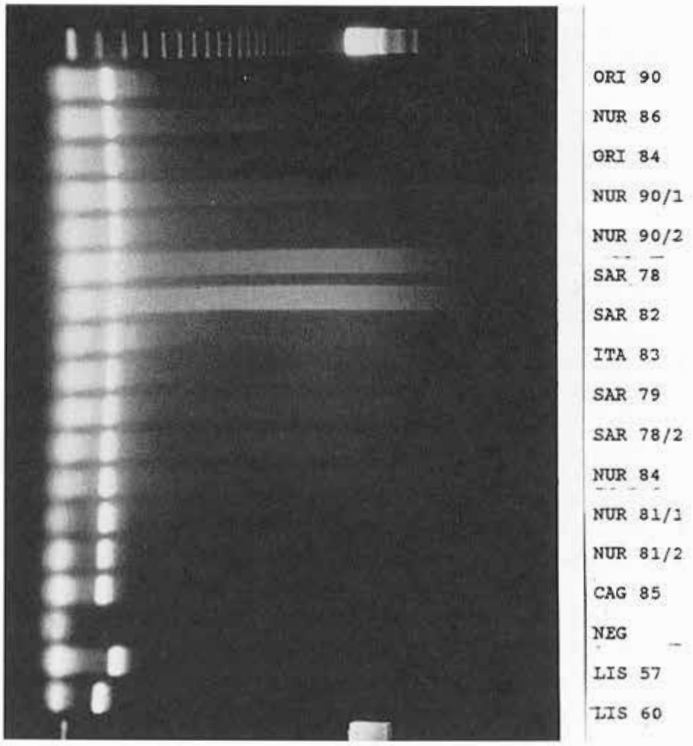


Foto 4 - Analisi mediante PCR del DNA di alcuni ceppi virali con differente origine. Elettroforesi dei prodotti ottenuti dopo amplificazione di una regione variabile del genoma virale. Il prodotto ottenuto dal DNA del ceppo LIS 57, di origine portoghese, mostra un *pattern* di migrazione elettroforetica differente rispetto agli altri ceppi analizzati (14 ceppi di origine sarda ed un ceppo di origine portoghese).

BIBLIOGRAFIA

1) Bool P. H., Ordas A., Sanchez-Botija C. (1969) *The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence.* Bull. Off. Int. Epizoot. *72*, 819-839.

2) Caccia A., Laddomada A., Oggiano A., Patta C., Cherchi R. (1992) *La Polymerase Chain Reaction (PCR) applicata alla diagnostica della peste suina africana: ricerca del DNA virale in organi di suini domestici e cinghiali selvatici.* Atti del 46° Convegno Nazionale della S.I.S.Vet., in corso di stampa.

3) Costa J.V. (1993) *Advances in African swine fever research.* In «African swine fever», pp. 95-104, A. Galo ed., Report EUR 14209 EN, published by the Commission of the European Communities.

4) Laddomada A. (1991) *Genetic variation of Sardinian isolates of African swine fever virus.* MSc Thesis, University of London.

5) Laddomada A., Usai A., Giuliano S., Marabelli R., Firinu A. (1992) *Il nuovo Piano di eradicazione della peste suina africana dalla Sardegna.* Il progresso veterinario *47*, 547-550.

6) Laddomada A, Wilkinson P.J. (1993) *Variazioni genetiche di ceppi del virus della peste suina africana isolati in Sardegna.* Atti del 47° Convegno Nazionale della S.I.S.Vet., in corso di stampa.

7) Laddomada A., Patta C., Pittau G., Ruiu A., Firinu A. (1993) *Epidemiology and control of African swine fever in Sardinia.* In «African swine fever», pp. 203-210, A. Galo ed., Report EUR 14209 EN, published by the Commission of the European Communities.

8) Mebus C. A. (1989) *African swine fever.* Adv. Virus Res. *35*, 251-276.

9) Pastor M. J., Laviada M. D., Sanchez-Vizcaino J.M., Escribano J.M. (1987) *Detection of African swine fever antibodies by immunblotting assay.* Can. J. Vet. Res. *53*, 105-107.

10) Sanchez-Vizcaino J.M. (1987) *African swine fever diagnosis.* In «African swine fever», pp. 63-72, Y. Becker ed., Martinus Nijhoff Publishing.

11) Steiger Y., Ackermann M., Mettraux C., Kihm U. (1992) *Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction.* J. Clin. Microbiol. *30*, 1-8 .

12) Tabares E., Martinez J., Ruiz-Gonzalvo F., Sanchez-Botija C. (1980) *Proteins specified by African swine fever virus II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties.* Arch. Virol. *66*, 119-132.

13) Tabares E., Fernandez M., Salvador-Temprano, Carnero M.E., Sanchez C. (1981) *A reliable enzyme-linked immunosorbent assay for African swine fever using the major structural protein as antigenic reagent.* Arch. Virol. 70, 297-300.

14) Vinuela E. (1985) *African swine fever virus.* Curr. Top. Microb. Immun. *116*, 151-170.

15) Wilkinson P.J. (1989) *Iridoviridae and African swine fever virus.* In «Andrew's viruses of vertebrates», pp. 333-345, 5th edn., Portfield J.S. ed., Bailliere Tindall.

16) Wilkinson P.J. (1990) *African swine fever.* In «Topley and Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunology», pp. 623-630, 8th edn., Edward Arnold.

S. GAUDI, L. GIAVEDONI*, T. SIMONIC, T. YILMA*

FORMAZIONE DI PARTICELLE SIMILI AL VIRUS (VLPs) CONTENENTI IFN-γ: UN POSSIBILE VACCINO RICOMBINANTE PER HIV (Human Immunodeficiency Virus)

Istituto di Fisiologia Veterinaria e Biochimica, Università di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano e
* International Laboratory of Molecular Biology for Tropical Disease Agents,
School of Vet. Medicine, University of California, Davis

RIASSUNTO

Studi recenti attribuiscono all'immunità cellulo-mediata, piuttosto che agli anticorpi, il controllo iniziale dell'infezione acuta da parte del virus dell'immunodeficenza acquisita umana (HIV). Diverse osservazioni supportano l'ipotesi che la risposta immune di Tipo 1 sia responsabile del controllo delle infezioni intracellulari ed anche dell'attivazione dei meccanismi che inducono la risposta cellulo-mediata. La risposta immune di Tipo 1 é caratterizzata sostanzialmente dalla produzione di interleuchina-2 (IL-2) e di interferone-g (IFN-γ); alti livelli di IFN-γ, a loro volta, inducono una risposta di Tipo 1 favorendo l'espansione di T_H1 e quindi inibendo la proliferazione delle cellule T_H2. In modelli animali, l'IFN-γ modula l'attività microbicida e tumoricida dei macrofagi, la citolisi delle cellule *Natural Killer* (NK) e le risposte agli antigeni sia delle cellule B che T. Da quanto descritto precedentemente si può comprendere l'importanza dell'azione dell'IFN-γ sul sistema immunitario nella difesa contro le infezioni virali.

Le proteine gag dei retrovirus, nel nostro caso gag di HIV, hanno la capacità di portare alla formazione di particelle simili al virus in assenza delle altre componenti virali. Questa peculiare ed importante caratteristica consente di costruire particelle veicolanti IFN-γ, o antigeni di interesse come la proteina env di HIV (gp160). Le particelle chimeriche così ottenute non sono infettive perché manca l'RNA e sono anche facili da isolare mediante centrifugazione del mezzo di coltura. Il facile isolamento le rende disponibili per una sperimentazione in modelli animali.

Abbiamo generato diversi geni chimerici che codificano per le proteine di fusione tra il gene gag di HIV e l'IFN-γ murino (MuIFN-γ). Questi costrutti contengono rispettivamente all'N-terminale o il gene gag o l'MuIFN-γ ed in alcuni casi sono state inserite tra i due geni delle sequenze transmembrana. Abbiamo espresso questi geni in *Vaccinia virus* ed effettuato studi di microscopia elettronica che hanno rivelato la presenza di particelle simili al virus (VLPs) solo nei casi in cui gag si trova all'N-terminale, libero per essere miristilato in glicina. L'attività antivirale indotta dall'IFN-γ è presente in tutte le proteine di fusione. La presenza della sequenza *leader* dell'IFN-γ in una delle due proteine chimeriche, che danno origine al processo di formazione delle VLPs, sembra facilitare il loro rilascio. Gli stessi geni chimerici, che producono VLPs, sono stati clonati in baculovirus e coespressi con il gene env di HIV (gp160) per poter ottenere un numero maggiore di particelle da utilizzare in un modello animale, quale quello rappresentato dal topo, e quindi verificare se la presenza dell'IFN-γ promuove una risposta immune di Tipo 1 contro gli antigeni di HIV.

Parole chiave: HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), VLPs (*Virus-Like Particles*), IFN-γ, *Vaccinia Virus*, Baculovirus, vaccino ricombinante.

FORMATION OF HIV VIRUS-LIKE PARTICLES CONTAINING IFN-γ: A POSSIBLE RECOMBINANT VACCINE FOR HIV

SUMMARY

Recent studies suggest that cell-mediated immunity, rather than antibodies, may be primarily responsible for the initial control of acute HIV infection. Several observations support the hypotesis that Type 1 immune responses are important in controlling intracellular infections and do so by activating cell-mediated immune mechanisms. Type 1 responses are characterized by substantial production of IL-2 and IFN-γ; in turn high levels of IFN-γ increase Type 1 responses. The effects of IFN-γ on the immune system are profound and involve the modulation of macrophage tumoricidal and microbicidal activities, the citolysis of NK cells and B and T cells responses to antigens. IFN-γ inhibits the proliferation of T_H2 cells and stimulates the one of T_H1 cells.

We have generated a number of chimeric genes that code for fusion proteins of HIV gag and murine IFN-γ (MuIFN-γ). The contructs contain either HIV gag or MuIFN-γ at the N-terminus, and in some cases membrane-binding sequences have been inserted between both genes. We have expressed these genes in vaccina virus and used electronmicroscopy for the study of particles formation. The fusion proteins were shown to be correct by western-blot analysis using specific monoclonal antibodies for both proteins. All fusion proteins with HIV gag at the N-terminus form budding processes. The presence of IFN-γ leader sequence in these constructs facilitates the release of VLPs that have an incomplete ring. IFN-γ-induced antiviral activity was retained in all fusion proteins. Additionally, HIV env (gp160) and the same chimeric genes were co-expressed in baculovirus. HIV/IFN-γ VLPs have been purified and used to inoculate mice in order to verify the IFN-γ ability of prompting a Type 1 immune response to HIV antigens that are not delivered by live vectors. Implications for the development of a recombinant vaccine for HIV will be discussed.

Key words: HIV (Human Immunodeficiency Virus), VLPs (Virus-Like Particles), IFN-γ, Vaccinia Virus, Baculovirus, recombinant vaccine.

INTRODUZIONE

Il Virus Vaccino è attualmente usato come vettore per l'espressione di geni esogeni nel citoplasma delle cellule eucariotiche. I ricombinanti del Virus Vaccino (VVr) sono impiegati per sintetizzare proteine biologicamente attive ed analizzarne le relazioni strutturali e funzionali, per determinare le cellule bersaglio dell'immunità umorale e cellulo-mediata, per identificare le risposte immunitarie contro specifiche ma-

lattie infettive. La possibilità di utilizzare il Virus Vaccino come vettore è dovuta alla sua capacità di contenere quantità di DNA esogeno molto grandi (centinaia di Kb), questo consente contemporaneamente il clonaggio e l'espressione di più geni: nel nostro caso il gene gag di HIV (HIV-gag) e l'interferone-g murino (MuIFN-γ).

La presenza di geni che codificano per diverse linfochine, nel genoma del Virus Vaccino, è in grado di diminuirne la virulenza; ricombinanti che esprimono l'interleuchina-2 o l'interferone-g sono meno patogeni rispetto al virus *wild-type* se iniettati in topi nudi atimici (1, 2, 3). Bovini vaccinati con doppi ricombinanti di Virus Vaccino, che esprimono i geni F ed H del virus della peste bovina, hanno mostrato una protezione del 100% ad una dose 1000 volte superiore a quella letale di RPV (*Rinderpest virus*); inoltre non c'è stata trasmissione di virus ricombinante dagli animali vaccinati a quelli, presenti nella stessa stalla, non trattati ed usati come controllo (6). Quanti più dati saranno disponibili sulla sicurezza e sull'efficacia dei ricombinanti del Virus Vaccino (VVr) tanto più questi ricombinanti saranno i migliori candidati per la costruzione di vaccini vivi e per il loro impiego nell'immuno terapia del cancro (13). Esperimenti precedenti hanno dimostrato che ricombinanti del Virus Vaccino, che esprimono solo il gene gag di HIV o di SIV, producono particelle simili al retrovirus (VLPs, *virus-like particles*). Queste particelle hanno una conformazione virtualmente identica al virus infettivo ma non contengono l'RNA virale e quindi non è necessario inattivarlo (4). La peculiare capacità da parte di gag di indurre la formazione di particelle, costituisce una potenzialità estendibile ad altri modelli biologici. La possibilità di fare esprimere antigeni, fattori di crescita, recettori di fattori di crescita o molecole di altra natura sulla superficie delle particelle rende possibile veicolare linfochine, presenti nel lume delle stesse, in specifiche cellule bersaglio. Tutte queste acquisizioni rappresentano il punto di partenza del lavoro condotto, che introduce un'ulteriore innovazione nella costruzione di vaccini ricombinanti.

Lo scopo di questa ricerca è la costruzione di ricombinanti del Virus Vaccino e di Baculovirus che esprimano proteine di fusione tra il gene gag di HIV (HIV-gag) e l'interferone-γ murino (MuINF-γ) in grado di formare VLPs in vista della realizzazione di vaccini ricombinanti vivi ed attenuati (Figura 1).

La miristilazione della glicina N-terminale della proteina gag costituisce uno dei passaggi fondamentali per la formazione di particelle virali. Perciò i geni chimerici sono stati costruiti in modo da presentare al 5'il gene gag, affinchè la proteina gag risulti con l'N-terminale libero, e al 3'l'IFN-γ.

Il nostro intento è quello di verificare se cellule infettate con ricombinanti del Virus Vaccino, che esprimono la proteina di fusione HIV-gag e MuIFN-γ , e che quindi formano VLPs contenenti IFN-γ, costituiscano un vaccino sintetico efficace contro l'infezione da HIV. La produzione locale di citochine, geneticamente ingegnerizzate, aumenta la risposta immunitaria nei confronti dell'infezione virale in corso. Sono stati costruiti geni chimerici usando l'IFN-γ con o senza la sua sequenza *leader* ed il gene gag di HIV. Per poter amplificare le due diverse sequenze dell'IFN-γ murino, sono stati costruiti oligonucleotidi sintetici, contenenti opportuni siti di restrizione compatibili con i siti di restrizione presenti nel gene gag e nel vettore di clonaggio. Questi due frammenti, dopo digestione con XhoI e Sma I, presentavano alle loro estremità i siti idonei per il clonaggio nel vettore plasmidico pVY6 precedentemente linearizzato con gli stessi enzimi.

Il gene gag di HIV, inserito precedentemente nello stesso vettore (pVY6), è stato exciso mediante digestione Xho I e quindi clonato nei due plasmidi ricombinanti che contenevano rispettivamente le sequenze *Mature* e *Leader* dell'IFN-γ.

Per ottenere l'espressione dei due geni chimerici schematizzati nella figura 1 sono state transfettate cellule precedentemente infettate con il Virus Vaccino *wild type*, e sucessivamente sono state selezionate le placche contenenti il gene chimerico, inseritosi dopo ricombinazione omologa, nel genoma di VV (5).

Per verificare l'integrazione dei due geni chimerici nel genoma dell'ospite, è stata condotta un'ibridazione di *dot-blots* che ha rivelato la presenza stabile dei geni chimerici gag-IFN-γ-*Mature* e gag-IFN-γ-*Leader*. L'espressione di questi geni chimerici è stata dimostrata mediante il riconoscimento, da parte degli anticorpi monoclonale contro gag e contro IFN-γ, delle proteine di fusione di peso molecolare corrispondente all'atteso.

L'attività antivirale indotta dalle proteine di fusione gag-IFN-γ-*Mature* e *Leader*, determinata mediante la prevenzione degli effetti citopatici di EMCV (virus dell'encefalomiocardite) in cellule omologhe ed eterologhe, è risultata essere il 10% (3000unità/ml) dell'attività antivirale presente nel virus ricombinante che esprime solo l'IFN-γ.

L'analisi al microscopio elettronico di preparati di cellule infettate con gag-MuIFN-γ-*Mature* (Figura 2) e gag-MuIFN-γ-*Leader* (Figura 3) ha rilevato la presenza di VLPs formate per autoassemblaggio delle proteine chimeriche. Queste particelle hanno un diametro che si aggira attorno ai 120 nm e mostrano un anello elettrondenso incompleto comparato a quello presente nelle particelle che esprimono solo il gene gag (Figura 4). In esperimenti di immunofluorescenza indiretta, la superficie fluorescente delle cellule, infettate con il ricombinante di vaccinia virus (rVV) che esprime gag/MuIFN-γ, indica che l'IFN-γ protrude all'esterno della membrana cellulare (Figura 5). Con l'intento di ottenere un maggior numero di VLPs ricombinanti, questi stessi geni chimerici e il gene envelope (gp160) sono stati espressi in Baculovirus (dati non mostrati). Le particelle prodotte dai geni chimerici gag/MuIFN-γ(M) e gag/MuIFN-γ(L) presentano IFN-γ sulla superficie, disponibile quindi all'interazione con il suo recettore.

La coespressione di questi geni chimerici in combinazione con env (gp160) nel sistema del baculo virus consente la produzione di una grande quantità di VLPs da potere saggiare in topi.

Queste particelle chimeriche, che eprimono i geni strutturali, non sono infettive perché non contengono RNA virale.

Noi proponiamo un nuovo tipo di vaccino per HIV che combina la presenza dei ben caratterizzati antigeni gag ed env con una citochina IFN-γ, infatti la presenza degli antigeni induce la produzione di anticorpi mentre l'IFN-γ stimola le funzioni cellulari accessorie. La presenza dell'IFN-γ durante la risposta immune potrà portare ad una espansione preferenziale delle cellule T_H1 rispetto alle cellule T_H2 ed a loro volta le cellule T_H1 potranno stimolare una risposta immune cellulo mediata in grado di controllare l'inizio dell'infezione virale.

Questo approccio per l'allestimento di nuovi, vaccini ricombinanti vivi sicuri ed efficaci è di fondamentale importanza non solo in una popolazione con un'alta incidenza di HIV (10, 11), ma rappresenta il punto di partenza per lo sviluppo di terapie riguardanti molti altri tipi di patologie (12, 13, 14).

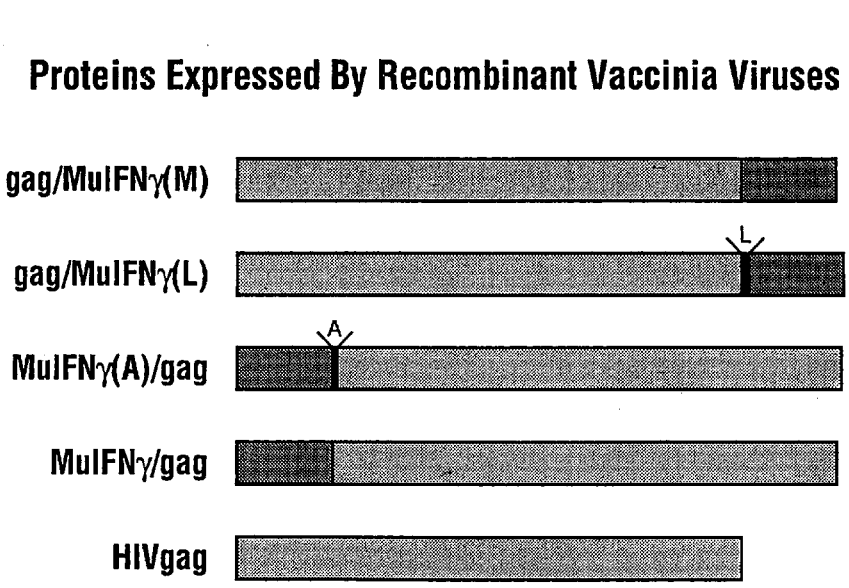


Figura 1 - *Rappresentazione schematica dei geni chimerici.*
I geni codificano per proteine di fusione che contengono rispettivamente all'N terminale o il gene gag di HIV (HIV gag) o l'interferone-γ murino (MuIFN-γ). In alcuni casi sono state inserite delle sequenze transmembrana: il gene chimerico MuIFNγ(A)/gag contiene 20 aminoacidi della sequenza idrofobica dell'emoagglutinina del virus dell'influenza; il gene gag/MuIFNγ(L) contiene 18 aminoacidi della sequenza *leader* dell'IFNγ.

Figure 2-7 - *Studi strutturali: Microscopia Elettronica ed Immunofluorescenza Indiretta.*
Cellule di osteosarcoma umano mancanti dell'enzima timidino chinasi (TK^-) sono state infettate con i diversi ricombinanti di virus vaccino (rVV) e con il virus wt (wild type) per 16 ore. Per l'immunofluorescenza indiretta le cellule sono state fissate e permeabilizzate con metanolo, trattate con un anticorpo monoclonale anti p24 e con un anticorpo secondario legato a FITC. Per gli studi di microscopia elettronica le cellule sono state fissate con glutaraldeide.

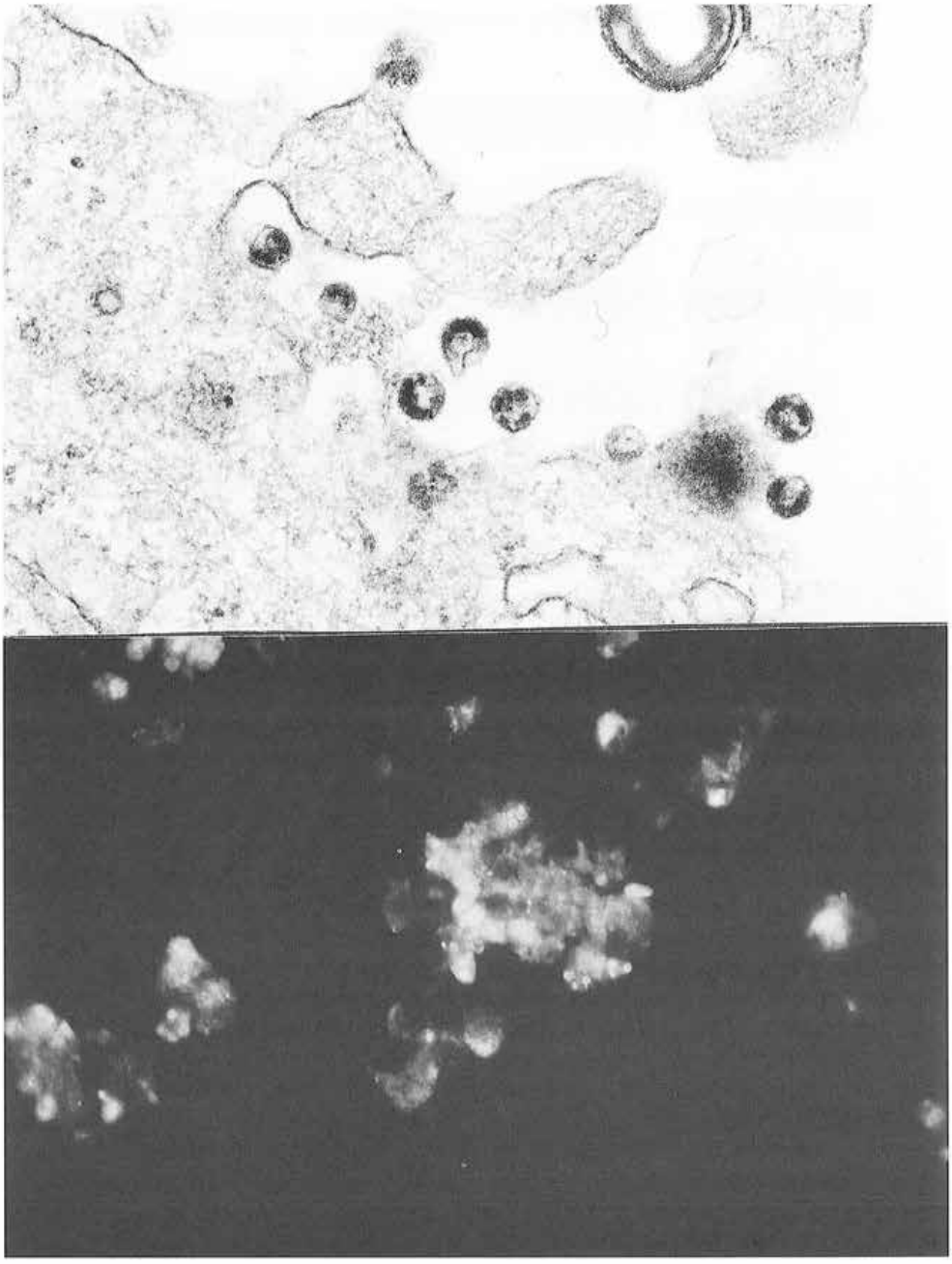


Figura 2 gag/MuIFNγ(M) - L'infezione di cellule TK$^-$ con questi rVV danno origine a VLPs che mostrano un anello elettrondenso incompleto.

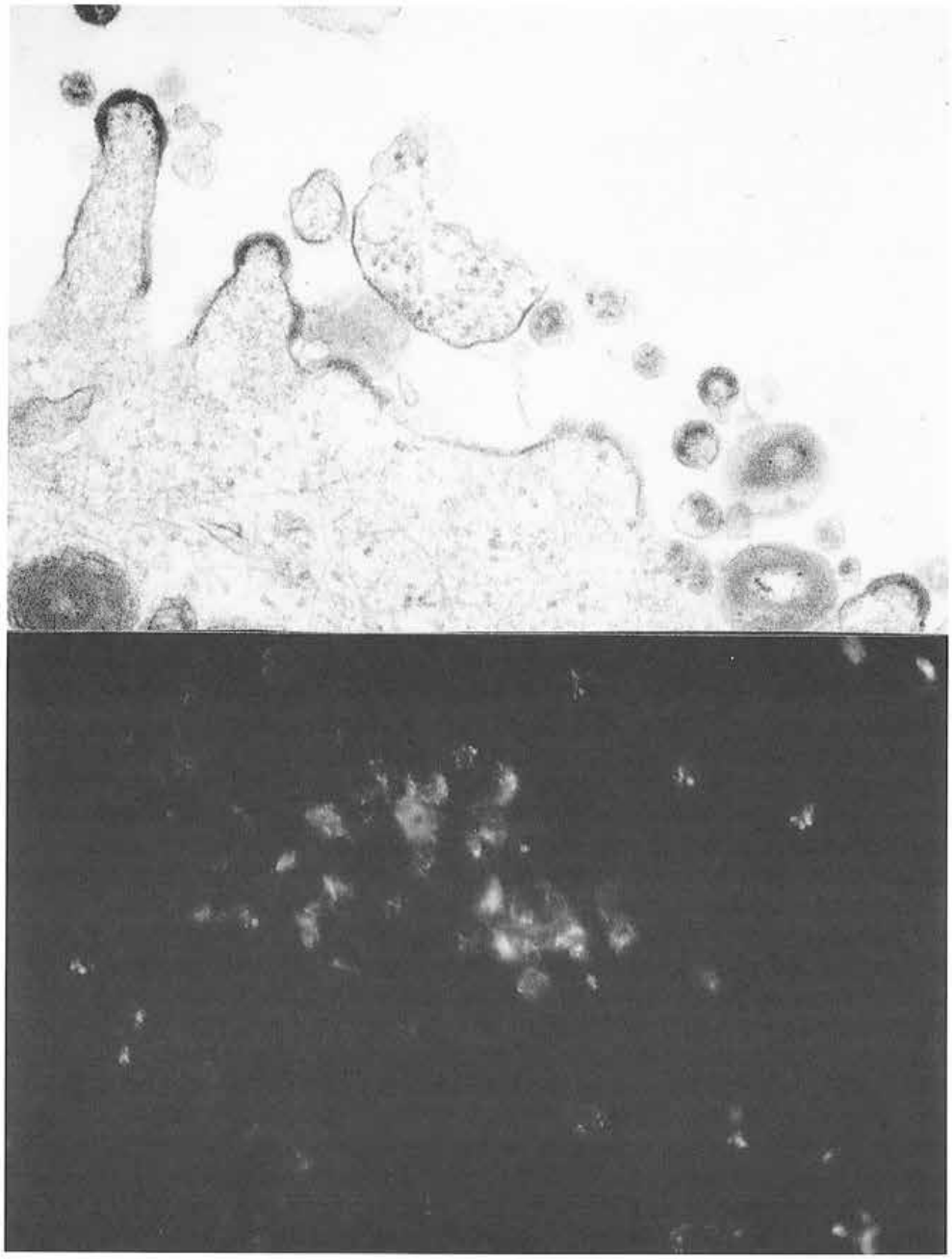


Figura 3 gag/MuIFNγ(L) - L'infezione di cellule TK$^-$ con questi rVV danno origine a VLPs che mostrano un anello elettrondenso incompleto.

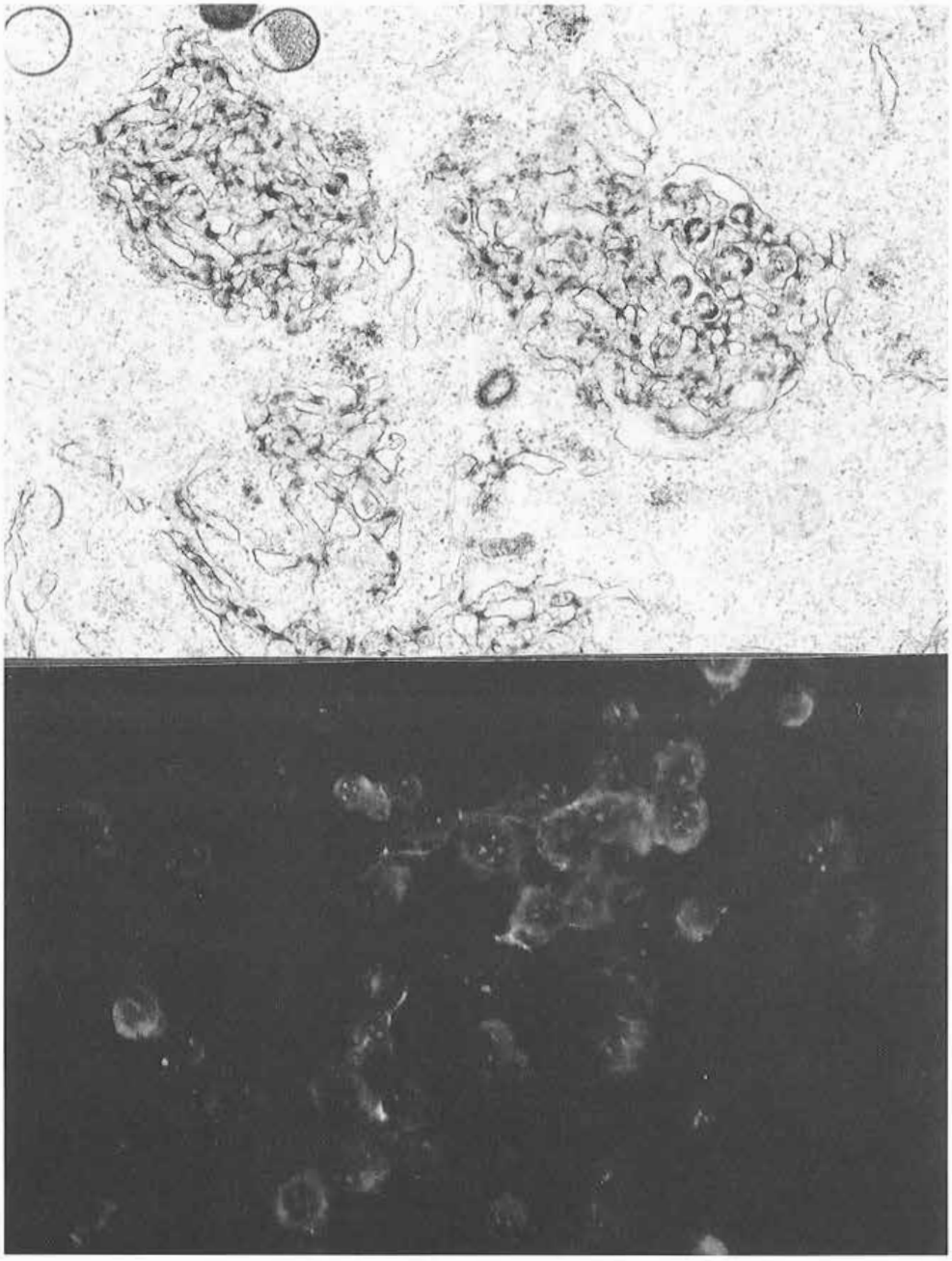


Figura 4 MuIFNγ(A)/gag - La presenza della sequenza dell'emoagglutinina del virus dell'influenza blocca queste proteine di fusione a livello del reticolo endoplasmatico. La fluorescenza citoplasmatica osservata nelle cellule fissate in metanolo, conferma la presenza di processi di «*budding*» nelle cisterne del reticolo endoplasmatico.

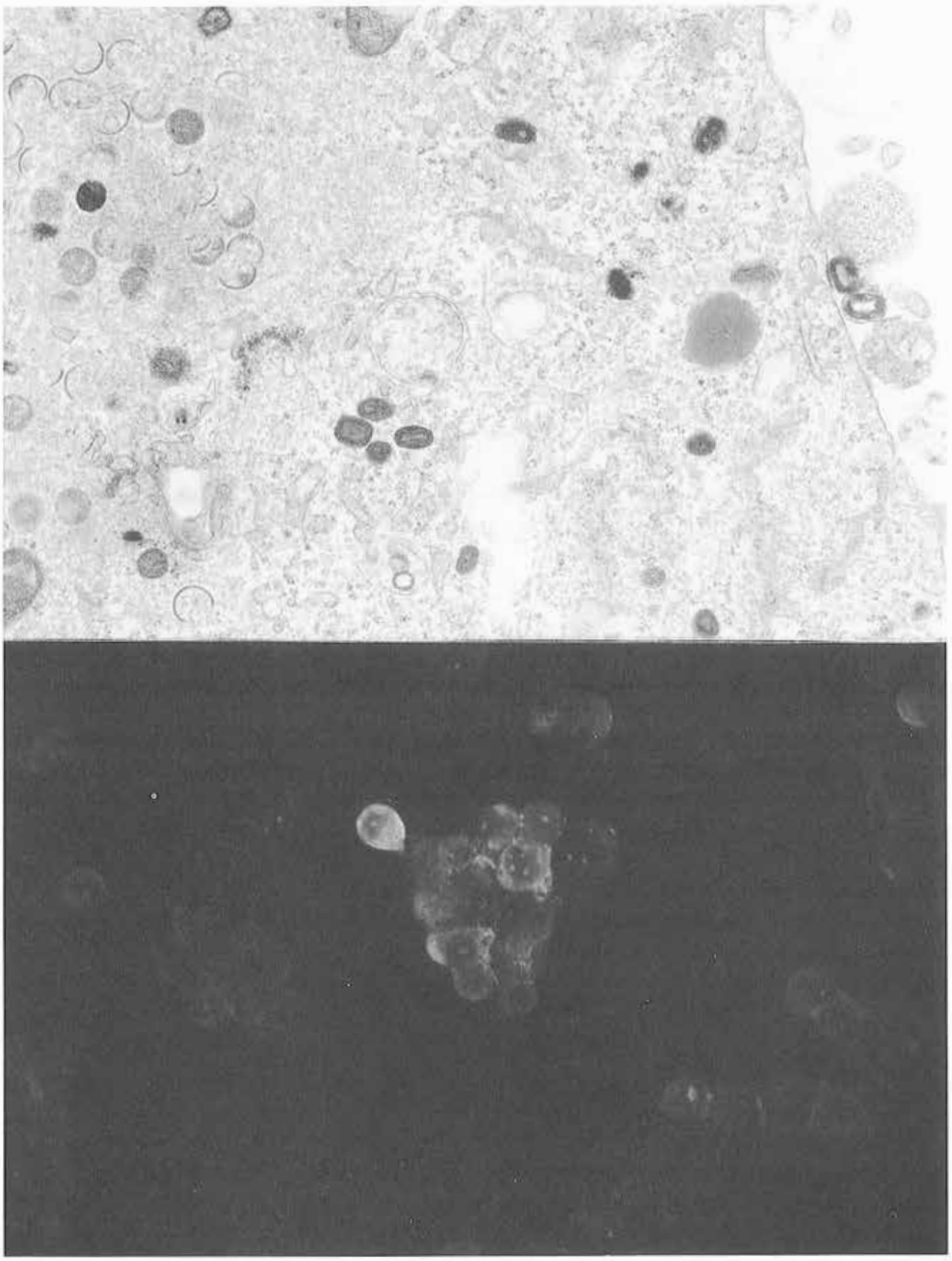


Figura 5 MuIFNγ/gag - L'IFNγ presente all'N-terminale della proteina di fusione non consente la miristilazione della glicina in posizione 11 del gene gag e quindi non porta alla formazione di VLPs con conseguente accumulo di materiale amorfo nel citoplasma.

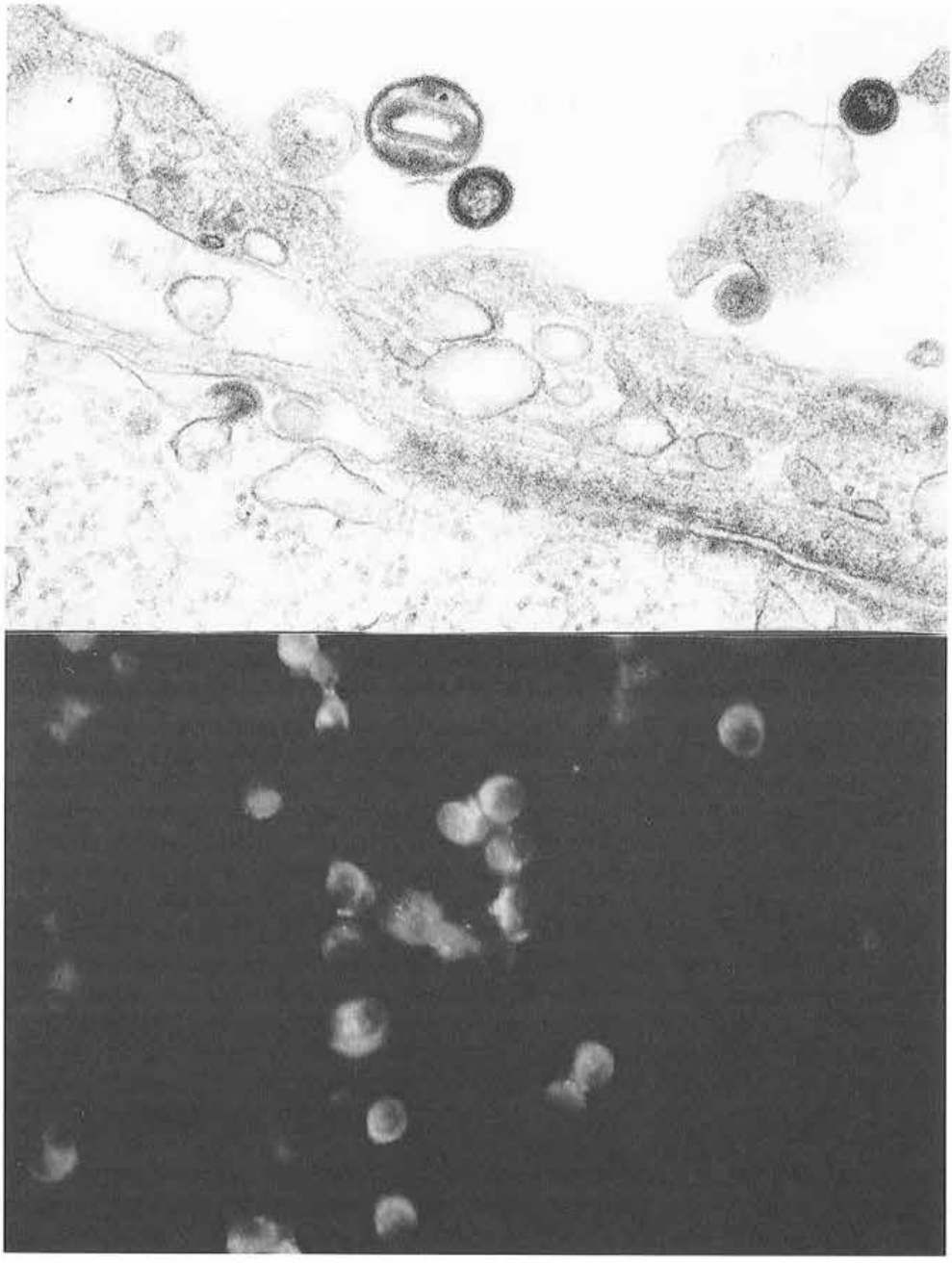


Figura 6 gag - Micrografie di cellule TK$^-$ infettate con rVV che esprime HIVgag e che mostra la formazione di VLPs con un anello elettrodenso completo. L'immunofluorescenza indiretta identifica le proteine gag di HIV.

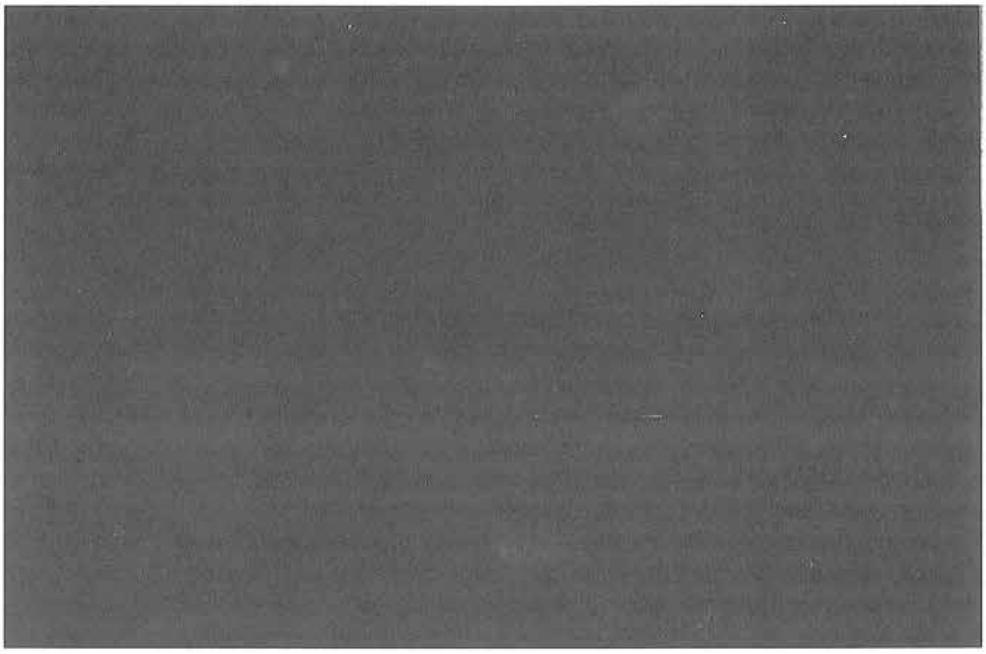


Figura 7 wt - Cellule TK$^-$ infettate con il virus vaccino wt, non esprimendo nessun gene chimerico, non danno origine a nessuna reazione con gli anticorpi specifici per HIV.

BIBLIOGRAFIA

1) Moss B. (1991) *Vaccinia Virus: a tool for research and vaccine development.* Science *252*, 1662-1667.

2) Heath A. W. and Playfair, J. H. L. (1992) *Cytokines as immunological adjuvants.* Vaccine *10*, 427-434.

3) Joklik W. K. (1990) *Interferons.* Virology, 383-410.

4) Giavedoni L. D., Jones L., Gardner M.B., Gibson H. L., Lee Ng C. T., Barr P. J. and Yilma T. D. (1992) *Vaccinia Virus recombinants expressing chimeric proteins of human immunodeficiency virus and g interferon are attenuate for nude mice.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3409-3413.

5) Chakrabarti S., Brechling K. and Moss B. (1985) Mol. Cell. Biol. *5*, 3403-3409.

6) Giavedoni L. D., Jones L., Mebus C. and Yilma T. D. (1991) *A vaccinia virus double ricombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus protects cattle against rinderpest and causes no pock lesions.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 8011-8015.

7) Joklik W. K. (1990) *Interferons.* Virology, 383-410.

8) Luo L., Li Y., Cannon P. M., Kim S. and Kang Y. (1992) *Chimeric gag-V3 virus-like particles of human immunodeficiency virus induce virus-neutralizing antibodies.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 10527-10531.

9) Wills J. W. (1992) *Retro-secretion of recombinant proteins.* Nature *340*, 323-324.

10 Salk J., Bretscher P. A., Salk P. L., Clerici M. and Shearer G. M. (1993) *A strategy for prophylactic vaccination against HIV.* Science *260*, 1270-1272.

11) Haynes, B. F. (1993) *Scientific and social issues of human immunodeficiency virus vaccine development.* Science *260*, 1279-1285.

12) Taylor-Papadimitriou J., Balkwill F. (1993) *Fusion potential for vaccines.* Nature *362*, 659.

13) Tao M. H., Levy R. (1993) *Idiotype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma.* Nature *362*, 755-758.

14) Street N. E. and Mosmann T. R. (1991) *Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns.* The FASEB Journal *5*, 171-177.

W. PONTI, L. MONTERMINI, E. BOLZANI, M. ROCCHI, M. POLLI*,
M. ZANOTTI*, M. LONGERI*, S. RUSSO, A. AGRESTI**, G. POLI

INFLUENZA DEI POLIMORFISMI BoLA SULL'INFEZIONE PRENATALE E NEONATALE DA BLV (BOVINE LEUKEMIA VIRUS)

Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, via Celoria 10 - Milano
* Istituto di Zootecnia, Sezione di Immunogenetica, Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano e
** Ospedale S. Raffaele - Milano.

RIASSUNTO

In due allevamenti di Frisone, ad alta incidenza di leucosi, è stata esaminata l'incidenza della trasmissione verticale dell'infezione da BLV (*Bovine Leukemia Virus*) e, contemporaneamente, è stata analizzata l'influenza dei polimorfismi BoLA di classe I e II su tale tipo di trasmissione.

I dati indicano che la trasmissione pre/prinatale è significativamente correlata alla presenza, nei vitelli, degli alleli BoLA-A20 e DQB-12, ereditati dalla madre.

Parole chiave: infezione da BLV (*Bovine Leukemia Virus*) - trasmissione verticale - polimorfismi BoLA.

INFLUENCE OF BoLA POLYMORPHISMS ON PRENATAL AND NEONATAL BLV (BOVINE LEUKEMIA VIRUS) INFECTION

SUMMARY

In two herds of Holstein Friesian cows, with an high incidence of enzootic leukemia, we analyzed the rate of the vertical transmission of BLV (*Bovine Leukemia Virus*) infection and, moreover, the influence of class I and class II BoLA polymorphisms on such a transmission.

Our data show that BoLA-A20 and DQB12 alleles, transmitted from cows to calves, have a significant influence in inducing prenatal or neonatal BLV infection.

Key words: BLV (*Bovine Leukemia Virus*) infection - Vertical transmission - BoLA polymorphisms.

INTRODUZIONE

La leucosi enzootica bovina (LEB), dovuta all'infezione da parte di un retrovirus, il BLV (*Bovine Leukemia Virus*), è caratterizzata da una lenta evoluzione. Si possono riconoscere infatti 3 stadi successivi: sieropositività agli antigeni virali; linfocitosi persistente (LP), con aumento importante e irreversibile dei linfociticircolanti, pre-

valentemente di tipo B; la LP si manifesta in circa il 30% degli animali infetti e sembra essere geneticamente determinata (4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13); infine il linfosarcoma, tumore dovuto alla trasformazione e alla espansione di un clone linfocitario B, che colpisce però solo una esigua percentuale di animali.

La malattia è attualmente in fase di eradicazione in Italia e in altri Paesi della CEE, e il sistema diagnostico ufficiale è basato sul rilievo di anticorpi anti-gp 51 (la proteina maggiore dell'*envelope* virale).Tale metodo non è applicabile ad animali al di sotto dell'anno di età per la persistenza di anticorpi di origine colostrale. In tal modo sfuggono all'eradicazione i vitelli che vengono infettati per via intrauterina e/o al momento della nascita, e che costituiscono per lungo tempo fonte di infezione per altri.

Non è del resto molto agevole individuare precocemente tali animali, almeno con metodi sierologici, in quanto è complicato, a livello aziendale, organizzare prelievi di sangue prima della assunzione del colostro, come anche somministrare colostro indenne privo di anticorpi. In ogni caso non si può escludere che vitelli risultati eventualmente sieronegativi alla nascita siano in realtà in fase molto precoce di infezione, a meno di eseguire più controlli sierologici distanziati nel tempo per verificare la comparsa della sieroconversione o l'aumento del tasso anticorpale (5).

I dati riportati in letteratura circa l'incidenza della trasmissione verticale di BLV sono piuttosto variabili, e vanno dallo 0,5 al 18% (2); questo può essere legato sì ai sistemi diagnostici inadeguati, ma anche, da un lato, alla diversa patogenicità dei ceppi virali e, dall'altro, alla diversa sensibilità degli animali, legata a fattori genetici.

Pertanto abbiamo sviluppato un metodo di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per il rilievo del DNA provirale nei linfociti circolanti, in modo da poter emettere una diagnosi certa dell'infezione virale anche in fase molto precoce (1) e l'abbiamo applicato per studiare l'infezione perinatale nella razza Frisona. Inoltre, considerando l'importanza degli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità del bovino (BoLA) nel condizionare la resistenza/suscettibilità alla progressione subclinica dell'infezione da BLV (8, 9, 11, 12, 13), abbiamo voluto verificare se anche la trasmissione verticale fosse in qualche modo correlata ai polimorfismi BoLA.

MATERIALI E METODI

Animali

In due allevamenti della Pianura padana sono state scelte 36 vacche di razza Frisona, non imparentate, di età compresa tra i 2 e gli 8 anni, e i rispettivi figli. Le vacche erano tutte sieropositive nei confronti di BLV e per metà circa con LP. La condizione di LP è stato stabilito sulla base delle conte dei linfociti, in funzione dell'età degli animali, secondo la chiave interpretativa di Bendixen.

Identificazione dello stato di infezione da BLV

La sieropositività nei confronti della gp51 di BLV è stata valutata mediante la tecnica di immunodiffusione in *gel* di *agar* (AGID) secondo la metodica ufficialmente riconosciuta dalla CEE.

Nei vitelli lo stato di infezione è stato determinato, entro la prima settimana dalla nascita, mettendo in evidenza il DNA provirale nei linfociti circolanti, dopo amplificazione dello stesso mediante PCR. I *primers* utilizzati (1) consentono l'amplificazione di 3 frammenti di DNA provirale interni ai geni *gag*, *pol* ed *env* (Fig.1).

Identificazione degli antigeni di istocompatibilità

Gli antigeni di classe I sono stati identificati mediante test di microlinfocitotossicità sui linfociti del sangue periferico, utilizzando un pannello di 69 reagenti, capaci di definire 12 specifictà internazionalmente riconosciute. I polimorfismi di classe II sono stati identificati con la tecnica RFLPs (*Restriction Fragment Lengh Polymorphisms*), tagliando il DNA con gli enzimi di restrizione TaqI, PvuII e BglII e ibridandolo con le sonde specifiche per le regioni DQA primo e secondo dominio, DQB secondo dominio (3) e DRB2 secondo dominio (12).

Analisi statistica

Il Rischio relativo (RR) della trasmissione verticale del virus è stato determinato come il rapporto tra i due prodotti in croce nelle tavole 2x2, che prendevano in considerazione la trasmissione contemporanea dell'allele BoLA e dell'agente infettante. L'associazione tra gli aplotipi BoLA e la trasmissione verticale della patologia è stata stimata sulle tavole di contingenza 2x2 mediante il test del c^2 (c^2 Fisher's exact test SAS Inst. Cary NC).

RISULTATI

5 vitelli su 36 (pari al 13%) sono risultati positivi al test PCR alla nascita.

Delle 36 coppie madre/figlio esaminate complessivamente, 26 sono state testate per la classe I, 16 per il DQA, 36 per il DQB e 18 per il DRB. L'analisi statistica è stata poi limitata agli alleli trasmessi nei 5 animali risultati infetti dal virus alla nascita, che peraltro sono tutti figli di vacche linfocitotiche o con una situazione ematologica sospetta. Il test delc^2 ha dato probabilità significative per gli alleli A20 (BoLA-A) e DQB-12 (rispettivamente $p = 0.002$ e $p = 0.009$), e al limite della significatività ($p = 0.06$) per l'allele DQA-11B (vedi Tab. 1 e Fig. 2).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati indicano che negli allevamenti da noi studiati il tasso della trasmissione verticale è di circa il 13%, piuttosto alto, quindi, e tale da risultare forse importante ai fine della successiva trasmissione orizzontale ad altri animali.

Si è già detto che precedenti segnalazioni (2) indicano una notevole variabilità dell'incidenza della trasmissione perinatale, con valori anche molto bassi, addirittura inferiori all'1%. È ovvio che questi numeri possono risentire del tipo di campionamento: ad esempio l'incidenza è molto più elevata negli animali portatori di linfosarcoma (10), mentre è stato evidenziato che la presenza LP favorisce la trasmissio-

ne verticale (5). Tuttavia la sensibilità del metodo diagnostico da noi utilizzato è tale che possono essere messi in evidenza anche animali nelle primissime fasi di infezione, che sfuggirebbero probabilmente ad indagini diverse. Quindi il dato da noi rilevato, pur limitato dalla bassa numerosità del campione, dovrebbe essere indicativo della reale incidenza della trasmissione verticale.

Nella nostra campionatura gli alleli BoLA-A20 e DQB-12 sono risultati fortemente associati alla trasmissione dell'infezione, con una probabilità altamente significativa, mentre DQA-12 e DRB-3A, pur non significativi, presentano il RR più alto tra gli alleli del *locus*.

Questo dato è interessante in quanto gli stessi 4 alleli, in un'analisi condotta a livello di popolazione (dati non mostrati) sono risultati associati alla predisposizione a sviluppare la LP, in accordo con quanto evidenziato da altri Autori su campionature differenti (8, 12).

Si può quindi affermare che le vacche con LP, come già osservato da altri (5), e con alleli BoLA a «rischio», più facilmente di altre trasmettono l'infezione ai figli. È per il momento comunque difficile stabilire se tale trasmissione sia in effetti favorita da una particolare conformazione degli antigeni di superficie dei linfociti, che sembra implicata, almeno per quanto riguarda la regione DRB (12, 13) nella presentazione del virus alle cellule immunocompetenti, o sia invece, più semplicemente, dovuta alla presenza di una quantità più elevata di virus nell'organismo materno.

Se la prima ipotesi fosse corretta, anche l'identificazione del BoLA-tipo potrebbe rientrare nei criteri da utilizzare per la selezione del bestiame, al fine del miglioramento sanitario degli allevamenti.

Ringraziamo il Dr. H.A. Lewin (Urbana,), il Dr. J.J./ vàn der Poel (Wageningen) e il Dr. M.J.T. van Eijk (Utrecht) che ci hanno fornito le sonde per la determinazione del BoLA-tipo di classe II.

Tabella 1 - Effetto dei polimorfismi MHC sulla trasmissione verticale di BLV. RR di ogni singolo allele per locus e P di PX^2.

BoLA-A

	A15	A19	A20
RR	1.5	2.83	80
PX^2	1	0.55	0.002

BoLA-DRB

1C	2D	3A
0.44	7	8
1	0.31	0.17

BoLA-DQB

	2	9B	11A	12
RR	2.33	1.69	21	20.08
PX^2	0.46	0.55	0.14	0.009

BoLA-DQA

11B	12
3	16.02
0.06	0.18

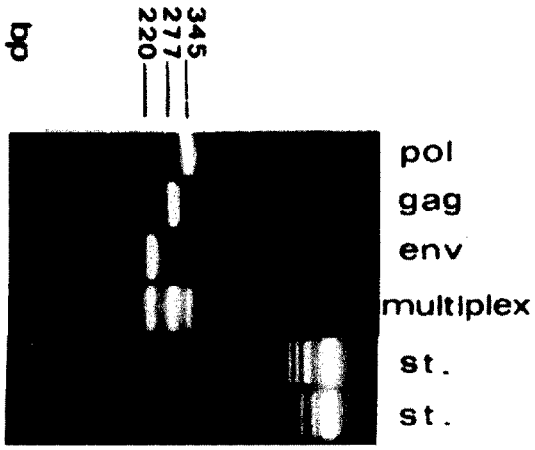


Figura 1 - PCR. Elettroforesi in *gel* di agarosio, in presenza di etidio bromuro, dei prodotti della amplificazione di frammenti interni ai geni *gag*, *pol* ed *env*, ottenibili separatamente, o contemporaneamente (*multiplex*) sullo stesso campione. St = standard di peso molecolare.

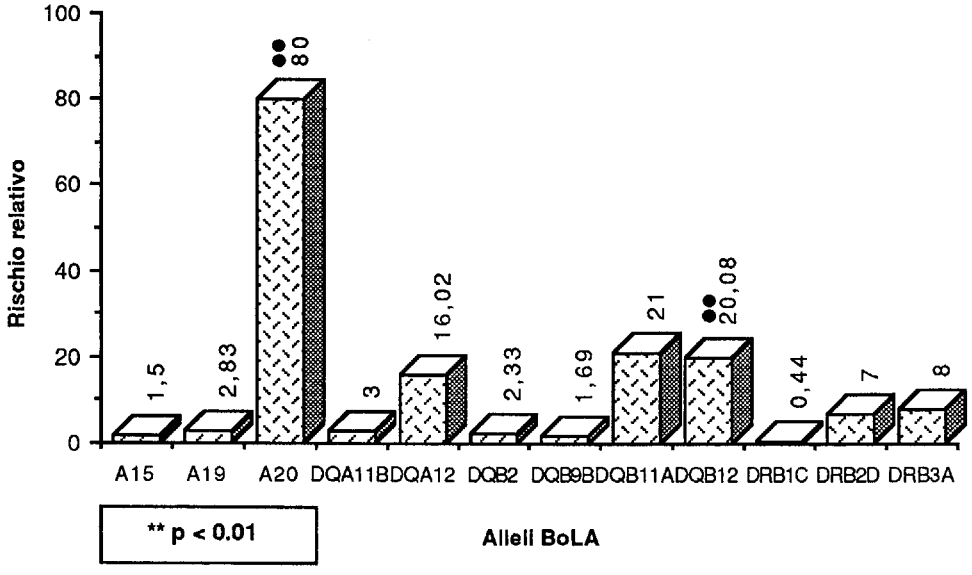


Figura 2 - Effetto degli alleli relativi alle regioni BoLA-A e BoLA-D sulla trasmissione verticale di BLV.

BIBLIOGRAFIA

1) AGRESTI A., PONTI W., ROCCHI M., MENEVERI R., MAROZZI A., CAVALLERI D., PERI E., POLI G., GINELLI E. (1993) *Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth.* Am. J. Vet. Res. *54*, 373-378.

2) DI GIACOMO R.F (1992) *Vertical transmission of the bovine leukemia virus. Symposium on bovine leukemia virus infection.* Veterinary Medicine, March, 258-262.

3) GROENEN M.A.M., VAN DER POEL J.J., DIJKHOF R.J.M., GIPHART M.J. (1990) *The nucleotide sequence of bovine MHC class II DQB and DRB genes.* Immunogenetics *31*, 37-45.

4) HINES H.C., ROSS M.J., MICHALAK M.M., ALLAIRE F.R. (1984) *The association of BoLA antigens with milk production and disease susceptibility differences.* An. Blood Group Biochem. Gen. *16* (suppl. 1), 89-95.

5) LASSAUZET M.L.G., THURMOND M.C., JOHNSON W.O., HOLMBERG C.A. (1990) *Factors associated with in utero or periparturient transmission of Bovine Leukemia Virus in calves on a California dairy.* Can. J. Vet. Res. *55*, 264-268.

6) LEVEZIEL H. (1989). *BoLA et leucose bovine.* Ann. Rech. Vét. *20*, 395-405.

7) LEWIN H.A. (1989) *Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence.* J. Dairy Sci. *72*, 1334-1338.

8) LEWIN H.A., WU M.C., STEWART A., NOLAN T.J. (1988) *Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein Friesian cows.* Immunogenetics *27*, 338-344.

9) LONGERI M., BOLZANI E., POLLI M., PONTI W., ZANOTTI M., POLI G. (1991) *Analisi delle popolazioni linfocitarie ed altri parametri immunologici nel bovino in correlazione all'infezione da BLV e al BoLA-tipo.* Boll. Microb. Ind. Lab. *11 (3)*, 37-45.

10) OHSHIMA K., TAKAHASHI K., OKADA K., NUMAKUNAI S., KAGAWA Y., MINAMINO K. (1982) *A pathologic study on fetuses and placentas from cows affected with Enzootic Bovine Leukosis with reference to transplacental infection of Bovine Leukemia Virus.Jpn.* J. Vet. Sci. *44*, 479-488.

11) STEAR M.J., DIMMOCK C.K., NEWMANN M.J., NICHOLAS F.W. (1988) *BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukemia virus.* Animal Genetics *19*, 151-158.

12) VAN EIJK M.J.T., STEWART-HAYNES J..A., BEEVER J.E., FERNANDO F.H., LEWIN H..A. (1992) *Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with DRB2.* Immunogenetics *37*, 64-68.

13) XU A., VAN EIJK M.J.T., PARK C., LEWIN H.A. (1993) *Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by Bovine Leukemia Virus.* J. Immunol. *151*, 6977-6985.

Atti della 2ª Conferenza Nazionale su:
Stato dell'arte delle ricerche
italiane nel settore delle
biotecnologie applicate alle
scienze veterinarie e zootecniche

G. SIRONI

ALTERATA ESPRESSIONE DEL TUMOR SUPPRESSOR GENE P53 IN NEOPLASIE DI ALCUNE SPECIE DOMESTICHE: INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Università di Milano,
via Celoria 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

Il ciclo cellulare è costituito da un'ordinata sequenza di eventi che possono essere regolati positivamente o negativamente da vari fattori. Un importante ruolo di regolazione negativa si ritiene sia svolto dal *tumor suppressor gene* p53 e dalla proteina da esso codificata. L'alterazione o l'inattivazione della proteina p53, per mutazione o per stabilizzazione da parte di altre proteine virali o cellulari ad azione oncogenica, può indurre trasformazione cellulare. Poiché tali alterazioni sembrano essere frequentemente presenti nelle neoplasie maligne dell'uomo, si è voluto, con il presente studio, valutare immunoistochimicamente la presenza di un'anomala espressione della proteina p53 in neoplasie degli apparati tegumentario, respiratorio, digerente, genitale, del gatto e del cavallo. Positività immunoistochimiche sono state riscontrate in un'elevata percentuale di carcinomi squamosi cutanei e delle mucose di entrambe le specie. Assai meno frequente è stato invece il riscontro di campioni positivi nelle neoplasie mammarie e degli apparati respiratorio e digerente del gatto.

Parole chiave: proteina p53 - neoplasie - gatto - cavallo.

ABERRANT EXPRESSION OF p53 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN TUMORS OF SOME DOMESTIC ANIMAL SPECIES: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Summary

The cell cicle is composed of a series of steps which can be negatively or positively regulated by various factors. An important downregulation function is carried out by tumor suppressor gene p53 and its protein product. Alteration or inactivation of p53 protein by mutation or stabilization mediated by viral or cellular oncoproteins can lead to cellular transformation. Such alterations are frequently detected in human malignant tumors. In the present study, the presece of aberrant expression of p53 protein in tumor of integumentary, respiratory, alimentary and genital sistems of horse and cat has been assessed. Immunohistochelmiacl positive reaction, which the sign of altered gene expression, has been observed in high percentage of cutaneous and mucosal squamous cell carcinomas of both species. Positive sam-

ples were less frequently detected among tumors of the mammary gland and of respiratory and alimentary tract of cat.

Key words: p53 protein - neoplasms - cat - horse.

INTRODUZIONE

«Certe molecole sono bravi soggetti, certe altre sono cattivi soggetti, altre ancora cattivi soggetti lo diventano quando perdono le loro funzioni. La molecola p53 è veramente un buon tipo quando funziona correttamente. Ma un piccolo cambiamento, una mutazione in uno dei suoi 393 aminoacidi, può eliminare la capacità della proteina di controllare il ciclo cellulare permettendo così al cancro di svilupparsi (4)».

Con queste parole si apriva sull'ultimo numero del 1993, l'editoriale con il quale la rivista *Science* nominava la proteina p53 «Molecola dell'anno».

p53 e cancerogenesi

Il *tumor suppressor gene* p53 codifica una fosfoproteina nucleare la cui sequenza aminoacidica risulta fortemente conservata nella scala evolautiva dei vertebrati (8). I meccanismi molecolari attraverso i quali essa agisce nella cellula normale sono ancora poco noti, tuttavia ecenti studi suggeriscono che la proteina p53 è in grado di legarsi a specifiche sequenze di DNA, agendo come punto di controllo di eventuali danni al DNA stesso nel passaggio tra la fase G1 e la fase S del ciclo cellulare.

Almeno cinque approcci sperimentali dimostrano che l'alterazione e/o l'inattivazione funzionale della proteina p53 sono probabilmente meccanismi di notevole importanza nei processi di trasformazione neoplastica (2) (figura 1):

— muatzioni puntiformi, riarrangiamenti e delezioni del gene p53 sono state osservate in un'alta percentuale (circa il 50%) di neoplasie maligne dell'uomo;

— mutazioni del gene p53 nella linea germinativa dell'uomo sono associate ad una sindrome familiare caratterizzata da un'elevata incidenza di neoplasie multiple (Sindrome di Li-Fraumeni);

— topi privati sperimentalmente del gene p53 presentano una predisposizione alla formazione di neoplasie in età giovanile;

— molti processi oncogenetici mediati da virus sono legati all'intrerazione della proteina p53 con oncoproteine virali e alla conseguente inattivazione della proteina stessa;

— l'oncoproteina celluare mdm 2, codificata da un gene spesso amplificato in sarcomi dell'uomo, sembrerebbe agire legandosi alla proteina p53 e determinandone così l'inattivazione funzionale.

Nei tessuti normali, la proteina p53 non è rilevabile con metodi immunoistochimici a causa della sua breve emivita e della bassa concentrazione intracellulare (2). La mutazione puntiforme e l'inattivazione conseguente all'interazione con oncoproteine cellulari o virali possono però stabilizzare la proteina causandone una sovraesposizione rilevabile immunoistochimicamente (3, 7, 9). Numerosi studi realizzati su neoplasie dell'uomo hanno dimostrato l'esistenza di una buona, se pur non asso-

luta, correlazione tra la presenza di mutazioni puntiformi e la sovraesposizione fenotipica rilevabile con tecniche immunoistochimiche (2, 3, 9). In conseguenza di ciò, indagini immunoistochimiche sono state effettuate, nel corso degli ultimi 2-3 anni su di un'ampia varietà di neoplasie dell'uomo. Poiché, al contrario, il ruolo svolto dalla proteina p53 nei processi di cancerogenesi spontanea degli animali domestici è ancora poco noto, con il presente studio, si è voluta valutare immunoistochimicamente la presenza di una anomala espressione della proteina p53 in neoplasie di vari organi di gatto e di cavallo.

A tale scopo, sezioni istologiche di 132 tumori di gatto e 58 tumori di cavallo beneigni o maligni, a varia localizzazione sono stati esaminati immunoistochimicamente con tecnica Avidina-Biotina associata a metodiche di pretrattamento in forno a microonde utilizzando gli anticorpi monoclonali DO 1, in grado di reagire sia con forme normali che con forme mutate di proteina p53, e PAb 240, un anticorpo specifico per alcune forme mutate della proteina p53 (1).

RISULTATI

All'esame immunoistochimico, sovraesperssione della proteina p53, sempre limitata ai nuclei delle sole cellule tumorali, è stata rinvenuta in diverse neoplasie di entrambe le specie studiate. In nessun caso sono stati osservati campioni p53 positivi tra le neoplasie benigne. Tra le neoplasie maligne del cavallo (tabella 1), campioni positivi per p53 sono stati riscontrati, con entrambi gli anticorpi, tra i carcinomi squamosi (9/11) (figura 2), i basaliomi (1/3) ed in due singoli casi di adenocarcinoma delle ghiandole sebacee (figura 3) e di leucosi megacariocitica (figura 4). La percentuale di cellule neoplastiche positive è sempre stata superiore al 50%. Assai più avria, invece, è risultata la distribuzione dei campioni positivi tra i tumori maligni del gatto (tabella 2) (figure 5, 6 e 7), nell'ambito dei quali di particolare rilevanza è apparsa l'elevata incidenza di carcinomi squamosi con diffusa positività per la proteina p53. Analogamente a quanto osservato nel cavallo, tutti i campioni positivi sia con DO1 sia con PAb 240 presentavano una percentuale di cellule neoplastiche positive superiore al 50%. Va tuttavia segnalata la presenza di un certo numero di campioni di tumori di gatto, quasi tutti positivi con il solo anticorpo DO1, nei quali la percentuale di cellule positive variava tra il 10 e il 50% o, in qualche caso, tra il 5 e il 10%.

CONCLUSIONI

I risultati qui descritti dimostrano la presenza di una sovraespressione della proteina p53 in alcune neoplasie maligne del gatto e del cavallo. In entrambe le specie, la percentuale globale di campioni positivi appare inferiore a quella osservata in neoplasie maligne dell'uomo (7) e ciò lascerebbe supporre un meno frequente coinvolgimento del gene e della proteina p53 nei meccanismi di carcinogenesi di queste due specie animali. Va tuttavia rilevata l'elevatissima percentuale di acmpioni positivi, anche utilizzando anticorpi specifici per alcune forme di proteina p53 mutata, tra i carcinomi squamosi di entrambe le specie. Ciò suppoterebbe l'ipotesi che, sia

nel gatto sia nel cavallo, mutazioni della proteina p53 possono svolgere un'importante ruolo nel processo carcinogenetico di tali neoplasie. Questa ipotesi può inoltre essere estesa a tutti quei tumori che, nella presente prova, hanno mostrato una diffusa positività con entrambi gli anticorpi utilizzati. Una definitiva e incontrovertibile conferma di ciò è però necessaria e solo l'analisi del DNA della sequenza genica di p53 in tali neoplasie ed il suo confronto con quella del gene p53 normale del gatto — recentemente clonato (5) — e del cavallo — a tutt'oggi sconosciuta — potrà essere d'aiuto a tal fine.

Un commento merita infine quella ristretta parte di tumori, tutti del gatto, risultati positivi per la presenza di proteina p53 solo con l'anticorpo DO1. In tali neoplasie, infatti, la mancanza di reattività nei confronti dell'anticorpo PAb 240 potrebbe essere attribuita sia alla presenza di forme mutate di proteina p53 non riconosciute da tale anticorpo sia, e più probabilmente, a meccanismi di stabilizzazione della proteina p53 normale in seguito alla sua interazione con altre proteine cellulari (3, 9).

Rivolgo un sentito ringraziamento ai Sig. Silvia De Carli, Mariangela De Franco, Piera Ferrieri, Pietro Riccaboni e ai Dr. Lucia Gibelli e Daniele Sisti che mi hanno coadiuvato con entusiasmo nella realizzazione del presente studio. Ognuno di essi può essere considerato, a pieno titolo, coautore di singole parti dello studio. Un particolare ringraziamento rivolgo inoltre al Dr. Giorgio Cattoretti, Dept. of Pathology, Columbia University, New York che, oltre ad avere inizialmente ispirato e incoraggiato questa ricerca, è stato durante tutto il periodo della sua realizzazione una inesauribile fonte di preziosissimi suggerimenti.

Tabella 1 - Risultati delle indagini immunoistochimiche realizzate su varie neoplasie di cavallo. Per ogni anticorpo viene riportato il rapporto casi positivi/casi esaminati.

	DO1	PAb 240
Cute		
Papilloma	0/3	0/3
Basalioma	1/2	1/2
Carcinoma squamoso	4/4	4/4
Adenocarcinoma ghiandole sebacee	1/1	1/1
Fibroma	0/3	0/3
Endotelioma	0/1	0/1
Linfangioendotelioma	0/1	0/1
Schwannoma	0/10	0/10
Sarcoide	0/6	0/6
Apparato digerente		
Carcinoma squamoso	0/1	0/1
Apparato respiratorio		
Carcinoma squamoso	1/1	1/1
Schwannoma	0/1	0/1
Sarcoma linforeticolare	0/1	0/1
Sistema urinario		
Adenoma renale	0/1	0/1
Adenocarcinoma tubulare renale	0/1	0/1
Mieloma	0/1	0/1
Apparato genitale		
Adenoma cellule interstiziali	0/1	0/1
Sertolioma	0/1	0/1
Tecoma	0/1	0/1
Tumore cellule della granulosa	0/1	0/1
Basalioma	0/1	0/1
Carcinoma squamoso	4/5	4/5
Melanoma maligno	0/1	0/1
Sistema endocrino		
Adenoma follicolare tiroideo	0/1	0/1
Carcinoma follicolare tiroideo	0/1	0/1
Feocromocitoma	0/2	0/2
Sistema emopoietico		
Leucosi linfoide	0/1	0/1
Leucosi megacariocitica	1/1	1/1

Tabella 2 - Risultati delle indagini immunoistochimiche realizzate su varie neoplasie di gatto. Per ogni anticorpo viene riportato il rapporto casi positivi/casi esaminati.

	DO1	PAb 240
Cute		
Basalioma	0/4	0/4
Carcinoma squamoso	18/30	13/30
Adenoma sebaceo	0/2	0/2
Adenoma ghiandole sudoripare	0/1	0/1
Adenoma ghiandole ceruminose	0/2	0/2
Epitelioma sebaceo	0/4	0/4
Epitelioma ghiandole ceruminose	0/1	0/1
Adenocarcinoma sebaceo	1/3	0/3
Adenocarcinoma ghiandole sudoripare	0/3	0/3
Adenocarcinoma ghiandole ceruminose	2/9	1/9
Melanoma maligno	1/2	0/2
Fibromixosarcoma	1/2	1/2
Apparato gastroenterico		
Canale digerente superiore		
Carcinoma squamoso	7/11	6/11
Canale digerente inferiore		
Polipo	0/1	0/1
Adenocarcinoma	3/21	1/21
Apparato respiratorio		
Vie aeree superiori		
Carcinoma squamoso	1/2	1/2
Polmone		
Adenocarcinoma bronchiolo-alveolare	3/6	1/6
Adenocarcinoma papillare	3/11	1/11
Carcinoma squamoso	0/1	0/1
Carcinoma anaplastico a grosse cellule	0/1	0/1
Carcinoma anaplastico a piccole cellule	0/1	0/1
Carcinoma epidermoide	0/1	0/1
Ghiandola mammaria		
Complesso iperplasia-fibroadenoma	0/7	0/7
Adenoma	0/1	0/1
Adenocarcinoma tubulare	2/13	1/13
Adenocarcinoma tubulopapillifero	1/10	1/10
Adenocarcinoma cistopapillifero	0/4	0/4
Adenocarcinoma trabecolare	0/19	0/19
Carcinoma solido	5/12	3/12
Carcinoma squamoso	0/3	0/3
Comedocarcinoma	0/1	0/1
Tumore misto maligno	0/1	0/1

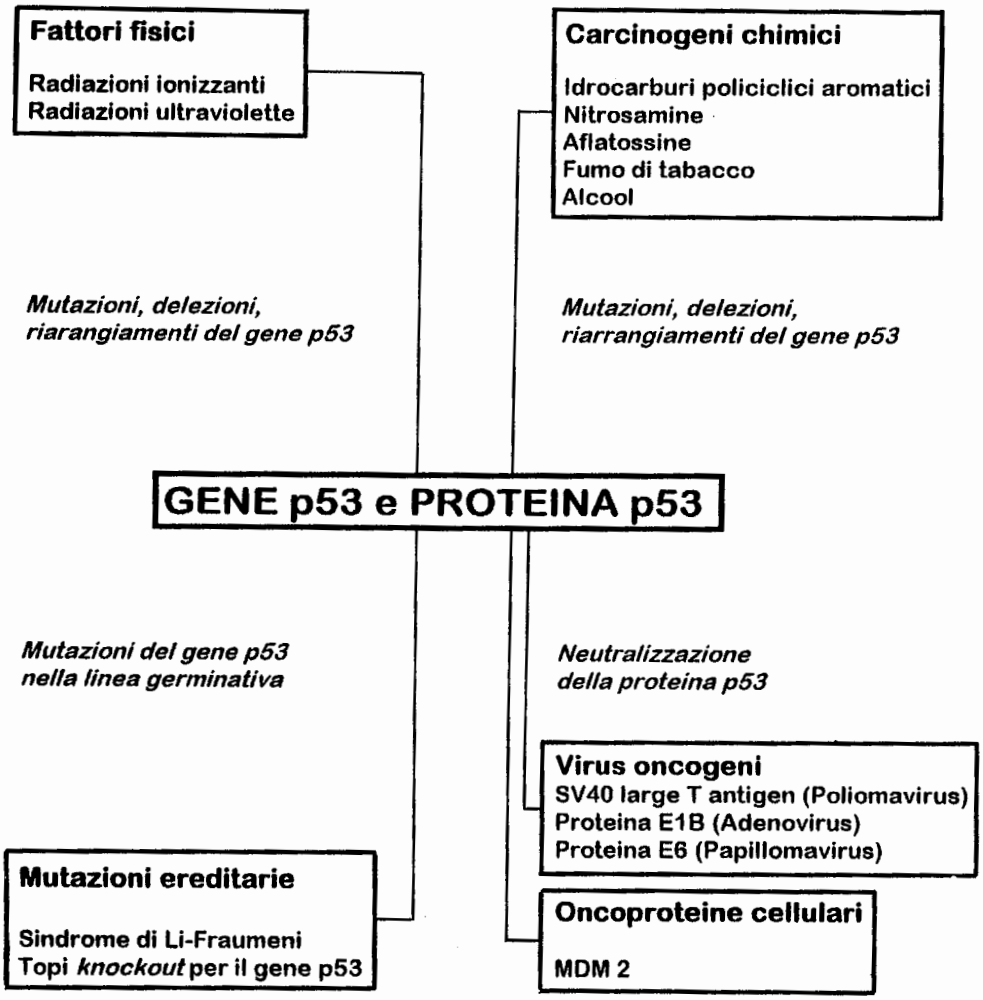


Figura 1 - Rappresentazione schematica dei meccanismi di inattivazione del gene e della proteina p53.

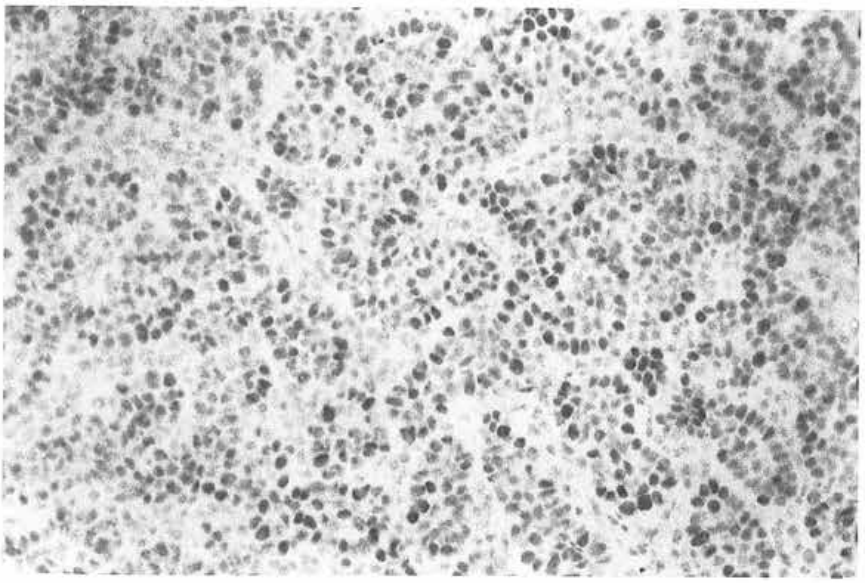


Figura 2 - Cavallo - Prepuzio. Diffusa risposta positiva per proteina p53 con anticorpo DO 1 in un carcinoma squamoso. 400x.

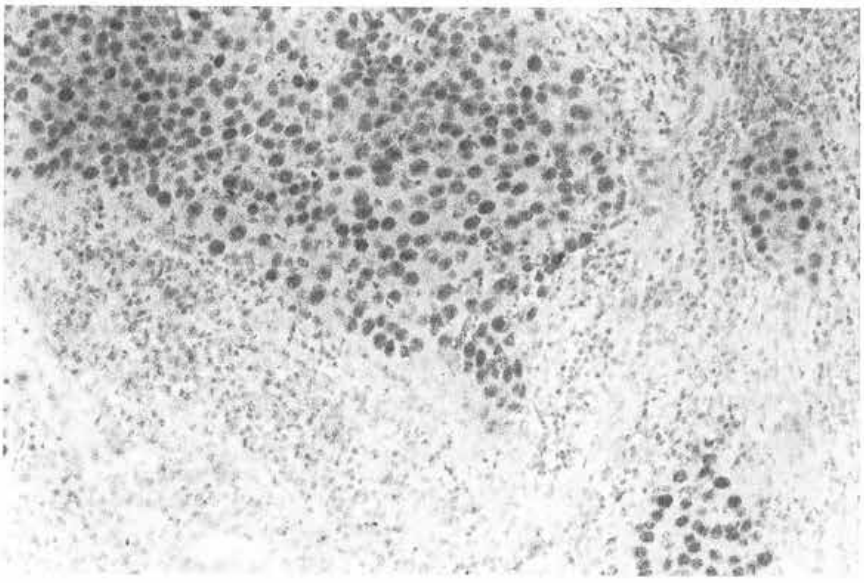


Figura 3 - Cavallo - Palpebra. Sovraespressione di p53 rilevata con anticorpo PAb 240 in un adenocarcinoma delle ghiandole sebacee. 400x.

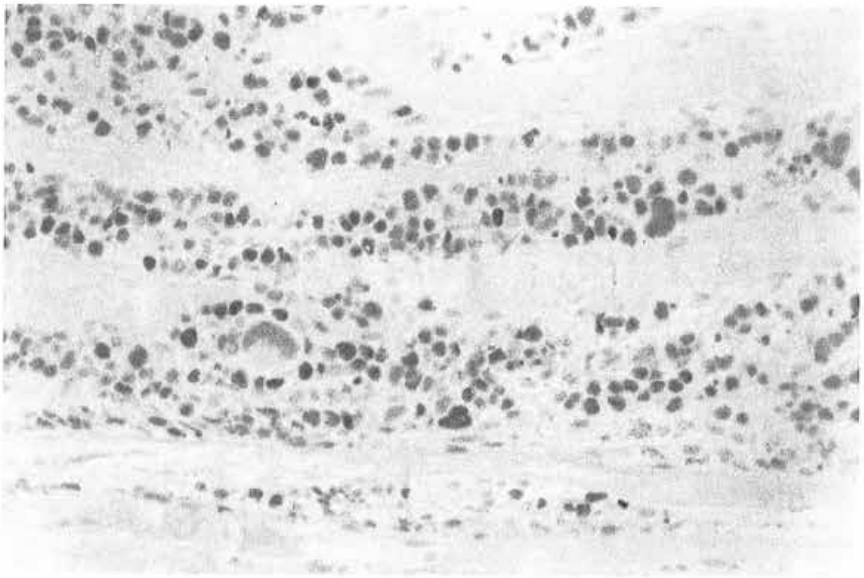


Figura 4 - Cavallo - Tessuto muscolare. Sovraespressione di p53 rilevata con anticorpo PAb 240 in una metastasi di leucosi megacariocitica. 400x.

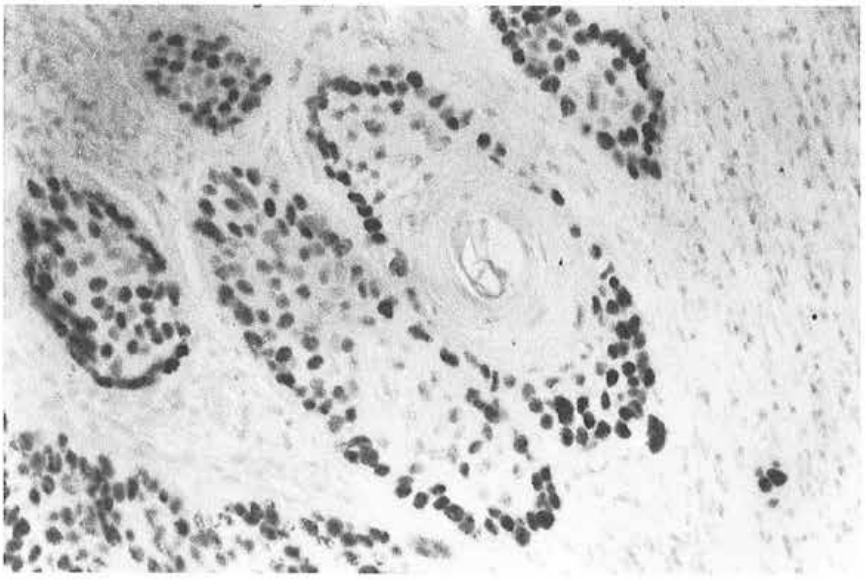


Figura 5 - Gatto - Cute. Positiva immunoreazione con anticorpo PAb 240 in un carcinoma squamoso. 400x.

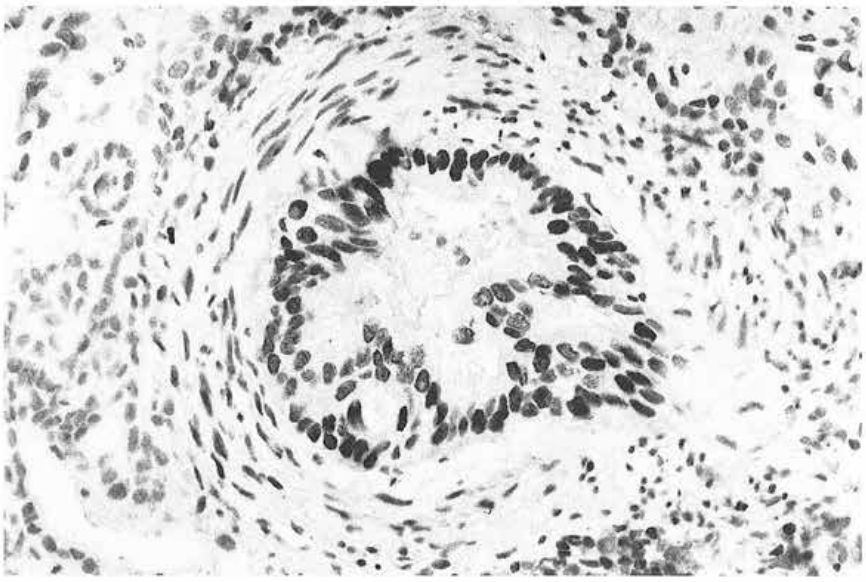


Figura 6 - Gatto - Polmone. Sovraespressione di p53 in un adenocarcinoma bronchiolo-alveolare. Anticorpo DO 1. 400x.

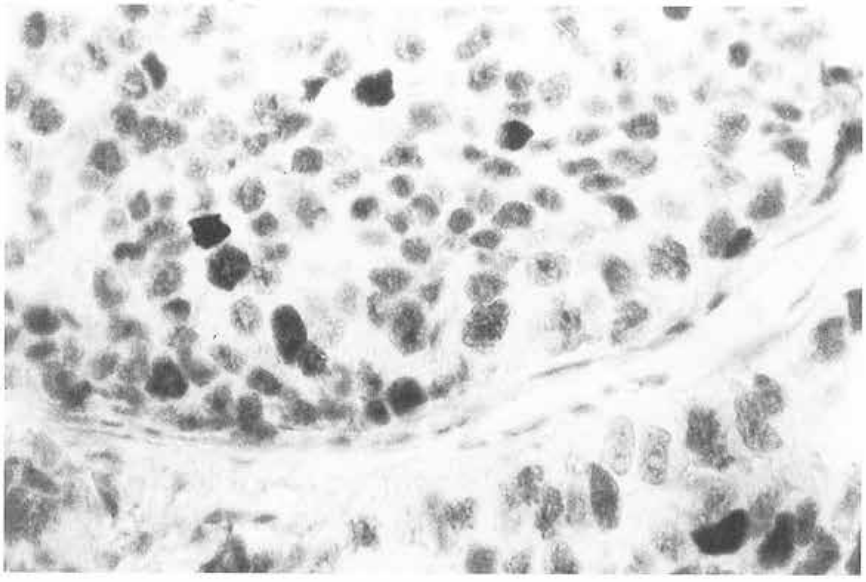


Figura 7 - Gatto - Mammella. Intensa positività per p53 rilevata con l'anticorpo DO 1 in un carcinoma solido. 1000x.

BIBLIOGRAFIA

1) Cattoretti G., Pileri S., Parravicini C., Becker M.H.G., Poggi S., Bifulco C., Key G., D'Amato L., Sabbatini E., Feudale E., Reynolds F., Gerdes J., Rilke F. (1993) Journal of Pathology *171*, 83-98.

2) Chang F., Syrjanen S., Tervahauta A., Syrjanen K. (1993) British Journal of Cancer *68*, 653-661.

3) Hall P.A., Lane D. (1994) Journal of Pathology?.

4) Koshland D.R. Jr. (1993) Science *262*, 1953.

5) Okuda M., Umeda A., Matsumoto Y., Momoi Y, Watary T., Goitsuka R., O'Brien S., Tsujimoto H., Hasegawa A. (1993) Journal of Veterinary Medicine Science *55*, 801-805.

6) Perry M.E., Levine A.J. (1993) Current Opinion in Genetics and Development *3*, 50-54.

7) Porter P.L., Gown A.M., Kramp S.G., Coltrera M.D. (1992) American Journal of Pathology *140*, 145-153.

8) Soussi T., Caron De Fromentel C., May P. (1990) Oncogene *5*, 945-952.

9) Wynford-Thomas D. (1992) Journal of Pathology *166*, 329-330.

III SESSIONE

BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE

Moderatori
A. Lauria - E. Seren

M. MATTIOLI, B. BARBONI, P. LUCIDI, L. GIOIA

MONITORAGGIO DELLO STATO DI CAPACITAZIONE DEL SEME PER L'OTTIMIZZAZIONE DELLE TECNICHE DI FECONDAZIONE ASSISTITA

Istituto di Fisiologia, Facoltà Medicina Veterinaria di Teramo - 64020 Nepezzano (TE)

RIASSUNTO

Nella presente ricerca sono state condotte indagini per la valutazione dello stato di capacitazione di campioni di seme. A tale scopo l'indagine è stata condotta a due livelli diversi sempre partendo dal presupposto che solo gli spermatozi capacitati sono in grado di reagire al contatto con la zona pellucida con la reazione acrosomiale. Spermatozoi capacitati *in vitro* con diverse metodiche sono stati incubati con una preparazzione di zone pellucide solubilizzate ed in tempi successivi sono state registrate le modificazioni del calcio intracellulare (Ca) e lo stato dell'acrosoma. Il Ca intracellulare è stato misurato utilizzando il fluorogeno Ca-sensibile Fluo-3AM, mentre l'integrità dell'acrosoma è stata analizzata impiegando una lectina fluorescente (PSA-FICT) che si lega selettivamente agli enzimi contenuti nell'acrosoma. Col procedere dell'incubazione si evidenzia un progressivo aumento degli spermatozoi che rispondono all'esposizione delle zone pellucide con un istantaneo aumento del Ca intracellulare e la perdita dell'integrità acrosomiale. I risultati di queste due metodiche sono state confrontate con lo studio della capacitazione eseguita tramite colorazione con CTC che ha permesso anche nel seme di verro di identificare un *pattern* di fluorescenza specifico per gli spermatozoi capacitati.

Parole chiave: spermatozoi - capacitazione - calcio intracellulare - lectine e CTC.

ASSESSMENT OF SPERM CAPACITATION FOR THE IMPROVEMENT OF *IN VITRO* FERTILIZATION TECHNIQUES

SUMMARY

Sperm capacitation was directly monitored in samples of boar spermatozoa cultured under capacitating conditions. Three different approaches were used. The rise in intracellular free calcium upon exposure to solubilized zonae pellucidae was the first parameter used to assess capacitation. As the capacitating incubation proceeded as an increasing percentage of spermatozoa had zona induced-calcium treatments. Similarly the study of acrosome integrity with PSA-FICT demonstrated an increasing; percentage of sperm undergoing acrosome reaction and therefore classificable as capacitated. Capacitation has finally been investigated by studing the fluorescence distribution of CTC-treated sperm. This rapid and simple staining procedure proved suitable to identify capacitated sperm thus representing a good means to improve IVF techniques.

Key words: Spermatozoa - capacitation - calcium - lectin and CTC.

INTRODUZIONE

Diverse ricerche condotte *in vivo* ed *in vitro* hanno ormai dimostrato che nei mammiferi gli spermartozoi non sono in grado di fecondare la cellula uovo immediatamente dopo l'eiaculazione mentre il potere fecondante viene raggiunto dopo una o pió ore di permanenza nel tratto genitale femminile o in coltura, tempo richiesto probabilmente per rimuovere i residui del plasma seminale. Questo processo che si conclude con l'acquisizione del potere fecondante del seme viene definito capacitazione. Poiché, tuttavia, l'accertamento di questa condizione di capacità potenziale di fecondare avviene utilizzando prove di fecondazione *in vitro* (IVF), il suo studio risulta ancora impreciso e frammentario. La valutazione ottenuta con questo metodo non puo' infatti ritenersi accurata poichè prende in considerazione non solo il processo di capacitazione ma anche altri eventi successivi che, pur verificandosi solo a capacitazione avvenuta, rappresentano momenti funzionali separati, quali la reazione acrosomiale (RA), la penetrazione della zona pellucida (ZP) ed infine la fusione tra membrana dell'oocita e dello spermatozoo. La valutazione del potere fecondante mediante IVF viene infine ulteriormente influenzata dalle caratteristiche di penetrabilità delle cellule uovo che essendo di solito ottenute mediante maturazione *in vitro* presentano percio' ampia variabilità. Un'indagine accurata dello stato di capacitazione degli spermatozoi dovrebbe pertanto essere condotta direttamente sullo spermatozoo ed in ogni caso prima che i gameti iniziano la loro complessa interazione. Nello spermatozoo capacitato il contatto con l'ovocellula, e più precisamente con la ZP, scatena una cascata di eventi che inizia con un aumento dei livelli intracellulari del calcio (Ca) e si conclude con la RA. La RA rappresenta in definitiva l'evento che contradistingue gli spermatozoi che hanno completato il processo di capacitazione. Con la ricerca in oggetto sono state condotte analisi sviluppate specificatamente per valutare lo stato di capacitazione studiando gli spermatozoi a due distinti livelli:

— Modificazione della concentrazione intracellulare del Ca in seguito ad esposizione degli spermatozoi ad una preparazione di ZP

— Integrità dell'acrosoma dopo esposizione alle glicoproteine della ZP.

Infine, poiché è stato dimostrato in altre specie animali (1,2,3) che la clortetraciclina (CTC) si lega agli spermatozoi distribuendosi in modo diverso a secondo del loro stato funzionale, con la presente ricerca abbiamo studiato se questa diversa distribuzione di fluorescenza si ripete analogamente negli spermatozoi di verro.

MATERIALI E METODI

Le indagini sono state condotte su campioni di seme raccolti da 6 verri di provata fecondità. Gli spermatozoi sono stati utilizzati immediatamente dopo la raccolta o dopo 1 o 3gg di conservazione a 16°C previo frazionamento in apposito mestruo diluitore (tipo Modena).

Per la capacitazione *in vitro* gli spermatozoi sono stati lavati tramite tre successive centrifugazioni (800 g per 5 min in Dulbecco addizionato con lo 0,4% di BSA) ed incubati alla concentrazione di $1x10^7$ spz/ml in *medium* da fecondazione (B & O) contenente FCS (10%) penicillina-streptomicina (100.000 U.I./l e 10 mg/l rispet-

tivamente) e calcio lattato (160 mg/100ml) fino ad ottenere livelli complessivi di Ca pari a 9 mM. Gli spermatozoi sono stati incubati a 39°C in un'atmosfera al 5% di CO^2 in aria e lo stato di capacitazione è stato valutato ogni 30 minuti prelevando campioni successivi di seme e sottoponendoli ai tre diversi test.

Determinazione dei livelli intracellulari del Ca

Gli spermatozoi sono stati incubati con Fluo 3-AM (5 uM per 1h) e quindi analizzati con un microscopio laser confocale con lunghezza d'onda di eccitazione di 488nm ed il fotomoltiplicatore tarato a 525 nm di emissione. Gli spermatozoi sono stati immobilizzati su di un vetrino pretrattato con polilisine ed analizzati utilizzando *scans* successivi ogni 20 secondi. Dopo un paio di *scans* di base alla sospensione di spermatozoi sono state aggiunte le ZP solubilizzate ad una concentrazione finale di 7 ZP/ul. L'indagine fluorimetrica è proseguita per altri 10 minuti.

Integrità dell'acrosoma

L'integrità dell'acrosoma è stata valutata utilizzando una lectina FITC-coniugata (*Pisum sativum agglutinin*, PSA-FICT) che si lega selettivamente al contenuto acrosomiale. In seguito a permeabilizzazione della membrana si rileva un'intensa fluorescenza nella regione acrosomiale dopo colorazione con FITC-PSA quando questa struttura conserva la sua integrità. Per questa indagine gli spermatozoi raccolti in diversi momenti della coltura sono stati permeabilizzati in etanolo (95%) e colorati con FITC-PSA (100ug/ml in PBS) utilizzando la metodica descritta da Cross (4). Al fine di eliminare dall'indagine gli spermatozoi morti, nei quali la scomparsa/rottura dell'acrosoma può essere il frutto di processi autolitici o degenerativi, gli spermatozoi sono stati preventivamente trattati con Hoechst 33258 (100ng/ml), un colorante sopravitale che colora il nucleo delle cellule morte. L'osservazione degli spermatozoi è stata eseguita utilizzando alternativamente flussi di eccitazione per l'Hoechst o per il PSA-FITC ed ha consentito di identificare nello stesso campo gli spermatozoi vivi, morti e quelli con acrosoma integro. La colorazione sopra descritta è stata condotta sui campioni di seme immediatamente dopo il prelievo o dopo esposizione ad una preparazione di ZP solubilizzate.

Distribuzione di fluorescenza dopo trattamento con CTC

Ricerche condotte sul seme di topo (1,2) ed umano (3) hanno dimostrato che la distribuzione della fluorescenza registrata sulla testa degli spermatozoi trattati con CTC consente di differenziare ed identificare gli spermatozoi non capacitati, capacitati e quelli che hanno avuto la RA. Questa tecnica, consentendo una rapida diagnosi di capacitazione, potrebbe risultare particolarmente utile nell'addattare i parametri della fecondazione *in vitro* alle caratteristiche dei singoli campioni di seme utilizzato. Con la presente ricerca abbiamo pertanto verificato quali classi di fluorescenza si possono ottenere impiegando il CTC su campioni di seme di verro. A tale scopo spermatozoi raccolti in diverse fasi della coltura sono stati colorati con CTC (750uM in Tris buffer) direttamente o previa esposizione ad una preparazione di ZP solubilizzate. Dopo la colorazione (30 secondi a 37oC) gli spermatozoi sono stati fissati con gluteraldeide (0,1%) e trattati con 0.22M di DABCO (in glicerolo)

per ritardare il *fading* della fluorescenza. L'indagine microscopica è stata eseguita analizzando i vetrini con un microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri di eccitazione UV ed emissione a 450nm.

RISULTATI

Modificazione dei livelli intracellulari di Ca

Il trattamento con ZP solubilizzate ha prodotto rapidi incrementi dei livelli intracellulari di Ca in una parte degli spermatozoi analizzati. La percentuale che ha risposto alle proteine della ZP è aumentata progressivamente col procedere dell'incubazione portandosi da valori iniziali del 10% al 40-45% dopo 4 ore di incubazione. Questo aumento è stato notevolmente ridotto quando la coltura è stata eseguita in presenza di plasma seminale. L'analisi cinetica della distribuzione del Ca libero a livello del singolo spermatozoo ha evidenziato inoltre che l'incremento dei livelli di Ca inizia dopo 1-3 min dall'aggiunta di ZP. L'aumento, che pare originare nella regione postacrosomiale, è risultato massimo dopo 5 minuti dalla perfusione delle ZP mentre i livelli di Ca ritornano su valori basali dopo 10-15 minuti.

Integrità dell'acrosoma

L'indagine condotta con PSA ha dimostrato che gli spermatozoi presentano, un progressivo aumento dell'incidenza delle RA spontanee, evidenziate poiché una debole fluorescenza colora la regione acrosomiale degli spermatozoi che hanno perso tutto o parte del contenuto acrosomiale. Gli spermatozoi reatti passano infatti dal 3% all'inizio della coltura al 10-15% dopo 4 ore.

L'incidenza delle RA in seguito alla aggiunta delle ZP, evento che si realizza solo in spermatozoi capacitati, aumenta marcatamente al progredire dell'incubazione passando da livelli basali dal 10% a valori intorno al 40-45% dopo 4 ore di incubazione.

La cinetica di capacitazione studiata con questo metodo ha mostrato evidenti differenze individuali tra i verri ed è risultata nettamente influenzata dalla conservazione del seme (Figura 1).

Distribuzione della fluorescenza dopo colorazione con CTC

In seguito alla colorazione con CTC negli spermatozoi sono evidenziabili tre diversi *patterns* fluorescenti:

A - fluorescenza uniformemente distribuita sulla testa
B - fluorescenza concentrata nella regione post-acrosomiale
C - fluorescenza concentrata nella regione acrosomiale.

La distribuzione percentuale dei tre *patterns* di fluorescenza si modifica col procedere dell'incubazione. Mentre A cala progressivamente, B aumenta al progredire della coltura (Figura 2). La percentuale degli spermatozoi con *pattern* B non presenta modificazioni di rilievo durante l'incubazione mantenendosi su livelli del 5-10%. L'aggiunta della preparazione di ZP solubilizzate modifica sostanzialmente la distribuzione di fluorescenza inducendo una marcata riduzione del *pattern* C che pertanto

è stato identificato come il *pattern* dell'avvenuta capacitazione visto che solo gli spermatozoi capacitati sono in grado di rispondere alla stimolazione prodotta dalle proteine della ZP. L'osservazione che le ZP riducono l'incidenza del *pattern* C e parallelamente fanno aumentare quella del *pattern* A suggerisce che gli spermatozoi che hanno presentato la RA in seguito all'esposizione alle ZP hanno variato la classe di fluorescenza da C (capacitato) ad A. In questo *pattern* pertanto nel verro si identificano sia gli spermatozoi non capacitati che quelli reatti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati della presente ricerca dimostrano che gli spermatozoi di verro acquisiscono durante la coltura la capacità di reagire alle proteine della ZP, uno degli stimoli fisiologici generalmente ritenuto in grado di provocare la RA. Col procedere dell'incubazione, un numero progressivamente maggiore di spermatozoi presenta infatti evidenti aumenti dei livelli intracellulari di Ca dopo 1-3 minuti dall'esposizione alle ZP.

Poiché l'aumento dei livelli di Ca viene ritenuto il *trigger* che innesca la cascata di eventi che si conclude con la RA e pertanto il suo riconoscimento è stato ritenuto equivalente all'identificazione degli spermatozoi capacitati. L'osservazione che la presenza di plasma seminale riduce notevolmente l'incidenza degli spermatozoi che presentano gli indotti incrementi di Ca conferma questa ipotesi secondo la quale nella categoria di spermatozoi che rispondono alle ZP aumentando i livelli intracellulari dello ione sono racchiusi gli spermatozoi capacitati. È noto, infatti, che il plasma seminale è il principale fattore a cui si attribuisce l'incapacità fecondante del seme appena eiaculato. La sua presenza potrebbe infatti prevenire l'espressione-localizzazione dei recettori per la ZP sulla testa dello spermatozoo o semplicemente mascherare il sito legante per queste glicoproteine.

Lo studio dei livelli di Ca all'interno del singolo spermatozoo ha consentito inoltre un'analisi cinetica dettagliata dell'evento che pare iniziare nella zona postcrosomiale per diffondere poi rapidamente all'intera regione acrosomiale. Gli incrementi dei livelli intracellulari di Ca raggiungono valori massimi dopo 4-5 minuti dall'esposizione alle ZP per poi diminuire dopo 7-10 minuti senza comunque ritornare, nella maggior parte dei casi, su livelli basali.

L'analisi dell'integrità dell'acrosoma dopo esposizione alle ZP fornisce risultati sostanzialmente analoghi dimostrando un progressivo aumento della percentuale degli spermatozoi nei quali le proteine della ZP inducono la RA. Anche con questa indagine risulta chiaro l'effetto stabilizzante esercitato dal plasma seminale sulla membrana cellulare dello spermatozoo poiché la sua presenza durante la coltura riduce notevolmente il numero degli spermatozoi che presentano la RA dopo l'aggiunta di ZP. La colorazione con PSA ha consentito di quantificare anche il fenomeno delle RA spontanee. Nei campioni di seme analizzati durante la capacitazione *in vitro* è stato evidenziato, infatti, una crescente percentuale di spermatozoi vivi che esocita il contenuto acrosomiale già prima dell'esposizione alle ZP. Questa osservazione conferma il ruolo stabilizzante del plasma seminale. Allontanando i fattori presente nel plasma seminale, cio' che si realizza durante il lavaggio a cui è sottoposto il seme prima dell'incubazione, una percentuale crescente di spermatozoi

raggiunge probabilmente una condizione di instabilità della membrana tale da consentire il procedere spontaneo di RA durante la coltura indipendentemente dal contatto con la cellula uovo. Calati in condizioni fisiologiche, questi spermatozoi non avrebbero alcuna possibilità di fecondare attivandosi in momenti diversi da quello che coincide con l'incontro spermatozoo-oocita. I due metodi d'indagine sopra descritti consentono pertanto sia l'identificazione degli spermatozoi capacitati che la verifica di questa condizione di potenzialità fecondativa mediante l'analisi del seme in momenti precisi che preludono alla fecondazione. In pratica l'impiego di queste metodiche risulta essere troppo indaginosa per diagnosticare lo stato di capacitazione del seme in esame visto la notevole richiesta di reagenti (disponibilità di ZP) per una corretta escuzione ed i tempi relativamente lunghi necessari per avere una risposta. Per potere ottimizzare la tecnica di IVF è infatti necessario poter disporre di metodiche semplici e di rapida esecuzione che consentano di monitorare minuto per minuto lo stato funzionale degli spermatozoi. I risultati ottenuti con la colorazione di CTC hanno dimostrato che la distribuzione di fluorescenza sugli spermatozoi, pur senza indicare alcun possibile meccanismo coinvolto nella loro maturazione finale, consente di identificare con precisione ed in tempo reale gli spermatozoi capacitati. I livelli di capacitazione registrati con questo metodo (fluorescenza nella regione acrosomiale) sono infatti perfettamente sovrapponibili a quelli ottenuti con le due metodiche prima descritte a conferma della buona sensibilità di questa colorazione. La rapidità di esecuzione del CTC consente di testare lo stato di capacitazione del seme in tempo reale durante l'incubazione *in vitro* ed identificare cos'é con precisione il momento in cui l'incidenza degli spermatozoi capacitati è massima, periodo ideale per cominciare la coincubazione con le ovocellule. Indagini condotte con questo metodo hanno consentito in ricerche preliminari di osservare le influenze che i terreni di coltura utilizzati hanno sulla cinetica di capacitazione *in vitro*. La colorazione con CTC ha consentito infatti di identificare con precisione l'effetto facilitante ed accelerante che il progesterone manifesta *in vitro* sul processo di capacitazione nel seme di verro, effetto preventivamente ipotizzato mediante IVF.

Si può pertanto affermare che il monitoraggio di specifici aspetti della reattività degli spermatozoi (transienti di Ca o esocitati dell'acrosoma) ha consentito, per la prima volta, di studiare in dettaglio il processo della capacitazione senza dover ricorrere alla fecondazione *in vitro* della cellula uovo, che pur essendo un evento che necessita di una preliminare capacitazione del seme è dalla stessa nettamente distinto. La metodica del CTC ha offerto un ulteriore vantaggio operativo poiché ha consentito di monitorare in tempo reale la cinetica della capacitazione dei diversi campioni di seme fornendo di volta in volta indicazioni precise sul seme utilizzato. Le informazioni fornite dal CTC possono sicuramente essere impiegate al fine di massimizzare l'efficienza delle tecniche di IVF ed eventualmente utilizzate per approntare metodiche di selezione, capaci di isolare i gameti capacitati da indirizzare quindi alla fecondazione *in vitro*.

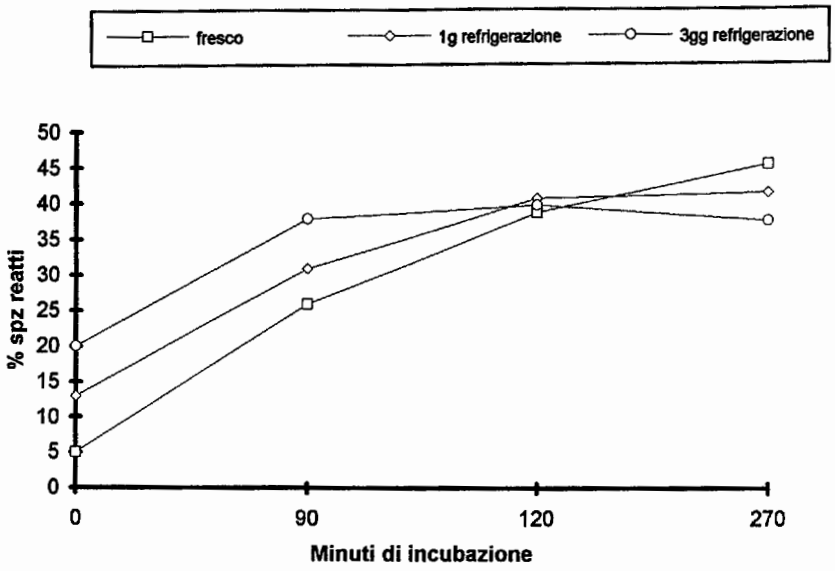


Figura 1 - Effetto della conservazione del seme sulla cinetica di capacitazione *in vitro* (PSA-FITC).

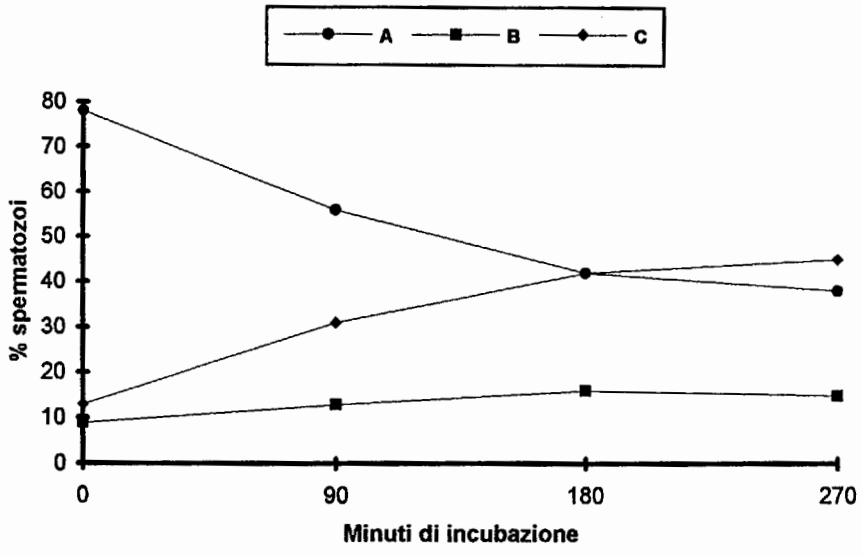


Figura 2 - Cinetica di distribuzione dei *patterns* di fluorescenza.

BIBLIOGRAFIA

1) WARD C.R., STOREY B.T. (1984) Dev. Biol. *104*, 287.
2) FRASER L., HEROD J.E. (1990) J. Reprod. Fertil. *88*, 611.
3) LEE M.A. et al. (1987) Fertil. Steril. *48*, 649.
4) CROSS N.L. et al. (1986) Gamete Research *15*, 213.

F. GANDOLFI, T.A.L. BREVINI*, S. MODINA,
L. PASSONI, A.M. LUCIANO**, A. LAURIA

FATTORI DI CRESCITA DI ORIGINE TUBARICA: POSSIBILE RUOLO NELLE PRIME FASI DELLO SVILUPPO EMBRIONALE

Istituto di Anatomia degli Animali Domestici, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Celoria, 10 - 20133 Milano
* Istituto di Endocrinologia, Facoltà di Farmacologia, Via Balzaretti, 23 20133 Milano e
** Istituto Sperimentale Italiano L.Spallanzani, Via Capolago 2, 20133 Milano

RIASSUNTO

Lo sviluppo embrionale dei mammiferi è il risultato di una delicata interazione fra il programma genetico cromosomico proprio dello zigote e le vie genitali femminili.

Studi recenti condotti sulla fisiologia dell'embrione preimpianto e dell'ovidotto hanno dimostrato che molti fattori intervengono in questo particolare periodo di proliferazione e differenziamento cellulare. Tali fattori possono essere suddivisi in due gruppi: proteine specifiche sintetizzate dall'epitelio tubarico e fattori di crescita, sia di origine serica che prodotti dall'ovidotto stesso.

Fattori di Crescita quali *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor* (TGF)-α e TGF-β, *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *inibine-activine*, insulina e *Insulin-like Growth Factors* (IGFs) in particolare, sembrano rivestire un ruolo molto importante nelle prime fasi dello sviluppo embrionale dei mammiferi.

Parole chiave: embrioni - cellule della tuba - fattori di crescita.

GROWTH FACTORS OF TUBARIC ORIGIN: POSSIBLE ROLE IN EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT

SUMMARY

In mammals, embryonic development is the result of a delicate interaction between the genetic program written in the chromosomes of each zygote and the female genital tract.

Current studies on the physiology of preimplantation embryos and of the oviduct indicate that several factors are involved in this particular period of cell proliferation and differentiation. These can be divided in two groups: oviductal specific proteins synthesised by the lining epithelium and Growth Factors, either as transudate of the serum or as secretory products of the oviduct.

In particular Growth Factors like Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF)-α e TGF-β, Platelet-derived Growth Factor (PDGF), inhibin-

Lavoro svolto con contributo UE, DG XII, grant BIO2-CT92-0067.

activins, insulin and Insulin-like Growth Factors (IGFs) seem to play an important role in early embryonic development in mammalian species.

Key words: embryo - tubaric cells - growth factors.

INTRODUZIONE

Le interazioni tra embrione e tratto genitale femminile iniziano molto prima dell'impianto ed i segnali che l'embrione invia per comunicare la sua presenza determinando l'instaurarsi di un corpo luteo gravidico rappresentano l'esempio meglio studiato di questo tipo di interazioni precoci (1).

Questa interazioni non sono a senso unico, infatti numerosi dati suggeriscono che anche l'ambiente materno produce sostanze indispensabili per lo sviluppo embrionale. In questo senso i problemi che insorgono durante la cultura in vitro degli embrioni dimostrano chiaramente che il contributo materno è fondamentale soprattutto durante i primi due o tre giorni dopo la fecondazione, proprio quando l'embrione in vivo soggiorna nell'ovidotto. Sembrerebbe quindi che quest'organo sia in grado di produrre molecole con attività embriotrofica.

Recentemente sono stati identificati due gruppi di molecole di origine tubarica che, pur con diverse modalità, interagiscono con l'embrione prima del suo impianto: un gruppo è costituito da proteine ad alto peso molecolare secrete esclusivamente dall'epitelio tubarico ed identificate in numerose specie tra le quali anche quelle domestiche (2); l'altro è composto da fattori di crescita, molecole proteiche di basso peso molecolare presenti e attivi in numerosi distretti dell'organismo e non solo nell'ovidotto.

In questa breve rivista si intende riassumere quanto fino ad ora è stato descritto sul ruolo dei fattori di crescita di origine materna ed embrionali nello prime fasi dello sviluppo.

FATTORI DI CRESCITA DI ORIGINE EMBRIONALE

I fattori di crescita sono proteine a basso peso molecolare sintetizzate e secrete da specifici tipi cellulari che esplicano le loro attività tramite recettori situati sulle cellule bersaglio.

Queste molecole, inizialmente riconosciute per la loro attività mitogena, più recentemente si è visto che sono attivamente implicati anche nei processi di morfogenesi e differenziamento (3).

In particolare è stato dimostrato che negli Anfibi alcuni fattori di crescita come il FGF e l'Activina inducono il differenziamento del mesoderma (4). Poiché sono state osservate molte omologie sia strutturali (omologie di sequenza) che di attività (mitogenica) fra le molecole isolate negli Anfibi e le corrispettive presenti nei Mammiferi si suppone che i fattori di crescita possano essere coinvolti nei processi di differenziamento anche nelle prime fasi dello sviluppo embrionale negli animali domestici.

A conferma di questa ipotesi è stato recentemente dimostrato che gli embrioni preimpianto di topo, bovino e pecora possiedono RNA messaggeri specifici per di-

versi fattori di crescita quali TGF-α, TGF-β, IGF-I e PDGF (5-6-7). In qualche caso l'espressione di questi fattori di crescita è già rilevabile nell'oocita indicando chiaramente che i relativi mRNA vengono sintetizzati durante la fase di accrescimento e maturazione della cellula uovo, sono poi immagazzinati e vengono quindi utilizzati per sostenere lo sviluppo embrionale in una fase successiva.

FATTORI DI CRESCITA ESOGENI

Malgrado siano stati identificati in diverse specie non è però ben chiara quale funzione svolgano queste molecole prodotte dagli embrioni. A questo proposito è interessante osservare che gli embrioni di topo e di pecora si sviluppano meglio in vitro quando vengono coltivati in gruppo invece che singolarmente (8). Ciò fa supporre che essi si giovino della produzione di fattori di crescita secondo una modalià autocrina/paracrina stimolando lo sviluppo degli embrioni vicini. A parziale conferma di questa possibilità si è osservato che TGF-α, TGF-β e EGF incrementano lo sviluppo degli embrioni di topo se aggiunti al medium di coltura (8).

Successivi esperimenti hanno messo in evidenza che queste non sono le uniche molecole in grado di stimolare lo sviluppo embrionale. Infatti si è visto che anche l'insulina ha un'attività simile (9). Essa infatti è in grado di stimolare la sintesi proteica dell'embrione a partire dallo stadio di otto cellule, fino a quello di blastocisti espansa. Inoltre questa molecola mostra anche un'attività specifica sul differenziamento cellulare in quanto stimola solo le cellue del nodulo embrionale mentre quelle del trofoectoderma risultano del tutto insensibili (10). Ciò risulta particolarmente significativo in quanto uno dei maggiori problemi che si osservano nella coltura di embrioni è proprio l'incompleto sviluppo del nodulo embrionale.

In alcune circostanze l'effetto dell'insulina nello sviluppo embrionale è apprezzabile ancor prima dello stadio a otto cellule, quando del recettore si osserva solo l'RNA messaggero (5) mentre la molecola proteica non è ancora rilevabile (11). Questo fatto potrebbe essere spiegato suppondo che l'attività dell'insulina sia mediata non dal proprio recettore, ma da quelli per gli IGF e che gli IGF intervengano nello sviluppo embrionale.

In accordo con questa ipotesi si è rilevata la presenza di recettori per IGF-I e dello specifico mRNA in embrioni di topo preimpianto (5) e l'IGF-I stimola attivamente lo sviluppo embrionale già allo stadio di due cellule (12-13).

Sebbene i dati relativi a questi fattori di crescita ed ai loro recettori siano ancora scarsi, il ruolo dell'insulina e degli IGF sembra comunque molto importante anche negli animali domestici. Negli embrioni di maiale infatti l'insulina aumenta l'attività della aromatasi P-450 (14) e stimola il disco embrionale a sintetizzare nuove proteine che potrebbero essere coinvolte nei meccanismi di riconoscimento materno della gravidanza (15); nel bovino invece questo ormone stimola lo sviluppo di ovociti fecondati in vitro (16).

FATTORI DI CRESCITA DI ORIGINE TUBARICA

In questo contesto, l'identificazione di IGF-I e IGF-II nel fluido tubarico di maiale (17) e dell'RNA messaggero specifico per l'IGF-II nell'epitelio della tuba di bovi-

no (7) permette di ipotizzare che proteine strettamente correlate con l'insulina possano rappresentare alcuni di quei mediatori specifici dell'ovidotto che influenzano lo sviluppo embrionale.

È anche interessante notare che le proteine tubariche specifiche secrete sia nella pecora che nel bovino hanno una forte attività mitotica di fibroblasti embrionali in coltura che viene selettivamente amplificata proprio dall'insulina (18). Questa sinergia potrebbe rappresentare l'effettivo legame fra le proteine tubariche specifiche che prendono contatti con l'embrione e i vari fattori di crescita presenti nel fluido tubarico.

Oltre ad insulina e IGFs altri studi hanno dimostrato che nell'ovidotto di bovino sono presenti anche mRNA per activina, TGF-α, TGF-β, PDGF e bFGF; inoltre il PDGF, l'activina e l'EGF sono presenti anche sotto forma di proteina, che può essere localizzata in tratti specifici dell'organo (19-20).

L'insieme di queste osservazioni suggerisce che i fattori di crescita di origine tubarica, siano essi di provenienza serica o prodotti direttamete dall'epitelio stesso, possono partecipare attivamente allo sviluppo embrionale in vivo. Analoghi meccanismi potrebbero essere responsabili, almeno in parte, anche dell'attività embriotrofica esercitata in vitro da monostrati di cellule dell'epitelio tubarico o dai medium da esse condizionati.

CONCLUSIONI

Le interazioni che si stabiliscono fra tuba ed embrione durante i primi giorni di sviluppo sono complesse e vengono mediate da molecole diverse: le proteine specifiche dell'ovidotto che prendono direttamente contatto con l'embrione ed i fattori di crescita prodotti dagli stessi embrioni o presenti nel fluido tubarico.

In entrambi i casi le modalità d'azione di queste molecole non sono ancora del tutto chiare. Presumibilmente un concreto contributo all'approfondimento di queste conoscenze potrebbe derivare dalla purificazione delle proteine di origine esclusivamente tubarica e da una più completa caratterizzazione delle modalità d'azione del complesso fattore di crescita-recettore a livello embrionale.

BIBLIOGRAFIA

1) BAZER F.W. , OTT T.L., SPENCER T.E (1991) Theriogenology *41*, 79-94.
2) GANDOLFI F. (1994) *J. Microsc. Tec.* (in stampa).
3) MERCOLA M., STILES C.D. (1988) Development *102*, 451-460.
4) DAWID I.B., MASANORI T., GOOD P.J. & REBAGLIATI M.R. (1992) Mol. Reprod. Devel. *32*: 136-144.
5) RAPPOLEE D.A., STURM K.S., SCHULTZ G.A., PEDERSON G.A., WERB Z. (1990) In *Early Embryo Development and Paracrine Relationship S. Heyner and L. Wiley eds., UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biochemestry,* New series, No. *117*, Alan Liss, New York, pp. 11-25 .
6) ADAMSON E.D. (1990) *Mol.Reprod.Devel.* 27, 16-22.
7) WATSON A.J., HOGAN A., HANHEL A., WEIMER K.E., SCHULTZ G.S. (1992) Mol. Reprod. Devel. *31*, 87-95.
8) PARIA B.C; & DEY S.K. (1990) Proc. Natl. Sci. USA *87*, 4746-4760.
9) HARVEY M.B. & KAYE P.L. (1988) Endocrinology *122*, 1182-1184.
10) HARVEY M.B. & KAYE P.L. (1990) Development *110*, 963-967.
11) HARVEY M.B. & KAYE P.L. (1991a) Mol. Reprod. Devel. *29*, 253-258.
12) HARVEY M.B. & KAYE P.L. (1991b) Reprod. Fert. Devel. *3*, 9-15.
13) HARVEY M.B. & KAYE P.L. (1992) Mol. Reprod. Devel. *31*,195-199.
14) HOFIG.A., SIMMEN F.A., BAZER F.W., SIMMEN R.C.M. (1991) J. Endocrinol. *130*, 245-250.
15) ESTRADA J.L., JONES E.E., JOHNSON B.H., PETTERS R.M. (1991) Biol. Reprod. *93*, 53-61.
16) ZHANG L., BLAKEWOOD E.G., DENNISTON R.S., GODKE R.A. (1991) Theriogenology *35*, 301.
17) WISEMAN D.L., HENRICKS D.M., EBERHARDT D.M., BRIDGES W.C. (1992) Biol. Reprod. *47*, 126-132.
18) GANDOLFI F. BREVINI T.A.L., MODINA S., PASSONI L., VARGA Z., LAURIA A. (1992a) in Hormones in Gynecological Endocrynology A.R.Gennazzani and F. Petraglia eds. The Parthenon Publishing Group, Carnforth, pp. 401-408.
19) GANDOLFI F. BREVINI T.A.L., MODINA S., PASSONI L., LAURIA A. (1992b) in *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production, A. Lauria and F. Gandolfi eds. Portland Press*, London, pp. 93-102.
20) ERIKSEN T., TREKELSEN O.I., HYTTEL P., MOLLGARD K., GREVE T. (1993) Biol. Reprod. *93*, 53-61.

L. ZICARELLI, R. BONI*, R. DI PALO, G. CAMPANILE,
L. ESPOSITO, S. ROVIELLO, V. BARBIERI

TECNOLOGIE INNOVATIVE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE DELLA BUFALA ALLEVATA IN ITALIA

Dipartimento di Scienze Zootecniche, Via F. Delpino, 1 - 80137 Napoli e
* Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza

RIASSUNTO

L'impiego integrato di tecnologie riproduttive d'avanguardia sviluppate per la specie bovina ed opportunamente adattate alla bufala potrebbe accelerare il progresso genetico di questa popolazione animale, perseguito a tutt'oggi esclusivamente per via materna.

Stagionalità riproduttiva e fattori di ordine climatico rappresentano senz'altro parametri in grado di condizionare sensibilmente l'efficienza riproduttiva della bufala italiana. A ciò vanno aggiunti fattori di ordine economico (maggior richiesta del latte in estate) che inducono all'adozione di strategie riproduttive volte a concentrare l'epoca dei parti nel periodo primaverile-estivo (destagionalizzazione).

Attualmente la monta libera rappresenta la tecnica riproduttiva maggiormente utilizzata negli allevamenti bufalini. L'inseminazione strumentale è, invece, una pratica scarsamente adottata per svariati motivi (bassi livelli di efficienza raggiunti, mancanza di tori provati, difficoltà nel rilievo dei calori). L'impiego del toro vasectomizzato ha, tuttavia, consentito sia un miglioramento dell'individuazione degli animali in estro che un significativo aumento dell'efficienza della tecnica.

L'impiego dei piani M.O.E.T. (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*), riducendo l'intervallo di generazione, potrebbe rappresentare un valido strumento per accelerare il progresso genetico annuo della popolazione bufalina italiana. Il numero di follicoli coinvolti dal trattamento di stimolazione ormonale e, di conseguenza, il numero di embrioni prodotti risulta tuttavia sensibilmente minore rispetto a quello ottenibile nella specie bovina. Le ragioni di tale differenza vanno probabilmente ricercate nell'analoga proporzione osservata tra le popolazioni follicolari di queste due specie. Un possibile condizionamento dello sviluppo follicolare potrebbe derivare dal pretrattamento con rBST che, tuttavia, nel corso di prove preliminari, non ha contribuito a modificare il numero di embrioni prodotti per animale con recupero positivo pur inducendo un aumento percentuale delle bufale responsive alla superovulazione.

La ridotta produzione follicolare di questa specie condiziona, inoltre, negativamente le possibilità applicative delle tecniche di produzione embrionale *in vitro*. Al numero estremamente ridotto di oociti utilizzabili nei programmi di produzione embrionale *in vitro* si associa la scadente efficienza raggiunta dall'applicazione di tali programmi nella bufala.

Lavoro eseguito con fondi MURST 40% (Prof. V. Barbieri) e MURST 60% (Prof. L. Zicarelli).

L'impiego della tecnica di *Ovum Pick-Up*, sfruttando l'attività follicologenetica dell'individuo, eventualmente stimolata con prodotti ormonali, consente mediante prelievi ripetuti di ottenere un maggior recupero di oociti per singolo individuo offrendo una soluzione, seppur parziale, alla disponibilità di materiale germinale femminile di questa specie.

Parole chiave: Bufalo - inseminazione strumentale - produzione embrionale *in vivo* - produzione embrionale *in vitro* - *Ovum Pick-Up*.

NEW REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES APPLIED TO BUFFALOES BRED IN ITALY

SUMMARY

New reproductive technologies which were developed for bovine can be applied to buffalo in order to geneticly improve the species. Up until now these genetic improvements have been effected only by maternal side selection.

Season and climate are parameters closely connected to reproductive efficiency of Italian buffaloes. In addition, economic considerations which affect breeding have to be taken into account: a higher request for buffalo milk in the summer forces a change in the natural breeding season (out-of-breeding-season-mating).

Natural mating is the only reproductive technique used in italian buffalo breeding in spite of the fact that A.I. has been available to breeders to quite some time. This is because of the low efficiency, the lack of progeny tested bulls and the practical difficulties in detecting estrus, make A.I. an unusual technique. The use of vasectomized bulls, however, has been shown to enhance both estrus detection and A.I. efficiency.

MOET programmes may represent a valid tool to speed up the genetic improvement of Italian buffaloes by decreasing the generation length. However, the number of follicles recruited by S.O. treatment, and consequently, the number of yielded embryos, is significantly lower than in bovines. The analougus follicular population ratio recorded in the ovary of the two species may explain these differences. An rBST priming maybe enhances the follicular recruitment in buffaloes. However, we recorded unexpected results when we administered rBST before S.O. treatment: rBST increased the percentage of positive responsive buffaloes without any effect on the number of recovered embryos per positive flushing animal.

The low follicular recruitment in buffalo also interferes with *in vitro* embryotechnologies. The low number of suitable IVM oocytes together with the low *in vitro* embryo-production efficiency produces a very low number of *in vitro* embryos per buffalo cow.

The repeated use of the OPU technique which takes advantage of the individual folliculo-genesis, increases the number of recovered oocytes per animal, expecially after hormonal administration.

Key words: Buffalo - Artificial Insemination - *in vivo* embryo production - *in vitro* embryo production - *Ovum* Pick-Up.

INTRODUZIONE

La bufala è una specie poliestrale tendenzialmente stagionale, che in condizioni naturali concentra i parti nel periodo compreso tra la fine di luglio-dicembre. Tale stagionalità riproduttiva è stata attribuita da numerosi autori (9) a fattori di ordine nutrizionale sulla base di esperienze effettuate in aree a clima tropicale, ove è concentrato la gran parte dell'allevamento bufalino mondiale ed ove la disponibilità foraggera assume un caratteristico andamento stagionale. In aree di allevamento come il Brasile, tuttavia, la maggiore attività riproduttiva si verifica nel periodo di minore disponibilità foraggiera.

La bufala italiana è allevata in aziende moderne e razionali dove i fabbisogni nutritivi necessari al mantenimento e alla produzione lattea sono abbondantemente soddisfatti durante tutto il corso dell'anno; ciò nonostante il fenomeno della stagionalità è rilevabile in maniera sensibile.

Le ragioni di tale stagionalità vanno quindi ricercate, piuttosto che in condizionamenti di ordine nutrizionale, nell'interferenza esercitata da fattori di ordine metereologico-climatico sul sistema neuro-endocrino. L'effetto del fotoperiodo assume un'influenza notevole sull'attività riproduttiva di questa specie, similmente a quanto osservato negli ovicaprini. Basti pensare che nell'emisfero australe, in condizioni di allevamento e di alimentazione completamente diverse dalle nostre, l'andamento riproduttivo di questo animale assume un andamente perfettamente speculare a quello registrato nell'emisfero boreale. Studi sull'andamento della melatonina attestano che tale ormone rappresenta il segnale endocrino dell'alternanza luce-buio (12) e che esso presenta un andamento diverso in soggetti con differente sensibilità alla stagionalità riproduttiva (5).

Numerosi fattori climatici quali piovosità, escursione termica, temperatura, possono, inoltre, interferire con l'effetto del fotoperiodismo e condizionare sensibilmente l'attività riproduttiva di questa specie (18).

Sarà necessario, quindi, per comprendere l'applicazione di tecniche riproduttive nella specie bufalina, tenere sempre presente l'effetto di tali parametri che costituiscono fonti di interferenza capaci di condizionare significativamente l'efficienza del trattamento utilizzato.

Ci sembra, infine, doveroso riferire che la stagionalità riproduttiva della bufala assume non solo un rilevante interesse scientifico ma anche un importante significato economico, in quanto determina la massima produzione lattea nei mesi di minore richiesta commerciale. Al fine di conciliare l'offerta alla domanda del prodotto sul mercato, sono state utilizzate numerose strategie riproduttive (8) volte a programmare l'attività produttiva della bufala nel periodo di maggior richiesta di latte (destagionalizzazione) la cui diffusione rappresenta senz'altro un motivo di sviluppo per l'allevamento di questa specie.

INSEMINAZIONE STRUMENTALE

La monta libera rappresenta la tecnica riproduttiva comunemente adottata negli allevamenti bufalini italiani. La difficoltà nell'individuazione del calore associata a problemi di ordine manageriale non hanno favorito l'attribuzione della paternità

dei soggetti allevati, ragion per cui la selezione è stata sinora operata esclusivamente per via materna, consentendo, così, un progresso genetico annuo abbastanza limitato.

L'impiego della tecnica di I.S. risulterebbe quindi auspicabile nel miglioramento genetico di questa popolazione animale le cui potenzialità produttive sono assurte ad un interesse mondiale malgrado lo scarso impegno finora profuso in programmi di selezione genetica.

L'efficienza della tecnica di inseminazione strumentale (I.S.) risulta, nelle specie animali di interesse zootecnico in cui si è diffusa, strettamente connessa al tempismo tra momento di inseminazione e ovulazione. La durata del calore nella bufala varia in funzione del mese di osservazione e del clima (18); più regolare risulta l'intervallo fine calore-ovulazione (circa 20 ore). Quest'ultimo parametro si rivela nella pratica, tuttavia, poco utile sia perchè oltre il 30 % delle bufale ovula dopo 24 ore dalla fine dell'estro sia perchè la variabilità della durata di quest'ultimo rende poco prevedibile la fine delle manifestazioni estrali e quindi il momento dell'ovulazione. Quanto detto è stato recentemente confermato dai risultati di un progetto finalizzato MAF (13). A complicare la scelta del momento di intervento I.S. bisogna, inoltre, segnalare il riscontro di doppie manifestazioni estrali e di doppie ovulazioni differite (15).

La sincronizzazione del calore potrebbe in parte ovviare a tali inconvenienti e rendere la tecnica di I.S. applicabile nella routine aziendale. La stagionalità riproduttiva risulta (18), tuttavia, anche nel caso dei calori indotti, in grado di interferire significativamente sia sull'intervallo trattamento-inizio calore (47.5 ± 5.5 h, rispettivamente in dicembre e marzo) sia su quello trattamento-ovulazione (71.491.4 h, rispettivamente in dicembre e marzo), rendendo gli interventi I.S. di difficile programmazione. L'intervallo inizio calore-ovulazione negli estri indotti (25.2 ± 17.8 h, rispettivamente in dicembre e marzo) è risultato, invece, un parametro meno variabile entro i mesi esaminati. Per eludere la problematica dei calori silenti, che negli indotti incidono per il 30-60% (18), si consiglia di assumere i calori indotti manifesti quale parametro di riferimento per l'applicazione della I.S..

La notevole variabilità dell'efficienza riproduttiva di questa specie, legata a numerosi condizionamenti ambientali, impone per la programmazione di tecniche riproduttive la conoscenza di un parametro discriminante, a nostro avviso, di rilevante importanza quale la ciclicità della mandria (rapporto bufale cicliche sul totale dei soggetti potenzialmente ciclici). Tale parametro consente di valutare la condizione riproduttiva della mandria e nel corso di precedenti ricerche (18) è risultato ben correlato all'efficienza di trattamenti quali l'I.S., la sincronizzazione dei calori, la superovulazione.

L'impiego del toro vasectomizzato (16) ha prodotto un sensibile miglioramento dell'efficienza riproduttiva di questa specie. Oltre a consentire una più efficiente individuazione dei soggetti in calore, la presenza del toro è responsabile di un aumento della ciclicità della mandria, di una ridotta incidenza di calori silenti e comporta un miglioramento sostanziale dell'efficienza della I.S. (46.6% vs 27.2%; $P < 0.01$). Tale risultato è stato verificato sia nei calori spontanei sia in quelli indotti. In questi ultimi è stato inoltre registrato un migliore mantenimento dell'attività ciclica dei soggetti sottoposti al trattamento di induzione rispetto ai controllo (90.5% vs 68.1%). L'utilizzo del toro vasectomizzato consente di migliorare la percentuale di soggetti ciclici nella mandria nel periodo di allontanamento dei tori per la desta-

gionalizzazione. L'applicazione di questa strategia riproduttiva offre interessanti vantaggi come una migliore programmazione del calendario dei parti, la possibilità di una facilitata segnalazione dei soggetti in calore da destinare alla I.S. o a programmi M.O.E.T., l'impiego dell'intervallo salto-ovulazione (17.8 ± 15.7 h) quale parametro particolarmente attendibile ai fini dell'I.S..

La acquisizione di ulteriori informazioni sulla fisiologia della riproduzione della specie bufalina in accordo con un reale coinvolgimento degli allevatori nei piani di miglioramento genetico, l'impiego nelle prove di progenie di tori dotati di pedigree realmente superiori alla norma, l'individuazione di tori miglioratori, rappresentano le premesse necessarie per consentire l'applicazione pratica della I.S. in questa specie.

PRODUZIONE EMBRIONALE IN VIVO

Sebbene il primo successo di superovulazione (S.O.) e trasferimento embrionale (E.T.) nella specie bufalina risalga al 1983 (7), tali tecniche restano a tutt'oggi applicate unicamente a scopo sperimentale. Le ragioni della mancata diffusione commerciale di tali programmi non risiedono senz'altro in una situazione di scarso interesse verso questa specie che è, anzi, attualmente in crescente espansione mondiale, ma vanno altres ricercate nella scarsa efficienza delle tecniche utilizzate.

In Italia l'impiego di programmi di S.O. ha portato alla nascita del primo vitello ET nel 1991 (17). Da allora numerosi studi sono stati eseguiti allo scopo di ottimizzare l'efficienza dei protocolli di superovulazione e di trasferimento embrionale creando le premesse per un interesse commerciale alla produzione embrionale di questa specie. Nel corso di tali studi sono stati esaminati numerosi fattori coinvolti nella risposta superovulatoria della bufala valutata sia come percentuale di soggetti con risposta positiva al trattamento sia come produzione embrionale media ottenuta per soggetto trattato. La distanza dal parto è risultata influenzare significativamente la risposta superovulatoria che è massima qualora il trattamento viene operato tra il 90-150° giorno *postpartum* (19). L'impiego di dosaggi e schemi di somministrazione dell'P-FSH differenziati (20) ha consentito l'individuazione dei trattamenti che meglio conciliano parametri quali la responsività al trattamento di superovulazione (percentuale di soggetti con recupero embrionale positivo) e il numero di embrioni prodotti per soggetto responsivo. Sulla base della tendenziale stagionalità riproduttiva della specie bufalina sono state, inoltre, esperite indagini volte ad individuare il periodo dell'anno in cui è più alta l'efficienza di detta tecnica (20). Il periodo giugno-ottobre è quello in cui si registra la maggior incidenza di bufale responsive al trattamento nonchè il maggior numero di embrioni prodotti per soggetto trattato. È rilevante notare, tuttavia, che il periodo novembre-gennaio, pur risultando caratterizzato da un'elevata efficienza riproduttiva in questa specie, ha registrato la minore percentuale di bufale responsive al trattamento ed il minor numero di embrioni prodotti. Ulteriori informazioni sulla risposta superovulatoria della specie sono state ottenute comparando l'effetto di numerosi fattori nutrizionali con l'efficienza del trattamento di superovulazione (6). Da tale analisi è emerso che il numero di embrioni prodotti è associato positivamente al tenore in fibra e negativamente a quello in amido soprattutto nei primi 120 giorni di lattazione.

Allo scopo di aumentare la popolazione follicolare responsiva al trattamento di S.O. sono state eseguite prove di prestimolazione con rBST (21). L'impiego di tale «*primer*» ha disatteso le ipotesi di partenza, infatti, piuttosto che aumentare la risposta ovulatoria dei soggetti trattati, ha aumentato significativamente la percentuale di soggetti responsivi al trattamento di superovulazione senza modificare la produzione embrionale nei soggetti con recupero positivo.

Al fine di rendere la produzione embrionale bufalina commercialmente applicabile sono infine necessarie informazioni circa l'efficienza della tecnica di trasferimento embrionale nonchè sulla possibilità di criopreservazione degli embrioni prodotti. Autori indiani (11) riportano una percentuale di gravidanza ottenuta dal trasferimento di embrioni congelati pari al 28% (11/39). Presso il nostro Dipartimento prove (18) di trasferimento di embrioni bufalini freschi hanno prodotto un'efficienza di gravidanze a termine pari al 36.3% (8/22); il trasferimento di embrioni (morule di grado I e II) congelati con metodica classica (dati non pubblicati) ha invece prodotto una percentule di gravidanza, valutata mediante indagine ginecologica al 40° giorno, pari al 23% (3/13) ed una percentuale di gravidanza a termine del 15% (2/13).

PRODUZIONE EMBRIONALE IN VITRO

Le tecniche di produzione embrionale *in vitro* risultano compromesse da svariati fattori quali il basso tasso di reclutamento follicolare, probabilmente associato ad una popolazione follicolare sensibilmente inferiore a quella registrata nella specie bovina, la scadente qualità degli oociti recuperati dalla sede follicolare, la bassa efficienza di sviluppo embrionale *in vitro*, che sono risultati responsabili di una produzione embrionale *in vitro* per individuo particolarmente bassa.

Nel 1991 Bacci *et al.* (1) rilevarono una buona efficienza di maturazione e fecondazione *in vitro* degli oociti bufalini. In essi, tuttavia, veniva riscontrata una incidenza di polispermia sensibilmente più elevata di quella emersa negli oociti bovini utilizzati come controllo. Boni *et al.* (2) in uno studio sulle caratteristiche ultrastrutturali degli oociti bufalini sottoposti a maturazione *in vitro*, rilevarono similitudini nei meccanismi di maturazione *in vitro* con quanto riportato nella specie bovina.

Da tali indagini preliminari sembrerebbe che la produzione embrionale *in vitro* nella specie bufalina non presenti grosse difficoltà e risulti, quindi, di facile attuazione. Autori indiani (14), tuttavia, nel corso di uno studio estensivo eseguito su 12.263 ovaie prelevate al macello hanno denunciato numerosi problemi connessi alla produzione embrionale di questa specie. Lo sviluppo embrionale *in vitro* di oociti sottoposti a maturazione, fecondazione e coltura embrionale *in vitro* (IVM, IVF, IVC) fino allo stadio di morula-blastocisti era raggiunto con efficienza (4.7%) e con una media di embrioni prodotti per bufala ($x = 0.04$) particolarmente bassa sebbene fosse stato utilizzato per la IVF esclusivamente seme bufalino fresco. Prove con sperma congelato fornivano invece risultati addirittura drammatici: 86 oociti divisi allo stadio di 2 cellule partendo da 1.904 COC (complessi oocita-cumulo oofo-ro) di ottima qualità prelevati da 4.428 ovaie (0.43 COC/ovaio e 0.86 COC/bufala) con una efficienza di *cleavage* pari al 4.5%, di produzione embrionale (morule + blastocisti) del 0.84% e con una media di 0.017 embrioni per bufala. Gli autori attribuirono questi risultati a possibili alterazioni di membrana che si stabilirebbero negli spermatozoi bufalini a seguito del congelamento.

Nel nostro laboratorio problemi di scarsa reperibilità di ovaie ci hanno impedito di compiere studi estesi in merito, tuttavia, nel corso di indagini preliminari (dati non pubblicati) sottoponendo a tecniche di IVM, IVF, IVC, 179 COC ottenuti mediante tecnica di aspirazione del fluido follicolare da 28 ovaia (6.4 COC/ovaio e 12.8 COC/bufala) e fecondati con sperma congelato sono state prodotte 4 morule di buona qualità e 2 blastocisti sgusciate, per un totale di 0.43 embrioni trasferibili per bufala e con una efficienza media di produzione embrionale pari al 3.4%.

OVUM PICK-UP

La tecnica di *Ovum Pick-Up* consente nella specie bovina il recupero ripetuto di elevate quantità di oociti utilizzabili nei programmi di produzione embrionale *in vitro* (10) costituendo, inoltre, un valido strumento di indagine della dinamica di reclutamento follicolare (3). Nella specie bufalina prove di prelievo *in vivo* di oociti mediante l'applicazione di tale tecnica sono state eseguite di recente (4) utilizzando animali in anaestro «profondo», caratterizzati da condizioni di ipotrofia ovarica. In tale studio è stata valutata l'efficacia di un pretrattamento con P-FSH sul numero e sulle dimensioni dei follicoli punti nonchè sulle caratteristiche morfologiche degli oociti raccolti. In assenza di prestimolazione sono stati punti mediamente 4.2 follicoli di dimensioni superiori a 2 mm per animale (n. 6) con recupero medio di 1.3 COC/animale. L'impiego della prestimolazione ormonale negli stessi animali ha consentito un significativo aumento sia del numero dei follicoli punti (6.8 vs 4.2) che degli oociti recuperati (3.0 vs 1.3) per soggetto, migliorando, inoltre, l'efficienza di recupero (44% vs 32%). Ulteriori prove sono in corso per valutare l'efficienza di tale tecnica in soggetti ciclici.

Il miglioramento dell'efficienza di produzione embrionale *in vitro* rappresenta il presupposto essenziale per rendere routinaria l'applicazione della tecnica di *Ovum Pick-Up* nella bufala, che potrebbe rappresentare una valida alternativa alla superovulazione nell'opera di miglioramento genetico di questa specie nell'ambito di nuclei di selezione, programma oggi operante nella specie bovina in Paesi come Olanda, Inghilterrra e USA.

BIBLIOGRAFIA

1) Bacci M.L., Galeati G., Mattioli M., Boni R., Seren E. (1991) *In vitro Maturation and In vitro Fertilization of buffalo oocytes.* Proc. III World Buffalo Congress, Varna, May *13-18*, pp. 599-609.

2) Boni R., Santella L., Dale B., Roviello S., Di Palo R., Barbieri V. (1992) *Maturazione in vitro di oociti bufalini: indagine ultrastrutturale.* Acta Medica Veterinaria *38*, 153-161.

3) Boni R., Roelofsen M., Pieterse M.C., Wurth Y.A., Kruip Th.A.M. (1993) *Follicular recruitment after repeated removal of all follicles* >2mm in the bovine ovary. J. Reprod. Fert., Abst. series *12*, n.69.

4) Boni R., Di Palo R., Barbieri V., Zicarelli L. (1994) *Ovum Pick-Up in deep anestrus buffaloes.* Proc. IV World Buffalo Congress, Sao Paolo, Brasil (In stampa).

5) Di Palo R., Parmeggiani A., Campanile G., Zicarelli L. (1993) *Stima del valore della ripetibilità dei livelli plasmatici di melatonina in bufale allevate in Italia.* Atti Soc. It. Sc. Vet. *45* (In stampa).

6) Di Palo R., Campanile G., Esposito L., Barbieri V., Zicarelli L. (1994) *Characteristics of the diet and FSH-P superovulatory response in Italian mediterranean buffaloes.* Proc. IV World Buffalo Congress, Sao Paolo, Brasil (In stampa).

7) Drost M., Wright J.M.jr., Cripe W.S., Ritchter A.R. (1983) *Embryo transfer in water buffalo (Bubalus bubalis).* Theriogenology *20*, 579-584.

8) Esposito L., Campanile G., Di Palo R., Boni R., Di Meo C., Zicarelli L. (1992) *Seasonal reproductive failure in buffaloes bred in Italy.* Proc. XII International Congress of Animal Reproduction (ICAR), The Hague, The Netherlands, 23-27 August, 2045-2047.

9) Hemeida A.N. (1988) *Reproductive problems in buffalo in the world.* Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, pp.197-205.

10) Kruip Th.A.M., Boni R., Wurth Y.A., Roelofsen M.W.M., Pieterse M.C. (1994) *Potential use of Ovum Pick-Up for embryo-production and breeding in cattle.* Theriogenology (In stampa).

11) Kasiraj R., Misra A.K., Mutha Rao M., Jaiswal R.S., Rangareddi N.S. (1993) *Successful culmination of pregnancy and live birth following the transfer of frozen-thawed buffalo embryos.* Theriogenology *39*, 1187-1192.

12) Parmeggiani A., Zicarelli L., Mongiorgi S., Esposito L., Barile V.L., Terzano G.M. (1992) *Modificazioni della concentrazione plasmatica della meletonina in manze e bufale durante diversi periodi dell'anno.* Atti Soc. It. Sc. Vet. *46* (In stampa).

13) ? E. (1993) *Modificazioni endocrine durante il ciclo estrale della bufala.* Atti del Seminario «Miglioramento dell'efficienza produttiva e riproduttiva della specie bufalina», Biella, 15 dicembre 1993, pp. 39-54.

14) Totey S.M., Singh G., Taneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P. (1992) *In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (Bubalus bubalis).* J. Reprod. Fert. *95*, 597-607.

15) Zicarelli L., Campanile G., Infascelli F., Esposito L., Ferrari G. (1988) *Incidence and fertility of heats with double ovulations in the buffalo cows.* Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, pp. 57-62.

16) Zicarelli L., Esposito L., Di Palo R., Campanile G., Boni R. (1991) *Effect of bull on spontaneous and induced heats in mediterranean buffaloes bred in Italy.* Proc. III World Buffalo Congress, Varna, May 13-18, pp. 639-649.

17) Zicarelli L., Dale B., Campanile G., Di Palo R., Boni R., Esposito L. (1991) *Superovulation and Embryo transfer in Bubalus bubalis.* Proc. VII European Congress of E.T. (A.E.T.E.), Cambridge, p. 220.

18) ZICARELLI L. (1992) *Recenti acquisizioni sull'attività riproduttiva nella bufala.* Atti IV Meeting Naz. «Studio dell'efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico» pp. 9-39.

19) ZICARELLI L., DI PALO R., PALLADINO M., CAMPANILE G., ESPOSITO L. (1992) *Embryo transfer in Mediterranean Bubalus bubalis.* Proc Symp. «Prospects of buffalo production in Mediterranean and Middle East», Cayro, Egypt, 9-12 december, pp.73-75.

20) ZICARELLI L., BONI R., PACELLI C., ESPOSITO L., SPADETTA M. (1994) *Superovulation in italian mediterranean buffaloes using FSH-P with different treatments.* Proc. IV World Buffalo Congress, Sao Paolo, Brasil (In stampa).

21) ZICARELLI L., DI PALO R., CAMPANILE G., BONI R., LANGELLA M. (1994) - *rBST + FSH-P in superovulatory treatment of italian mediterranean buffaloes.* Proc. IV World Buffalo Congress, Sao Paolo, Brasil (In stampa).

Atti della 2ª Conferenza Nazionale su:
Stato dell'arte delle ricerche
italiane nel settore delle
biotecnologie applicate alle
scienze veterinarie e zootecniche

S. NAITANA, S. LEDDA, P. LOI°, P. CAPPAI°

LE NUOVE TECNOLOGIE RIPRODUTTIVE PER LA TUTELA DEL MUFLONE SARDO/CORSO

Istituto di Fisiologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Sassari;
° Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna, Olmedo (Sassari)

RIASSUNTO

Le tecnologie riproduttive possono contribuire alla salvaguardia delle specie di interesse naturalistico per il mantenimento della biodiversità faunistica. Tali tecnologie, sperimentate con successo nella pratica zootecnica, presentano seri limiti di applicabilità cha hanno portato al conseguimento di risultati sporadici in campo faunistico. Da diversi anni in Sardegna si studia la possibilità di costituire una banca genetica di embrioni per la tutela del muflone sardo/corso. Queste ricerche hanno permesso di valutare la risposta ovarica di mufle superovulate in diversi periodi dell'anno e di ottenere la nascita di mufloni dopo il trasferimento in pecore riceventi di blastocisti sia sviluppate in vivo che coltivate *in vitro*. Permangono tuttavia problemi di applicabilità legati alle scarse conoscenze della fisiologia riproduttiva di questa specie.

Parole chiave: muflone - superovulazione - *embryo transfer.*

NEW REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES FOR CORSICAN/SARDINIAN MOUFLON CONSERVATION

SUMMARY

Reproductive technologies can be used for preserving endagered wildlife species keeping in this way the biological and genetic diversity. The efficiency of these technologies, which has been used in farm animal, has not generally been throughly investigated in endagered species. From several years we have studied the possibility to provide genetic resource banks as a tool for preservation Ovis gmelini mousimon in Sardinia. These researchs have been focused on the ovarian responses after superovulatory treatment during breeding and non breeding season and the production offspring mouflons after transfer blastocysts developed in vivo or cultured *in vitro* into recipients sheep. Obviously several obstacles must be surmonted before genetic resource bank of mouflon can be used on a pratical basis to propagate this wild sheep.

Key word: mouflon - superovulation - embryo transfer.

INTRODUZIONE

L'ultima conferenza mondiale sull'ambiente svoltasi in Brasile (1993) ha messo in evidenza il pericolo derivante dalla scomparsa di numerose specie vegetali ed animali. Il problema della conservazione della biodiversità acquista quindi un importanza basilare per il mantenimento degli equilibri naturali all'interno di un ecosistema. Le recenti acquisizioni biotecnologiche nel campo della riproduzione possono fornire un importante contributo alla salvaguardia delle specie di interesse faunistico (1). Tali tecnologie, già impiegate con successo in campo zootecnico, qualora vengano trasferite sulle specie selvatiche possono presentare tuttavia problemi di applicabilità legati alla scarse conoscenze della fisiologia riproduttiva di questi animali (2).

La presente sperimentazione si inserisce in un progetto più generale che si prefigge lo scopo di sviluppare le potenzialità applicative delle nuove tecnologie riproduttive in ambito faunistico attraverso la costituzione di una banca genetica di materiale seminale e di embrioni nel muflone sardo/corso. Parte di questo progetto è stata realizzata con successo impiegando spermatozoi crioconservati di muflone nella fecondazione artificiale degli ovini (3). La costituzione della banca di embrioni appare più complessa e richiede la messa a punto di diverse fasi fra loro interdipendenti: a) incrementare il livello produttivo degli embrioni, b) individuare le specie riceventi biologicamente compatibili, c) sviluppare valide metodiche di crioconservazione degli embrioni.

In questa sede verranno affrontate le problematiche relative ai primi due punti.

MATERIALI E METODI

L'esperienza è stata condotta nell'arco di due anni su 32 mufle, delle quali 22 catturate nell'isola dell'Asinara (selvatiche) e 10 nate in cattività (semi-domestiche), e su 26 pecore di razza Sarda.

Nel corso del primo anno a 10 mufle e a 14 pecore in stagione riproduttiva e a 12 mufle e a 12 pecore in stagione anestrale è stato indotto l'estro con spugne di FGA. La superovulazione è stata praticata somministrando a ciascun animale 16 mg di un estratto ipofisario porcino suddivisi in 4 dosi scalari a partire dalle 24 ore precedenti l'asportazione delle spugne. Gli embrioni sono stati recuperati in laparotomia a 6 giorni dall'estro (estro giorno 0) mediante un *flushing* uterino, in quella stessa seduta si valutava il numero e le caratteristiche dei corpi lutei (C.L.).

Nel corso della stagione riproduttiva del secondo anno le 10 mufle semidomestiche, trattate con le stesse procedure di sincronizzazione e superovulazione descritte in precedenza, sono state suddivise in due gruppi in base ai tempi di recupero embrionale: dall'ovidotto a 60 ore (gruppo E) e dall'utero a 6 giorni (gruppo F). Nel gruppo E sono stati eseguiti prelievi ematici per il dosaggio del progesterone. In considerazione dello stadio di sviluppo gli embrioni raccolti dalle mufle del gruppo E sono stati coltivati in un *medium* semplice (CZB) su monostrato di epitelio tubarico a 39°C con il 5% di CO^2 e aria. Lo sviluppo embrionale è stato valutato dopo 2-4 giorni allorchè raggiungevano lo stadio di 16 cellule e di morula/blastocisti.

La vitalità degli embrioni prodotti nei due anni dalle pecore e dalle mufle è stata valutata mediante il trasferimento su pecore riceventi.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportati i risultati del primo anno di osservazione. Sia in stagione riproduttiva che anestrale la risposta al trattamento è risultata inferiore nelle mufle rispetto alle pecore; nelle prime infatti il numero degli animali in estro, il numero di C.L., le percentuali di recupero e di embrioni trasferibili erano significativamente più bassi. In entrambe le stagioni inoltre, mentre la percentuale di fertilizzazione è risultata simile per i due genotipi, è stata osservata in un certo numero di mufle la precoce regressione luteale (P.R.L.).

I risultati ottenuti nel secondo anno sono riportati nelle tabelle 2 e 3. Come si può osservare nella tabella 2, operando nelle mufle un *flushing* tubarico a 60 ore dall'inizio dell'estro, in modo da anticipare la P.R.L. osservata negli animali trattati nell'anno precedente, è stato registrato un alto tasso di recupero di embrioni rispetto a quello ottenuto con il *flushing* delle corna uterine a 6 giorni (88.6 vs 31.6).

Il sistema colturale utilizzato (tab.3) ha permesso un soddisfacente sviluppo degli embrioni dei quali il 73.3% è risultato con più di 16 blastomeri dopo due giorni di coltura e il 53.3% ha raggiunto lo stadio di morula/blastocisti dopo 4 giorni.

Il risultato del trasferimento degli embrioni e la durata della gestazione delle pecore riceventi sono riportati nella tabella 4. Sono nati a termine il 70.8% degli embrioni di pecora e il 57.1% di quelli di muflone prodotti in vivo, il 56.2% di quelli di muflone coltivati *in vitro*; la durata della gestazione è risultata rispettivamente di 148.2 - 155.8 - 158.7 giorni per le tre categorie di embrioni.

DISCUSSIONE

Se la mancata risposta ovarica delle mufle può trovare una giustificazione in periodo anestrale, essa risulta tuttavia inattesa in stagione riproduttiva. L'efficacia del trattamento superovulatorio osservato nella pecora domestica fa ritenere che nelle mufle alcuni fattori riconducibili alle condizioni non naturali di allevamento possano aver influenzato in qualche misura il risultato, come già osservato nel caso di analoghi trattamenti su altre specie ovine selvatiche (4). Altri fattori condizionanti possono essere attribuiti: al protocollo superovulatorio che, utilizzato con successo negli ovini domestici non è risultato adatto nelle specie selvatiche; alle caratteristiche genetiche del muflone che in natura deve subire un continuo processo selettivo per favorire i soggetti più strettamente monotocici maggiormente capaci di garantire la sopravvivenza della specie; alle ripetute immobilizzazioni necessarie per effettuare il trattamento di superovulazione che hanno determinato nelle mufle uno stato di *stress*. Queste ipotesi giustificano inoltre il maggiore numero dei C.L. per soggetto riscontrati nel gruppo delle mufle semidomestiche (6.7) rispetto al gruppo delle selvatiche (4.2).

La presenza nelle mufle della P.R.L. dopo il trattamento con le gonadotropine ipofisarie modifica i tempi di transito degli embrioni lungo il tratto oviduttale e ne compromette il loro recupero. La titolazione del progesterone plasmatico nelle mufle del gruppo E ha permesso di osservare che la P.R.L. si manifesta solo dopo il quarto giorno dall'inizio dell'estro, pertanto effettuando il *flushing* dall'ovidotto al secondo giorno si ha la possibilità di accrescere le percentuali di recupero degli

embrioni e di evitare l'arresto del loro sviluppo, come riscontrato in alcuni casi di recupero al sesto giorno. Naturalmente con l'anticipato *flushing* si ottengono embrioni a stadi precoci che necessitano di un ulteriore sviluppo per raggiungere le fasi di morula/blastocisti più favorevoli a garantire un buon livello di successo nei programmi di *embryo transfer* o di crioconservazione.

Lo sviluppo in CZB e monostrato di epitelio tubarico dallo stadio di 2-4 cellule fino a morula/blastocisti è risultato nel caso degli embrioni di mufla inferiore rispetto a quanto normalmente si riscontra per quelli di pecora (5). Dopo il trasferimento degli embrioni sulle pecore riceventi è stata ottenuta una più alta percentuale di attecchimento nelle ovini domestici (70.8%) rispetto al muflone sia che essi provengano da sviluppo *in vivo* che da coltura *in vitro* (57.1% e 56.2%). I tempi di gestazione delle pecore riceventi sono risultati simili a quelli della specie donatrice di embrioni; ciò ha messo in evidenza l'influenza determinante del feto sulla durata della gravidanza. Vi è ancora da sottolineare, a conferma di quanto osservato in precedenti esperienze condotte sull'ovino domestico, che nel caso degli embrioni coltivati *in vitro* la durata della gestazione è risultata maggiore rispetto a quella degli embrioni sviluppati *in vivo*.

Dai risultati ottenuti in queste sperimentazioni, incoraggianti risultano le prospettive di applicazione delle nuove tecniche riproduttive per la salvaguardia del muflone sardo/corso. Permane tuttavia la necessità di approfondire le conoscenze sulla fisiologia riproduttiva di questa specie selvatica al fine di ottimizzare la risposta superovulatoria, di migliorare le metodiche colturali degli embrioni e la loro vitalità e di incrementare la percentuale di attecchimento.

Tabella 1: Risposta ovarica, recupero, fertilità ed embrioni trasferibili in pecore e mufloni.

	Stagione riproduttiva		Stagione anaestrale	
	Mufla	Pecora	Mufla	Pecora
Estro	7/10a	14/14b	5/12a	12/12b
Corpi lutei	4,4±2,7A	9,6±4,8b	4,0±1,6a	8,2±4,3b
P.R.L.	1,1±0,8	—	0,8±0,4	—
% recupero	35,4a (11/31)	68,7b (92/132)	30,0a (6/20)	71,4b (70/98)
% fertilità	72,7 (8/11)	78,3 (72/92)	66,7 (4/6)	74,3 (52/70)
% embrioni trasferibili	37,5 (3/8)	73,6 (53/72)	25,0 (1/4)	69,2 (36/52)

P.R.L. = Precoce regressione luteale.

Tabella 2 - Risposta ovarica e recupero embrionale di ogni singolo muflone nei gruppi E ed F.

	Mufle	Corpi lutei	Recupero
Gruppo E: recupero a 60 ore dall'estro	m 1	10	6 (2 cel.), 3 (4 cel.)
	m 2	7	4 (2 cel.), 2 (4 cel.)
	m 3	1	1 (4 cel.)
	m 4	5	1 (2 cel.), 3 (4 cel.)
	m 5	12	1 (non fertiliz.), 4 (2 cel.), 6 (4 cel.)
			% 88,6
Gruppo E: recupero a 60 ore dall'estro	m 6	—	—
	m 7	11	3 (non fertilizz.)
	m 8	4	—
	m 9	—	—
	m 10	4	1 (mor.), 2 (blastoc.)
			% 31,6

Tabella 3 - Effetto del CZB con monostrato di epitelio tubarico sullo sviluppo *in vitro* degli embrioni di mufle.

Sistema colturale	Numero di embrioni	> di 16 cellule	Morula/ blastocisti
CZB	30	22	16
MET	(2-4 cellule)	(73,3%)	(53,3%)

MET = monostrato epitelio tubarico.

Tabella 4 - Vitalità di embrioni di ovino e di muflone dopo trasferimento su pecore riceventi.

	Ovino	Muflone	
	in vivo	*in vivo*	*in vitro*
Embrioni trasferiti	24	7	16
Vitalità (60 giorni)	17	4	10
Nati	17 (70,8%)	4 (57,1%)	9 (56,2%)
Durata di gestazione	148,2 ± 1,2	155,8 ± 1,3	158,7 ± 2,8

BIBLIOGRAFIA

1) WILDT D.E. (1992) *Genetic resource banks for conserving wildlife species justification, examples and becoming organized on global basis.* Anim. Reprod. Sci. *28*, 247-257 .

2) SCHIEWE M. C., BUSH M., PHILLIPS L.G., CITINO S., WILDT D.E. (1991) *Comparative aspects of estrus synchronization, ovulation induction and embryo cryopreservation in the scimitar horned oryx, bongo, eland and breater kudu.* J. Exp. Zool. *58*, 75-88 .

3) LOI P., LEDDA S., FILIA F., NAITANA S., CAPPAI P. (1989) *I.A. intrauterina con seme fresco e congelato di muflone.* Atti S.I.S. Vet. *43*, 323-325.

4) BUCKRELL B.C., GARTLEY C.J., MEHREN K.G., GOODROWE K.L. (1990) *Superovulation in dall's sheep (ovis dalli dalli).* Theriogenology *33*, 201abs.

5) LEDDA S., LOI P., CAPPAI P., NAITANA S. (1991) *Effect of glucose on early ovine embryos developed in simple serum free medium.* J. Reprod. Fert. *7*, 6abs.

M.S.L. ROCCHI, S. CEROLINI*, F. PIZZI*, P. DALL'ARA

SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) PER LA VALUTAZIONE QUALITATIVA DEL SEME BOVINO

Istituto di Microbiologia e Immmunologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Milano, via Celoria, 10 - 20139 Milano e
* Istituto per la Difesa e la Valorizzazione del Germoplasma Animale - CNR, Milano

RIASSUNTO

La tecnica SCSA permette di valutare *in vitro* lo stato di compattamento della cromatina nucleare degli spermatozoi, parametro non altrimenti valutabile in laboratorio e correlato alla fertilità maschile. Abbiamo voluto verificare l'applicabilità di tale tecnica all'analisi del seme bovino congelato, valutando nel contempo l'eventuale influenza del glicerolo (10%) nel *buffer* di congelamento e utilizzando un citofluorimetro predisposto per analisi di routine. Le analisi sono state condotte su seme di 7 tori provati, normalmente utilizzati in un centro di F.A. Sia le prove di standardizzazione del metodo, sia i test relativi alla valutazione dell'influenza del glicerolo hanno confermato la reale applicabilità della SCSA all'analisi del seme bovino congelato e la semplicità, rapidità e affidabilità della metodica.

Parole chiave: SCSA - cromatina nucleare - arancio di acridina - citofluorimetria - fertilità.

SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) FOR QUALITATIVE EVALUATION OF BULL SEMEN

SUMMARY

The sperm chromatine structure assay (SCSA) can be considered as a new tecnique to evaluate in vitro semen quality and it is well correlate to male fertility. The aim of our research was to perform the SCSA using a flow cytometer for routine analsis, and to study the influence of 10% glycerol addition into the freezing buffer for sperm.
Semen samples from 7 bulls were used. Semen was diluited to 2 x 106 cells/ml in TNE buffer and in TNE buffer plus 10% glycerol. SCSA standardization was achieved even using a flow cytometer for routine analysis. The glycerol into the freezing buffer for semen samples does not influence the analysis. SCSA could be suggested as an easy and rapid laboratory analysis to evaluate frozen bull sperm.

Key words: SCSA - Chromatin - acridine orange - flow cytometry - fertility.

INTRODUZIONE

La possibilità di valutare la fertilità dei maschi riproduttori mediante analisi *in vitro* del materiale seminale riveste una notevole importanza per il miglioramento delle produzioni animali nelle specie di interesse zootecnico. Tuttavia, attualmente, i tradizionali parametri di valutazione del materiale seminale non consentono una corretta valutazione della fertilità. Recentemente, l'applicazione di tecniche analitiche di citofluorimetria allo studio delle cellule germinali maschili ha consentito di ottenere nuovi parametri utilizzabili per la valutazione *in vitro* della qualità degli spermatozoi; tra queste si è dimostrata molto interessante la tecnica denominata SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) sviluppata da Evenson e coll. tra il 1980 e il 1986 (6, 7, 8). L'SCSA utilizza l'arancio di acridina (AO, *acridine orange*, colorante degli acidi nucleici) e la citometria a flusso al fine di misurare il grado di suscettibilità alla denaturazione *in situ* della cromatina nucleare degli spermatozoi. Un aumento della denaturabilità corrisponde, infatti, ad una maggiore eterogeneità nella struttura della cromatina. Il grado di denaturabilità della cromatina nuclare riflette, a sua volta, alterazioni della stessa, alterazioni che potrebbero influenzare la qualità del materiale seminale; infatti, diversi studi effettuati nell'uomo, nel topo e nel toro (2, 3, 7, 8) hanno evidenziato come l'aumento della eterogeneità della struttura della cromatina dopo denaturazione *in situ* possa essere associata a difetti della spermatogenesi, a una elevata percentuale di spermatozoi con anomalie morfologiche e ad infertilità. I dati ottenuti con SCSA potrebbero quindi essere impiegati nella valutazione della fertilità dei riproduttori d'interesse zootecnico (1, 2, 12). Il grado di denaturazione della cromatina nucleare degli spermatozoi viene determinato valutando l'emissione di fluorescenza del campione denaturato con acido e quindi colorato con arancio di acridina: il DNA nucleare nativo è presente nelle cellule sotto forma di doppio filamento (*double strand* DNA, dsDNA), il trattamento con calore o con acidi forti separa i due filamenti denaturando la molecola, formando DNA a singolo filamento (*single strand* DNA, ssDNA). Generalmente il DNA degli spermatozoi è estremamente resistente alla denaturazione, tuttavia, in caso di maturazione anomala, incompleta o di anomalie di condensazione della cromatina, lo stesso diviene estremamente sensibile alla denaturazione *in situ* condotta in condizioni standardizzate (con soluzioni di acidi forti a pH definito per tempi limitati e a basse temperature, detta denaturazione parziale). Infatti, maggiori sono le alterazioni della cromatina e più elevata è la quota di DNA che, in queste condizioni, passa dalla forma a doppio filamento a quella a singolo filamento. Per misurare l'entità di questa denaturazione si sfrutta una peculiare caratteristica dell'AO: infatti questa molecola cambia la sua emissione di fluorescenza (nel verde o nel rosso) in relazione al tipo di acido nucleico a cui si lega (vedi figura 1) (4). Nel caso di acidi nucleici a doppio filamento l'arancio di acridina si intercala all'interno della doppia elica ed emette fluorescenza verde, mentre quando si lega alla singola elica emette fluorescenza rossa. Quindi ogni spermatozoo emetterà sia fluorescenza verde che fluorescenza rossa, in rapporto, rispettivamente, alla quantità di dsDNA e ssDNA presenti. Poiché gli spermatozoi maturi sono virtualmente privi di RNA, come dimostrato da Monesi nel 1971 (5), l'intensità delle due fluorescenze risulta indicativa della proporzione tra DNA a singolo e a doppio filamento, quindi del grado di denaturazione del campione.

Impiegando un citometro a flusso è possibile ottenere una misura accurata dell'emissione nel rosso e nel verde di ogni singola cellula; queste misurazioni, condotte su un numero di cellule elevato (minimo 5000) consentono di definire alcuni parametri indicativi della sensibilità alla denaturazione della cromatina nucleare (vedi oltre) che riassumono le caratteristiche della popolazione cellulare analizzata.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del presente lavoro è stato la messa a punto della metodica per la valutazione della struttura della cromatina spermatica (SCSA) su seme bovino congelato in un *buffer* specifico per l'analisi (TNE), utilizzando un citofluorimetro predisposto per analisi di *routine*.
Si è voluto inoltre verificare l'eventuale influenza della presenza del glicerolo nella soluzione di congelamento sulla analisi citofluorimetrica. Infatti il seme bovino prodotto dai centri di F.A., contiene una certa percentuale di glicerolo che, se da un lato svolge la funzione di crioprotettore, dall'altro potrebbe causare un aumento del *background* di fluorescenza aspecifica. Abbiamo quindi voluto confrontare campioni dello stesso eiaculato congelato in 2 *medium* differenti per presenza o assenza di glicerolo al fine di valutare la sua eventuale influenza.

MATERIALI E METODI

Seme

Le analisi sono state condotte sul seme di tori provati, utilizzati in F.A.
Più precisamente, le prove iniziali di messa a punto del metodo sono state condotte sul seme di 2 tori, mentre per le prove relative al confronto tra diversi *buffer* di congelamento è stato utilizzato il seme di altri 5 animali.
I campione di materiale seminale provengono da un centro tori; durante un normale giorno di lavorazione, da un eiaculato di alcuni tori, dopo valutazione della concentrazione, sono state prelevate due aliquote di sperma. Tali aliquote sono state diluite rispettivamente in TNE-*buffer* ed in TNE-*buffer* con il 10% di glicerolo alla concentrazione finale di 2 x 10^6 spermatozoi/ml, ritenuta la concentrazione ottimale per l'analisi citofluorimetrica. Il materiale seminale è stato quindi congelato in azoto liquido e conservato a —80°C fino al momento dell'analisi. Il giorno dell'analisi i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente, quindi posti in bagno ghiacciato (+4°C) fino al momento della marcatura; tutte le operazioni successive sono state condotte a +4°C.

Marcatura dello standard e dei campioni

Da ogni campione di seme è stato prelevato un volume di 200 µl a cui sono stati aggiunti 400 µl di soluzione denaturante (0,15 M NaCl, 0,1% Triton-X, 0,08 N HCl); dopo 30' dall'aggiunta di questa soluzione la denaturazione è stata bloccata aggiungendo 2 ml di soluzione colorante (0,2 M Na_2 HPO_4, 1 mM Na_2 -EDTA,

0,05 M NaCl, 0,1 M acido citrico monoidrato, pH 6,0 contenente 5 μg/ml di *acridine orange*). Il campione è stato quindi inserito nel citofluorimetro e 3 minuti dopo l'aggiunta della soluzione denaturante è stato dato inizio all'acquisizione dei dati. Il seme non denaturato ha subito identico trattamento, con la variante che al posto della soluzione denaturante è stata usata la seguente soluzione: 0,15 M NaCl, 0,1% Triton-X.
Per ogni campione sono stati acquisiti i dati (*forward scatter*-FSC, *side scatter*-SSC, fluorescenza verde-FL1 e fluorescenza rossa-FL3) relativi a 5000 cellule. Al fine di escludere dall'analisi la fluorescenza aspecifica legata alla eventuale presenza di detriti cellulari, è stato utilizzato un *gate* di acquisizione che permette di sottrarre automaticamente questi segnali (vedi risultati).

Strumento

È stato utilizzato un citometro a flusso (FACScan, Becton Dickinson) equipaggiato con un *laser Argon-Ion* da 15 mW che emette luce monocromatica blu a 488 nm. Le fluorescenze verde [l 515-530 nm] e rossa [l > 630 nm] corrispondenti, rispettivamente, all'emissione del DNA a doppio filamento e del DNA a singolo filamento, emesse da ogni singola cellula marcata, sono state raccolte da un idoneo set di filtri, processate elettronicamente e successivamente analizzate.

Taratura dello strumento

All'inizio di ogni sessione di analisi lo strumento è stato equilibrato mediante passaggio della soluzione colorante nel sistema fluidico per 40 minuti. Questa operazione si è resa necessaria per eliminare il *background* di fluorescenza prodotto dalle molecole di arancio di acridina libere presenti in soluzione.
Si è quindi proceduto alla taratura dello strumento mediante un campione *standard*: aliquote di questo campione di seme vengono utilizzate ad ogni seduta analitica per tarare il citofluorimetro in modo da ottenere valori costanti delle due fluorescenze emesse da questo campione. La marcatura dello *standard* viene condotta analogamente alla marcatura dei campioni in esame.

Analisi

Dall'analisi dei dati ottenuti viene poi calcolato, per ogni cellula, il parametro α-t, definito come rapporto tra la fluorescenza rossa e la fluorescenza totale (rossa + verde) (10); tale valore dipende dalla proporzione relativa tra ssDNA e dsDNA di ogni singola cellula. L'insieme dei valori di α-t di tutta la popolazione cellulare analizzata assume una distribuzione caratteristica del tipo di quella riportata in figura 2. Questa distribuzione comprende un picco di massima frequenza cellulare che viene definito come popolazione principale ed una zona molto variabile che si estende a destra del picco precedente.
Di questa distribuzione è possibile calcolare:
— il valore medio di α-t (Xα-t), per convenzione compreso tra 0 e 1000;
— la moda di distribuzione di α-t (picco);
— il coefficiente di variazione di α-t (CVα-t);
— la deviazione standard di α-t (SDα-t);

— la COMPα-t (*Cell Outside the Main Population*), pari alla % di cellule che non appartengono alla popolazione principale.

Tutti questi valori sono indicativi del grado di denaturazione del DNA.

RISULTATI

Nel citogramma riportato in figura 3 è rappresentata la caratteristica emissione di fluorescenza degli spermatozoi dopo colorazione con AO.

In ascissa è riportata la fluorescenza rossa, corrispondente all'emissione del DNA a singolo filamento, in ordinata la fluorescenza verde corrispondente all'emissione del DNA a doppio filamento.

In grassetto è riportato il *gate* di acquisizione posto sul citogramma per escludere dall'analisi i detriti eventualmente presenti (fluorescenza aspecifica, di bassa intensità).

La distribuzione allungata del segnale di fluorescenza visibile in questo citogramma è tipica delle cellule spermatiche quando analizzate utilizzando un citofluorimetro (quale il nostro) con sorgente di illuminazione ortogonale al flusso cellulare. Poiché i nuclei degli spermatozoi sono asimmetrici e possiedono un elevato indice di rifrazione la fluorescenza rilevata risulta dipendente dall'orientamento di questi quando intercettati dal fascio laser: i vari orientamenti, quindi, producono un segnale allungato, più evidente nel caso della fluorescenza verde (intensità maggiore, quindi elevata dispersione). Poiché il parametro principale di analisi α-t è misurato come rapporto tra fluorescenza rossa e fluorescenza totale (rossa più verde) risulta indipendente dagli effetti dell'orientamento del nucleo (10).

Come si può osservare è presente una popolazione piuttosto omogenea che rappresenta la quasi totalità delle cellule analizzate, insieme a alcune cellule che forniscono segnali di diversa intensità, le quali rappresentano la COMP del campione.

Effetto della denaturazione sulla emissione di fluorescenza degli spermatozoi dopo colorazione con AO: confronto tra seme non denaturato e denaturato

Nella figura 4 è riportato il confronto tra le due distribuzioni di α-t del seme del toro A prima e dopo denaturazione. Il seme di questo toro presenta solo piccole variazioni tra le due emissioni di fluorescenza, come si può notare dal lievissimo aumento di α-t nel seme sottoposto a denaturazione rispetto al non denaturato; gli altri parametri rilevati non mostrano variazioni di rilievo. L'aumento non è ben apprezzabile dal confronto tra le due curve, ma diviene evidente se si confrontano i due citogrammi biparametrici (α-t vs fluorescenza totale), dove la popolazione cellulare dopo denaturazione (figura 5b) risulta spostata rispetto allo stesso campione non denaturato (figura 5a). Sul campione non denaturato (5a) vengono posti due *markers* che definiscono i limiti di α-t: riportando gli stessi *markers* sul citogramma biparametrico relativo allo stesso campione denaturato si osserva un aumento di α-t, il quale è indice di un'aumentata denaturazione della cromatina nucleare.

Nella figura 6 è riportato il confronto tra le due curve di α-t del seme del toro B prima e dopo denaturazione. Anche in questo caso le variazioni rilevate sono estremamente lievi, ma comunque apprezzabili dal confronto dei citogrammi biparametrici (figure 7a e 7b).

Le variazioni delle fluorescenze riscontrate in entrambi i campioni, in seguito alla denaturazione del DNA, confermando quindi l'applicabilità della metodica; in entrambi i casi, comunque, l'analisi indicherebbe un basso grado di denaturabilità della cromatina nucleare, quindi, per estensione, un ottimo grado di fertilità del seme testato, come d'altronde atteso, vista la provata carriera produttiva dei tori testati.

Effetto della presenza di glicerolo (10%) nella soluzione di congelamento

La tabella 1 riporta i valori ottenuti dall'analisi di campioni di seme provenienti da 5 tori diversi, il cui seme è stato congelato sia in TNE sia in TNE-10% glicerolo. Per gli stessi animali vengono inoltre riportati i citogrammi di fluorescenza relativi (figura 8).

Confrontando sia i dati numerici sia i citogrammi di ogni toro si può notare come siano presenti solo lievi variazioni nei valori ottenuti, non costantemente presenti. La differenza massima viene osservata nel toro n° 2, con un valore di COMP che varia dello 0.6 %, ma con valori di Xα-t, SDα-t e CVα-t praticamente identici tra i due campioni.

Inoltre, la nuvola di fluorescenza che si ottiene assume un aspetto unico e tipico per ogni individuo in esame, analogamente a quanto dimostrato nell'uomo da Evenson (9), aspetto che non viene modificato dalla presenza di glicerolo nel *medium* di congelamento; queste peculiarità possono essere osservate confrontando, ad esempio, i citogrammi del toro 1 e del toro 3.

Infine, in tutti i tori, a valori piuttosto bassi di α-t si associano valori altrettanto bassi degli altri parametri considerati, indicando quindi una bassa suscettibilità della cromatina nucleare degli spermatozoi testati alla denaturazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le analisi convenzionali condotte sul seme comprendono tipicamente valutazioni di parametri quali la concentrazione, la motilità, e la percentuale di anomalie morfologiche. Tali valutazioni sono però influenzate dal giudizio soggettivo dell'operatore e richiedono un notevole impegno in termini di tempo. La tecnica SCSA permette di valutare una caratteristica della cellula spermatica quale lo stato di compattamento della cromatina che, al momento, non è testabile con altri metodi, e di ottenere risultati caratterizzati da un errore estremamente piccolo, dato che le misure vengono condotte su un minimo di 5000 cellule. Inoltre, questa tecnica offre alcuni vantaggi sostanziali quali la rapidità, la facilità di esecuzione, la possibilità di impiego su seme bovino congelato utilizzando un citofluorimetro predisposto per analisi di *routine*; l'SCSA, però, richiede un'accurata standardizzazione, soprattutto per quello che riguarda tempi, temperature, concentrazioni reciproche di reagenti e taratura dell'apparecchio con il campione *standard*.

I valori di Xα-t, SDα-t, CVα-t e COMP ottenuti dallo stesso campione sono tra loro correlati, ma vanno considerati tutti attentamente (come dimostrato anche nel toro da Ballachey nel 1987 [2]), poiché ognuno di essi fornisce una indicazione diversa sull'eventuale anormalità del campione analizzato. Ad esempio, la COMP

quantifica la percentuale di cellule con difetti nella cromatina, ma non è in grado di fornire informazioni sull'estensione delle anormalità in queste cellule. La SDα-t, invece, è influenzata da molti fattori quali il grado di denaturazione delle cellule e l'uniformità o meno della popolazione: questo valore appare quindi maggiormente correlato alla fertilità rispetto alla COMP, quando le anomalie nel campione non siano estremamente evidenti.

I tori da noi testati sono tori provati utilizzati in F.A., pertanto si può ipotizzare che il livello di fertilità di questi animali sia buono: questo spiegherebbe i bassi livelli di denaturabilità della cromatina da noi rilevati, anche se l'effetto della denaturazione è comunque sempre visibile. Per quanto riguarda l'influenza del glicerolo presente nella soluzione di congelamento sulla denaturabilità del DNA, non abbiamo rilevato differenze significative tra i vari campioni testati. Pur essendo queste prove preliminari, questi dati fanno ipotizzare l'applicabilità di tale tecnica, in associazione con le altre valutazioni condotte di *routine*, anche al materiale seminale normalmente congelato presso i centri tori.

Un ringraziamento particolare al Prof. Marcello Spanò, dell'Ente Nazionale per le Energie Alternative (ENEA) di Roma, per gli indispensabili suggerimenti.

Tabella 1 - Effetto della presenza di glicerolo (10%) nella soluzione di congelamento: risultati delle analisi dei diversi campioni di seme.

Campione	Picco (moda)	Xα-t	SDα-t	CVα-t	COMP
Toro 1 TNE	70	72,61	4,17	5,75	0,57
Toro 1 TNE-gly	70,3	72,64	4,35	5,99	0,77
Toro 2 TNE	70	71,56	3,58	5,00	1,54
Toro 2 TNE-gly	69	71,85	3,87	5,39	0,94
Toro 3 TNE	76	77,91	4,34	5,57	0,28
Toro 3 TNE-gly	75	76,82	4,68	6,09	0,49
Toro 4 TNE	67	69,33	4,48	6,46	0,46
Toro 4 TNE-gly	68	70,01	4,44	6,34	0,42
Toro 5 TNE	70	71,61	4,05	5,65	0,56
Toro 5 TNE-gly	70	71,77	3,96	5,52	0,36

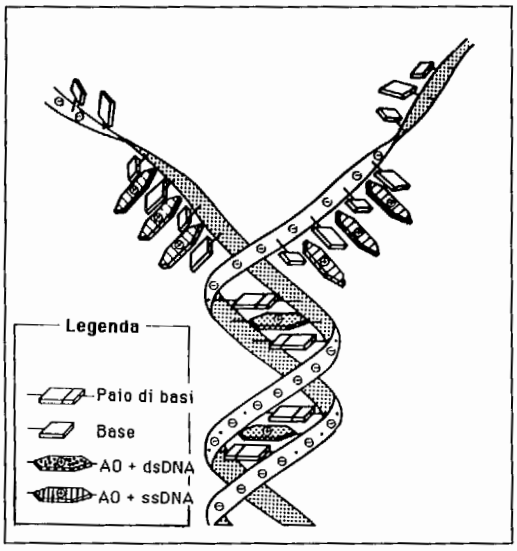


Figura 1 - Rappresentazione schematica del legame dell'arancio di acridina agli acidi nucleici. Da Darzynkiewicz Z., Kapuscinski J., modificata (4).

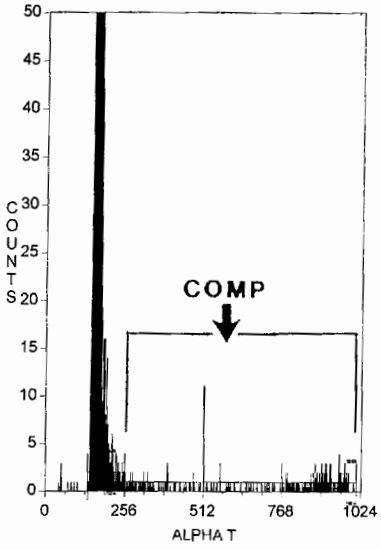


Figura 2 - Distribuzione dei valori di α-t nella popolazione analizzata; in ascissa, valori di α-t, in ordinata numero delle cellule. COMP: *Cells Outside the Main Population*.

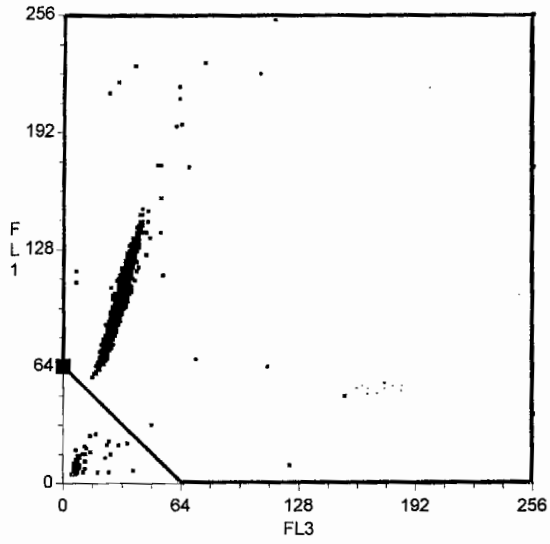


Figura 3 - Citogramma di acquisizione (fluorescenza) dei campioni di spermatozoi colorati con arancio di acridina. In grassetto è riportato il *gate* di acquisizione.

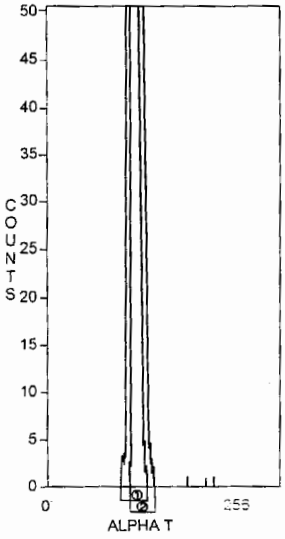


Figura 4 - Confronto tra le due distribuzioni di α-t del seme del toro A; in ascissa è riportata la distribuzione dei valori di α-t, in ordinata il numero relativo delle cellule. 1 popolazione principale del campione non denaturato, 2 popolazione principale del campione denaturato.

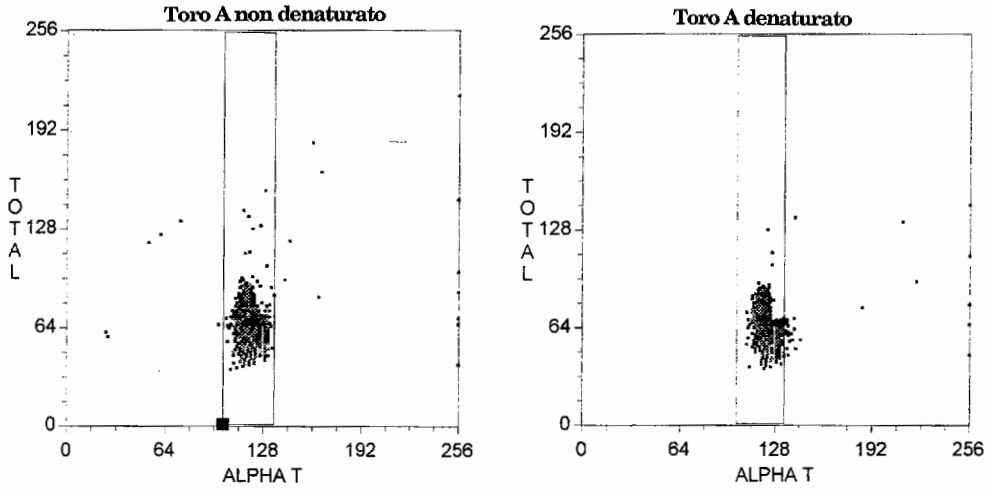


Figura 5 - Citogrammi biparametrici (α-t vs fluorescenza totale) ottenuti dall'analisi del seme del toro A, prima (5a) e dopo (5b) denaturazione.

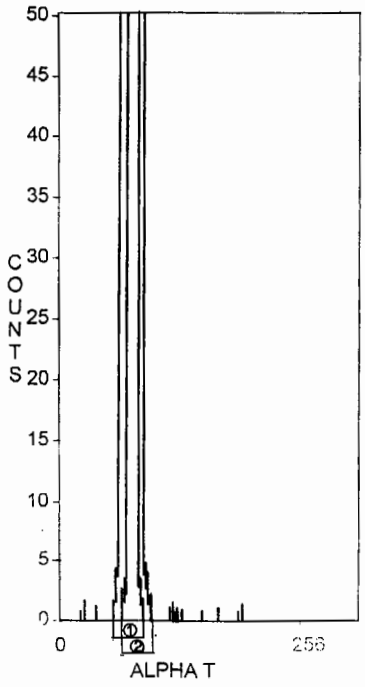


Figura 6 - Confronto tra le due distribuzioni di α-t del seme del toro B; in ascissa è riportata la distribuzione dei valori di α-t, in ordinata il numero relativo delle cellule. 1 popolazione principale del campione non denaturato, 2 popolazione principale del campione denaturato.

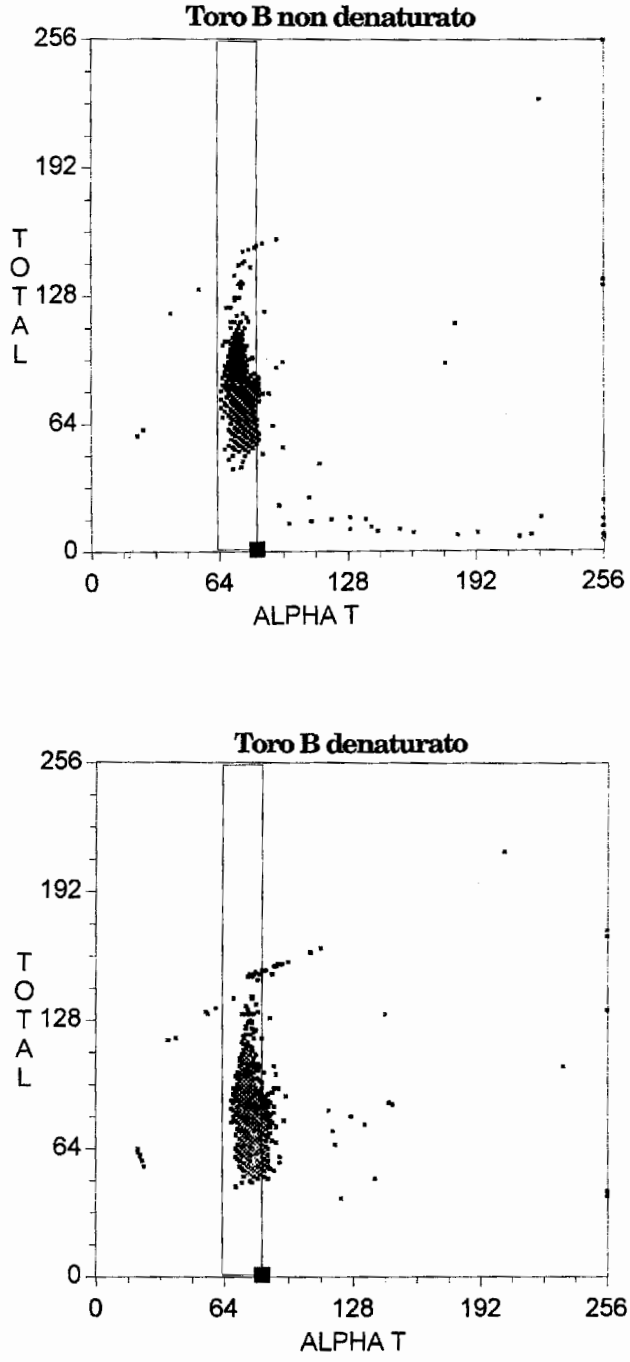


Figura 7 - Citogrammi biparametrici (α-t vs fluorescenza totale) ottenuti dall'analisi del seme del toro B, prima (7a) e dopo (7b) denaturazione.

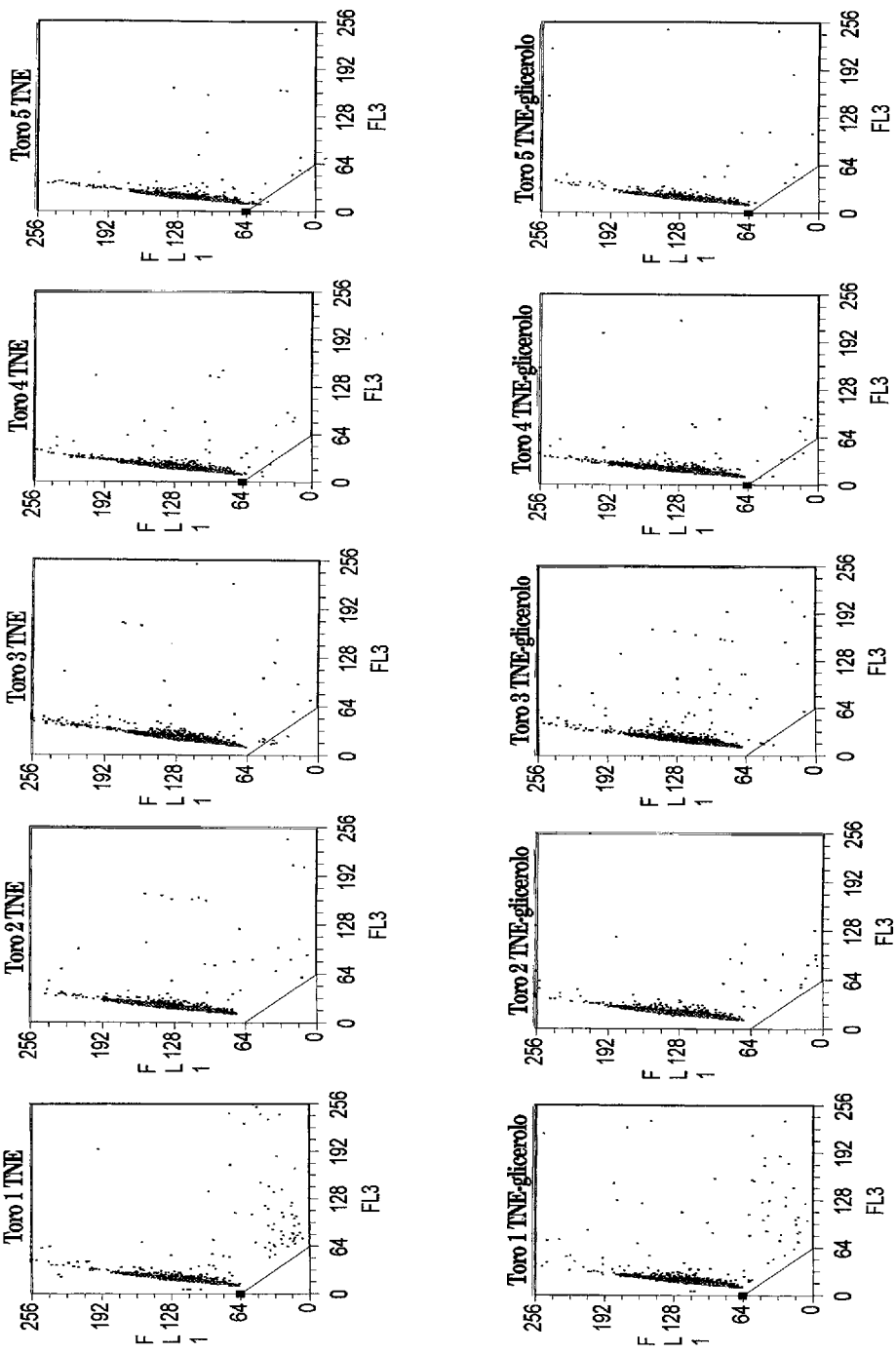


Figura 8 - Citogrammi di fluorescenza dei tori testati per verificare l'eventuale influenza del glicerolo nella soluzione di congelamento.

BIBLIOGRAFIA

1) BALLACHEY B.E., EVENSON D.P., SAACKE R.G. (1988) *The Sperm Chromatin Structure Assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.* J. Androl. *9*, 109-115.

2) BALLACHEY B.E., HOHENBOKEN W.D., EVENSON D.P. (1987) *Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.* Biol. Reprod. *36*, 915-925.

3) BALLACHEY B.E., MILLER H.L., JOST L.K., EVENSON D.P. (1986) *Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol.* J. Anim. Sci. *63*, 995-1004.

4) DARZYNKIEWICZ Z., KAPUSCINSKI J. (1991). *Acridine orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents.* In: flow cytometry and cell sorting. Eds. M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L. Mendelsohn. Wiley-Liss Inc., New York, 291- 341.

5) DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., SHARPLESS T., MELAMED M.R. (1986) *Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorimetry.* Exp. Cell. Res. *90*, 411-428.

6) EVENSON D.P. (1990) *Flow cytometric analysis of male germ cell quality.* In: Methods in Cell Biology, Vol 33, Eds. Z. Darzynkiewicz and H.A. Crissman, Academic Press, San Diego, CA, 401-410.

7) EVENSON D.P., BAER R.K., JOST L.K., GESCH R.W. (1986) *Toxicity of thiotepa on mouse spermatogenesis as determined by dual parameter flow cytometry.* Toxicol. Appl. Farmacol. *82*, 151-163.

8) EVENSON D.P., DARZYNKIEWICZ Z., MELAMED M.R. (1980) *Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.* Science *240*, 1131-1133.

9) EVENSON D.P., JOST L.K., BAER R.K., TURNER T.V., SCHRADER S.M. (1991) *Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay.* Reprod. Toxicol. *5*, 115-125.

10) GLEDHILL B.L., EVENSON D.P., PINKEL D. (1991) *Flow cytometry and sorting of sperm and male germ cells. In: Flow cytometry and cell sorting.* Eds. M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L. Mendelsohn. Wiley-Liss Inc., New York, 531-552.

11) MONESI V. (1971). *Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis.* J. Reprod. Fertil. *13* (Suppl.), 1-14.

12) SPAN O' M., EVENSON D.P. (1993) *Flow cytometric analysis for reproductive biology.* Biol. Cell. *78*, 53-62.

IV SESSIONE

BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA ZOOTECNIA

Moderatori
V. Barbieri - G. Rognoni

L. FERRETTI, P. LEONE, Y. ZHANG, L. REDAELLI[1], S. COMINCINI, F. PILLA[2], T. GLIOZZI, B. CASTIGLIONI, A. MEZZELANI, G. PAGNACCO[3], G. ROGNONI[3]

APPLICAZIONE DEI MARCATORI MOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI BOVINI

Istituto per la Difesa e la Valorizzazione del Germoplasma Animale - CNR - via Celoria 10, 20133 Milano,
[1] Dipartimento di Genetica e Microbiologia - Facoltà di Scienze Biologiche - via Abbiategrasso 207, 27100 Pavia,
[2] Dipartimento di Scienze Animali Vegetali ed Ambientali - Università del Molise, Campobasso,
[3] Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

Come gruppo partecipante al Progetto CEE di mappaggio del genoma bovino (BOVMAP) abbiamo concentrato la nostra attenzione sull'isolamento di marcatori polimorfici, precisamente i microsatelliti. Negli ultimi dodici mesi abbiamo isolato e caratterizzato 35 cosmidi contenenti microsatelliti (AC)n mediante 1) sequenza della regione polimorfica direttamente sui cosmidi; 2) localizzazione fisica delle sonde mediante ibridazione *in situ* (FISH) a cromosomi bovini; 3) caratterizzazione del polimorfismo associato ad ogni microsatellite.

Alcuni dei marcatori isolati hanno permesso di completare l'assegnazione dei gruppi di sintenia bovini a specifici cromosomi.

L'utilizzo di un sistema digitalizzato per l'acquisizione delle immagini al microscopio ci consente di localizzare mediante FISH più di 50 microsatelliti in un anno.

Abbiamo cominciato ad applicare i microsatelliti polimorfici alla tipizzazione di una popolazione di meticci Piemontese x Chianina. Il nostro primo obbiettivo è confrontare i risultati della selezione basata sulla valutazione delle caratteristiche fenotipiche e produttive con i dati dell'analisi genetica molecolare.

Parole chiave: genoma bovino - microsatelliti - mappa fisica - FISH (*Fluorescence In situ Hybridisation*) - nuovi tipi genetici.

APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS TO THE GENETIC CHARACTERIZATION OF BOVINES

SUMMARY

As a parteicipating group to the EEC-funded Bovine Genome Mapping programme (BOVMAP), we have focused our activity on the isolation of highly polymor-

Lavoro eseguito con un contributo del CNR, nell'ambito del PF RAISA, sottoprogetto 3. Pubblicazione n°. 1646.

phic microsatellite markers. In the last 12 months we have characterised more than 30 cosmids containing (AC)n microsatellites by means of 1) the direct sequencing of the polymorphic region on cosmids; 2) the physical mapping of the probes by in situ hybridisation to bovine chromosomes (FISH); 3) the description of the polymorphism associated to the microsatellite.

Some of the isolated markers allowed us to complete the assignment of the bovine synteny groups to specific chromosomes.

The use of a computer controlled CCD camera to record images from the microscope will allow us to analyzse by FISH at least 50 microsatellite clones per year.

We have started a project aimed at typing with our microsatellites a population of animals that were obtained from a cross of Piemontese bulls with Chianina females. Our first goal is to make a confrontation between the results of the selection based on the evaluation of the phenotypic traits and the results of the genetic typing.

Key words: bovine genome - microsatellites - physical Map - FISH (Fluorescence In situ Hybridisation) - New Genetic Types.

INTRODUZIONE

Recentemente sono stati pubblicati alcuni lavori che riassumono lo stato attuale della mappa genetica bovina e la costruzione della prima mappa di *linkage* (1, 2, 4). In questo modo è segnata la via che in breve tempo porterà al sistematico isolamento dei geni che influenzano le caratteristiche produttive sia in senso qualitativo che, soprattutto, quantitativo. È noto infatti che una mappa genetica è il presupposto irrinunciabile per qualsivoglia indagine su di un genoma. Ancor più vero nel caso della specie bovina e delle specie di animali d'allevamento in genere, dove gli interessi economici in campo hanno «orientato» la elaborazione di mappe genetiche verso l'utilizzo di marcatori (i microsatelliti) e di strategie di mappaggio particolarmente adatte alla ricerca della base genetica dei cosiddetti QTLs (*Quantitative Trait Loci*).

Per la verità alcuni QTLs erano stati già isolati (6, 7), ma in quel caso la mappa genetica sfruttata non era pubblica, bensì di proprietà di una ditta, la GenMark Inc., e soggetta a brevetto. Al contrario le mappe recentemente pubblicate sono di pubblico dominio, cioè a disposizione di tutta la comunità scientifica.

In questo contesto il progetto di costruzione di una mappa del genoma bovino finanziato dalla CEE, il cosiddetto BOVMAP, giunge con un certo ritardo. D'altra parte, come per il progetto Genoma Umano, sarà necessario lavorare intensamente alla mappa di *linkage* prodotta per renderla più valida e informativa, per colmarne le lacune e gli inevitabili «buchi» (4). Il solo pericolo che rimane da scongiurare, e non è cosa da poco, è che le energie in campo siano sprecate nella produzione di più mappe genetiche (ottenute cioé utilizzando famiglie di riferimento diverse). È positivo perciò che il gruppo del BOVMAP e gli altri attivi nel mondo sul mappaggio del genoma bovino (in Australia e negli Stati Uniti soprattutto) abbiano deciso di costituire un pannello di famiglie comune, detto IBRP (*International Bovine Reference Panel*). Quando tutti gli animali dell'IBRP saranno stati tipizzati con tutti i marcatori esistenti si avrà a disposizione una sola, quindi estremamente utile, mappa del genoma bovino.

Parte essenziale del completamento-miglioramento della mappa sarà la disponibilità di marcatori polimorfici localizzati fisicamente sui cromosomi: i microsatelliti, essendo degli STS (*Sequence Tagged Sites*) altamente polimorfici si prestano particolarmente bene a tale impiego. Gli STS mappati sui cromosomi serviranno tra l'altro a orientare gruppi di *linkage* per i quali l'ordine dei marcatori rispetto ai centromeri/telomeri non è noto. Inoltre saranno il punto di partenza per la ricerca di geni identificati mediante *linkage* sulla mappa. Infine, la conservazione evolutiva di una buona frazione di microsatelliti ne consentirà l'uso in specie affini (per es. pecora e maiale).

Il mappaggio fisico dei microsatelliti è il nostro contributo allo sviluppo della mappa genetica bovina. Negli ultimi 12 mesi abbiamo isolato e caratterizzato più di trenta cosmidi contenenti microsatelliti (AC)n da una genoteca in SuperCos1 (Wigger e Fries, dati non pubblicati). I microsatelliti sono stati caratterizzati mediante 1) sequenza della regione polimorfica direttamente sui cosmidi; 2) localizzaione fisica delle sonde mediante ibridazione *in situ* (FISH) a cromosomi bovini; 3) caratterizzazione del polimorfismo associato ad ogni microsatellite.

In questo lavoro presentiamo anche dati preliminari sulla applicazione dei microsatelliti da noi isolati alla tipizzazione di una popolazione di meticci Piemontese x Chianina.

MATERIALI E METODI

Caratterizzazione di microsatelliti

Per l'isolamento dei microsatelliti (AC)n e per la sequenza direttamente sui cosmidi si veda Ferretti *et al.* (3).

Ibridazione in situ di cosmidi contenenti microsatelliti

La procedura è descritta in dettaglio in Solinas-Toldo *et al.* (9). In sintesi, ogni cosmide viene marcato mediante *nick translation* con biotina 16-dUTP; l'efficenza della marcatura viene testata mediante *dot blot assay*. Allo scopo di eliminare elementi ripetitivi dalla sonda, questa si riassocia, prima della ibridazione *in situ*, con un eccesso di DNA bovino sonicato non biotinilato (CISS, *Chromosomal In situ Suppression*). Dopo la CISS, la sonda è concentrata per precipitazione in etanolo, risospesa nel tampone di ibridazione, denaturata e deposta in quantità opportuna sui preparati cromosomici. L'ibridazione *in situ* viene quindi effettuata incubando i campioni *overnight* a 37°C.

I suddetti preparati, ottenuti da fibroblasti bovini, erano stati precedentemente bandeggiati con mostarda di quinacrina (bandeggio QFQ) e fotografati al microscopio a fluorescenza. In seguito alla ibridazione la sonda viene visualizzata in tre passaggi successivi: nel primo i vetrini vengono incubati con avidina-fluorescinata, nel secondo con un anticorpo anti-avidina biotinilato e nel terzo ancora con avidina fluoresceinata. Dopo una controcolorazione con propidio ioduro, le mitosi vengono fotografate nuovamente. I nostri dati e le figure del testo sono state ottenute con un sistema di analisi d'immagine digitale, composto da un microscopio Leitz equipaggiato con una telecamera CCD (Photometrics, Tucson, AZ), controllata da un *computer* Macintosh Quadra 950.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dell'immagine (pulitura del fondo, pseudocolorazione e sovrapposizione) sono stati usati rispettivamente i *softwares* «IPLab Spectrum» e «Gene Join». Dopo aver localizzato la sonda si procede, sempre con «IPLab Spectrum», alla sua assegnazione ad una specifica banda cromosomica (FLcen) (9): su almeno 10 cromosomi si misura la lunghezza del cromosoma recante il segnale e la distanza di quest'ultimo dal centromero. Le misure vengono poi rapportate alla lunghezza dei cromosomi dell'idiogramma ISCNDA (1989) e dalla media di questi valori si attribuisce la sonda ad una banda specifica del cromosoma.

RISULTATI

Studio di microsatelliti

Una genoteca di cosmidi bovini in SuperCos1 é stata sondata con l'oligonucleotide (TG)8 o con il copolimero poli[d(AC):d(TG)]. I cloni positivi sono stati controllati per la assenza di DNA satellite e quindi sequenziati nella regione della ripetizione (AC)n.

Per valutare il livello di polimorfismo associato ad ogni microsatellite, primers fiancheggianti la regione (AC)n sono stati sintetizzati ed usati per amplificare il DNA di bovini di razza Chianina, Maremmana, Frisona, Piemontese, Valdostana (complessivamente da 15 a 40 animali). I prodotti di PCR, ottenuti in presenza di [a^{32} P]-dCTP o [a^{35} S]-dATP, sono stati separati su gel denaturante (7% acrilamide - 7M urea) per visualizzare i diversi alleli presenti al *locus*.

Ogni marcatore è stato quindi studiato in due famiglie di mezze sorelle di razza Normanda, per verificare la corretta segregazione Mendeliana degli alleli. Un esempio tipico di caratterizzazione di un microsatellite è illustrato dalla figura 1.

Per ogni microsatellite sono stati elaborati i dati relativi al numero di alleli osservati, ai genotipi riscontrati e, di conseguenza, é stato calcolato un valore approssimativo del P.I.C. (*Polymorphism Information Content*). Un quadro riassuntivo dei marcatori da noi studiati é sintetizzato dalla tabella 1.

Mappaggio fisico di microsatelliti mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH)

Tutti i microsatelliti studiati per il polimorfismo, sono stati isolati da cosmidi per i quali é stato effettuato il mappaggio fisico mediante FISH (vedi Materiali e Metodi). Il numero complessivo di cosmidi da noi localizzati sui cromosomi finora è di 35, si veda per i dettagli la tabella 1.

Le 35 sonde identificano 17 dei 31 cromosomi bovini, 9 dei quali hanno almeno due microsatelliti. Abbiamo notato anche una frequenza inaspettatamente elevata di sonde sul cromosoma 19. Sette dei cosmidi mappano su tale cromosoma. Altri gruppi hanno avuto risultati analoghi, così che i microsatelliti localizzati sul 19 sono già almeno 14. È probabile che il 19 sarà tra i primi cromosomi bovini ad avere una mappa sia fisica che di *linkage* di marcatori microsatelliti.

Due esempi di ibridazione *in situ* sono mostrati in figura 2. In *A*, la sonda IDVGA-41 è assegnata al cromosoma 12 banda q15 (12q15); in *B* quattro sonde sono state co-ibridate al cromosoma 19, precisamente IDVGA-42, -44, -46 e -47 che sono assegnate rispettivamente a 19q15, 19-q22, 19-q16 e 19-q17.

Assegnazione dei gruppi di sintenia U7 e U27 ai cromosomi 25 e 12

I cosmidi contenenti i microsatelliti IDVGA-7 e IDVGA-41 sono stati localizzati rispettivamente su 25q24 e 12q15. Poichè i cromosomi 12, 25 e 27 erano gli unici non ancora associati ai gruppi di sintenia U7, U27 e U14, abbiamo derivato dei primers per amplificare la regione microsatellite di IDVGA-7 e IDVGA-41 in un pannello di ibridi cellulari bovino-criceto. I risultati della analisi degli ibridi mediante PCR, svolta in collaborazione con G. Guerin (INRA), hanno dimostrato che U7 corrisponde al cromosoma 25 e U27 al 12 (8). La figura 2A mostra l'ibridazione mediante FISH di IDVGA-41.

Questi risultati hanno inoltre consentito di assegnare indirettamente l'ultimo gruppo di sintenia, U14, all'unico cromosoma rimasto sprovvisto, cioè il 27. In questo modo l'attribuzione dei gruppi di sintenia ai singoli cromosmomi é finalmente completa.

Applicazioni zootecniche dei microsatelliti

Abbiamo iniziato lo studio di una popolazione di meticci Chianina x Piemontese in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per la Zootecnia (Tormancina, Roma). La popolazione é stata ottenuta incrociando 6 tori di razza Piemontese con 43 vacche di razza Chianina. A tutt'oggi la F1 conta 79 animali, cho sono stati in parte re-incrociati per produrre una F2 stimata in 150 individui (attualmente disponibili 37). Finora abbiamo effettuato la tipizzazione di tutti i parentali con 15 microsatelliti (tabella 2). Il nostro primo obbiettivo è estendere l'analisi a tutti i microsatelliti in nostro possesso, e forse ad altri pubblicati nella recente mappa di *linkage* del bovino, qualora fossero particolarmente utili. In seguito l'analisi sarà estesa agli animali della F1 ed F2.

DISCUSSIONE

Questo lavoro descrive l'isolamento e l'identificazione di marcatori genetici altamente polimorfici, i microsatelliti, nel genoma bovino. Questi marcatori sono tutti derivati da cosmidi e mappati sui cromosomi bovini mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH).

Lo stadio attuale della mappa genetica bovina è abbastanza incompleto, anche se ci sono tutte le premesse per un rapido sviluppo e miglioramento. Al contrario, poco si è fatto nella direzione del mappaggio fisico, soprattutto a causa delle difficoltà che il cariotipo bovino pone agli studiosi, e alla non disponibilità di genoteche di inserti bovini in cromosomi artificiali di lievito (YAC).

Disporre di marcatori di tipo II, quali i microsatelliti localizzati sui cromosomi, rappresenta un contributo importante per «sovrapporre» la mappa genetica e quella fisica (2, 4). Inoltre gli STS, come i microsatelliti, sono i siti di ancoraggio sul genoma dai quali partirà la ricerca dei geni associati a caratteri di interesse zootecnico.

Finora abbiamo isolato e mappato con la FISH 35 microsatelliti derivati da cosmidi. La loro tipizzazione genetica sul pannello di famiglie del BOVMAP (progetto CEE di mappaggio del genoma bovino) é avviata e in futuro avremo a disposizione i dati di *linkage* e la posizione sulla mappa genetica.

L'utilità delle mappe di *linkage* realizzate con i microsatelliti nella ricerca di loci con un effetto sulle caratteristiche produttive è stata recentemente dimostrata dalla identificazione di vari QTL (6, 7). Nel nostro caso, l'analisi molecolare con i microsatelliti della popolazione di meticci Piemontese x Chianina potrebbe portare alla scoperta di marcatori associati a qualcuna delle caratteristiche produttive che più probabilmente segregheranno nella popolazione (la «doppia groppa» per fare un solo esempio).

Indipendentemente da questo, il nostro interesse deriva anche dalla possibilità di confrontare i risultati del meticciamento, effettuato finora secondo i metodi di selezione standard, con i dati che scaturiranno dalla tipizzazione genetica degli animali, sia quelli scelti per generare la F2 che quelli scartati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia particolarmente il Prof. G. Poli coordinatore del Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche (VIII ciclo) per aver consentito lo stage della Dott.ssa Mezzelani presso il laboratorio del Dr. R. Fries di Zurigo. Un ringraziamento a R. Fries e a S. Solinas-Toldo per la preziosa collaborazione sulla FISH di parte dei cosmidi descritti. Si ringraziano inoltre H. Leveziel e G. Guerin dell'INRA per i DNA delle vacche di razza Normanda e per la assegnazione dei gruppi di sintenia su ibridi somatici. Si ringraziano il Prof. Pilla e i Dr. F. Napolitano e B. Moioli dell'Istituto Sperimentale per la Zootecnia per la collaborazione prestata e per la preparazione dei DNA.

Tabella 1 - Analisi di cosmidi bovini contenenti microsatelliti (AC)n.

Sonda (Cosmide)	Simbolo Locus	Localizz. Cromos.	Gruppo di sintenia	(AC)n	Prod. PCR (bp)	Numero di alleli	P.I.C./ /Heter.
IDVGA-2	D2S7	2q45	17	10	132	7	0.616/0.653
IDVGA-2	D25S8	25q15	7	ness. micros.	-	-	-
IDVGA-3	D11S27	11	16	11	158	8	0.693/0.731
IDVGA-7	D25S2	25q24	7	9	195	6	0.641/0.669
IDVGA-8	D28S10	28	29	19	224	5	0.643/0.699
IDVGA-9	D5S27	5	3	11	203	2	0.239/0.278
IDVGA-10	D15S13	15	19	23	190	10	0.844/0.860
IDVGA-11	-	8	18	19	231	6	0.720/0.760
IDVGA-27	D3S24	3q37	6	9	138	3	0.552/0.629
IDVGA-28	D15S14	15q25	19	7	183	1	N.D.
IDVGA-29	D28S12	28q13	29	22	149	5	0.602/0.649
IDVGA-30	D21S23	21q23	4	40	240	19	0.897/0.904
IDVGA-31	D18S10	18q12/q13	9	23	214	10	0.759/0.782
IDVGA-32	-	15q25	19	15	205	7	0.766/0.791
IDVGA-35	D3S25	3q35	6	(AC)6GC(AC)19	233	11	0.840/0.856
IDVGA-37	D2S19	2q45	17	(AC)17....(AC)6	210	5	0.475/0.527
IDVGA-38	D17S20	17q23	23	ness. microsat.	-	-	-
IDVGA-39	D21S24	21q23	4	17	191	6	0.479/0.512
IDVGA-40	-	17q23	23	16	240	8	0.752/0.782
IDVGA-41	D12S16	12q15	12	7	170	2	0.137/0.144
IDVGA-42	D19S16	19q15	21	7	142	1	N.D.
IDVGA-44	D19S17	19q22	21	19	211	7	0.639/0.688
IDVGA-46	D19S18	19q16	21	11	205	7	0.600/0.660
IDVGA-47	D19S19	19q17	21	7	159	1	N.D.
IDVGA-45	D21S25	21q15	4	22	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-43	D28S10	28q17	29	14	171	3	0.492/0.552
IDVGA-48	-	19q21	21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-49	D16S21	16q17	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-50	-	Y	Y	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-51		N.D.	N.D.	11	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-52	-	8q23	18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-53	-	3q21	6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-54	-	19q17	21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-55		18	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-56		3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-57		12q13	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-58		19q15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-59		26q22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-60		15q21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-61		6q32	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-62		7q15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-63		11q24/25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IDVGA-64		2q44	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Tabella 2 - Meticciamento Piemontese x Chianina (PD x CH). Analisi dei parentali con microsatelliti.

Microsatellite	n° alleli totali	n° alleli tori (PD)	padri eterozigoti	n° alleli vacche (CH)
IDVGA-2	8	4	67%	7
IDVGA-3	13	5	83%	13
IDVGA-7	5	5	67%	5
IDVGA-8	7	5	67%	5
IDVGA-9	2	2	17%	2
IDVGA-11	9	5	83%	7
IDVGA-27	3	3	67%	3
IDVGA-29	8	3	67%	8
IDVGA-32	6	6	83%	6
IDVGA-37	8	2	67%	8
IDVGA-39	7	4	83%	6
IDVGA-40	8	4	33%	7
IDVGA-43	6	2	17%	6
IDVGA-44	6	4	50%	5
IDVGA-46	3	2	50%	3

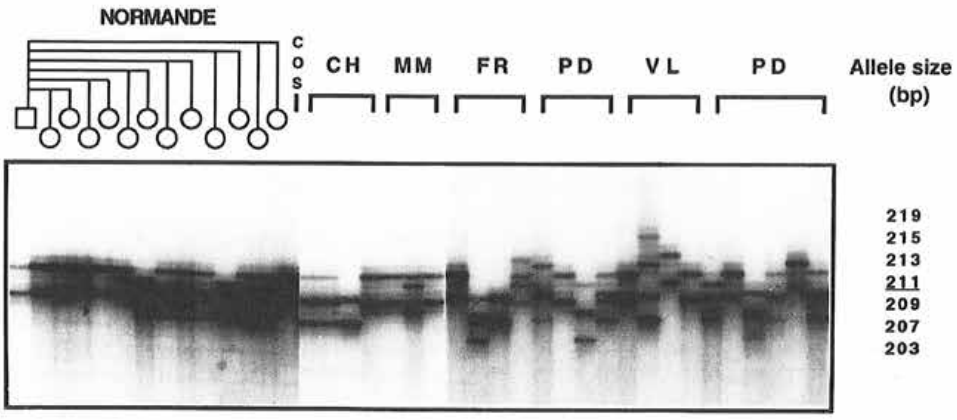


Figura 1 - Analisi del microsatellite IDVGA-44
La figura mostra la autoradiografia di un gel di sequenza sul quale sono stati separati i prodotti di PCR della regione del microsatellite ottenuti in un gruppo di bovini di cinque razze diverse: *CH*, Chianina; *FR*, Frisona; *MM*, Maremmana; *PD*, Piemontese; *VL*, Valdostana. *NORMANDE* evidenzia l'analisi della segregazione di IDVGA-44 in una famiglia di mezze sorelle di razza normanda. *Cos* indica il prodotto di IDVGA-44 amplificato dal cosmide corrispondente. A destra sono indicate, in nucleotidi, le dimensioni degli alleli evidenziati; l'allele sequenziato sul cosmide IDVGA-44 è sottolineato.

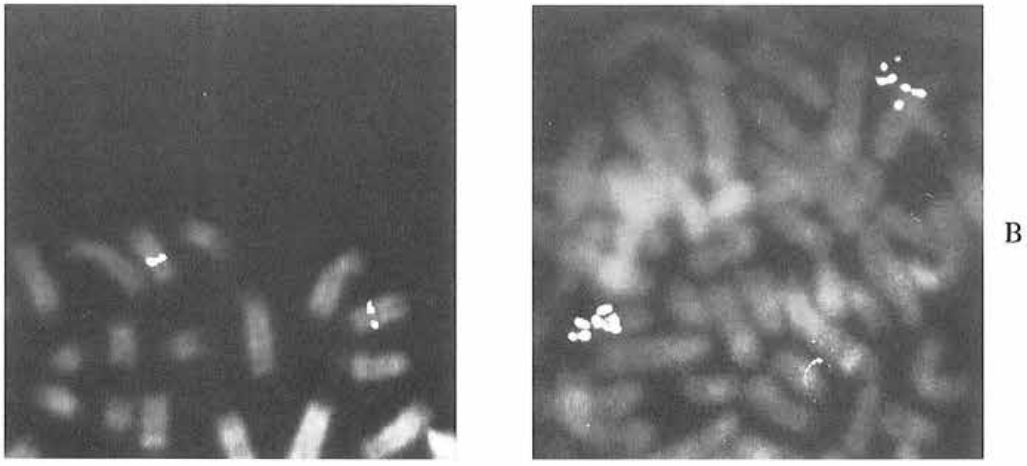


Figura 2 - Localizzazione cromosomica di microsatelliti mediante ibridazione *in situ* a fluorescenza (FISH). *A)* IDVGA-41 su 12q15; *B)* IDVGA-42, -44, -46 e -47 sono localizzate rispettivamente a 19q15, 19q22, 19q16 e 19q17. Si noti la presenza del segnale corrispondente alle sonde direttamente sui cromosomi bandeggiati (bandeggio QFQ), ottenuta con la sovrapposizione al *computer* delle rispettive immagini acquisite prima e dopo l'ibridazione *in situ*.

BIBLIOGRAFIA

1) W. BARENDSE et al. (1994) *A genetic linkage map of the bovine genome.* Nature Genetics *6*, 227-235.

2) M.D. BISHOP et al. (1994) *A genetic linkage map for cattle.* Genetics *136*, 619-639.

3) L. FERRETTI et al. (1994) *Direct characterization of bovine microsatellites from cosmids: polymorphism and synteny mapping.* Animal Genetics *25*, in corso di stampa.

4) R. FRIES (1993) *Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy.* Animal Genetics *24*, 111-116.

5) R. FRIES, A. EGGEN, J.E. WOMACK (1993) *The bovine Genome map.* Mammalian Genome *4*, 405-428.

6) M. GEORGES ET AL. (1993a) *Microsatellite mapping of the gene causing Weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA *90*, 1058-1062.

7) M. GEORGES ET AL. (1993b) *Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in Bos taurus.* Nature Genetics *4*, 206-210.

8) A.MEZZELANI ET AL. (1994) *Mapping of syntenic groups U7 and U27 to bovine chromosomes 25 and 12, respectively.* Mamm. Genome, in corso di stampa.

9) S. SOLINAS-TOLDO et al. (1993) *Physically mapped cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes.* Mamm. Genome, in corso di stampa.

I. CAPPUCCIO, A. VALENTINI, M. BAGLIACCA*

FONTI ALTERNATIVE DI DNA PER EVIDENZIARE POLIMORFISMI RAPD IN SPECIE DI INTERESSE ZOOTECNICO

Università della Tuscia, Istituto di Zootecnia, Viterbo e
*Università di Pisa, Dip. Scienze Anat., Fisiol. e Prod Anim., Pisa

RIASSUNTO

I polimorfismi del DNA possono essere messi in evidenza con diverse tecniche, quali RFLP, VNTR, PCR di geni polimorfici, sequenziamento ecc. Recentemente è stata messa a punto una tecnica molto rapida per l'analisi dei polimorfismi chiamata RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), che è stata utilizzata da diversi Autori per stimare distanze genetiche, filogenesi e variabilità genetiche in numerosi organismi. La tecnica si basa sulla amplificazione con PCR di DNA genomico utilizzando come *primer* un singolo nucleotide di 10 basi. Poiché l'*annealing* del *primer* avviene a bassa stringenza, particolare cura deve essere posta nella messa a punto delle condizioni sperimentali che diano risultati riproducibili. Ad oggi la tecnica è stata utilizzata negli animali di interesse zootecnico su DNA ottenuto da linfociti di sangue periferico. È interessante poter applicare la tecnica RAPD a specie e popolazioni di diverse provenienze, ma spesso risulta difficoltoso spedire sangue o cellule nucleate al centro di analisi, quando non sia possibile effettuare l'estrazione di DNA sul posto. Abbiamo voluto allora provare diverse fonti di DNA, facilmente trasportabili, che dessero con la tecnica RAPD le stesse risposte ottenute con DNA estratto con i procedimenti classici. Abbiamo utilizzato unghioni e pelo per bovini e penne per fagiani. Le condizioni sperimentali che hanno consentito di massimizzare la ripetibilità dei profili RAPD sono state una polverizzazione fine dei materiali con azoto liquido e digestione con Proteinasi K a temperatura di 56°C limitata nel tempo. In questo modo i profili RAPD sono risultati indipendenti dalla fonte di DNA impiegata almeno per le bande di maggiore intensità.

Parole chiave: DNA - RAPD - estrazione - polimorfismo.

ALTERNATIVE DNA SOURCES TO DETECT RAPD POLYMORPHISMS IN SPECIES FOR ANIMAL PRODUCTION

SUMMARY

The DNA's polymorphism can be detected by different techniques as RFLP, VNTR, PCR of specific genes, DNA sequencing and others. Recently a fast technique has

Lavoro effettuato con contributi CNR RAISA e 93.02576.CT06

been introduced to reveal polymorphisms called RAPD (random amplified polymorphic DNA). Many researchers have employed this technique to determine genetic distances and variability in several species or for phylogenetic studies.

The technique is based on PCR amplification of genomic DNA, using a single random 10-mer primer. The assessment of the experimental parameters is of primary importance to obtain reproducible results. Actually the mammalian genomic DNA used as template in the PCR is extracted from periferic blood lymphocites. The possibility to apply the RAPD technique to worldwide populations can be limited by problems of expedition of blood or nucleate cells to the analysis centre, when the DNA extraction is not feasible in place. We have experimented the possibility to obtain genomic DNA from different sources, easy to store, but still able to produce the same RAPD results as the DNA obtained by traditional methods. We have used genomic DNA extracted from fingernail and hair of cattle and from feathers of pheasant. The experimental conditions that maximized the repeatibility of RAPD analysis were a fine grinding of the materials by liquid nitrogen and a short incubation with K proteinase at 56°C. In this way the RAPD profiles resulted independent from the DNA source at least for the stronger bands.

Key words: DNA - RAPD - extraction - polymorphism.

INTRODUZIONE

L'analisi della variabilità genetica presente nelle popolazioni naturali o sottoposte a selezione è stata condotta in passato sulla base di una valutazione dei caratteri fenotipici presentati dagli individui o delle prestazioni delle loro progenie. L'introduzione dei marcatori molecolari, in grado di rilevare la variabilità presente direttamente a livello del DNA, rappresenta un notevole progresso verso la caratterizzazione del patrimonio genetico. Nei programmi di selezione la possibilità di stabilire il grado di parentela fra gli individui rappresenta un utile parametro per valutare gli effetti della selezione mentre una più accurata analisi del genoma può rappresentare la base per l'individuazione dei soggetti da introdurre in tali programmi. Il metodo più diffuso di caratterizzazione del genoma è quello basato sugli RFLP. Esso utilizza il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione generati da appropriati enzimi come base per la determinazione della variabilità e per la creazione di mappe genetiche. La carenza di polimorfismo evidenziabile nel caso di individui strettamente imparentati fra loro, quali quelli appartenenti a popolazioni sottoposte a selezione spinta, rende difficoltosa la creazione di tali mappe mediante RFLP. In seguito alla introduzione della PCR (5) sono stati creati dei metodi alternativi per la determinazione molecolare del polimorfismo, tra questi ha incontrato particolare successo la tecnica di analisi basata sull'amplificazione casuale, impiegando *primers* arbitrari, di molteplici frammenti del genoma (RAPD) che venne presentata nel 1990 da Williams *et al.* (9) e Welsh e McClelland (7). Non è richiesta alcuna conoscenza della sequenza del DNA utilizzato come stampo che non deve essere necessariamente purificato ed inoltre le quantità che ne vengono impiegate sono estremamente ridotte. L'ottenimento di risultati immediati facilita notevolmente la programmazione del lavoro. Tuttavia tale tecnica presenta diversi inconvenienti. Numerosi parametri influenzano la reazione di amplificazione, i più

importanti sono la concentrazione del magnesio e le temperature impiegate nei cicli di amplificazione. L'ottimizzazione di tali parametri, effettuata per via sperimentale, risulta talora difficoltosa e non è in grado di assicurare la ripetibilità dei risultati ottenibili con la maggior parte dei *primers*. È preferibile allora scartare i *primers* che non danno risultati affidabili ed usare solo quelli che forniscono lo stesso *pattern* di amplificazione in più prove successive.

Tale tecnica è stata applicata su numerose specie vegetali (*Allium, Hordeum, Lactuca, Medicago, Vitis, Lycopersicum, Solanum, Malus, Phaseolus, Avena, Triticum, Vicia, Brassica* ecc.), animali (*Mus, Pan, Gallus, Hymenoptera, Aphis*, ecc.) e microrganismi (*Staphylococcus, Streptococcus, Lactococcus.*). Tra le applicazioni di tale tecnica più diffuse vi è la caratterizzazione genotipica (DNA *fingerprinting*). Infatti i profili dei RAPD presentano un polimorfismo utilizzabile per la differenziazione di diverse specie (9), varietà di una medesima specie (8) e addirittura singoli individui (10). Inoltre i RAPD possono essere utilizzati come marcatori molecolari associati a particolari geni (3), per la realizzazione di mappe genetiche (4); e per la localizzazione cromosomica di mutazioni (10). Infine i RAPD sono stati impiegati per analisi di popolazione e di parentela (2) nonchè per studi filogenetici.

Nel nostro laboratorio la tecnica dei RAPD è stata impiegata per determinare la variabilità presente in una popolazione di tori di razza Frisona Italiana sottoposti a prova di progenie presso l'ANAFI (Associazione Nazionale Allevatori Razza Frisona Italiana) (6).

In relazione al DNA utilizzato, poichè la tecnica è in grado di amplificarne quantità ridottissime, abbiamo voluto esaminare la possibilità di ricavarlo da fonti alternative al sangue che viene generalmente impiegato nel caso degli animali ma presenta difficoltà di conservazione, di spedizione e trasporto. Fonti di DNA alternative al sangue, quali penne e pelo, sono poi particolarmente utili negli studi sulle popolazioni selvatiche in quanto tali campioni che sono spesso raccolti nell'areale di diffusione e non rendono necessario, in molti casi, procedere alla cattura e al prelievo di sangue dell'animale.

La prova si è resa necessaria in quanto, come già detto, la tecnica dei RAPD è influenzata da molti fattori, tra cui anche la marca della Taq polimerasi e della macchina per PCR, inoltre in letteratura non risultavano lavori che paragonassero i profili RAPD ottenuti da diverse sorgenti di DNA.

Abbiamo dunque ricavato il DNA da individui di specie animali appartenenti rispettivamente alla classe «mammiferi» (bovino) e «uccelli» (fagiano), per sottoporlo ad analisi mediante RAPD e verificare che DNA di differente origine potessero essere usati indifferentemente. Nel caso del fagiano il DNA di ciascun individuo è stato estratto da tutte le cellule del sangue (compresi gli eritrociti) e dalle penne. Nel caso del bovino il DNA è stato estratto da linfociti, da pelo e da frammenti di unghioni.

MATERIALI E METODI

Estrazione del DNA

Sangue

Per il fagiano i linfociti e gli eritrociti sono stati separati mediante centrifugazione da un volume di 0.5 ml di sangue, mentre per il bovino sono stati utilizzati i linfoci-

ti, separati da 10 ml di sangue utilizzando Lymphoprep®. Dopo lavaggio con PBS le cellule sono state risospese in 10 ml *buffer* di estrazione (0.01 M TRIS pH 8; 0.1 M EDTA pH 8; 0.1 M NaCl; 0.5% SDS; 100 mg/ml proteinasi k nel caso del bovino o 200 mg/ml nel caso del fagiano) e lasciate in incubazione a 37° C per una notte. Dopo 2 estrazioni con fenolo-cloroformio ed una estrazione con solo cloroformio il campione è stato trattato con 20 ml/ml di RNAsi a 37°C per 30'. Il DNA è stato quindi precipitato in 1/10 del volume di CH_3 COONa e 2 volumi di alcool etilico al 100% e recuperato con la punta chiusa di una pipetta *Pasteur*.

Fonti alternative

Nel caso dell'estrazione del DNA dalle penne di fagiano, dal pelo e dagli zoccoli del bovino, il materiale, dopo lavaggio in acqua distillata ed acqua è stato sminuzzato in fini particelle con mezzi meccanici oppure polverizzato utilizzando azoto liquido, risospeso in 10 ml di *buffer* di estrazione (0.01 M TRIS pH 8.3; 50 mM KCl; NP40 0.9%; 300 mg/ml proteinasi k per penne e pelo, oppure 0.45 % NP40 - 0.45 %Tween 20; 0,01% gelatina; 0,5% SDS; 200 mg/ml proteinasi k nel caso degli zoccoli di bovino) ed incubato 1 notte a 37°. Nel caso delle penne di fagiano è stata sperimentata anche una incubazione breve a 56° per 60'. L'estrazione è proseguita come per le cellule del sangue, ma il DNA è stato recuperato mediante centrifugazione. Il pescaggio assicura l'integrità del DNA recuperato, mentre nel secondo caso il DNA potrebbe essere frammentato e di diversa origine, genomica e mitocondriale. Poiché la PCR amplifica anche minime quantità di DNA, è importante verificare da quale DNA stampo derivano i prodotti della reazione.

Reazioni di amplificazione

Dopo opportuna diluizione e test di digestione i DNA genomici sono stati sottoposti ad amplificazione su una macchina per PCR della M.J. Medical. Il programma prevedeva: 1 minuto di *Hot Start* a 94°C e poi 1 minuto di denaturazione a 94°C, 1 minuto di *annealing* a 36°C e 2 minuti di *extention* a 72°C per un totale di 45 cicli. Le reazioni sono state condotte con 20 ng di DNA genomico, 100 nM di *primer* (kit P Operon Technology), 100 μM rispettivamente di dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2 μl di *buffer* 10x per PCR Boehringer e 1 unità di Taq polimerasi della stessa ditta. Ciascun campione era ricoperto con 0.4 ml di olio minerale per prevenire l'evaporazione.

Rilevazione del DNA amplificato

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio al 1.5% per 3-4 ore a 80 V e una volta colorati con bromuro di etidio fotografati sotto luce UV.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'estrazione del DNA a partire dal sangue, rispetto a quella effettuata a partire da altro materiale consente di recuperare una maggiore quantità di DNA, dell'ordi-

ne di decine di mg/ml, piuttosto che alcune unità di mg/g. Questo fa sì che mentre l'estrazione da materiali alternativi consente di ricavare una quantità di DNA sufficiente per effettuare una reazione di PCR, che amplifica anche ridottissime quantità di DNA, non lo è per metodologie quali gli RFLP che richiedono quantità superiori di DNA per effettuare le ibridazioni.

La frammentazione mediante bisturi di penne, unghioni e pelo non ha consentito alcun recupero di DNA anche con dosi elevate di proteinasi K (300 mg/ml) e incubazione *over night*.

Il congelamento dei campioni con azoto liquido e la macinazione fine in mortaio hanno invece consentito un recupero apprezzabile di DNA (tabella 1).

Per quanto riguarda il periodo di incubazione con proteinasi k, è risultato che un'incubazione più breve a temperatura superiore, rispetto a quella indicata nei protocolli impiegati comunemente per estrazioni da sangue, consente di ottenere dei risultati migliori rispetto ad un'incubazione più lunga a temperatura minore. Infatti come si osserva in figura 1 le bande amplificate a partire da DNA estratto da penne trattate *over night* con proteinasi K risultano più deboli. Questo risultato è probabilmente dovuto ad una maggiore degradazione del DNA che queste ultime condizioni determinano. I profili nel loro complesso non differiscono se non nelle bande più deboli.

Anche per quanto riguarda il bovino non si sono riscontrate differenze tra i profili RAPD ottenuti con DNA proveniente da differenti tessuti (figura 2).

La sostanziale identità dei profili ottenuti da sangue, in cui è presente solo DNA genomico, o da altre fonti, con DNA genomico e mitocondriale, dimostra che l'unico DNA amplificato è di origine genomica. Ovviamente questo risultato si riferisce ai *primers* della serie P della Operon da noi utilizzati, per cui impiegando altri *primers* è necessario procedere ad apposite prove preliminari.

Per entrambe le specie è da rilevare che alcune bande amplificate erano leggermente meno fluorescenti sul gel di elettroforesi. Questo fatto deve essere tenuto in considerazione se le analisi statistiche vengono effettuate a partire da profili RAPD ottenuti sia da sangue che da altri tessuti: in questo caso dovrebbero essere conteggiate solo le bande più forti o in alternativa dovrebbero essere utilizzati sistemi di rilevazione più sensibili come la Elettroforesi Capillare (11).

Riteniamo dunque che fonti di DNA alternative al sangue possano essere utilizzate proficuamente sopratutto quando i campioni debbano essere spediti a notevoli distanze e quando dell'animale disponiamo solo di alcuni campioni di tessuto. La tecnica è completamente affidabile nei casi in cui l'analisi mediante RAPD può essere condotta tenendo conto prevalentemente delle bande di maggiore intensità.

Tabella 1 - Quantità di DNA ricavata da differenti materiali.

Sorgente DNA	Quantità DNA recuperata (mg/g)
Penne	1.5
Unghioni	1
Pelo	3

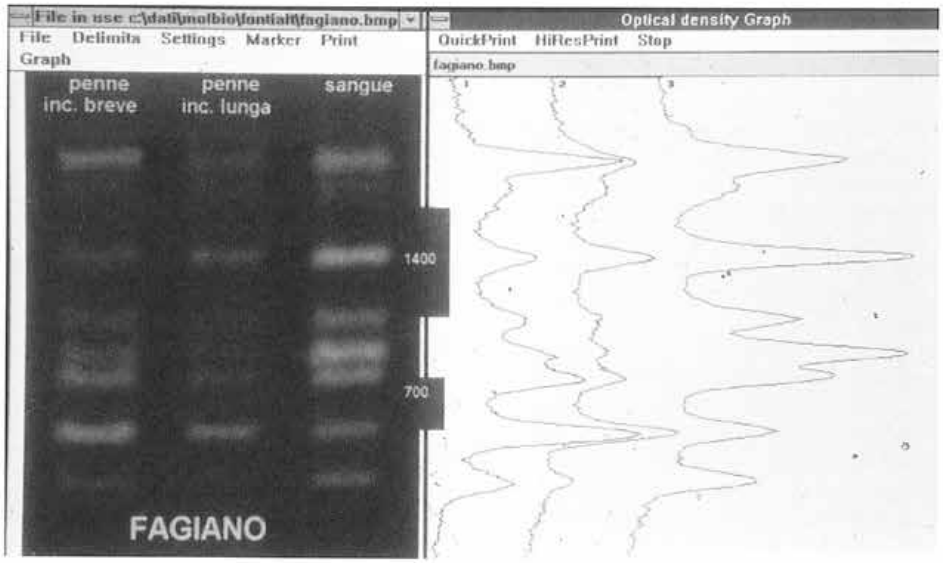


Figura 1 - Profilo RAPD di DNA di fagiano estratto da penne con incubazione breve o lunga con proteinasi K e da sangue (rispettivamente *lanes* 1-3).

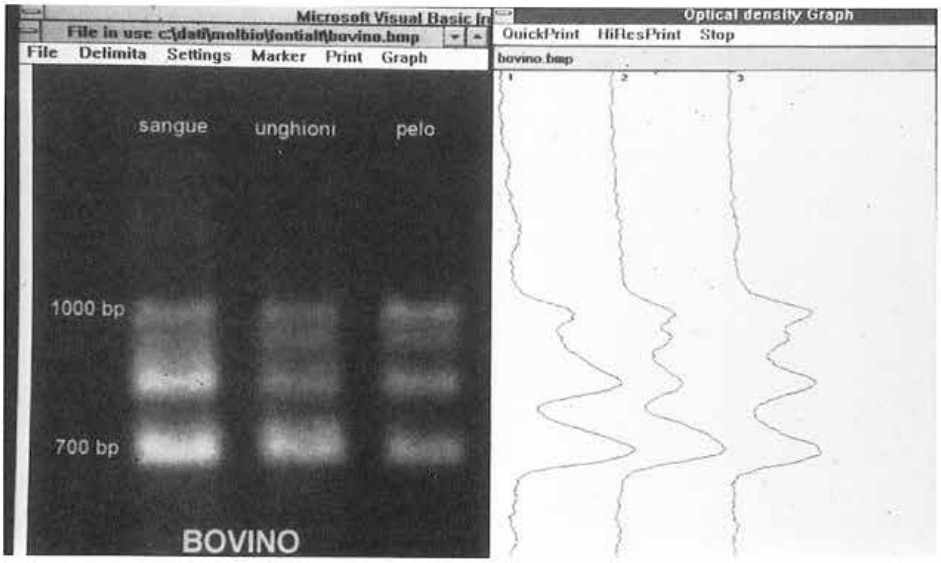


Figura 2 - Profilo RAPD di DNA bovino estratto da linfociti, unghioni e pelo (rispettivamente *lanes* 1-3).

BIBLIOGRAFIA

1) Damiani G., Bardin M. G., Comincini S., Bandi C., Sangalli S., Gandini G., Bolla P., Caroli A., Rognoni G. (1993) *Stima delle relazioni genetiche tra alcune specie di bovidi e tra diverse razze bovine.* Atti della 1° conferenza nazionale su: stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche. 147-156.

2) Dweikat I., Mackenzie S., Levy M., Ohm H. (1993) *Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species.* T. A. G. *85*, 497-505.

3) Haley S. D., Miklas P. N., Stavely J. R., Byrum J., Kelly J. D. (1993) *Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean.* T. A. G. *86*, 505-512.

4) Levin I., Crittened L. B., Dogson, J.B. (1993) *Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.* Genomics *16*, 224.

5) Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R. H., Horn G. T., Mullis K. B., Elrich H. A. (1988) *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science *239*, 487-491.

6) Valentini A., Porceddu A., Dadati E. (1993) *Impiego di RAPD per lo studio della variabilità genetica in bovini di razza frisona italiana.* Atti della 1° conferenza nazionale su: Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche. 157-161.

7) Welsh J., McClelland M. (1990) *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.* N. A. R. *189*, 7213-7218.

8) Welsh J., Petersen C., McClelland M. (1991) *Polymorphism generated by arbitrarly primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping.* N. A. R. *19*, 303-306.

9) Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., Tingey S. (1990) *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* N. A. R. *18*, 6531-6535.

10) Williams J. G. K., Reiter R. S., Young, R. M. (1993) *Genetic mapping of mutations using phenotipic pools and mapped RAPD markers.* N. A. R. *21*, 2697.

11) Zolla L., Valentini A., Papa F., Cappuccio I. (1994) *Detection of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) products by Capillary electrophoresis.* In corso di stampa.

L. D'AIUTO, G. RAGONE, M.R. LIPSI, S. MASSARI, G. VONGHIA*, S. CICCARESE

ANALISI ED ESPRESSIONE DI GENI γ/δ DEL *T-CELL RECEPTOR* NEGLI OVINI

Istituto di Genetica e * Dipartimento di Produzione Animale.
Università degli Studi di Bari, Via Amendola, 165/A - 70126 Bari

RIASSUNTO

Lo studio del T-*cell receptor* negli ovini inteso ad individuare la relazione tra recettori di superficie antigene-specifici di T linfociti immunocompetenti e la resistenza genetica degli animali alle malattie ha indirizzato una delle nostre linee di ricerca all'analisi di varianti alleliche del gene Cγ2 del TCRγ. Questo interesse è scaturito dai dati ottenuti in un nostro precedente lavoro in cui è stata isolata una variante allelica del suddetto gene in feti di 3 mesi e mezzo della razza Gentile di Puglia (GPCγ2). La nostra indagine si è quindi spostata su individui adulti della razza Altamurana, dai quali i cDNA dei trascritti relativi al gene espresso nel sangue periferico sono stati isolati e sequenziati. In uno di questi individui è stata osservata la presenza di tre trascritti correlati, uno dei quali espressione del gene Cγ2, un altro identico all'allele GPCυ2 ed un terzo che si discosta sensibilmente dal primo e differisce dal GPCγ2 per l'assenza di una mutazione silente nella porzione codificante carbossiterminale e per ulteriori due mutazioni nella porzione 3' trascritta e non tradotta. Tutto ciò ci fa supporre che siamo in presenza di una probabile duplicazione del gene Cγ2 in questione. L'altro aspetto della ricerca riguarda la caratterizzazione genomica non ancora nota del gene ovino Cδ.

Parole chiave: geni del T-*cell receptor* - sequenze nucleotidiche - varianti alleliche - organizzazione genomica - cDNA.

ANALYSIS AND EXPRESSION OF γ/δ GENES OF OVINE T-CELL RECEPTOR

SUMMARY

The study of T-cell receptor in sheep, meant to characterize relationship between surface antigen-specific receptors of immunocompetent lumphocytes and animals genetic resistance to desease, has directed one of our research lines to the analysis of TCR Cγ2 gene's allelic variants.

This interest results from data obtained in one of our previous works, in which was isolated an allelic variant of Cγ2 gene in 3-4 months foetuses of «Gentile di

Questo studio è stato realizzato con il contributo del CNR, nell'ambito del P.F. RAISA, sottoprogetto 3. Pubblicazione N. 1647.

Puglia» breed (GPCγ2). Then our research moved to adult individuals of «Altamurana» breed from which cDNAs of transcripts related to the gene expressed in peripheral blood were isolated and sequenciated. In one of these individuals was observed the presence of three related transcripts: one of them is expressed by Cγ2 gene, another is identical to GPCγ2 for the absence of a silent mutation in carbossiterminal coding region and further two mutations in 3' transcripted non translated region. These results let us suppose that we are in presence of a probable duplication of Cγ2 gene in object. The other side of our research is the genomic characterization of Cδ gene in sheep, actually unknown.

Key words: T-cell receptor genes - nucleotide sequences - allelic variants - genomic organization - cDNA

INTRODUZIONE

*Caratteristiche generali delle cellule T*γ/δ e dei geni γ/δ negli ovini

Negli artiodattili, le cellule Tγ/δ+ formano un'ampia porzione di cellule T circolanti. Nel giovane ovino, per esempio, raggiungono il 50-80%, quota che negli adulti scende solo fino al 20-30% (1). Altre evidenze indicano che potrebbe essere avvenuto, durante la radiazione evolutiva dei mammiferi, una diversificazione delle specie nella quale alcune hanno mantenuto, come aspetto prominente del sistema immunitario, le cellule Tγ/δ+. La distribuzione fisiologica nelle diverse specie animali definisce uno spettro quantitativo tra specie «γ/δ *high*» come i ruminanti, e γ/δ *low* come uomo e topo. Negli ovini, studi su cloni di cDNA, hanno permesso di identificare 10 geni Vγ suddivisi in 6 famiglie (2). Le famiglie Vγ2 e Vγ5 contengono rispettivamente 4 e 2 segmenti genici, probabilmente derivati da una duplicazione genica recente (omologia dell'81-97%). Le altre famiglie sono ognuna rappresentata da un singolo gene. L'omologia di sequenza tra esse varia dal 40 al 75%. I segmenti genici V sono stati comparati ad omologhe sequenze Vγ del topo e dell'uomo: 4 regioni V ovine hanno mostrato un'alta omologia tra le specie. Soprattutto il gene Vγ4 ha mostrato una omologia aminoacidica del 74.7% rispetto al Vγ3 murino. Ogni gene Vγ riarrangia con uno dei 5 segmenti J. Tra questi Jγ2, Jγ3 e Jγ5 mostrano un'omologia di sequenza del 71-74%, mentre Jγ1 e Jγ4 mostrano una maggiore divergenza sia tra loro che rispetto agli altri segmenti J (omologia del 47-59%); il residuo di GLY è conservato in ognuno di essi. I segmenti genici Cγ finora individuati sono 5 e hanno un'omologia del 73-84% ed domini Ig simile; TM (transmembrana) e CYT (citoplasmatico) mostrano aspetti ben conservati, sebbene il dominio CYT di Cγ5 sia più divergente. Eterogeneità è osservata a livello di regione connettrice prossimale di membrana che può andare da 24 (in Cγ5) a 75 (in Cγ2) codoni. Inoltre nella porzione più distale della regione di connessione, Cγ1, Cγ2 e Cγ4 contengono ognuno due residui addizionali di CYS in posizione conservata ed in Cγ2 vi è un motivo di 5a.a. (TTEPP) ripetuto (residui 144-158) (1). Nella posizione corrispondente (142-146), Cγ1, Cγ3 e Cγ4 contengono solo un singolo motivo in cui una SER ha sostituito la quarta PRO (TTSEP); in Cγ1 e in Cγ3 una LYS sostituisce il terzo a.a. (TTKPP). Inoltre nella regione TM, il caratteristico residuo LYS coinvolto nelle interazioni con i residui A. aspartico e A. glutammico del complesso CD3 è sostituito, in Cγ2, da un residuo di LEU che destabilizza questa asso-

ciazione, facendo optare verso particolari proprietà di trasduzione del segnale. Tuttavia, diversi residui sono conservati in tutte le sequenze, come ad esempio i più prossimali alla membrana (SAYY) e il residuo di CYS coinvolto nel ponte S-S con la catena δ e quelli coinvolti nei legame intracatena. Studi comparativi tra geni Cγ di ovino, bovino, uomo e topo dimostrano che, filogeneticamente, il Cγ1 e il Cγ2 ovino sono simili al Cγ1 umano e al Cγ2 di topo, mentre il Cγ2 ha un'omologia dell'86%, 87% e 59% rispettivamente con i geni bovini Cγ, Cγ2 e Cγ3 nei quali è anche riscontrabile il motivo TTEPP o TTKPP (3). Esso è ripetuto quattro volte in Cγ1, due volte in Cγ2 e una volta in Cγ3, che presenta però il motivo ATKPP. Il dominio EX è filogeneticamente conservato. Le posizioni dei due residui di CYS coinvolti nel legame S-S intracatena sono costanti. Alto livello di conservazione si riscontra anche nelle regioni CYT e TM (quest'ultima con l'eccezione del residuo LEU di Cγ2 ovino). Al contrario grandi differenze sono visualizzabili tra le varie specie, nella regione connettrice prossimale di membrana. Questa, infatti, è più ampia nei ruminanti che non nell'uomo e nel topo in cui manca il motivo ripetuto dei 5 a.a., oltre ai due residui di CYS aggiuntivi in posizione 135 e 151 di Cγ1, Cγ2 e Cγ4 ovino, che fanno pensare ad un altro potenziale legame S-S intracatena o ad un ulteriore stabilizzazione o interazione con molecole di membrana adiacenti. A causa delle sequenze ripetute corrispondenti alla regione di connessione paragonabili ad una triplicazione simile a quella dell'esone CII umano, o a un sito di *splicing* alternativo in un piccolo esone, il TCRγ dei ruminanti è rappresentato da una catena più lunga di quella osservabile in altri animali. Le cellule Tγ/δ, almeno quantitativamente, giocano, negli ovini e nei ruminanti in genere, un ruolo molto significativo; osservazioni sull'espressione genica nelle cellule Tγ/δ periferiche in tre diversi periodi di differenziamento fetale e in animali adulti rivelano patterns distinti durante lo sviluppo (2). Con l'eccezione della famiglia genica Vγ2, che è espressa in tutti i periodi dello sviluppo, nella periferia del feto e dell'adulto vengono utilizzati differenti segmenti genici V. Anche la frequenza relativa di utilizzazione di Vγ4, Vγ5 e Vγ6 cambia con l'età fetale. L'unico gene osservato esclusivamente nella periferia di adulto è Vγ. Inoltre, i patterns di riarrangiamento tra segmenti Vγ e Jγ nel feto sono normalmente invarianti e sono espresse con distinte regioni Cγ, con l'unica eccezione, osservata nell'adulto, del gene Vγ2.1 che combina con Jγ1/Cγ piuttosto che con Jγ3/Cγ3. Le regioni giunzionali V-J mostrano diversità in tutti gli stadi di sviluppo esaminati (2).

MATERIALI E METODI

Estrazione DNA genomico

Il Dna genomico viene estratto da fibroblasti embrionali in coltura, provenienti da feti ovini. Il *pellet* di cellule è risospeso in 2 ml di tampone Jeffrey 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0-8.2, Na_2 EDTA 10 mM; NaCl 0.1 M). Alla sospensione si aggiunge 1 mg di RNAsi ed SDS a concentrazione finale 1.7% e proteinasi K (200 ng/ml finale). Si incuba a 60°C per 10', si addizionano 270 μl di NaCl per ogni ml di tampone Jeffrey e dopo aver agitato vigorosamente per 30'' si centrifuga

a 4500 r.p.m. per 15'; si precipita il DNA addizionando al sovranatante 2.5 Vol. di etanolo assoluto. Il DNA raccolto viene essiccato e risospeso in H_2 distillata sterile.

Estrazione di RNA totale da linfociti

Per ogni ml di sangue vengono addizionati 100 µL di destranolo 3% in NaCl 0.15 M. Si incuba poi per 30' a 37°C e si centrifuga a 3000 r.p.m. per 10'; quindi il *buffy coat* è portato a 10 ml con tampone di lisi (ACK). Segue una incubazione per 20' in ghiaccio e una centrifugazione a 1500 r.p.m. per 10'. Il *pellet*, costituito solo dalla serie bianca del sangue intero viene lavato in NaCl 0.15 M. Per la estrazione dell'RNA, le cellule vengono omogenizzate in 1 ml di soluzione A. All'omogenato si aggiunge agitando 0.1 ml di Na Acetato 2 M, pH 4.0; 1 ml di fenolo, 0.2 ml di cloroformio/alcool isoamilico 49:1. Si centrifuga a 4°C per 20' a 10.000 r.p.m. e si recupera la fase acquosa con gli acidi nucleici che vengono poi precipitati con 1 vol. di alcool isopropilico a 20°C *o.n.* Si centrifuga a 4° C per 20' a 10.000 r.p.m. Il *pellet*, risospeso in 0.3 ml di soluzione A, è riprecipitato con 1 vol. di alcool isopropilico a 20°C *o.n.* Dopo centrifugazione il *pellet* viene lavato con etanolo a 75%, essicato e risospeso in 50 µl di 0.5% SDS. L'RNA viene controllato mediante elettroforesi, su *gel MOPS* agarosio-formaldeide.

Tampone di lisi (ACK): 0.155 M NH_4 Cl; 0.012 M $NaHCO_3$; 0.0001 M Na_2 EDTA. Soluzione A: 10 ml di una soluzione 4 M guanidin isotiocianato, 25 mM Na citrato, 0.5% Sarcosyl, 104 µl ß-mercaptoetanolo.

Sintesi di cDNA

La sintesi della prima *strand*, si realizza in 15 µl di *nuclease free water*, mediante la combinazione di oligo d(T) ed RNA in rapporto di 0.5 µg *primer*/µg RNA. Dopo aver riscaldato, per 15' a 70°C, e raffreddato lentamente a temperatura ambiente, la miscela *primer*-stampo viene mescolata con 10 µl di 5x *first strand buffer* (50mM tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM, $MgCl_2$, 0.5 mM spermidina, 10 mM DTT e 1 mM di ciascun dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U di rRNAsin (*ribonuclease inhibitor*), 5 µl di Na pirofosfato 40 mM e 15 U/µg RNA di AMV *reverse transcriptase*. La reazione è condotta a 42°C per 60', non prima di aver prelevato dalla miscela 5 µl e messi in un altro tubo contenente 1-5 µCi (α^{32}P) dATP (>400 Ci/mmole). In questo modo, ottenendo una sintesi marcata, abbiamo l'opportunità di seguire l'avvenuta reazione che verrà evidenziata mediante elettroforesi su *gel* alcalino di agarosio 1.4% in 50 mM NaCl, 1 mM EDTA e successiva autoradiografia. Per realizzare la sintesi della seconda *strand*, 20 µl della prima reazione vengono mescolati con 10 µl di 10x *second strand buffer* (400 mM Tris-HCl, pH 7.2, 900 mM HCl, 30 mM $MgCl_2$, 30 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA), 23 U. *E. coli* i DNA *polymerase* I, 0.8 U RNAse H e *nuclease free water* sino ad arrivare a un volume finale di 100 µl. Dopo aver incubato 2 h a 14°C, la miscela di reazione viene riscaldata a 70°C per 10', messa in ghiaccio dove si aggiungono 2 U di T4 DNA *polumerase*/µg RNA iniziale ed ancora incubata a 37°C per 10'. Ultimata la reazione, il CDNA viene estratto con fenolo-cloroformio, precipitato con etanolo, ed infine risospeso in 12 µl di H_2O sterile.

Polymerase Chain Reaction - «Hot Start Technique»

La tecnica PCR permette di amplificare enzimaticamente, *in vitro*, piccole quantità di DNA usando *primers* specifici e l'enzima Taq DNA *polymerase* (Perkin Elmer). La reazione viene condotta usando un apparecchio automatico (DNA THERMAL cycler della Perkin Elmer Cetus) in grado di far variare, secondo un programma, la temperatura. La tecnica *Hot Start* con gocce di cera «Ampliwax» PCR, permette di evitare la completa mescolanza dei reagenti prima, che venga raggiunta la temperatura per ridurre errori di *annealing* non-specifico o di oligomerizzazione dei *primers*. La procedura consiste in due fasi. Fase *lower*: 25 µl 10x PCR *buffer* (10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) 2.5-4 mM $MgCl_2$, 10 mM di ogni dNTP, 20 pmoli di ciascun *primer* in un volume finale di 25 µl. A questa miscela si aggiunge una goccia di cera «Ampliwax», si incuba a 80°C per 5' e poi gradualmente a 25°C dove si tiene per 1 minuto. Fase *upper*: 7.5 µl 10x PCR *buffer*, 2.5 U Taq DNA *polymerase* e 50 µg DNA in un volume finale di 75 µl con H_2O HPLC *grade*. Le condizioni di amplificazione sono:

— denaturazione 95°C per 1'
— temperatura di *annealing* $T° = C(G+C)+2(A+T)-5$ dei *primers* per 1'
— estensione 72°C per 1'

Il numero dei cicli utilizzati è generalmente 30.

Il prodotto di amplificazione viene evidenziato mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% in TAE 1x (40mM Tris-acetato 1mM EDTA).

Trasformazione con elettroporatore

La tecnica permette di poter inserire il DNA ricombinante in cellule batteriche, sottoponendole ad una scarica negativa ad alto voltaggio, utilizzando un apparecchio, l'elettroporatore e delle speciali cuvette che per metà sono in metallo. La miscela di ligazione viene estratta con fenolocloroformio e precipitata aggiungendo 4 µg tRNA di lievito (per appesantire la frazione nucleotidica), 1/10 vol. Na acetato 3 M ed etanolo assoluto ed infine risospesa in 1-2 µl di H_2O HPLC *grade* per un vol. di 40 µl di *E. coli*. Prima di piastrare, le cellule vengono risospese in 1 ml di SOC e incubate, in agitatore, per 1 h a 37°C. I cloni ricombinanti vengono estratti mediante *Magic minipreps* (Promega) e quelli positivi vengono sequenziati mediante il metodo di Sanger modificato.

Preparazione SOC/litro: 20 g. tryptone, 5 g. estratto di lievito, 0,5 g. NaCl, 10 ml KCl 250 mM; portare a pH 7 con 10 N NaOH e aggiungere 5 ml $MgCl_2$ 2M; autoclavare ed aggiungere 20 ml glucosio 1M.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi di geni C

Il nostro approccio sperimentale, utilizzato per la caratterizzazione molecolare dei geni TCRγ/δ, comprende sia lo studio dei trascritti Cγ su sangue periferico negli ovini della razza «Altamurana», sia l'osservazione dell'organizzazione genomica del

gene Cδ (razza sarda). Il primo studio prende il via dall'isolamento di linfociti circolanti a partire da 20 ml di sangue di un individuo adulto. L'RNA totale estratto da queste cellule col metodo del guanidin isotiocianato viene quindi purificato e poi analizzato su gel agarosio 1% in formaldeide. 25 cloni del cDNA corrispondente sono stati analizzati per stabilire la lunghezza degli inserti e sono stati selezionati i più significativi per lunghezza e regione rappresentata (schema I). In particolare, il clone V3.1 rappresenta una regione corrispondente alla sonda pSFTG4 (1) comprendente il gene Jγ2 fiancheggiato in 5' da una porzione di un gene V non ancora identificato ed in 3' dal primo esone di Cγ2. Il clone V2.1 corrisponde alla maggior parte della regione codificante, incluso il codone di stop, di Cγ2. I cloni V5.1, V5.2 (di 451bp), corrispondono alla regione connettrice prossimale di membrana, alla regione transmembrana, alla citoplasmatica e alla 3' non tradotta completa del gene GPCγ2. In un lavoro precedente (4) abbiamo identificato il gene GPCγ2 come una forma allelica del gene Cγ2 espressa preferenzialmente nel timo fetale di individui di razza Gentile di Puglia. Il gene GPCγ2 rispetto al Cγ2 presenta nella regione codificante 4 sostituzioni missenso rispettivamente alle posizioni 608, 620, 623, e 716 (4); 2 silenti alle posizioni 582 e 648 e, nella regione in 3', 7 mutazioni tra cui una delezione. L'allineamento tra le sequenze dei cloni V5.1; V5.2 e del gene Cγ2 (figura 1) ha messo in evidenza la uguaglianza dei cloni V5.1, V5.2 al gene GPCγ2; una sequenza identica hanno i cloni V3.13, V4.3 (schema 1). Tali cloni mancano però della parte in 3' e ciò fa ipotizzare che abbiamo di fronte due distinti cDNA dello stesso trascritto. Il clone V4.1 di 400 bp, si differenzia dagli altri quattro precedentemente descritti, e quindi dal GPCγ2, solo per un *mismatch* silente nella parte codificante e due mutazioni nella regione in 3' (figura 2). Il motivo per cui il gene GPCγ2 era stato considerato una forma allelica del gene Cγ2 era dettato dall'osservazione che le sostituzioni aminoacidiche individuate nella regione carbossiterminale del Cγ2 erano rappresentate alle stesse posizioni nel Cγ1. Tale osservazione era confermata da una situazione analoga riscontrata nelle forme alleliche di Cγ1 e Cγ2 umane, nell'esone I (5). Alla luce dei risultati precedentemente prodotti, indicanti analisi di sequenza nucleotidica di cloni di cDNA provenienti dal sangue periferico di un soggetto di razza «Altamurana», potremmo avanzare l'ipotesi di una probabile duplicazione del gene Cγ2. Infatti, se prendiamo in considerazione l'esone III dei geni Cγ1 e Cγ2 umani vediamo che esso è altamente conservato sia nella regione codificante con una singola sostituzione aminoacidica risultata da un unico mismatch, che nella regione non codificante con solo 2 cambi di base. Nel caso da noi esaminato, il gene GPCγ2 e quindi anche i cloni V5.1, V5.2 e V3.13, V4.3 che rappresentano la porzione carbossiterminale della catena γ (contenente probabilmente l'esone II e sicuramente l'esone III) divergono rispetto al Cγ2 per ben 4 sostituzioni aminoacidiche e 7 mutazioni nella 3' non tradotta (schema 1). Nel soggetto da noi analizzato sono quindi espressi sia il Cγ2 (clone V2.1), sia il GPCγ2 (cloni V5.1, V5.2 e V3.13, V4.3); è inoltre espresso un altro gene (clone V4.1) che si differenzia dagli ultimi cloni e quindi dal GPCγ2 solo per una mutazione silente nella parte non tradotta (schema 1). Sembrerebbe quindi, che il nostro individuo sia eterozigote per il GPCγ2; entrambe le forme alleliche mancano inoltre di una mutazione silente nella posizione 648 che è tipica della razza Gentile di Puglia (4). Dati di recente letteratura (2), mettono in evidenza che, per quanto riguarda la parte costante dei geni γ, negli ovini c'è un uso preferenziale

di determinati isotipi rispetto ad altri. Per esempio, mentre nel sangue fetale sono adoperati i geni Cγ2, Cγ4, Cγ5, nel sangue periferico di soggetti adulti si ritrovano i geni Cγ3 (con una frequenza di 19/20 cloni esaminati) e Cγ1. Uno degli obiettivi della nostra ricerca era quello di individuare il repertorio dei geni γ espressi nel sangue periferico di soggetti della razza ovina «Altamurana». Considerando i risultati di un precedente lavoro (4) ottenuti nel timo fetale della «Gentile di Puglia» dove è preferenzialmente espresso il gene GPCγ2, abbiamo voluto individuare in un'altra razza locale e nel sangue periferico l'espressione di Cγ2 per mezzo della sonda pSFTG4 (1). I risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza non solo l'espressione del gene Cγ2 nell'adulto, ma anche l'uso preferenziale di forme alleliche a tale gene. Inoltre, è stata avanzata l'ipotesi di una probabile duplicazione genica di Cq2 che dovrà essere verificata al più presto con l'analisi del *cluster* dei geni costanti Cγ su DNA genomico.

Organizzazione genomica del gene Cδ

DNA genomico estratto da fibroblasti (razza Sarda) secondo la procedura standard è stato utilizzato in una reazione di amplificazione usando come primers oligonucleotidi complementari all'estremità 5' e 3' comprendenti la regione codificante del cDNA noto per Cδ (1). Il prodotto amplificato è stato clonato in pBS e sequenziato. L'identificazione di due siti Hind III all'interno ha consentito il successivo subclonaggio del frammento per completare la sequenza. Il gene Cδ (figura 3) presenta un'organizzazione in esoni (lettere maiuscole) ed introni (lettere minuscole) già evidenziata in topo e uomo con la regione extracitoplasmatica divisa nei tre esoni, l'ultimo dei quali contenente anche la porzione transmembrana e citoplasmatica. Inoltre anche le dimensioni degli introni risultano paragonabili a quelli di topo e uomo. Infatti nella pecora il primo e secondo introne sono lunghi rispettivamente 527 e 372 bp, nel topo e uomo 643 e 366 bp.

Schema 1 - Quadro riassuntivo delle mutazioni che caratterizzano il gene GPCγ2 (quindi i cloni V5.1; V5.2 e V3.13; V4.3) rispetto al gene Cγ2 e il clone V4.1 sempre rispetto a Cγ2. Con gli asterischi sono indicate le differenze tra il gene GPCγ2 e il clone V4.1.

CLONE	LUNGHEZZA	CORRISPONDENZA pSFTG4
V3.1	97 bp	bp da 1 a 97
V2.1	552 bp	bp da 189 a 741
V5.1 e V5.2	451 bp	bp da 543 a 995
V3.13 e V4.3	171 bp	bp da 543 a 741
V4.1	400 bp	bp da 555 a 956

Quadro riassuntivo delle caratteristiche generali dei cloni sequenziati.

DIFFERENZE Cγ2-GPCγ2

Regione codificante:

1 silente: T > C bp 582*
4 missenso: G > A bp 608
C > T bp 620
C > A bp 623
A > T bp 716

Regione 3 non tradotta:

G > T bp 746
G > T bp 767
T > C bp 768*
T > C bp 773
G > A bp 774
C > T bp 779*
C del. bp 868

V5.1 e V5.2

= GPCγ2

V3.13 e V4.3

DIFFERENZE Cγ2-V4.1

4 missenso G > A bp 608
C > T bp 620
C > A bp 623
A > T bp 716

G > T bp 746
G > T bp 767

T > C bp 773
G > A bp 774
C del. bp 779
C del. bp 868

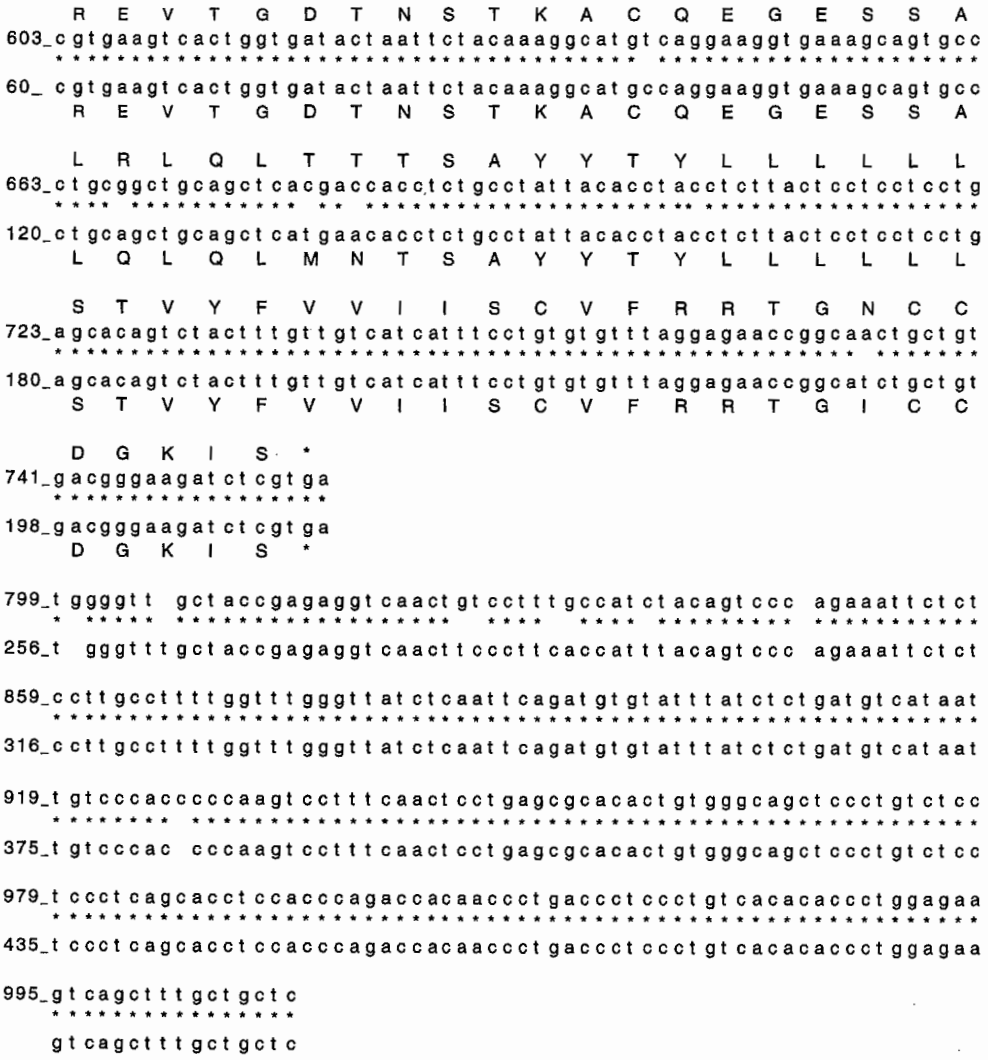


Figura 1 - Allineamento tra le sequenze dei cloni V5.1; V5.2 e del gene Cγ2.

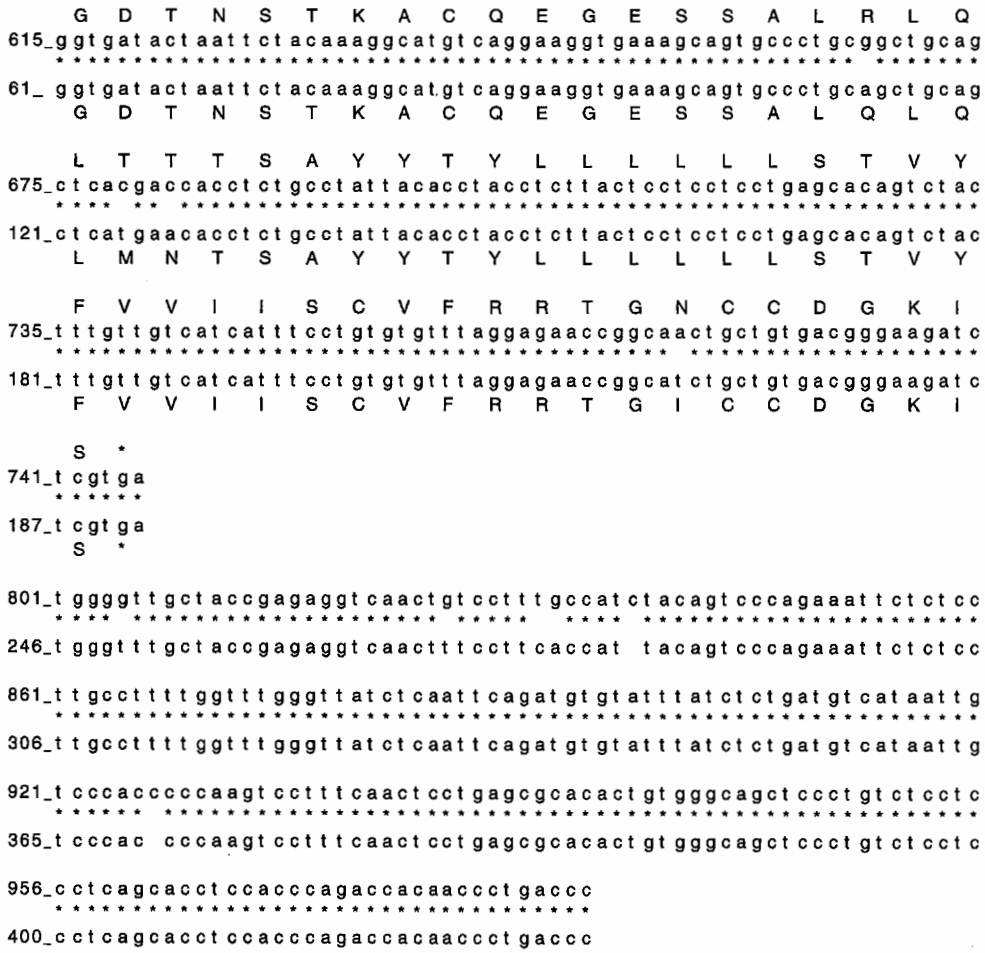


Figura 2 - Allineamento tra la sequenza del clone V4.1 e la sequenza del gene Cγ2.

```
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
   1 AGCCCATCTG TTTTTGTCAT GAAAAATGGG ACAAACGTCG CTTGTTTGGT GAAGGAGTTC 60
  61 TACCCCAAAG AAGTAATCTA TAAGTCTGCA ATCATCCAAG AAAATAATAG AATATGAGCC 120
 121 TGCTATTGTC GTCTCACCTG GGGGGAGGTA CAGCGCTGTC AAGCTTGGTC AGTACAACGA 180
 181 TCCCGATTCA GTGACATGTT CAGTTGAACA CAACAAAAAA ACCTGGCACT CTTCTGACTT 240
 241 TGAACCAAAG AAAGACATTT CAGgtaggtc ctatctggcc tcaaggggct ggggttgtgg 300
 301 ggaagaaaaa ttgagggaaa gagaagttgg agatgtaaac tcttgacaga tcacattcaa 360
 361 tatggcatca tcgtggaaat aagacttagg ttcagattta agaattaagc ttaattccca 420
 421 tccttgaaca ggaattaaac ttgttacatc tctgagctgg aatctaggat gcaatccatc 480
 481 ttatttcatc cccatctctc ctcttcaccc acctctgtct tcctttcata ctaaagactc 540
 541 tagcattgaa cattcatgtg ggatctgatc tagtgtgagt gccccagcca agggccaccc 600
 601 agctgatctt ggtgttcata tccagtctct acaatagagg catactgagt gtcagctaga 660
 661 aaactcagca ggagcatgtg tcagtagcgt tagactacga gtactctctg tctagttact 720
 721 actaagtcct cagtctaact gaagcctgag cctctcagtg tcatgtaacc tgactactac 780
 781 tgttgtccag AAACAACTCC AAAACCAACG GAATCTGAAA ACACCACAGA AATTCAAGTT 840
 841 CCAGCGACCT GCTATGAGCC CCAAGgttag gttgaaggcc aaagggccaa ccttcagaat 900
 901 tgaggttaaa gcaaactgtc tcattgtcag atggggccca aaattattct atttcaaaag 960
 961 aaaacaaaaa ccatacttga gtccagttgg ctccctccaa ctcttcaagc agagtcttcc 1020
1021 tgactatagg aatgggtttt cccaaagctt cgtttcgtaa ctgtgaacag caccttcagg 1080
1081 tctgtgaagg ctgtctggca ccacgctggg cttcagaccg agaagaatga tggtgatgtg 1140
1141 gggcaggctg gtcgtcggtg ctgtaagcca atacctggca ggaaatttag tctcttgact 1200
1201 aagtgagaga accatcttca ctctcgttca tctgcagTGC AACCTGGGAA GGTGAACATG 1260
1261 ATGTCCCTCT CGGTGCTGGG GCTCCGAATG CTGTTTGCCA AGAGTGTCGC CGTCAATTTT 1320
1321 CTCTTTACTG CCAAGTTATT TT                                          1342
        |   10      |   20      |   30      |   40      |   50      |   60
```

Figura 3 - Organizzazione genomica della regione codificante per il gene ovino della catena Cδ. Il gene presenta un'organizzazione in esoni (lettere maiuscole) ed introni (lettere minuscole) già evidenziate in topo e uomo con la regione extracitoplasmatica divisa nei tre esoni, l'ultimo dei quali contenente anche la porzione transmembrana e citoplasmatica. Inoltre anche le dimensioni degli introni risultano paragonabili a quelle di topo e uomo. Infatti nella pecora il primo e secondo introne sono lunghi rispettivamente 527 e 372 bp, nel topo e uomo 643 e 366 bp.

BIBLIOGRAFIA

1) HEIN W.R., DUDLER L., MARCUZ A., GROSSBERGER D. (1990) Eur. J. Immunol. *20*, 1795-1804.

2) HEIN W.R., DUDLER L. (1993) EMBO. J. *12*, 715-724.

3) TAKEUCHI N., ISHIGURO N., SHINAGAWA N. (1992) Immunogenetics *35*, 89-96.

4) RUSSO B., MASSARI S., VONGHIA G., CICCARESE S. (1994) Bulletin of Molecular Biology and Medicin *19*, (1), 41-56.

5) LEFRANC M.P., FORSTER A., RABBITTS T.H. (1986) Proc. Natl. Acc. Sci. *83*, 9596-9600.

Atti della 2ª Conferenza Nazionale su:
Stato dell'arte delle ricerche
italiane nel settore delle
biotecnologie applicate alle
scienze veterinarie e zootecniche

M.G. BARDIN, M. SIRONI, G. GANDINI[1], P. BOLLA[1],
A. CAROLI[1], R. CLEMENTI, G. DAMIANI

UTILIZZAZIONE DEI MARCATORI DEL DNA PER STIMARE LE RELAZIONI DI PARENTELA

Istituto per la Difesa e la Valorizzazione del Germoplasma Animale, CNR, e
[1] Istituto di Zootecnica, Facoltà di Medicina Veterinaria, via Celoria 10 - 20133, Milano

RIASSUNTO

Esistono numerosi metodi di tipizzazione genetica utilizzabili per la determinazione delle relazioni di parentela. Le tecniche del *Southern blotting* e della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sono state utilizzate per la caratterizzazione di diversi *loci* polimorfici in animali con genealogie conosciute. Da un confronto tra le diverse metodiche utilizzate è risultato che la tecnica più semplice e meno costosa per ottenere un sufficiente numero di informazioni utili è l'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione di singoli *loci* ipervariabili e dei frammenti di DNA ottenuti dalla loro eventuale digestione con enzimi di restrizione. Come esempio di questa procedura abbiamo sviluppato un metodo per l'amplificazione e la successiva digestione con enzimi di restrizione di una regione altamente polimorfica del locus DRB3 del BoLA comprendente sia l'esone 2 che il microsatellite fiancheggiante. Questa metodo, insieme all'analisi di altri *loci* ipervariabili, può consentire un chiaro, univoco ed economico controllo delle paternità nei bovini e in altre specie.

Parole chiave: determinazione della parentela - DNA ipervariabile - *fingerprint* - PCR - DRB3.

UTILIZATION OF DNA MARKERS FOR PARENTAGE DETERMINATION

SUMMARY

Several methods of genetic typing for parentage determination are available. The *Southern blotting* and the PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques have been used to characterize several polymorphic *loci* in cattle with well-known genealogies. The comparison between the different methods suggests that the most simple and useful technique to obtain informative data is the electrophoretic analysis on agarose gel of DNA fragments amplified from single locus hypervariable sequences and digested with restriction enzymes if necessary. An example of this procedure is a

Lavoro eseguito con un contributo del CNR.

developed protocol for the amplification and restriction of the exon 2 and the flanking microsatellite of the highly polymorphic BoLA-DRB3 gene. This method, together with the analysis of other hypervariable *loci*, should be useful for a rapid and cheap parentage determination in cattle and other species.

Key words: parentage determination - hypervariable DNA - fingerprint - PCR - DRB3.

INTRODUZIONE

Il controllo delle genealogie degli animali di interesse zootecnico mediante l'analisi di marcatori genetici viene effettuata in tutti i paesi tecnologicamente progrediti. Questo controllo è di fondamentale importanza per mettere in evidenza frodi ed errori nei rapporti di parentela attribuiti agli animali impiegati nei processi di selezione. Inoltre l'analisi di marcatori genetici può avere numerose altre applicazioni, come l'identificazione dei gemelli monozigotici e la stima del livello di diversità genetica tra ed entro popolazioni.

A partire dal primo dopoguerra, per il controllo delle genealogie degli animali di interesse zootecnico sono stati utilizzati essenzialmente metodi immunologici e biochimici basati sulla caratterizzazione di proteine presenti nei fluidi biologici e in particolare nel sangue (ad esempio gruppi sanguigni, proteine sieriche, enzimi eritrocitari, antigeni leucocitari). Per le diagnosi di parentela dei bovini sono stati prodotti numerosi sieri standardizzati impiegati in analisi immunologiche.

Negli ultimi anni le innovazioni tecnologiche in biologia molecolare hanno reso possibile l'identificazione di un numero molto grande di marcatori genetici direttamente a livello del DNA. Le informazioni ottenute dall'analisi di sequenze di DNA altamente polimorfiche possono essere efficacemente utilizzate per la determinazione della parentela di animali di interesse zootecnico. Un loro uso effettivo è attualmente limitato dalle indecisioni sulla scelta delle tecniche da utilizzare e delle sequenze da analizzare.

Le sequenze dei genomi eucariotici che presentano una maggiore variabilità sono quelle di particolari geni (come ad esempio quelli implicati nella risposta immunitaria) e di corte sequenze ripetute denominate microsatelliti e minisatelliti (o VNTR, da *Variable Number of Tandem Repeats*). Le tecniche normalmente usate per l'analisi di queste sequenze ipervariabili sono essenzialmente due: il *Southern blotting* e la PCR.

Nella tecnica del *Southern blotting*, il DNA genomico viene digerito con enzimi di restrizione, separato mediante elettroforesi e ibridato con sonde marcate che evidenziano polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (denominati RFLP, da *Restriction Fragment Length Polymorphism*) di uno o più loci. Quando vengono usate sonde che si ibridano a più *loci* ipervariabili vengono prodotte impronte genetiche individuali (chiamate DNA *fingerprint*).

In alternativa al *Southern blotting* è possibile utilizzare la tecnica denominata PCR (*Polymerase Chain Reaction*) scoperta negli ultimi anni. Grazie a questa tecnica si possono amplificare singoli *loci* che contengono numerose mutazioni puntiformi (caratterizzabili con varie tecniche) o altre sequenze ipervariabili come minisatelliti e microsatelliti. Usando contemporaneamente più coppie di *primer* è anche pos-

sibile amplificare contemporaneamente più *loci*. Inoltre in condizioni opportune è possibile ottenere dei RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) *fingerprint* risultanti da amplificazioni di più *loci* con un solo *primer*.

In questo lavoro riportiamo alcuni risultati ottenuti utilizzando diverse tecniche per la caratterizzazione genetica degli stessi animali. Il confronto tra le diverse metodiche ha messo in evidenza numerose indicazioni utili per decidere su quale base programmare un'estensiva applicazione dei marcatori del DNA per la determinazione della parentela negli animali di interesse zootecnico.

MATERIALI E METODI

La purificazione dei DNA, le digestioni con gli enzimi di restrizione, le elettroforesi, il *Southern blotting* e le ibridazioni sono stati eseguite come descritto da Sambrook *et al.* (6). Gli estratti grezzi di DNA genomici utilizzati nelle PCR sono stati preparati scaldando a 90° C per 10 minuti 105-107 cellule in 50 µl di TE (6) prima e dopo una digestione con proteinasi K (50 µg/ml) per 3 ore. Circa 20 ng di DNA purifcato ϕ 2 µl dell'estratto grezzo sono stati utilizzati nelle reazioni di PCR. Le condizioni di amplificazione sono quelle convenzionali mentre per la produzione di RAPD si è usata la procedura descritta in Fani *et al.* (3). Le sequenze sono state ottenute direttamente dai prodotti di PCR utilizzando il kit CircumVentTM (Biolabs). Abbiamo utilizzato il sistema computerizzato Bioprofil (Vilber Lourmat) per l'acquisizione e l'elaborazione delle immagini dei *patterns* elettroforetici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Scelta della tecnica

Le principali differenze tra la tecnica *Southern blotting* e la PCR sono rappresentate schematicamente nella figura 1.

Negli ultimi anni la tecnica di Southern è migliorata mediante l'utilizzazione di nuovi materiali. In particolare, oggi è possibile usare sistemi non radioattivi per evidenziare i segnali di ibridazione. Il *Southern blotting* rimane comunque una tecnica piuttosto laboriosa che, per la sua complessità, presenta problemi di riproducibilità certamente non inferiori a quelli della PCR. Per questo tipo di analisi sono necessari inoltre parecchi microgrammi di DNA purificato e diversi giorni di lavoro di un tecnico altamente qualificato. Il costo è di alcune migliaia di lire per ogni individuo analizzato.

La PCR è una tecnica più semplice, rapida ed economica delle tecniche di ibridazione ed è quindi logico preferirla per le analisi genetiche. A differenza della tecnica precedente, pochi nanogrammi di DNA non purificato e poche ore di lavoro sono sufficienti. Il costo è nell'ordine di diverse centinaia di lire per ogni individuo analizzato. L'attività dei nostri istituti e di altri gruppi di ricercatori ha portato allo sviluppo di una serie di test diagnostici basati sulla PCR utilizzabili in zootecnia. Quindi i laboratori attrezzati per eseguire questa metodica potranno utilizzarla non solo per la determinazione delle parentele ma anche per un numero sempre crescente

di diagnosi genetiche. La tecnica è simile nei diversi test: cambiano soltanto alcuni parametri della reazione (*primers* e temperature di reazione). Per ogni analisi sono sufficienti piccole quantità di materiale biologico contenente DNA non degradato (sangue, latte, tessuti, biopsie di embrioni, ecc.).

Per quel che riguarda la separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione, l'utilizzazione di gel di agarosio orizzontali è certamente una tecnica più semplice e meno pericolosa per l'operatore rispetto all'impiego di gel di acrilamide. Inoltre un gel di agarosio può essere utilizzato più volte. Il DNA può essere evidenziato mediante la colorazione con bromuro d'etidio o con altri sistemi (marcatura radioattiva, *silver staining*, fluorescenza o ibridazione) più sensibili anche se più complessi.

Sono in commercio attrezzature che consentono di automatizzare quasi tutti i passaggi necessari per l'amplificazione del DNA mediante PCR e la sua caratterizzazione elettroforetica anche se il loro costo attuale (alcune centinaia di milioni) è decisamente poco conveniente.

Scelta dei loci da analizzare

La figura 2 sintetizza le indicazioni emerse dal lavoro di questo istituto riguardo alle caratteristiche: informatività (I), ripetibilità (R) e semplicità (S) delle principali tecniche utilizzate per l'individuazione di diversi tipi di marcatori DNA altamente polimorfici.

La prima scelta da fare riguarda la possibilità di analizzare *fingerprint* complessi prodotti dalla rivelazione simultanea di numerosi *loci* o piuttosto profili elettroforetici più semplici prodotti dall'esame di singoli *loci*.

La tecnica più usata per produrre DNA *fingerprint* utilizza il *Southern blotting* e l'ibridazione con sonde di minisatelliti e oligonucleotidi. Esiste una vasta letteratura sui vantaggi e i limiti di questa procedura che consente di ottenere una buona tipizzazione individuale anche se l'identificazione dei genotipi ai diversi *loci* analizzati è spesso impossibile (1, 4, 6). Inoltre non è semplice ottenere fingerprint perfettamente riproducibili in esperimenti indipendenti.

È possibile ottenere dei DNA *fingerprint* anche amplificando simultaneamente più *loci* in una singola reazione di PCR. La tecnica più usata per produrre DNA *fingerprint* mediante la PCR è sicuramente quella denominata «RAPD *analysis*» (5). Amplificando DNA genomici in una reazione di PCR innescata da un solo *primer* con sequenza casuale si producono numerosi frammenti di DNA anonimi, di cui alcuni polimorfici, che possono mappare in *loci* differenti. Utilizzando genomi di vertebrati della stessa specie generalmente si ottengono *patterns* elettroforetici simili con poche bande polimorfiche. La tecnica è molto rapida e semplice ma i protocolli descritti in letteratura non consentono di ottenere facilmente RAPD *fingerprint* sufficientemente informativi e riproducibili. Per ovviare a questi inconvenienti nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un protocollo che consente di ottenere risultati riproducibili in esperimenti indipendenti. Inoltre utilizzando sequenze di elementi interspersi (come i retroposoni SINE e ALU) che sono associati a DNA ipervariabili abbiamo ottenuto la produzione di RAPD *fingerprint* sufficientemente polimorfici. Purtroppo i marcatori RAPD sono dominanti e quindi il loro impiego nella determinazione dei rapporti di parentela è limitato dall'impossibilità di identificare il completo genotipo degli animali analizzati. Questa limitazione riguarda quindi sia i DNA fingerprint ottenuti mediante la PCR che quelli prodotti utilizzando il *Southern*.

Solo l'analisi di singoli *loci* di cui sia possibile identificare tutti i diversi genotipi può consentire di mettere a punto delle procedure affidabili non solo per identificare la similarità genetica tra animali ma per poter ricostruire esattamente le genealogie.

La tendenza attuale dei ricercatori impegnati nell'identificazione di singoli *loci* ipervariabili è quella di caratterizzare microsatelliti costituiti dalla ripetizione di dinucleotidi. Purtroppo l'analisi di questi microsatelliti comporta l'uso di gel di acrilamide e di complessi sistemi di evidenziazione del DNA tanto che con uno sforzo analogo a quello necessario per la tipizzazione di un *locus* contenente un microsatellite è possibile determinare la sequenza di un frammento di DNA. Molte delle difficoltà tecniche necessarie per effettuare la tipizzazione di microsatelliti dinucleotidici possono essere superate ricorrendo all'analisi di microsatelliti costituiti dalla ripetizione di tetranucleotidi o di minisatelliti (VNTR). In questo caso è possibile evidenziare il polimorfismo utilizzando semplicemente un gel di agarosio e la colorazione del DNA con bromuro d'etidio. La caratterizzazione di DNA umani presenti in estratti grezzi con i VNTR dei *loci* apoB e D1S80 ha dato dei buoni risultati tranne nei casi in cui la quantità di DNA genomico era bassa (<1 ng). Purtroppo non sono descritti in letteratura molti VNTR nelle diverse specie di interesse zootecnico. Una valida alternativa all'uso dei VNTR consiste nell'amplificazione e digestione con enzimi di restrizione di sequenze di singoli *loci* genici ipervariabili.

Come esempio di questa procedura abbiamo sviluppato un metodo per l'amplificazione e la successiva digestione con enzimi di restrizione di una regione del gene DRB3 del sistema maggiore di istocompatibilità bovino (BoLA). Questo *locus* è una delle regioni più polimorfiche nei mammiferi. Utilizzando due successive reazioni di amplificazione dell'esone 2, la digestione dei prodotti di amplificazione e la corsa elettroforetica su gel di acrilamide sono stati identificati 30 diversi alleli del DRB3 (8). Ulteriori polimorfismi sono stati identificati in un microsatellite localizzato nell'introne fiancheggiante l'esone 2 (2). Sulla base di queste informazioni abbiamo deciso di amplificare una regione di circa 416-463 coppie di basi comprendente sia l'esone 2 che il microsatellite fiancheggiante. Sino ad oggi abbiamo amplificato questa regione a partire dal DNA di più di duecento animali indipendenti e di diverse famiglie ottenendo sempre una efficiente amplificazione di entrambi gli alleli. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati digeriti con diversi enzimi di restrizione e l'analisi dei frammenti di restrizione mediante gel d'agarosio (figura 3) ci ha permesso di identificare un numero di alleli maggiore di quelli già descritti. Le bande recuperate dal gel di agarosio possono essere sequenziate direttamente usando un sistema di sequenziamento ciclico degli stessi *primer* utilizzati nelle reazioni di amplificazione.

CONCLUSIONI

Esistono numerosi metodi di tipizzazione genetica utilizzabili per la determinazione della parentela. L'evoluzione tecnologica consente oggi di affiancare con successo ai marcatori proteici tradizionali i marcatori del DNA. A nostro parere l'identificazione dei genotipi di singoli *loci* ipervariabili amplificati in vitro mediante la PCR permette di ottenere il maggior numero di informazioni utili con il minor impegno e il più basso costo. La caratterizzazione dei prodotti di amplificazione mediante

gel di agarosio e colorazione con bromuro d'etidio consente di ottenere una notevole semplificazione dei materiali e delle tecniche utilizzate. Le informazioni acquisite sono facilmente archiviabili e consentono di ricostruire le genealogie in quanto i diversi alleli segregano in modo mendeliano semplice. Un singolo operatore può analizzare più di cento animali in un giorno di lavoro al costo di circa mille lire per animale. La procedura descritta per l'analisi del *locus* DRB3, assieme all'analisi di alcuni *locus* VNTR e di altre sequenze geniche ipervariabili come quelle che codificano per i recettori delle cellule T (TCR) e delle immunoglobuline, può consentire una chiaro, univoco ed economico controllo delle paternità nei bovini e in altre specie di interesse zootecnico.

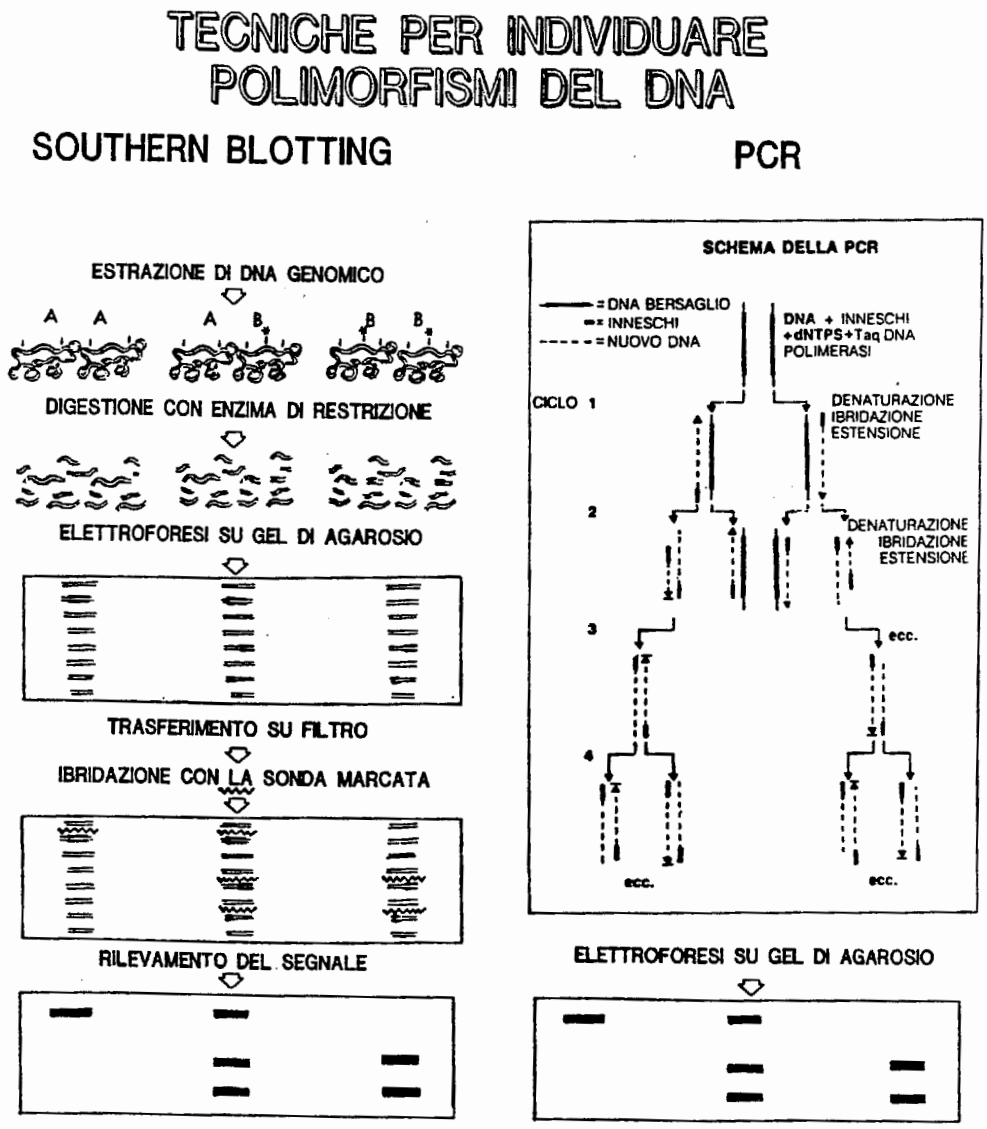


Figura 1 - Confronto tra le due principali tecniche usate per individuare polimorfismi del DNA: il *Southern blotting* (a destra) e la PCR (a sinistra).

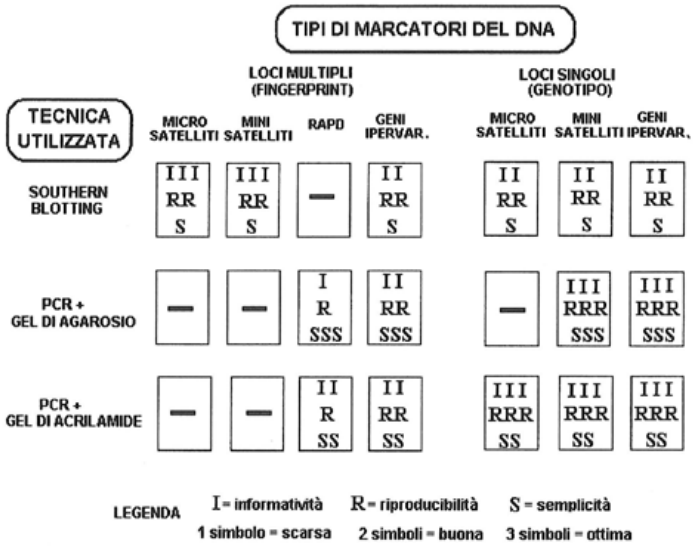


Figura 2 - Rappresentazione grafica di alcune caratteristiche (informatività, riproducibilità e semplicità) delle principali tecniche usate per l'individuazione di diversi tipi di marcatori del DNA altamente polimorfici.

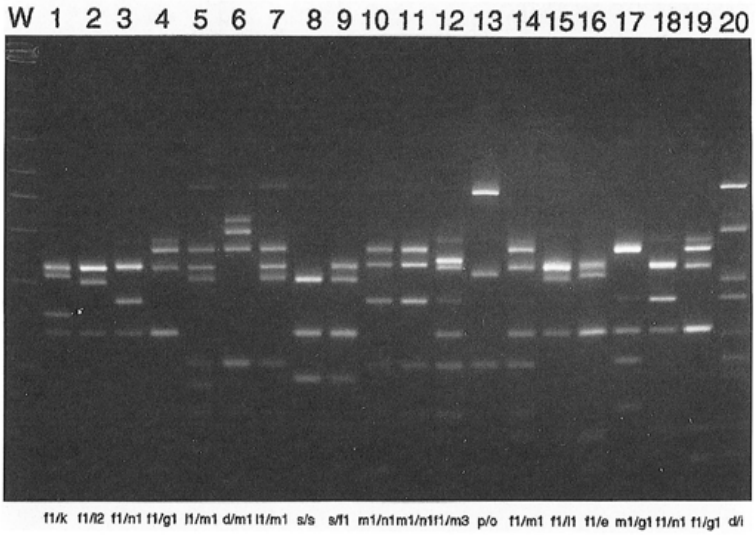


Figura 3 - Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei frammenti ottenuti digerendo con Rsa I i prodotti di amplificazione di una regione del gene DRB3 del BoLA comprendente l'esone 2 e il microsatellite fiancheggiante. Sono stati analizzati 20 soggetti scelti a caso e appartenenti alla razza bovina Reggiana (numeri da 1 a 20 in alto). In fondo alla figura sono indicati i genotipi dei diversi animali secondo la nomenclatura stabilita da Van Eijk *et al.* (8). La lettera W indica il marcatore di peso molecolare (50-2000 bp Ladder della Biorad).

BIBLIOGRAFIA

1) Amos B. e Pemberton J. (1992) *DNA fingerprinting in non-human populations.* Current Opinion in Genetics and Development *2*, 857-860.

2) Ellegren H., Davies C.J., Andersson L. (1993) *Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the BoLA-DRB3 gene: implications for microsatellite stability and PCR-based DRB3 typing.* Animal Genetics *24*, 269-275.

3) Fani R., Bandi C., Bardin M.G., Comincini S., Damiani G., Grifoni A., Bazzicalupo M. (1993) *RAPD fingerprinting is useful for identification of Azospirillum strains.* Microb. Releases *1*, 217-221.

4) Gilbert D.A., Packer C., Pusey A.E., Stephens J.C., O'Brien S.J. (1991) *Analytical fingerprinting in lions: parentage, genetic diversity, and kinship.* Journal of Heredity *82*, 378-386.

5) Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1991) *Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology.* Molecular Ecology *1*, 55-63.

6) Jeffreys A.J., Turner M., Debenham P. (1991) *The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships determined from extensive casework.* Am. J. Hum. Genet. *48*, 824-840.

7) Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual - Cold Spring Harbor Laboratory,* New York.

8) Van Eijk M.J.T., Stewart-Haynes J.A., Lewin H.A. (1992) *Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP.* Animal Genetics *23*, 483-496.

G. SAVOINI, V. CHIOFALO*, A. ZUMBO*, V. DELL'ORTO**

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI SOMATOTROPINA BOVINA RICOMBINANTE (rbST) IN PECORE DA LATTE ALIMENTATE CON DIETE A DIFFERENTE DEGRADABILITA' RUMINALE DEI CARBOIDRATI

Istituto di Zootecnica, Facoltà di Agraria - Piazza S. Francesco 6, 89061 (Reggio Calabria);
* Istituto di Zootecnica, Facoltà di Medicina Veterinaria - Via S. Cecilia 30, 98123 Messina;
** Istituto di Alimentazione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

È stata condotta una sperimentazione al fine di valutare gli effetti della somministrazione di somatotropina bovina ricombinante (rbST) sulla produzione e qualità del latte di pecore alimentate con diete contenenti carboidrati a diversa degradabilità ruminale. Quaranta pecore di razza Comisana sono state suddivise in 4 gruppi omogenei, che si differenziavano per il diverso tenore in amido e NDF del mangime: 1) gruppo AA (mangime ad alto tenore in amido, 34,16%/s.s.); 2) gruppo AA + rbST; 3) gruppo BA (mangime a basso tenore in amido, 12,29%/ s.s.); 4) gruppo BA + rbST. La somatotropina bovina a lento rilascio (Somidobove, Ely Lilly, Elanco) è stata somministrata in unica dose per un ciclo di 28 giorni (320 mg/capo). Il trattamento con rbST ha determinato un aumento significativo ($P < 0,001$) della produzione di latte. Il trattamento alimentare e l' rbST non hanno influenzato nè il tenore lipidico nè quello proteico del latte. Il trattamento con rbST non ha influenzato il contenuto in cellule somatiche del latte. L'impiego di carboidrati a diversa fermentescibilità ruminale e la somministrazione di rbST non hanno influenzato significativamente l'attitudine alla coagulazione del latte. Il pH del latte delle pecore alimentate con le diete ad alto tenore in amido è risultato significativamente inferiore a quello delle pecore che ricevevano le diete a più basso contenuto in amido.

Parole chiave: pecore - somatotropina bovina ricombinante (rbST) - latte - carboidrati.

THE EFFECTS OF RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPIN (rbST) ADMINISTRATION TO LACTATING EWES FED DIETS WITH DIFFERENT RUMEN CARBOHYDRATE DEGRADABILITY

SUMMARY

The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) treatment on milk yield and composition of lactating ewes fed diets with different rumen degradability of carbohydrate were investigated. Fourty Comisana ewes were divided into four groups: 1) group AA (concentrate high starch, 34,16% d.m.); 2) group AA + rbST; 3) group BA (concentrate low starch, 12,29% d.m.); 4) group BA + rbST. Recombinant bovine somatotropin (Somidobove Ely Lilly, Elanco) was injected once (320 mg/ewe)

for a cycle of 28 d. Milk production was increased ($P<0,001$) by rbST treatment. Dietary treatment and rbST did not affect milk fat and protein percentages and rennet milk coagulation. Somatoptropin did not affect milk somatic cell count. High starch concentrate lowered significantly milk pH.

Key words: sheep - recombinant bovine somatotropin (rbST) - milk - carbohydrate.

INTRODUZIONE

I positivi effetti della somministrazione di somatotropina bovina ricombinante (rbST) sulla produzione di latte nei ruminanti sono noti (1, 2, 7, 8, 9, 10). Per quanto riguarda in modo specifico la specie ovina non totalmente chiare risultano però le implicazioni del trattamento con somatotropina sia sul reale incremento produttivo ottenibile in funzione di differenti piani alimentari, sia sulla qualità del latte, che deve essere attentamente valutata considerando che il latte ovino è destinato alla trasformazione casearia.

Obiettivo della sperimentazione è stata la valutazione dell'influenza della somministrazione di somatotropina bovina ricombinante (rbST) sulla produzione e sulle caratteristiche qualitative di latte ovino, in funzione di differenti piani alimentari.

MATERIALI E METODI

Per la prova la cui durata totale è stata di 40 giorni, di cui 12 di adattamento alle diete e 28 di rilevamento dati, sono state utilizzate 40 pecore di razza Comisana, pluripare, al 2° mese di lattazione e con produzione iniziale media giornaliera di 0,970 Kg di latte. Sono stati costituiti 4 gruppi di 10 pecore cadauno, omogenei per produzione di latte, e che si differenziavano per la somministrazione di mangimi caratterizzati da diverso tenore in amido e NDF:

— gruppo AA mangime ad alto tenore in amido (34,16%/ s.s.) e basso tenore in NDF (19,91%/s.s.);

— gruppo AA + rbST;

— gruppo BA mangime a basso tenore in amido (12,29%/s.s.) e alto tenore in NDF (32,64%/ s.s.);

— gruppo BA + rbST.

La razione giornaliera era costituita da mangime (1,2 kg) la cui composizione analitica e chimica viene riportata nella tabella 1, da fieno di veccia (1 kg) e da pascolo costituito da erbaio polifita effettuato dalle ore 10 alle ore 16. La somatotropina bovina a lento rilascio (Somidobove Ely Lilly Elanco) è stata somministrata per via sottocutanea alle pecore appartenenti ai gruppi AA + rbST e BA + rbST, in unica dose per un ciclo di 28 giorni (320 mg/capo). Sono stati effettuati nei giorni 7, 14, 21 e 28, dalla somministrazione dell'rbST, controlli della quantità di latte prodotto, rilevata in 2 mungiture consecutive effettuate alle ore 16 e alle ore 6 del giorno successivo e sono stati prelevati campioni per valutare le percentuali di grasso e proteina del latte effettuate mediante Milkoscan (Foss Electric), il contenuto in cellule somatiche del latte mediante Fossomatic (Foss Electric); sono stati

inoltre valutati: il pH, l'acidità titolabile (°SH/100 ml) e i parametri inerenti l'attitudine alla coagulazione del latte: r (minuti), indice del tempo di formazione del coagulo; K_{20} (minuti), indice della velocità di formazione del coagulo e a_{30} (millimetri), indice della consistenza del coagulo. I dati covariati per i valori medi rilevati prima della somministrazione dell'rbST (giorno 0) (tabella 2), sono stati sottoposti ad analisi della varianza a 2 fattori (dieta e rbST).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La somministrazione di somatotropina bovina in pecore in lattazione ha determinato un aumento significativo ($P<0,001$) della produzione di latte (tabella 3), come osservato da Stelwagen e coll., (1993) indipendentemente dal tipo di dieta. L'andamento (figura 1) della produzione di latte conferma quanto riscontrato nella bovina da latte, infatti la massima risposta al trattamento è stata osservata una settimana dopo la somministrazione dell'rbST, in seguito si è rilevato un graduale calo della produzione (2).

La percentuale in grasso del latte (tabella 3), non è stata influenzata dal trattamento con rbST. Per quanto concerne l'andamento del tenore in grasso (figura 2) si è rilevato un incremento in corrispondenza della massima risposta produttiva al trattamento con rbST nel caso delle pecore alimentate con la dieta a basso tenore in amido, che può essere correlato ad una situazione di bilancio energetico negativo, in accordo con quanto osservato nelle bovine da latte (2), tale andamento non si è osservato invece nel caso delle pecore trattate con rbST e alimentate con la dieta ad elevato tenore in amido. Nè il trattamento con rbST nè il differente tenore in amido della dieta hanno influenzato il tenore proteico del latte, anche se i valori riscontrati nel latte delle pecore alimentate con la dieta ad alto tenore in amido sono risultati più elevati (tabella 3). È da rimarcare (figura 3) come il tenore proteico del latte delle pecore trattate con somatotropina, indipendentemente dal tipo di dieta somministrata, abbia fatto registrare un netto calo in corrispondenza del picco di produzione lattea. Tale andamento è probabilmente da collegarsi ad una momentanea situazione di bilancio azotato negativo (2, 6, 9). Il pH del latte prodotto dalle pecore alimentate con le diete a più alta fermentescibilità dei carboidrati (AA) ha presentato valori significativamente inferiori ($P<0,05$) rispetto a quello del latte prodotto dalle pecore del gruppo BA (tabella 3); l'acidità titolabile (° SH/100 ml), ha presentato valori più elevati per il latte delle pecore alimentate con la dieta ad alto tenore in amido, anche se le differenze non sono risultate statisticamente significative. Il trattamento con somatotropina bovina ricombinante non ha influenzato significativamente i parametri relativi alla coagulazione del latte (tabella 3), in accordo con Laurent e coll., (1993). È da sottolineare che con la somministrazione della dieta ad alto tenore in amido e senza trattamento con rbST, è diminuito sia il tempo che la velocità di formazione del coagulo mentre è aumentata la consistenza dello stesso. Il numero di cellule somatiche del latte, parametro che indica lo stato sanitario della mammella, non è stato influenzato significativamente dalla somministrazione di somatotropina.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano che la somministrazione di somatotropina bovina ricombinante (rbST) è in grado di incrementare significativamente la produzione di latte anche negli ovini oltre che nei bovini. La differente concentrazione in amido e fibra delle diete non ha influenzato la risposta al trattamento. Rimane da stabilire la dose minima per ottenere la massima risposta produttiva utilizzando un prodotto non destinato specificatamente agli ovini.

Interessante risulta evidenziare, considerata la destinazione del latte ovino, come il trattamento con somatotropina in pecore alimentate con diete a differente tenore in amido e fibra, non ha influenzato significativamente le caratteristiche qualitative del latte e l'attitudine alla trasformazione casearia, eccetto una riduzione del pH nel caso di somministrazione di diete ad elevato tenore in amido.

Tabella 1 - Ingredienti e composizione dei concentrati

ALIMENTI	«AA»	«BA»
Polpe di bietola secche	—	36%
Soia f.e. 42	18%	19,5%
Cruschello frumento	9,5%	11%
Orzo	16%	—
Carruba	8%	9%
Mais	23%	8%
Fava schiacciata	5%	5%
Girasole f.e. dec.	4%	4%
Lino panello	3%	3%
Farinaccio frumento	9%	—
Carbonato Ca	2%	2%
Fosfato bicalcico	1%	1%
Sodio cloruro	0,5%	0,5%
Int. min. vit.	1%	1%
Analisi (% S.S.)		
Sostanza secca	87,02	87,05
Proteina grezza	19,96	19,90
Estratto Etereo	1,48	1,85
NDF	19,91	32,64
ADF	8,70	16,63
AMIDO	34,16	12,29

Tabella 2 - Produzione e caratteristiche del latte al giorno 0

	AA	BA	AA + rbST	BA + rbST
Latte (g)	1088	902	929	897
Grasso (%)	8,04	8,57	8,32	7,56
Proteina (%)	5,96	5,83	5,94	5,60
Cell. Som. x 1000	138	220	148	227
pH	6,67	6,74	6,74	6,8
°SH/100 ml	11,96	11,02	11,6	9,62
r (min)	18,67	20,03	24,63	20,72
K_{20} (min)	2,69	3,39	3,27	3,96
a_{30} (mm)	48,25	45,83	33	44,16

Tabella 3 - Produzione e caratteristiche del latte

	AA	BA	AA + rbST	BA + rbST	ES
Latte (g) (1)	1085,2	882,8	1307,9	1199,1	81,33
Grasso (%)	7,61	7,81	7,67	7,02	0,39
Proteina (%)	6,02	5,87	5,92	5,59	0,10
Cell. Som. x 1000 (2)	115	198	129	140	0,23
pH (2)	6,57	6,64	6,59	6,66	0,02
°SH/100 ml	12,11	11,36	11,98	10,13	0,43
r (min)	15,97	18,88	18,22	18,18	1,94
K_{20} (min)	2,71	2,94	2,90	3,03	0,31
a_{30} (mm)	53,33	48,54	47,20	49,14	5,40

(1) Effetto rbST ($P < 0,001$)
(2) Effetto dieta ($P < 0,05$)

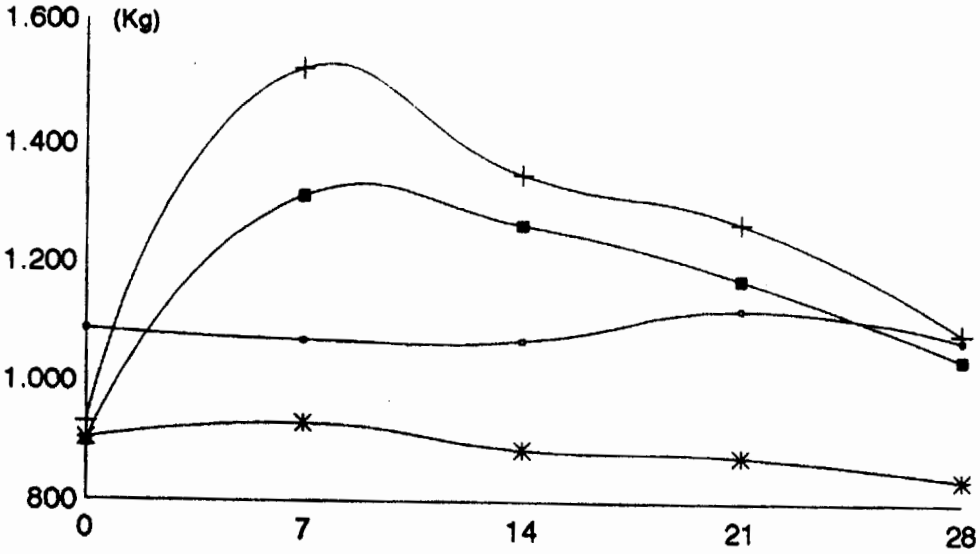


Figura 1 - Effetto dell'rbST e della dieta sulla produzione di latte.

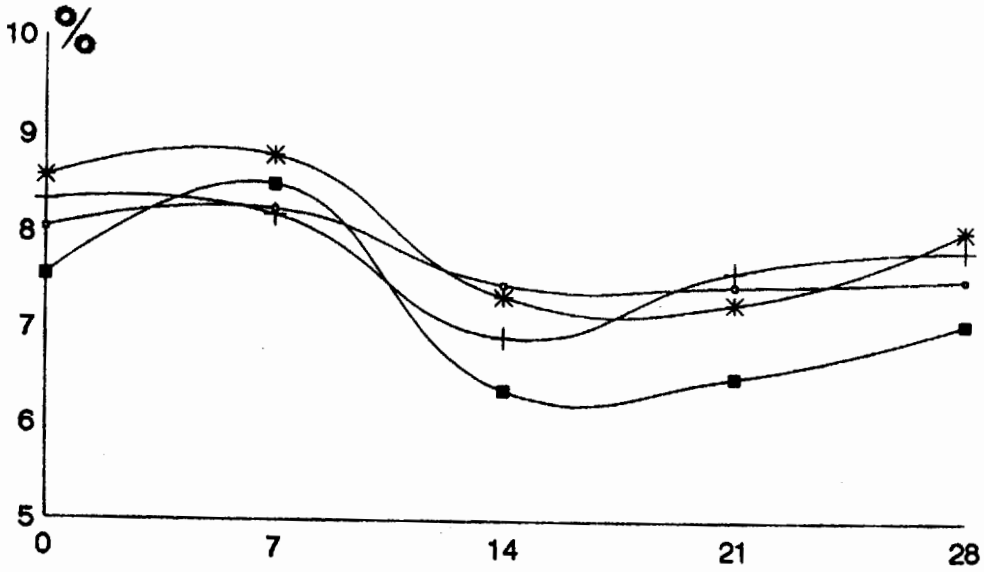


Figura 2 - Effetto dell'rbST e della dieta sulla % di grasso del latte.

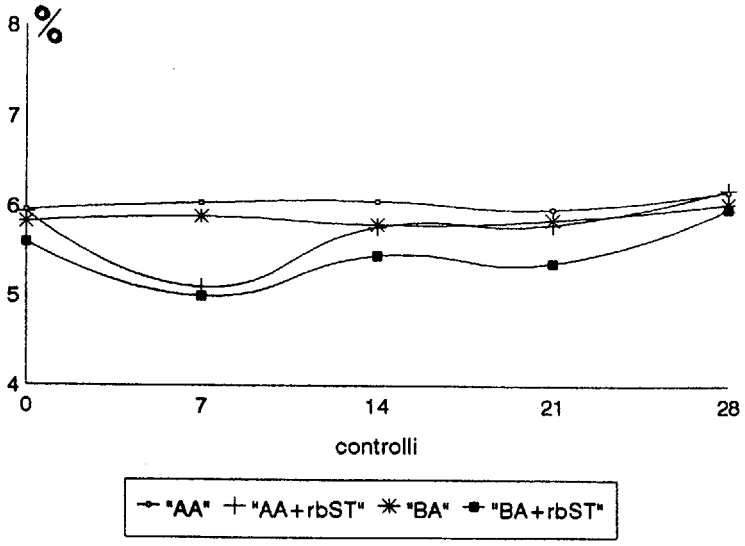


Figura 3 - Effetto dell'rbST e della dieta sulla % di proteina del latte.

BIBLIOGRAFIA

1) HILLIARD Y. (1988) *Rôles et mècanismes d'action de la somatotropine (hormone de la croissance) chez les ruminants en lactation.* Reproduction Nutrition Development *28*, 35-39.

2) DELL'ORTO V., SAVOINI G. (1991) *Recombinant bovine somatotropin (rbST) treatment in dairy cows: effects on ruminal activity and milk properties.* Microbiologie-Aliments-Nutrition *9*, 121-132.

3) DISENHAUS C., HERVIEU J., TERNOIS F., JAMMES H., KANN G., SAUVANT D. (1992) *Influence d'injections quotidiennes de somatotropine bovine recombinèe (rbST) sur la production laitiére, l'ingestion et l'ètat nutritionnel de la chévre en lactation.* Annales de Zootechnie *41*, 109-110.

4) HART I.C., CHADWICK P.M.E., JAMES S., SIMMONDS A.D. (1985) *Effect of intravenous bovine growth hormone-releasing factor on milk production and plasma hormones and metabolites in sheep.* Journal of Endocrinology *105*, 189-196.

5) LAURENT F., VIGNON B., COOMANS D., WILKINSON J., BONNEL A. (1992) *Influence of bovine somatotropin on the composition and manufacturing properties of milk.* Journal of Dairy Science *75*, 2226-2234.

6) MC BRIDE B.W., BURTON J.L., BURTON J.H. (1988) *The influence of bovine growth hormone (Somatotropin) on animals and their products.* Res. Dev. Agric., 5:1.

7) PEEL C.J., BAUMAN D.E. (1987) *Somatotropin and lactation.* Journal Dairy Science *70*, 474-486.

8) SGOIDO ROSSI C.A., SENATORE E.M., SAVOINI G., DELL'ORTO V., FANTUZ F., POLIDORI F. (1993) *The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) and calcium soaps on Italian buffalo (Bubalus bubalis) milk yield and composition.* Journal Animal Science *71* (suppl. 1), 274.

9) SAVOINI G., VAN VUUREN A.M., VAN DER KOELEN C.J., (1992) *The effect of daily administration of recombinantly-derived somatotropic hormone on feed intake, digestibility, milk composition and rumen fermentation in dairy cows.* J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. *68*, 185-196.

10) STELWAGEN K., GRIEVE D.G., WALTON J.S., BALL J.L., MC BRIDE B.W. (1993) *Effect of prepartum bovine somatotropin in primigravid ewes on mammogenesis, milk production, and hormone concentrations.* Journal Dairy Science *76*, 992-1001.

L.P. SCORDAMAGLIA, C. RENIERI*, F. VALFRÈ**

BIOTECNOLOGIE APPLICATE AL RICONOSCIMENTO ED ALLA VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI QUALITA' DELLE CARNI: VARIABILITÀ FENOTIPICA E GENETICA DELLE PROTEINE MUSCOLARI

Istituto di Produzioni Animali - Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia;
* Facoltà di Medicina Veterinaria di Camerino - Via Fidanza 15 - 62024 Matelica (MC);
** Istituto di Zootecnia Generale - Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano

RIASSUNTO

Il lavoro prende in considerazione le principali implicazioni biotecnologiche applicabili allo studio della qualità della carne nei mammiferi domestici di interesse zootecnico. È descritta dettagliatamente la variabilità fenotipica e genetica delle principali componenti proteiche strutturali del muscolo e delle proteasi lisosomiali. Sono brevemente riportate le linee di ricerca seguite relativamente allo studio del polimorfismo genetico delle catene pesanti delle miosine.

Parole chiave: proteine muscolari - proteasi lisosomiali - qualità della carne - MHC.

BIOTECHNOLOGY AND MEAT QUALITY: PHENOTYPIC AND GENETIC POLIMORPHISM OF MUSCLE PROTEINS

SUMMARY

Phenotypic and genetic polimorphisms of muscle protein components and lisosomial proteases and their relationship with meat quality parameters are described. A short review on research lines about genetic polimorphism of heavy chain of myosin is presented.

Key words: muscle protein - lisosomial proteases - meat quality - MHC.

INTRODUZIONE

La ricerca sulla qualità della carne nelle principali specie di mammiferi domestici si è poco interessata finora del rapporto tra i parametri fisico-organolettici e la struttura istologica e molecolare del muscolo e del connettivo. Le uniche osservazione a tale proposito di riferiscono infatti all'influenza sulla tenerezza e sulla tessitura delle carni del polimorfismo sia delle fibre muscolari (6) che del collagene (1). Le

Lavoro eseguito con un contributo del CNR, nell'ambito del PF RAISA, sottoprogetto 3. Pubblicazione n. .

caratteristiche differenziali delle fibre muscolari sono il risultato della combinazione sia dei diversi tipi di proteine che delle diverse isoforme esistenti per alcune di tali proteine. Una discreta variabilità fenotipica esiste anche per il collagene. Appare necessario quindi approfondire la conoscenza della variabilità fenotipica e genetica di tali sistemi proteici.

Un'applicazione biotecnologica già avanzata è rappresentata invece dallo studio dei geni interessati e dei metodi di identificazione degli animali portatori nell' ipertermia maligna del suino.

Infine, un campo di applicazione ancora tutto da scoprire è rappresentato dalla possibilità di utilizzo di proteasi lisosomiali, quali le catepsine, per il miglioramento biologico e/o tecnologico dei parametri di qualità organolettica delle carni.

VARIABILITA' FENOTIPICA E GENETICA DELLE COMPONENTI PROTEICHE DELLA CARNE

Proteine contrattili

La miosina rappresenta circa il 55% delle proteine totali del tessuto muscolare. È costituita da due catene pesanti (*heavy chains*) del peso molecolare di circa 200.000 *daltons* e da quattro catene leggere (*light chains*), del peso variabile tra i 17 ed i 21.000 *daltons*. Nell'ambito delle catene pesanti è possibile distinguere due differenti domini: la porzione globulare, amino-terminale, responsabile del legame con le catene leggere e dell'attività ATPasica e la porzione carbossi-terminale, con struttura ad a-elica, che costituisce la parte filamentosa della proteina. Le catene leggere sono associate alla porzione globulare di quelle pesanti ed hanno un'attività regolatrice sull'attività ATPasica. Nei diversi tessuti muscolari (liscio, striato, cardiaco) sono stati individuati isoformi diversi sia delle catene pesanti (MHC) che di quelle leggere (MLC); l'espressione di tali isoforme è rigidamente regolata sia nello spazio che nel tempo. Nei mammiferi sono stati individuati almeno 11 isoformi MHC differenziati sulla base del tipo di cellula in cui compaiono e del periodo di sviluppo dell'organismo: 1 *super fast skeletal*, 2 *adult fast skeletal*, 1 *perinatal skeletal*, 1 *embryonic/fetal skeletal*, 2 *cardiac*, 1 *adult slow skeletal*, 1 *smooth muscle*, 2 *non muscle* (8). Durante lo sviluppo del tessuto scheletrico si verifica una transizione sequenziale dei differenti isoformi scheletrici MHC da quelli embrionali/fetali a quelli perinatali e quindi adulti. Questo fenomeno è stato dimostrato in diverse specie anche attraverso l'isolamento di forme differenti di RNAm. Il problema principale che si è posto nello studio del determinismo genetico di tali proteine è stato quello di riuscire a comprendere se tali isoformi fossero codificati da differenti geni o se rappresentassero invece il prodotto differenziato di un unico gene attraverso fenomeni di *splicing* alternativo o di modificazioni post-traduzionali. L'esistenza di geni differenti per le catene pesanti della miosina (geni MHC) è stata dimostrata da numerosi lavori nell'uomo, nel topo, nel pollo ed anche nel bovino (4). Tuttavia, soltanto un singolo gene MHC è stato osservato nella drosofila. In generale è possibile affermare che, nella maggior parte dei casi, le catene pesanti della miosina sono codificate da una famiglia multigenica caratterizzata da un elevato grado di omologia tra le diverse specie. Diverso parrebbe essere invece il determinismo gene-

tico delle catene leggere i cui differenti isoformi deriverebbero essenzialmente da fenomeni di *splicing* alternativo. Attraverso l'assemblaggio di esoni diversi dello stesso gene si avrebbe quindi la sintesi di proteine differenti.

L'actina, altra importante proteina contrattile, rappresenta circa il 25% delle proteine muscolari. L'actina globulare ha un peso molecolare di 45.000 *daltons*; polimerizzando essa forma l'actina filamentosa. Nei vertebrati superiori sono stati individuati 6 differenti isoforme tessuto-specifiche di tale proteina: 4 tipi muscolari (scheletrico, cardiaco, e due della muscolatura liscia) e 2 tipi non-muscolari (actina citoplasmatica). Nel tessuto muscolare scheletrico, quindi, sarebbe espressa essenzialmente un'unica isoforma di actina (a-actina). La variabilità fenotipica sembrerebbe quindi ridotta rispetto a quella osservata nella miosina. A livello genetico, il problema è però molto complesso; diversi autori, infatti, in lavori eseguiti nella specie umana, hanno messo in evidenza l'esistenza di almeno 20 differenti geni responsabili della sintesi di tale proteina. In generale si può affermare che, anche in questo caso si tratta comunque di una famiglia multigenica, altamente conservata nella scala evolutiva. Esiste infatti nella sequenza aminoacidica della proteina una differenza di appena il 4% tra l'actina del *Physarum* e quella dei mammiferi.

Anche la tropomiosina, pur essendo quantitativamente meno rappresentata rispetto alle prime due, ha una funzione essenziale nel sistema contrattile muscolare; ogni dimero di questa proteina filamentosa interagisce con 7 monomeri di actina ed è associata ad un complesso di troponina. Anche per la tropomiosina sono stati individuati nelle diverse specie animali differenti isoformi muscolari e non. Tra gli isoforme muscolari, la tropomiosina a risulta prevalente nei muscoli a contrazione rapida mentre la β in quelli a contrazione lenta; in quest'ultimo tipo di muscolo sono stati individuati altre due isoforme indicate rispettivamente con ϕ e δ. Risultati analoghi sono stati ottenuti nel pollo, nel gatto e nel bovino Anche in questo caso la variabilità fenotipica osservata dipenderebbe essenzialmente dall'esistenza di una famiglia multigenica derivante da duplicazioni successive di un gene ancestrale. Nei vertebrati superiori sono stati identificati 4 differenti geni responsabili della sintesi di isoformi diversi. La maggior parte delle isoforme della tropomiosina muscolare sono codificati in particolare da due geni indicati rispettivamente con α e β TM. Il gene αTM da solo è in grado di sintetizzare nove differenti isoformi attraverso fenomeni di *splicing* alternativo e *promoters* alternativi. Nel ratto, ad esempio, questo gene contiene 15 esoni, di cui soltanto 5 comuni a tutti gli RNAm maturi espressi dal gene. Alcuni di questi esoni sono espressi in maniera tessuto-specifica (es.9a negli isoformi del tessuto muscolare striato) e codificano per domini funzionali distinti della molecola di tropomiosina.

La troponina è una molecola globulare costituita da tre subunità: la troponina T, in rapporto con la tropomiosina; la troponina I, collegata con l'actina, e la troponina C che presenta un'elevata affinità per gli ioni Ca^{2+}. A differenza delle altre proteine contrattili, la troponina presenta una variabilità fenotipica ridottissima. Confrontando la struttura primaria della troponina C umana con quelle isolate rispettivamente nel tessuto muscolare scheletrico del coniglio ed in quello cardiaco del bovino, è stata osservata un'unica differenza aminoacidica. Si tratta quindi di una proteina altamente conservata che non sembra presentare variazioni legate alla tessuto-specificità.

Collagene

Il collagene rappresenta la proteina più abbondante nei vertebrati superiori; è presente nella matrice extracellulare dei tessuti connettivi, generalmente associato con proteoglicani, glicoproteine ed elastina. Si tratta di una grossa proteina fibrosa la cui unità fondamentale è rappresentata da una molecola a forma di spirale strettamente assemblata denominata tropocollagene, del peso di circa 300.000 *dalton*, lunga circa 3000Å e con un diametro di 15Å. Ciascuna molecola di tropocollagene è costituita da tre catene polipeptidiche avvolte in una triplice elica; questa particolare conformazione è resa possibile dalla sequenza aminoacidica delle catene caratterizzata dalla presenza della glicina ogni tre aminoacidi. Essendo infatti l'aminoacido più piccolo, la glicina si adatta perfettamente allo spazio ristretto del punto in cui le tre catene si uniscono.

La struttura generale di tali catene (catene a) può essere così rappresentata: $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_{333}$; si tratta in pratica della ripetizione di un singolo monomero costituito da una tripletta che si ripete circa 333 volte. Pur potendo variare, X ed Y sono rappresentate nella maggioranza dei casi rispettivamente dalla prolina e dall'idrossiprolina; a volte, la posizione Y è occupata dall'idrossilisina. Anche l'alanina è presente nel collagene in una certa quantità, mentre l'unico aminoacido assente è il triptofano.

Fino ad oggi sono state individuate differenti tipi di catene a sulla base della loro composizione aminoacidica e del loro comportamento elettroforetico. Tali catene sono identificate da numeri romani progressivi nell'ordine cronologico della loro scoperta.

Ogni differente tipo di collagene è composto o da tre catene identiche o da due identiche ed una differente. Nell'uomo, la famiglia delle proteine del collagene è costituita da almeno 9 differenti tipi di collagene le cui catene sono codificate da almeno 17 geni.

Il collagene tipo I è quello predominante nel tessuto connettivo della pelle, dell'apparato tendineo-muscolare e del tessuto osseo. La proteina è costituita da due catene a1 ed una a2, ciascuna delle quali codificata da un RNAm monocistronico . La differenza di questo tipo di collagene nei tre differenti tessuti è legata essenzialmente al grado di idrossilazione dei residui di prolina e lisina ed alla conseguente formazione di *crosslinks*. Va infatti ricordato che l'idrossilazione di questi due aminoacidi, che avviene a livello del reticolo endoplasmatico prima che le catene a si uniscano a formare il tropocollagene, è essenziale per la formazione dei legami idrogeno tra le catene che rendono possibile la stabilizzazione della tripla elica.

Tromp e coll. (7) hanno isolato per la prima volta un clone cDNA *full lenght* per il gene COL1A1 (responsabile della sintesi della catena a1), assegnato successivamente da Sundar Ray (1977) al cromosoma 17. Attraverso *in situ hybridization* alcuni autori hanno localizzato più precisamente il gene sul braccio lungo di tale cromosoma, probabilmente nella banda 17q21 o 17q22. Interessante sottolineare l'associazione esistente tra tale gene e quello che codifica per l'ormone dell'accrescimento; tra i due geni è stata osservata una frequenza di ricombinazione di 0.10. Nell'uomo sono state individuate alcune mutanti del gene COL1A1 responsabili di alcune patologie ereditarie in cui la proteina corrispondente, modificata nella sequenza aminoacidica, presenta caratteristiche anomale tra cui una ridotta stabilità termica.

Il gene COL1A2, responsabile della sintesi della catena a2, è stato invece assegnato al cromosoma 7; mutazioni dominanti a carico di tale gene sono considerate responsabili di forme ereditarie di Osteogenesi Imperfetta.

Tali geni sono stati iindividuati anche nel topo dove, secondo alcuni autori, sarebbero entrambi localizzati sul cromosoma 16. Si tratterebbe di un gruppo di *linkage* altamente conservato con un'elevata omologia nei confronti dei corrispondenti geni umani del cromosoma 17. Lavori successivi nell'uomo hanno consentito l'identificazione dei loci responsabili della sintesi delle catene degli altri 8 differenti tipi di collagene, quantitativamente meno rappresentati rispetto al tipo I.

Le molecole di collagene identificati nel tessuto muscolare degli animali domestici sono essenzialmente 4: tipo I, III, IV e V, diversamente distribuiti. Nel tessuto connettivo dell'epimisio, sono presenti esclusivamente i tipi I (più rappresentato) e III (in scarsa quantità); nel perimisio oltre ai primi due tipi già citati, compare anche il tipo V; nell'endomisio si ritrovano anche piccolissime quantità del tipo IV (2). Vista la loro maggiore importanza, numerosi autori hanno studiato la proporzione relativa dei tipi I e III di collagene intramuscolare in diverse specie di interesse zootecnico.

Elastina

Le fibre di elastina sono costituite da due componenti distinte: una componente amorfa più abbondante ed una componente microfibrillare. L'elastina è composta prevalentemente da glicina, prolina, e da altri residui idrofobici e contiene molti legami crociati derivati dalla lisina. I domini della frazione idrofobica e dei legami crociati sono codificati da piccoli esoni (27-114 bp), separati da grandi introni. Il prodotto iniziale della traduzione è un polipeptide di 72000 *daltons* denominato tropelastina. Utilizzando un cDNA di elastina ovina è stato mappato il gene dell'elastina umana al cromosoma 7. Sono stati descritti anche *splicing* alternativi dello RNAm, che farebbero pensare all'esistenza di isoforme diverse della proteina.

La proteina è idrolizzata da specifiche elastasi, secrete da leucociti, magrofagi e a livello di pancreas, i cui geni appaiono essere altamente conservati tra uomo, suino, ratto e bovino. L'elastasi pancreatica tipo I del suino è stata clonata.

Regolazione dell'espressione genica

La composizione finale del tessuto muscolare è il risultato dell'espressione differenziata dei geni che codificano per i differenti componenti fin qui presi in esame; particolare importanza riveste quindi la conoscenza dei meccanismi e dei fattori che intervengono nel regolare l'espressione di tali geni. Nella regione 5' non-trascritta dei geni MHC (catene pesanti della miosina) sono state individuati degli elementi che, sotto l'azione dell'ormone tiroideo, attivano o reprimono il processo di trascrizione. Fattori *trans-acting*, generalmente rappresentati da proteine, favoriscono o inibiscono l'attacco della RNA polimerasi al sito promotore regolando l'espressione del gene corrispondente. Geni appartenenti alla stessa famiglia hanno generalmente sequenze regolatrici simili per cui è molto probabile che la loro espressione sia regolata dalle stesse proteine.

È nota, ad esempio, l'importanza che gli ormoni tiroidei hanno nel mantenere l'equilibrio tra i differenti tipi di fibra nel tessuto muscolare adulto. Trattamenti sperimentali con T3 e T4 provocano a livello del soleo (muscolo caratterizzato prevalentemente dalla presenza di fibre rosse) un aumento dell'attività ATPasica ed una trasformazione (*switching*) degli isoformi MHC da *slow* a *fast*. Al contrario, una condizione di ipotiroidismo provoca un effetto opposto, con un aumento delle fibre rosse legato essenzialmente ad un aumento dei processi di trascrizione dei geni *slow* MHC. Studi recenti hanno evidenziato che l'ormone tiroideo (T3) agisce attivando la trascrizione del gene *skeletal fast* MHC e dell'*a-cardiac* MHC; più precisamente, tale ormone si legherebbe ad un recettore citoplasmatico (proto-oncogene *c-erb receptor*) che andrebbe ad agire direttamente sulle sequenze regolatrici dei geni in questione. Anche il testosterone contribuisce attraverso meccanismi analoghi alla definizione del tipo di muscolo; tale ormone tende infatti a trasformare il tipo di fibra da un metabolismo prevalentemente ossidativo ad uno prevalentemente glicolitico. In definitiva, è possibile affermare che la struttura ultima del muscolo è il risultato dell'informazione genetica mediata nella sua espressione da una serie di fattori quali l'equilibrio ormonale e l'esercizio muscolare.

Proteina calcium release channel (procine ryanodine receptor)

La proteina CRC (*Calcium Release Channel*) entra nella costituzione dei canali per il rilascio del calcio a livello del reticolo sarcoplasmatico; tale proteina, anche denominata *ryanodine receptor*, è codificata dal gene CRC; una mutazione di tale gene al nucleotide 1843, (timina per citosina) determina la sostituzione di una arginina con una cisteina in posizione 615; viene codificata così una variante proteica considerata responsabile dell'ipertermia maligna, attraverso una mancata decontrazione della muscolatura scheletrica causata dal mancato riassorbimento degli ioni calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico. Lo stesso sistema viene chiamato in causa per spiegare la sensibilità all'alotano dei suini.

A tutt'oggi non è ancora chiaro se esiste e quanto è significativo il rapporto tra tale sistema e la comparsa delle due condizioni di PSS (Sindrome da *stress*) e PSE (carni pallide, soffici ed essudative) nel suino. Malgrado ciò, parecchi programmi di eradicazione delle due condizioni sopra elencate utilizzano l'identificazione dei genotipi per l' ipertermia maligna come criterio di selezione (5).

Proteasi lisosomiali

La rottura dei lisosomi conseguente alla morte dell'animale permette la liberazione di un sistema enzimatico protagonista dei processi maturativi della carne. Si tratta in generale di idrolasi, responsabili della digestione di acidi nucleici, mucopolisaccaridi, glicogeno e proteine; in quest'ultimo caso si parla di catepsine e collagenasi, entrambe responsabili della risoluzione del *rigor mortis* e della iniziale digestione delle proteine muscolari.

Le catepsine comprendono un gruppo di proteasi intracellulari presenti nei tessuti dei vertebrati e degli invertebrati. Tra queste, particolare importanza rivestono alcune proteasi cisteino-dipendenti comprendenti le catepsine B, H ed L, strutturalmente legate alla papaina. La catepsina A è strutturalmente simile alla pepsina con un'atti-

vità ottimale ad un pH di 5.6. La catepsina C e quella D svolgono rispettivamente un'azione di aminopeptidasi e carbossipeptidasi. Le diverse catepsine sono codificate da *loci* associati; il *cluster* delle catepsine B, H ed L è stato assegnato, nell'uomo, a 11p13, mentre il gene strutturale della catepsina D mappa nella regione 11q12. Altre catepsine individuate nell'uomo sono la A e la E.

Nell'uomo è stata individuata una collagenasi tipo IV (CLG 4), metalloproteinasi che taglia specificamente il collagene tipo IV, il maggior componente strutturale delle membrane basali. Alcuni Autori hanno assegnato nell'uomo il gene CLG 4 a 16q21.

LINEE DI RICERCA SEGUITE

La nostra unità operativa ha affrontato lo studio del polimorfismo genetico delle catene pesanti della miosina nel bovino nel tentativo di mettere in evidenza l'esistenza di una condizione di polimorfismo RFLP nei *loci* corrispondenti. Vista l'attuale impossibilità di disporre di *probes* specie-specifiche, tale indagine viene eseguita utilizzando *probes* MHC isolate in altre specie, a motivo dell'elevato grado di omologia interspecifica descritta per tali geni in letteratura. Finora le *probes* da noi utilizzate sono state le seguenti (8):

1) 320-bp Pst I-Pst I *fragment* del pMHC2.2 (*mouse embryonic skeletal*);
2) 250-bp Pst I-Pst I *fragment* del pMHC16.2A (*mouse perinatal MHC*);

Tali *probes* sono state marcate mediante *nick-traslation* con ^{32}P ed ibridizzate in esperimenti di *Southern blotting* su DNA genomico bovino. Con entrambe le *probes* non è stato ottenuto alcun segnale di ibridizzazione, a differenza di quanto ottenuto da Richter e coll. (4) con una *probe* costituita da un clone cDNA MHC di quaglia. Tentativi successivi verranno eseguiti utilizzando altre *probes*.

Un lavoro analogo è stato eseguito recentemente nella specie ovina dove è stato utilizzato come *probe* un clone cDNA umano MIHC (clone cHNKp1). In questo lavoro, Phua e coll. (1993) hanno individuato tre frammenti allelici PstI al locus M1HC: allela A1, di 4.4 Kb; allele A2, di 4.1 Kb; allele A3, di 2.9 Kb, che hanno presentato, in 28 individui non imparentati, una frequenza rispettivamente di 0.52 (A1), 0.39 (A2) e 0.09 (A3); l'eredità codominante dei tre alleli è stata confermata seguendone la segregazione in 5 famiglie per due generazioni.

Lo studio dei rapporti tra polimorfismo genetico e polimorfismo fenotipico dei componenti del muscolo sin qui analizzati risulta particolarmente complesso. L'isolamento e la caratterizzazione dei geni che codificano per i differenti isoformi proteici è un procedimento estremamente lungo e rischia inoltre di risultare inapplicabile per il miglioramento dei caratteri qualitativi del prodotto carneo. In particolare, l'obiettivo da perseguire sarà quello di trovare la relazione più diretta tra i diversi livelli di polimorfismo (fenotipico proteico, RFLP e genico) ed i parametri di qualità desiderati. A questo scopo, l'unità operativa ha iniziato ad affiancare allo studio del polimorfismo genetico quello proteico, pur consapevoli della notevole complessità dello studio di proteine così complesse quali quelle strutturali del muscolo.

BIBLIOGRAFIA

1) LIGHT N., CHAMPION A.E., VOGLE C., BAILEY A. (1985) *The role of epimysial, perimysial and endomisyal collagen in determining texture in six bovine muscles.* Meat Sci. *13*, 137-149.

2) MOHR V., BENDALL J.R. (1969) *Constitution and physical chemical properties of intramuscolar connective tissue.* Nature *233*, 404-405.

3) PHUA S.H., COLLINS L.J., WOOD N.J., DAVIDSON B.P. (1993) *A three-allele PstI RFLP at the ovine locus for myosin I heavy chain-like proteine (M1HC).* Animal genetics *24*, 150.

4) *Richter H.E., Young R.B., Hudson J.R., D.M. Mariarity* (1987) *Screening of a bovine genomic library for myosin heavy-chain genes.* J. Anim. Sci. *64* 607-614.

5) RUSSO V., DAVOLI R., TAGLIAVINI J., DALL'OLIO S., BIGI D., COSTOSI E., COSCELLI M.B., FONTANESI L. (1993) *Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'alotano a livello di DNA mediante PCR.* Zoot. Nutr. Anim. *1*, 89-93.

6) TOTLAND G.K., KRYUI H., SLINDE E. (1988) *Composition of muscle fibre types and connettive tissue in bovine m. Semitendinosus and its relation to tenderness.* Meat Sci. *23*, 303-315.

7) TROMP G., KUIVANIEMI H., STACEY A., SHIKATA H., BALDWIN C.T., JAENISCH R., PROCKOP D.J. (1988) *Structure of a full-lenght cDNA clone for the prepro-alpha I.-chain of human type I procollagen.* Biochem J. *253*, 919-922.

8) WEYDERT A., DAUBAS P., LAZARIDIS I., BARTON P., GARNER I., LEADER D.P., BONHOMME F., CATALAN J., SIMON D., GUÈNET J.L., GROS F., BUCKINGHAM M.E. (1985) *Genes for skeletal muscle myosin heavy chains are clustered and are not located on the same mouse chromosome as a cardiac myosin heavy chain gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *82*, 7183-7187.

M.G. BARDIN, C. BANDI[1], G. DAMIANI

STIMA DELLA STRUTTURA GENETICA DI ALCUNE POPOLAZIONI BOVINE MEDIANTE L'ANALISI DI CAMPIONI COSTITUITI DALL'UNIONE DI DNA INDIVIDUALI

Istituto per la Difesa e la Valorizzazione del Germoplasma Animale, CNR,
via Celoria 10 — 20133, Milano e
[1] Istituto di Patologia Generale Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,
via Celoria 10 — 20133 Milano

RIASSUNTO

L'analisi della diversità genetica delle popolazioni di animali domestici è importante per la loro conservazione ed utilizzazione. Le analisi di marcatori del DNA polimorfici consentono di ottenere utili indicazioni sulla struttura genetica di una popolazione. Purtroppo per stimare la diversità genetica entro e tra popolazioni è spesso necessario analizzare un gran numero di *loci* in numerosi individui. Per superare questa limitazione abbiamo verificato la validità dell'analisi mediante PCR di campioni costituiti dall'unione di DNA individuali (*bulked analysis*). Sono stati amplificati diversi RAPD e singoli *loci* a partire da DNA individuali e mescolati di 140 bovini appartenenti a sette diverse razze italiane (Frisona, Grigio Alpina, Pezzata Rossa, Reggiana, Chianina, Maremmana e Piemontese). Dopo digestione dei prodotti di amplificazione con diversi enzimi di restrizione abbiamo confrontato i risultati ricavati dall'analisi individuale con quelli ottenuti dall'analisi di insiemi di individui della stessa popolazione. Generalmente abbiamo osservato che i profili elettroforetici prodotti a partire da DNA mescolati corrispondono ad una sovrapposizione dei profili individuali. I risultati ottenuti confermano l'utilità della *bulked analysis* per monitorare la variabilità delle popolazioni animali sottoposte a processi di selezione.

Parole chiave: variabilità genetica - *bulked analysis* - PCR - RFLP - RAPD

RAPID ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN CATTLE POPULATIONS USING AMPLIFICATION OF BULKED GENOMIC DNA SAMPLES

SUMMARY

The analysis of the genetic diversity of livestock populations is important for theier conservation and improvement. DNA markers are very useful to study the genetic structure of animal populations. Studies for estimating the genetic diversity

Lavoro eseguito con un contributo del CNR, nell'ambito del PF RAISA, sottoprogetto 3. Pubblicazione n. 1675.

between and within populations usually involve the analysis of large numbers of gene *loci* in many individuals. To overcome this limitation we have studied the possibility to use bulked genomic DNA samples as templates in polymerase chain reactions. We amplified several RAPD and single *loci* using individual and bulked genomic DNAs of 140 bulls from seven italian breeds (Friesian, Grey Alpine, Red Pied Friuli, Reggio, Chiana, Maremma and Piedmont). After digestion with different restriction enzymes we compared the results obtained from individual and *bulked analysis*. The patterns derived from bulked DNA samples generally consisted of superpositions of the patterns seen for individuals. Our results indicate that the *bulked analysis* is an useful tool to monitor the genetic diversity of animal populations during selection processes.

Key words: genetic variability, *bulked analysis*, PCR, RFLP, RAPD

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni uno degli argomenti più dibattuti dalla comunità scientifica riguarda l'origine, l'evoluzione, la conservazione e la perdita della diversità biologica. In particolare dopo la «Conservazione sulla diversità biologica» del *Summit* di Rio del 1992 sono state avviate numerose iniziative di diverse istituzioni internazionali con lo scopo di stimare la biodiversità ancora presente nella biosfera. Una migliore comprensione dei processi che portano alla produzione e alla perdita della variabilità genetica è di fondamentale importanza per una migliore utilizzazione delle specie utilizzate dall'uomo per la produzione di beni ed alimenti. La disponibilità di metodi per la caratterizzazione genetica degli individui permette di stimare la diversità genetica all'interno di una popolazione o tra diverse popolazioni. La stima del grado di differenziazione tra individui appartenenti a diversi gruppi viene generalmente effettuata mediante comparazioni tra differenze delle proprietà e delle sequenze amminoacidiche di proteine omologhe o delle sequenze nucleotidiche dei geni codificanti per queste proteine. Le metodologie utilizzate per la determinazione della variabilità genetica sono piuttosto complesse e richiedono molto tempo per la loro attuazione. Infatti per ottenere delle stime di variabilità genetica statisticamente significative è necessario analizzare un gran numero di *loci* in numerosi individui. Fortunatamente negli ultimi anni sono state messe a punto delle metodiche basate sulla PCR che consentono di analizzare facilmente e rapidamente un gran numero di *loci* (6, 7). Nei nostri laboratori abbiamo applicato una di queste metodiche, denominata analisi RAPD (da *Random Amplified Polymorphic* DNA), per produrre e studiare diversi marcatori polimorfici in diverse specie di animali, piante e ceppi batterici (1, 2). I risultati di un analisi eseguita su bovini di diverse razze italiane sono stati riportati negli atti della 1ª conferenza nazionale sullo stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche. La prosecuzione di questo lavoro ci ha portato a sviluppare dei metodi semplici e rapidi per stimare alcuni parametri genetici di una popolazione. Questi metodi analitici sono basati sull'amplificazione mediante PCR di campioni costituiti dall'unione di DNA individuali (*bulked analysis*). In questo lavoro riportiamo alcuni risultati ottenuti utilizzando questa procedura per esaminare 140 bovini appartenenti a sette diverse razze italiane.

MATERIALI E METODI

La purificazione dei DNA, le razioni di amplificazione, le digestioni con gli enzimi di restrizione e le elettroforesi sono stati eseguite essenzialmente come descritto in letteratura (1, 2, 4). Sono stati amplificati sia diversi RAPD che singoli *loci* a partire da DNA individuali e mescolati di 140 bovini appartenenti a sette diverse razze italiane (Frisona, Grigio Alpina, Pezzata Rossa, Reggiana, Chianina, Maremmana e Piemontese). I prodotti di amplificazione, dopo un eventuale digestione con diversi enzimi di restrizione, sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Abbiamo utilizzato il sistema computerizzato Bioprofil (Vilbert Lourmat) per l'acquisizione e l'analisi densitometrica dei *patterns* elettroforetici. Per l'analisi dei dati sono stati impiegati i tradizionali metodi della genetica di popolazioni (3) e della tassonomia numerica (5). Per la stima dei parametri genetici, degli indici di similarità e per l'applicazione di metodi di analisi multivariata abbiamo usato il programma NTSYS (Applied Biostatistic Inc.). Questo programma è stato utilizzato anche per verificare le corrispondenze tra i valori di variabilità e di distanze genetiche ottenuti dall'analisi dei dati individuali e di quelli ricavati da insiemi di individui della stessa popolazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per verificare la validità dell'analisi mediante PCR di campioni costituiti dall'unione di DNA individuali (*bulked analysis*) abbiamo confrontato i risultati ricavati dall'analisi di DNA individuali con quelli ottenuti dall'analisi di insiemi di DNA. Nelle figure 1 e 2 viene mostrato un esempio di analisi RAPD eseguita rispettivamente su DNA genomici individuali e su campioni costituiti dall'unione dei DNA di 20 bovini delle diverse razze. Nelle figure 3 e 4 viene riportato un esempio di analisi di un singolo *locus* eseguita su DNA genomici individuali e miscelati. Diversi esperimenti sono stati realizzati su miscele di DNA per studiare un'eventuale differenza nell'efficienza della reazione di amplificazione dei diversi alleli e della digestione con enzimi di restrizione delle molecole *heteroduplex* che si formano durante la PCR (vedi figura 3). Per ogni campione abbiamo misurato l'intensità delle bande e i valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto ad una banda di riferimento monomorfica per eliminare differenze di intensità dovute ad una diversa efficienza della reazione di PCR o ad errori di pipettamento durante il caricamento del gel. Nel caso dei RAPD su insiemi di DNA il confronto dell'intensità delle bande polimorfiche con quella della banda di riferimento monomorfica è stato utilizzato per stimare la frequenza degli individui che possedevano la banda polimorfica nel campione analizzato. Il confronto tra i risultati ricavati dall'analisi individuale con quelli ottenuti dall'analisi di insiemi di individui ha dimostrato una buona correlazione tra i due tipi di dati. Generalmente abbiamo osservato che i profili elettroforetici prodotti a partire da DNA mescolati corrispondono ad una sovrapposizione dei profili individuali. Alcuni marcatori RAPD ottenuti dai campioni di DNA mescolati mostrano una efficienza di amplificazione diversa da quella attesa sulla base dell'analisi dei campioni individuali. Queste differenze probabilmente sono dovute a fenomeni di competizione tra le diverse bande durante il processo di amplificazione. Inoltre

perchè una banda polimorfica sia presente nel campione *bulked* generalmente è necessario che sia presente in almeno il 10% degli individui che costituiscono il campione. L'analisi degli RFLP (da *Restriction Fragment Length Polymorphism*) dei RAPD o dei prodotti di amplificazioni specifiche di singoli *loci* è piuttosto affidabile ma è molto importante tenere conto dell'efficienza con cui l'enzima di restrizione utilizzato taglia le molecole *heteroduplex* che si formano durante la PCR. Nell'esempio mostrato nella figura 3, l'analisi densitometrica indica che l'intensità delle bande di 326 bp e 89 bp specifiche dell'allele A piuttosto che essere proporzionale alla frequenza p dell'allele A è correlato con il valore p^2. Questo dato suggerisce che l'enzima HinfI non è in grado di tagliare le molecole *heteroduplex* AB. Nonostante queste limitazioni le stime di variabilità genetica e le distanze genetiche calcolate a partire da DNA individuali o da DNA mescolati sono molto simili. In conclusione, è possibile utilizzare la *bulked analysis* per ottenere un gran numero di dati su numerose popolazioni in pochi giorni di lavoro. I risultati ottenuti confermano l'utilità di questo tipo di analisi per monitorare la variabilità e le relazioni genetiche delle popolazioni animali di interesse zootecnico.

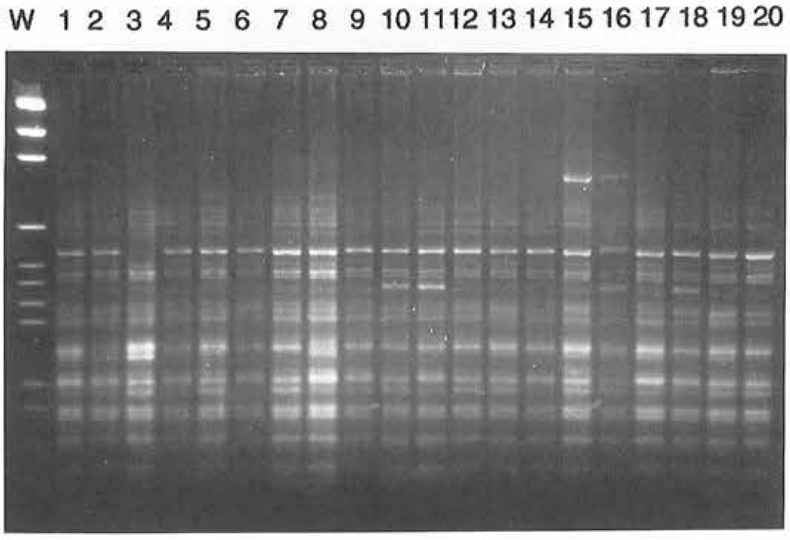


Figura 1 - Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei RAPD ottenuti a partire dal DNA di 20 bovini di razza Reggiana (1-20). I DNA genomici individuali sono stati amplificati con il *primer* CGAAACAAGCGTGCATGAGCCCGAA e digeriti con Hinf I. Il marcatore di peso molecolare (W) è pGEM (Promega).

Figura 2 - Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei RAPD ottenuti a partire da campioni costituiti dall'unione dei DNA di 20 bovini delle razze Frisona, Grigio Alpina, Pezzata Rossa, Reggiana, Chianina, Maremmana e Piemontese (1-7). Gli insiemi di DNA genomici individuali sono stati amplificati con il *primer* CGAAACAAGCGTGCATGAGCCCGAA e digeriti con Hinf I. Il marcatore di peso molecolare (W) è ∅ X174-HaeIII.

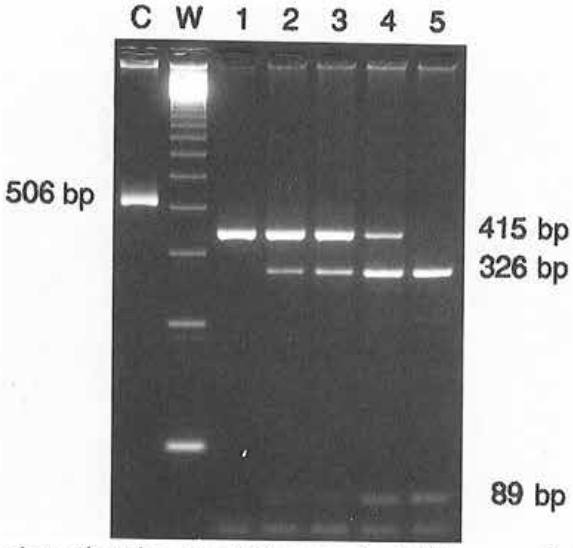


Figura 3 - Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei frammenti ottenuti digerendo con Hinf I i prodotti di amplificazione dell'esone IV della k-caseina. Sono stati amplificati campioni di un animale con genotipo BB (1) miscelato al 75% (2), 50% (3), 25% (4) con il DNA di un animale con genotipo AA (5). La banda di 415 bp è caratteristica della variante B mentre quelle di 326 bp e 89 bp sono specifiche della variante A. Il controllo (C) è un prodotto di amplificazione non digerito. Il marcatore di peso molecolare (W) è un multimero di 123 bp (BRL).

Figura 4 - Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei frammenti ottenuti digerendo con Hinf I i prodotti di amplificazione dell'esone IV della k-caseina. Sono stati amplificati campioni costituiti dall'unione dei DNA di 20 bovini delle razze Frisona, Grigio Alpina, Pezzata Rossa, Reggiana, Chianina, Maremmana e Piemontese (1-7). Il controllo (C) è un prodotto di amplificazione non digerito. Il marcatore di peso molecolare (W) è un multimero di 123 bp (BRL).

BIBLIOGRAFIA

1) Bandi C., La Rosa G., Bardin M.G., Damiani G., De Carneri I., Ponzio E. (1993) *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction of Individual* Trichinella *Specimens.* Journal of Parasitology *79.*

2) Fani R., Bandi C., Bardin M.G., Comincini S., Damiani G., Grifoni A., Bazzicalupo M. (1993) *RAPD fingerprinting is useful for identification of* Azospirillum *strains.* Microb. Releases *1*, 217-221.

3) Nei M. (1972) *Genetic distance between populations.* Am. Nat. *106*), 283-292.

4) Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual - Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.

5) Sneath P.H.A. and Sokal R.R. (1973) *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* W.H. Freeman and Company, San Francisco.

6) Welsh J. and Mcclelland M. (1990) *Fingerprinting genomes using PCR with aribtrarily primer.* Nucleic Acids Res. *18*, 7213-7218.

7) Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rfalsky J.A., Tingey S.V. (1990) *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18*, 6531-6535.

A. CAROLI, P. BOLLA, M.G. BARDIN*, R. RIZZI, G. DAMIANI*, G. ROGNONI

VARIABILITÀ DELLE PRODUZIONI E MARCATORI AD EFFETTO MAGGIORE

Istituto di Zootecnica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Celoria 10, 20133 Milano e
* Istituto per la Difesa e la Valorizzazione del Germoplasma Animale - CNR, Via Bassini, 20133 Milano

RIASSUNTO

Viene esposto l'aggiornamento delle ricerche sulle problematiche inerenti l'utilizzo di marcatori genetici associati a caratteri produttivi (QTL) in piani di selezione. In particolare, si considera l'effetto di gene maggiore del *locus* α_{s1}-caseina nel latte di capra e la possibiltà di identificarne il polimorfismo genetico mediante analisi del DNA. L'effetto del genotipo α_{s1}-caseina 'nullo' su caratteri produttivi (latte kg, proteina %, proteina kg, grasso %, grasso kg) viene stimato mediante modello misto, tenendo conto delle relazioni di parentela tra gli animali. Si è osservato in particolare un effetto significativo del *locus* sulla percentuale di proteina del latte: i genotipi a contenuto basso-nullo di α_{s1}-caseina producono mediamente 2.8 g/kg in meno di proteina rispetto ai genotipi a contenuto medio-alto.

Parole chiave: marcatori genetici - caratteri produttivi - lattoproteine caprine.

PRODUCTIVE TRAITS VARIABILITY AND MAJOR EFFECT MARKERS

SUMMARY

The paper deals about the use of genetic markers associated with productive traits (QTL) in selection. In particular, the major effect of goat α_{s1}-casein *locus* and the possibility of identify its genetic polymorphism by DNA analysis are considered. The effect of α_{s1}-casein «null» genotype on productive traits (milk, protein, fat yield, protein and fat percent) is estimated by mixed model, considering the relationships among the animals. Low and null α_{s1}-casein level genotypes decrease protein percent of about 2.8 g/kg of milk compared with genotypes associated to medium-high levels of α_{s1}-casein.

Key words: genetic markers - goats - lactoprotein.

INTRODUZIONE

Geni maggiori

Lo studio di geni con effetto maggiore sui caratteri produttivi (QTL = *quantitative trait loci*) è attualmente favorito e stimolato dall'avanzamento raggiunto nelle

tecniche di ingegneria genetica. Se un singolo gene presenta un effetto maggiore su di un carattere di interesse zootecnico, la sua introduzione nei piani di selezione può rappresentare un vantaggioso ausilio alle tradizionali tecniche selettive. Una nuova era sta probabilmente per iniziare nel campo del miglioramento genetico degli animali domestici, con l'utilizzo di tecniche molecolari nell'identificazione di geni strettamente associati a caratteri selettivi.

Tra i marcatori genetici tradizionali, le proteine del latte sono sicuramente i geni più studiati per il loro effetto su caratteri di interesse zootecnico. In particolare per quanto riguarda il latte caprino, numerosi studi hanno evidenziato un effetto maggiore del *locus* α_{s1}-caseina su alcuni caratteri quantitativi (5), indicando nel polimorfismo genetico di tale proteina un interessante modello di QTL, anticipazione di quanto potrà avvenire in un prossimo futuro in seguito alla conoscenza dettagliata del genoma degli animali domestici.

Polimorfismo genetico dell'α_{s1}-caseina caprina

L'α_{s1}-caseina nel latte di capra presenta un complesso polimorfismo di tipo qualitativo e quantitativo. Ad oggi, sono noti almeno 9 differenti alleli denominati A, B, C, D, E, F, F', O ed O' (6). Gli alleli O ed O' appaiono essere veri alleli nulli; latti di capre omozigoti per O od O' oppure eterozigoti OO' hanno un contenuto nullo di α_{s1}-caseina. Gli alleli A, B e C sono invece correlati ad un contenuto elevato in tale frazione (3,6 g/l per allele), gli alleli F e D ad un tenore basso (0,6 g/l per allele), mentre l'allele E risulta associato ad un tenore intermedio (1,6 g/l). Una forte correlazione positiva è stata osservata tra il livello di α_{s1}-caseina e il contenuto di caseina totale (5). Questa relazione tra genotipi α_{s1}-caseinici e contenuto in caseina è alla base dell'effetto maggiore del gene sull'attitudine alla coagulazione presamica del latte.

Con l'analisi del DNA, è possibile inoltre riconoscere il genotipo di un animale al *locus* α_{s1}-caseina (6, 8). Questo permette di selezionare alla nascita individui portatori dei genotipi più interessanti.

La sequenza degli aminoacidi dell'α_{s1}-caseina caprina e le differenze biochimiche tra le varianti A, B, C, D, E ed F sono state recentemente studiate (1, 2). È stata inoltre evidenziata la struttura del gene dell'α_{s1}-caseina (7). Si tratta di un gene formato da 19 esoni, di cui 16 codificanti per la proteina propriamente detta, gene che si estende per circa 17 kilobasi.

La conoscenza delle alterazioni caratteristiche di ciascuna variante genetica consente di utilizzare una procedura d'identificazione specifica di questi alleli, mediante la tecnica di amplificazione del DNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*: reazione di polimerizzazione a catena). Questa tecnica è destinata a sostituire l'approccio metodologico basato sull'analisi dei frammenti di restrizione, proposta inizialmente (6), che non permette tuttavia di distinguere tutti gli alleli.

SCOPO DEL LAVORO

Il progetto di ricerca che l'Istituto di Zootecnica Veterinaria e l'Istituto per la Valorizzazione del Germoplasma Animale stanno congiuntamente conducendo in par-

ticolare sull'α_{s1}-caseina caprina e sul suo importante effetto di gene maggiore si propone i seguenti obiettivi:

— lo studio della variabilità genetica del *locus* in alcune razze popolazioni caprine allevate in Italia e dell'effetto di alcuni particolari genotipi su caratteri produttivi;

— la messa a punto di metodiche PCR per la tipizzazione diretta del genotipo degli animali (maschi, femmine non in lattazione).

MATERIALI E METODI

È in corso un lavoro di tipizzazione delle razze popolazioni caprine in Lombardia. In particolare, si è iniziato la ricerca presso un allevamento di capre Camosciate situato nelle Prealpi Bergamasche.

Sono stati analizzati mediante elettrofocalizzazione isoelettrica i campioni individuali di latte delle 39 pecore di tale allevamento (3).

Sono stati inoltre raccolti i dati produttivi ed anagrafici. I controlli giornalieri (kg di latte, grasso, proteine, contenuto in cellule somatiche) sono stati analizzati mediante la funzione di Wood (10), uno dei modelli matematici più utilizzati per la descrizione della curva di lattazione. Tale funzione si basa sulla trasformazione logaritmica di una funzione di tipo gamma incompleta contenente tre costanti a, b e c che definiscono l'andamento della lattazione. Le produzioni giornaliere individuali di latte relative ai controlli funzionali effettuati mensilmente da parte dell'Associazione Provinciale Allevatori, sono state utilizzate per calcolare le costanti a, b, c della equazione di Wood:

$y_n = an^b exp(-cn)$

dove y è la produzione giornaliera alla n-esima settimana, a indica la produzione media iniziale, b l'inclinanazione della curva prima del picco (o *nadir*) e c il grado di inclinazione dopo il picco (o *nadir*). Le costanti sono state calcolate mediante la procedura NLIN del SAS (9). L'equazione è stata valutata separamente a seconda del genotipo degli animali al *locus* α_{s1}-caseina, suddiviso in due livelli: genotipi associati a livello nullo o debole di α_{s1}-caseina ('nullo') e genotipo non nullo ('altro'). Questa seconda classe comprende l'insieme degli altri genotipi.

Le lattazioni delle medesime capre sono state inoltre analizzate mediante modello misto, tenendo conto delle relazioni di parentela tra gli individui. È stato utilizzato il seguente modello:

1) $y_{ijklm} = m + \alpha_i + OP_j + AP_k + MP_l + A_m + P_m + e_{ijklm}$

dove:

y_{ijklm} è l'l-mo carattere produttivo (di volta in volta: kg di latte, kg di grasso, kg di proteina, % di grasso, % di proteina);m è la media generale;

α_i è l'effetto fisso dell'i-mo genotipo al locus α_{s1}-caseina (2 livelli: nullo, altro);
OP_j è l'effetto fisso del j-mo ordine di parto (2 livelli, 1 = primipare, 2 = pluripare);
AP_k è l'effetto fisso del k-mo anno di parto (5 livelli);
MP_l è l'effetto fisso del l-mo mese di parto (5 livelli);
A_m è l'effetto casuale genetico additivo dell'm-mo animale (38 livelli);
P_m è l'effetto casuale genetico dello stesso animale;
e_{ijklm} è la variabilità residua.

Si sta inoltre mettendo a punto la caratterizzazione mediante PCR dell'allele nullo. Sono stati estratti i DNA di animali omozigoti per tale allele e si sta studiando in base alla sequenza nucleotidica del cDNA dell'α_{s1}-caseina caprina (6) una metodica di semplice attuazione per il riconoscimento sia del genotipo omozigote per l'allele nullo che dei genotipi eterozigoti per tale allele. La tipizzazione dei becchi renderà così possibile utilizzare, in valutazioni di tipo *BLUP-Animal Model*, l'informazione relativa al genotipo dei riproduttori maschi e di procedere ad un'accurata stima del valore genetico additivo delle varianti genetiche di α_{s1}-caseina caprina su caratteri di interesse zootecnico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi elettroforetica dei campioni individuali di latte ha evidenziato un'alta percentuale di soggetti con contenuto nullo-debole di α_{s1}-caseina (23.13%). Una preliminare analisi statistica dei dati aveva indicato un effetto sfavorevole dei genotipi associati a tale contenuto sulle produzioni giornaliere di latte, grasso, proteine, come pure era emerso un maggior contenuto in cellule somatiche (3).

Le figure 1 e 2 riportano l'andamento, nel corso della lattazione, rispettivamente della quantità di latte prodotta e del contenuto di cellule somatiche a seconda del livello di α_{s1}-caseina. Le due curve sono state ottenute a partire dai parametri della funzione di Wood. Si osserva una differenza marcata tra genotipo «nullo» e «altro»: i genotipi associati ad assenza o a bassi livelli di α_{s1}-caseina risultano sfavorevoli per entrambi i caratteri rispetto al complesso degli altri genotipi.

La tabella 1 riporta le differenze tra genotipo «altro» e genotipo «nullo» stimate mediante modello misto e i rispettivi valori del t di Student.

Si può notare un effetto significativo del *locus* α_{s1}-caseina sul contenuto percentuale in proteina, con una differenza di 2.8 g/kg di latte. Tale risultato è in accordo con quanto osservato dagli autori francesi (5) che hanno evidenziato una differenza di 2.5g/kg di latte tra gli alleli A (allele cosiddetto «forte», cioé a contenuto elevato di α_{s1}-caseina) e l'allele F (allele «debole», a contenuto basso di α_{s1}-caseina). È interessante osservare che il genotipo «nullo» non presenta effetti sulla quantità di latte. Il genotipo nullo presenta un effetto negativo anche sulla quantità di proteine (-1.95 kg); tale effetto è al limite della significatività ($P < 0.15$) È anche interessante osservare la differenza tra genotipi «altro» e «nullo» per quanto riguarda la quantità e il tasso di grasso: la selezione per alleli a contenuto medio-elevato di α_{s1}1-caseina non presenterebbe quindi ripercussioni negative sulla quantità di latte e sulla quantità e sul tasso di grasso del latte.

L'utilizzo dell'α_{s1}-caseina caprina come gene maggiore nella selezione è sicuramente un'interessante indicazione che la genetica molecolare suggerisce alla tradizionale genetica quantitativa, in vista di una migliore resa casearia del latte caprino. La biotecnologia del DNA ricombinante potrà sicuramente costituire un valido aiuto alla selezione nella tipizzazione dei maschi e nella conseguente scelta di riproduttori con genotipi particolarmente idonei ad incrementare il tasso proteico e caseinico del latte.

Tabella 1 - Differenze stimate tra genotipo «alto» e genotipo «nullo» di α_{s1}-caseina e t di Student.

Carattere	Stima (alto-nullo)	t di Student
kg latte	1.05	0.02
kg grasso	0.46	0.38
kg proteina	1.95	1.46
% grasso	0.11	0.49
% proteina	0.28	2.32*

* $0.01 < P < 0.05$

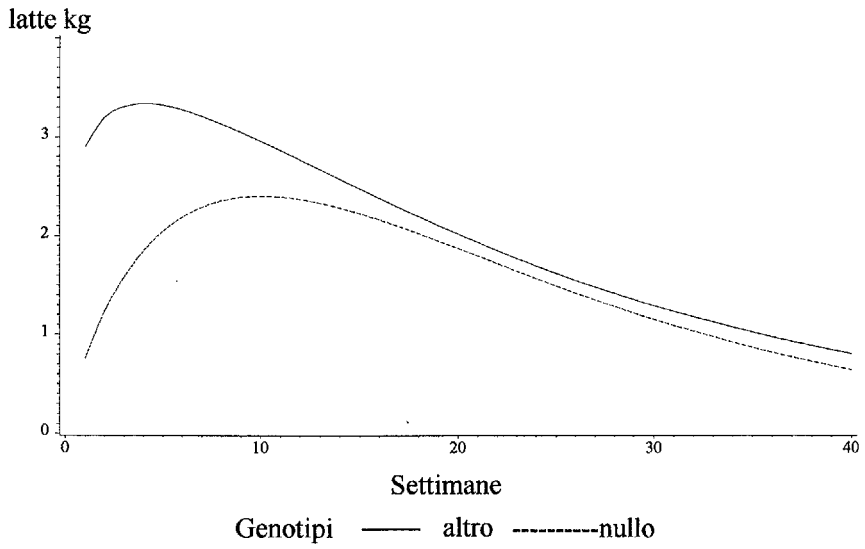


Figura 1 - Curva di lattazione per i due genotipi al locus α_{s1}-caseina.

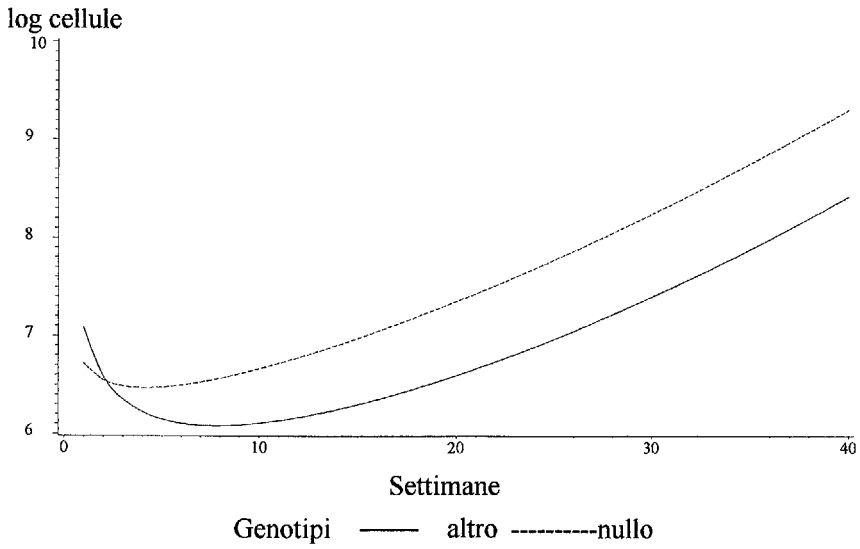


Figura 2 - Andamento delle cellule somatiche per i due genotipi al locus α_{s1}-caseina.

BIBLIOGRAFIA

1) BRIGNON G., MAHÈ M.F., GROSCALUDE F., RIBADEAU-DUMAS B. (1989) *Sequence of caprine* α_{s1}-casein and characterization of those of its genetic variants which are syntesized at a high level, α_{s1}-Cn A, B and C. Protein Seq. Data Anal. *2*, 181-188.

2) BRIGNON G., MAHÉ M.F., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. (1990) *Two of the three genetic variants of goat* α_{s1}-casein which are synthesized at a reduced level have an internal deletion possibly due to altered RNA splicing. Eur. J. Biochem. *193*, 237-241.

3) CAROLI A., BOLLA P., MACCARINI G., BRUNI G. (1993) *Polimorfismo genetico dell'*α_{s1}-caseina ed effetto sui caratteri quantitativi nella razza caprina Camosciata. Atti XXVIII Simp. Intern. Zootecnia (in stampa).

4 GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., BRIGNON G., DI STASIO L. E JEUNET R. (1987) *A mendelian polymorphism underlying quantitative variation of goat* α_{s1}-casein. Génét. Sél. Evol. *19 (4)*, 399-412.

5 GROSCLAUDE F., RICORDEAU G., MARTIN P., REMEUF F., VASSAL L., BOUILLON J. (1994) *Du géne au fromage: le polymorphisme de la casèine* α_{s1} caprine, ses effets, son évolution. INRA Prod. Anim. *7 (1)*, 3-19.

6 LEROUX C., MARTIN P., MAHÈ M.F., LÉVÉZIEL H. E MERCIER J.C. (1990) *Restriction fragment length polymorphism identification of goat* α_{s1}-casein alleles: a potential tool in selection of individuals carrying alleles associated with a high level protein synthesis. Anim. Genet. *21*, 341-351.

7 LEROUX C., MAZURE N., MARTIN P. (1992) *Mutations away from splite rite recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat* α_{s1}-casein transcripts. Structural organization af the relevant gene. J. Biol. Chem. *267*, 6147-6157.

8) RAMUNNO L., RANDO A., DI GREGORIO P., MASSARI M., BLASI M., MASINA P. (1991) *Struttura genetica di alcune popolazioni caprine allevate in Italia al locus della caseina* α_{s1}. Atti IX Congr. Naz. ASPA , 579-589.

9) SAS (1990) *Sas User's guide: Statistics.* Version *6*. Ed. Cary, NC.

10) WOOD P.D.P. (1967) *Algebraic model of the lactation curve in cattle.* Nature *216*, 164-165.

F. PILLA, P. LEONE*, Y. ZHANG*, L. REDAELLI*, L. FERRETTI*, S. COMINCINI*, F. NAPOLITANO**, B.M. MOIOLI**, S. PUPPO**

APPLICAZIONE DI MARCATORI MICROSATELLITI ALLA TIPIZZAZIONE DI UN NUOVO TIPO GENETICO

Dipartimento Scienze Animali, Vegetali e Ambientali, Università del Molise, via Cavour 50, Campobasso;
* Istituto Difesa e Valorizzazione del Germoplasma Animale, CNR, via Celoria 10, Milano;
** Istituto Sperimentale per la Zootecnia, via Salaria 31, 00016 Monterotondo Scalo (Roma)

RIASSUNTO

In questo lavoro viene descritta l'utilizzazione di alcuni tipi di marcatori genetici — microsatelliti, geni noti, RAPD — per studiare la variabilità genetica di una popolazione costituita dall'incrocio di tori di razza Piemontese con vacche di razza Chianina. Sono stati rilevati con i microsatelliti 99 alleli, di cui 9 sono presenti solo nella razza Piemontese. Sono stati evidenziati polimorfismi nel DNA per i geni dell'ormone della crescita e della k-caseina. Le frequenze geniche del primo sono risultate di 0,67 per l'allele a e 0,33 per l'allele b; le frequenze geniche al *locus* k-caseina sono risultate di 0,34 per l'allele a e 0,66 per l'allele b.

Con la tecnica dei RAPD si è individuato un polimorfismo evidenziato dal *primer* aspecifo D17.

Parole chiave: marcatori genetici - microsatelliti - RAPD - PCR - polimorfismi del DNA.

APPLICATION OF MICROSATELLITES DNA MARKERS TO CHARACTERIZE A NEV GENETIC TYPE

SUMMARY

The use of a few genetic markers — microsatellites, known genes and RAPD — is here described, in order to study the genetic variabilitity of a population created by crossbreeding of Piemontese bulls and Chianina cows. Microsatellites allowed to evidence 99 alleles, 9 of which are present only in the Piemontese breed. DNA polymorphisms at the Growth Hormon and k-casein genes were evidenced; gene frequency of Growth Hormon was 0.67 for the a allele and 0.33 for the b allele. Gene frequency of k-casein was 0.34 for the a allele and 0.66 for the b allele.

TheRAPD technique evidenced a polymorphism produced by the random primer D17.

Key words: genetic markers - microsatellites - RAPD - PCR - DNA polymorphisms.

INTRODUZIONE

I microsatelliti sono regioni del DNA che presentano ripetizioni in tandem di semplici sequenze di-, tri- e tetranucleotidiche, con n variabile da 10 a 40 circa, che si trovano distribuite a caso e in numero elevatissimo. Il più noto è AC(n), presente in più di un milione di copie nel genoma bovino.

Il polimorfismo dei microsatelliti è molto elevato e deriva dal variare del numero di ripetizioni del motivo base del microsatellite (n) ed è chiaramente evidenziabile da una reazione di amplificazione *in vitro* (PCR) di DNA innescata da due *primers* fiancheggianti la regione del microsatellite.

Oltre a quelli rilevabili con i microsatelliti, è possibile evidenziare altri polimorfismi amplificando sia geni conosciuti (ormone della crescita, k-caseina, beta-lattoglobulina, etc.), sia porzioni casuali del genoma con *primers* aspecifici (RAPD).

Per identificare geni relativi ai caratteri di interesse zootecnico sono necessari due elementi: una serie di marcatori disposti omogeneamente lungo il genoma e una popolazione di animali che esprima in maniera dissimile i caratteri. Il primo elemento è già disponibile per i suini (PIG MAP) ed è in corsodi studio per i bovini (BOV MAP); tali progetti hanno lo scopo di isolare, caratterizzare e localizzare sui cromosomi i marcatori individuati. Riguardo al secondo elemento, una popolazione adatta per tale studio è stata costituita presso l'Istituto Sperimentale per la Zootecnia di Roma, dove si è effettuato l'incrocio tra tori di razza Piemontese e vacche di razza Chianina, allo scopo di ottenere un nuovo tipo genetico da utilizzare come incrociante su razze da latte e rustiche per aumentare la produzione di carne. La Piemontese ha infatti dimostrato, nelle numerose prove effettuate all'ISZ, una migliore conformazione e ridotta adiposità della carcassa oltre a valori molto alti di resa alla macellazione e ottime caratteristiche qualitative della carne; la Chianina invece è risultata migliore per accrescimento medio giornaliero, peso vivo finale e capacità di ingestione. È nata così l'ipotesi che dall'incrocio di queste due razze potessero derivare soggetti in grado di massimizzare la complementarietà tra i caratteri produttivi desiderati presenti nelle due razze parentali.

MATERIALE E METODI

Dall'incrocio di 6 tori Piemontesi con 45 vacche Chianine, anche mediante trattamenti di superovulazione e trasferimento embrionale, sono nati 123 meticci, di cui 57 maschi e 66 femmine, su cui sono stati rilevati i pesi dalla nascita a 19 mesi, misure somatiche (alla nascita, svezzamento e 12 mesi) - altezza al garrese, lunghezza, larghezza, altezza e circonferenza toracica, lunghezza e larghezza della groppa, lunghezza e larghezza della testa, circonferenza dello stinco). Gli animali sono stati inoltre valutati da un esperto per la conformazione.

Solo sui maschi macellati sono infine stati rilevati gli aspetti quanti-qualitativi della carcassa: a) peso e lunghezza della carcassa, profondità del torace, lunghezza e larghezza minima e massima della coscia; b) punteggio di conformazione e di adiposità; c) dissezione carcassa in regioni anatomiche e rilievo dei quantitativi di carne, grasso e ossa; d) aspetti qualitativi della carne nei muscoli *caput longum tricipiti brachii, gluteobiceps, semimembranosum, semitendinosus e longissimus dorsi*: colore, forza di taglio, potere di ritenzione dell'acqua, parametri chimici elementari.

Per la caratterizzazione genetica attraverso i microsatelliti, sono stati tipizzati gli individui della popolazione parentale, 6 tori Piemontesi e 43 vacche Chianine per mezzo di 15 marcatori tipo microsatellite prodotti dall'IDVGA-CNR (2). Per tutti i microsatelliti usati è conosciuta la localizzazione cromosomica e in particolare ben 11 sono specifici per un singolo cromosoma.

Per quanto riguarda l'amplificazione di geni noti, una porzione di 315 bp del gene dell'ormone della crescita, sequenziato da Miller (4) e da Woychick (8) è stata amplificata con due *primers* specifici e mediante PCR su 53 femmine meticce F1. Il prodotto amplificato è stato digerito con l'enzima di restrizione Alu I e il polimorfismo riportato da Zhang (9) è stato evidenziato con un'elettroforesi su gel al 2% di agarosio Metaphor e all'1% con Seakem.

Il gene della k-caseina, sequenziato da Stewart (5) e da Gorodetsky (3) è stato amplificato con *primers* specifici (1) e poi digerito con l'enzima di restrizione Hind III su 50 femmine meticce F1, per evidenziarne il polimorfismo.

Per completare l'approccio metodologico all'individuazione della variabilità a livello genomico, sul DNA di 5 tori Piemontesi e di 5 vacche Chianine è stata impiegata la tecnica dei RAPD (6, 7) utilizzando diverse sequenze aspecifiche.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi elettroforetica dei microsatelliti utilizzati ha permesso di rivelare (tab.1) 99 alleli totali, di cui 9 appaiono solo negli animali di razza Piemontese. L'elevata eterozigosità riscontrata nei tori — per 12 marcatori i valori sono superiori o uguali al 50% — permetterà di seguire abbastanza agevolmente la ridistribuzione degli alleli negli animali della generazione F1.

Dall'analisi effettuata amplificando specifici geni, si sono evidenziati polimorfismi per l'ormone della crescita e precisamente le frequenze genotipiche sono risultate di 24 aa, 23 ab e 6 bb, in equilibrio con la legge di Hardy-Weinberg ($P = 0{,}007$) secondo le frequenze geniche di 0,67 per l'allele a e 0,33 per l'allele b (tab. 2).

Per il gene della k-caseina, le frequenze genotipiche sono risultate 3 aa, 30 ab e 17 bb, tendenti all'equilibrio con la legge di Hardy-Weinberg ($P = 0{,}10$) secondo le frequenze geniche di 0,34 per l'allele a e 0,66 per l'allele b (tab. 2).

L'applicazione della tecnica dei RAPD ha permesso di individuare alcuni *primers* che evidenziano sequenze polimorfiche ripetibili nelle due popolazioni parentali, come ad esempio il D17 (fig. 1).

CONCLUSIONI

Data la loro variabilità, i microsatelliti si sono rivelati lo strumento ideale per gli scopi prefissati: tipizzazione molecolare della popolazione che si sta costituendo e ricerca di associazioni con i caratteri produttivi. Anche i geni dell'ormone della crescita e della k-caseina sono risultati polimorfici e analoghi incoraggianti risultati sono stati ottenuti utilizzando la tecnica dei RAPD.

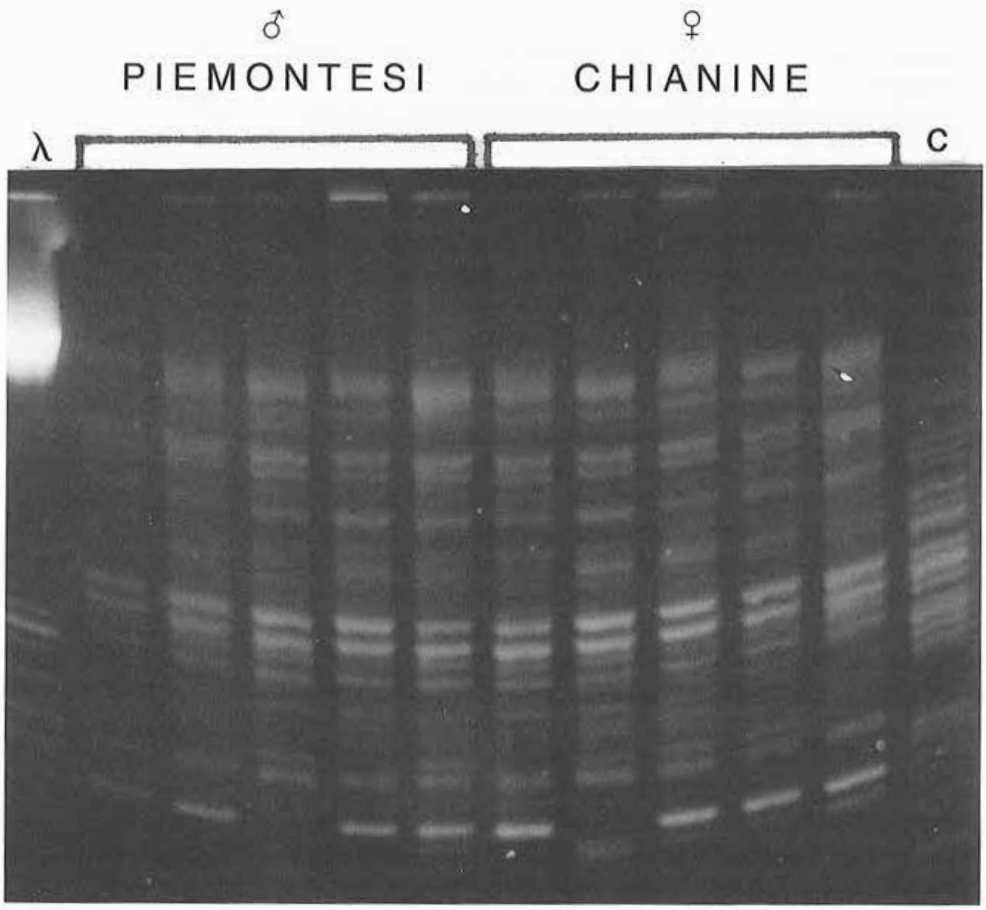
Una volta individuati dei marcatori molecolari sarà utile cercarne l'associazione con caratteri produttivi interessanti dal punto di vista zootecnico al fine di poter determinare anticipatamente e con estrema precisione gli individui portatori dei caratteri desiderati.

Tabella 1 - Analisi del polimorfismo di microsatelliti utilizzati per la tipizzazione della popolazione parentale.

Microsatellite	n. alleli totali	n. alleli tori	padri eterozigoti	n. alleli vacche
IDVGA-2	8	4	67%	7
IDVGA-3	13	5	83%	13
IDVGA-7	5	5	67%	5
IDVGA-8	7	5	67%	5
IDVGA-9	2	2	17%	2
IDVGA-11	9	5	83%	7
IDVGA-27	3	3	67%	3
IDVGA-29	8	3	67%	8
IDVGA-32	6	6	83%	6
IDVGA-37	8	2	67%	8
IDVGA-39	7	4	83%	6
IDVGA-40	8	4	33%	7
IDVGA-43	6	2	17%	6
IDVGA-44	6	4	50%	5
IDVGA-46	3	2	50%	3

Tabella 2 - Frequenze geniche e genotipiche per i loci della k-caseina e dell'ormone della crescita in una prova sui soggetti F1.

ormone della crescita	k-caseina
n. 53	n. 50
$f_a = 0,67$ $f_b = 0,33$	$f_a = 0,34$ $f_b = 0,66$
n. genotipi osservati	n. genotipi osservati
aa = 24	aa = 3
ab = 23	ab = 30
bb = 6	bb = 17



λ = Marcatore (λ-dig. Hind III).
c = Controllo prodotti PCR.

Figura 1 - Esempio di polimorfismi nei prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando come primer la sequenza aspecifica D17.

BIBLIOGRAFIA

1) Damiani G. et al. (1989) Atti Associazione Genetica Italiana, *35*, 91 (Abs).
2) Ferretti L. et al. (1994) In questo volume.
3) Gorodetsky S.I. e Kaledin A.S. (1987) Genetika *23*, 596.
4) Miller W.L. et al. (1980) J. Biol. Chem. *255*, 7521.
5) Stewart A. F. et al. (1984) NAR *12*, 3895.
6) Welsh J. , McClelland M. (1990) NAR *18*, 7213.
7) Williams J. et al. (1990) NAR *18*, 6531.
8) Woychick R.P. et al. (1982) NAR *10*, 7197.
9) Zhang H.M. et al. (1993) Journ. Animal Sci. *71*, suppl. 1 (Abs).

C.A. SGOIFO ROSSI, E.M. SENATORE, G. SAVOINI, F. FANTUZ, F. POLIDORI

EFFETTI DELLA SOMATOTROPINA BOVINA RICOMBINANTE (rbST) E DEI SAPONI DI CALCIO SULLA PRODUZIONE E COMPOSIZIONE DI LATTE DI BUFALA (Bubalus bubalis)

Istituto di Alimentazione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, via Celoria 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

Allo scopo di determinare gli effetti della somministrazione di rbST e di saponi di calcio sulla produzione e composizione del latte bufalino, sono state impiegate 40 bufale alloggiate presso un allevamento del nord Italia. Gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi omogenei: C = dieta di controllo; SAP = dieta di controllo + 0.3 kg/d di saponi di calcio; rbST = dieta di controllo + rbST; rbST + SAP = 0.3 kg/d di saponi di calcio + rbST. La somatotropina bovina ricombinante (Somidobove) è stata somministrata ad intervalli di 21 giorni alla dose di 320 mg/capo. L'aggiunta di saponi di calcio alla dieta ha incrementato la produzione di latte e di latte corretto al 4% di grasso ($P < 0.05$). A sette giorni dall'inizio del trattamento con somatotropina è stata osservata la massima risposta in termini di produzione di latte e di latte corretto al 4% di grasso ($P < 0.01$). Le bufale trattate con rbST hanno evidenziato una diminuzione della condizione corporea (—0.80 unità). L'aggiunta di saponi di calcio alla dieta degli animali trattati con rbST ha evitato tale calo.

Parole chiave: rbST - saponi di calcio - bufala.

EFFECT OF RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPIN (rbST) AND CALCIUM SOAPS ADMINISTRATION ON ITALIAN BUFFALO (Bubalus bubalis) MILK YIELD AND COMPOSITION

SUMMARY

The aim of this trial was to investigate the effects of rbST (Somidobove, 320 mg/head every 21 days for four cycles) and calcium soap on milk production and composition. Forty italian buffalo were divided into four homogeneous groups: C = control diet, SAP = control diet + 0.3 kg/d added calcium soaps, rbST = control diet + rbST, rbst + SAP = 0.3 kg/d added calcium soaps + rbST. Addition of calcium soaps increased milk yield and 4% FCM ($P > 0.05$). Maximum milk yield and 4% FCM was observed 7 days after rbST injection ($P < 0.01$). Body condition score decreased in rbST treated buffalo (0.80 units). Calcium soaps addition reduced this effect.

Key words: rbST - calcium soaps - buffalo.

INTRODUZIONE

L'allevamento bufalino, da secoli circoscritto alle zone meridionali per lo sfruttamento delle aree meno produttive e più avverse, sta vivendo negli ultimi anni momenti di crescita sia numerica che tecnologica. Tale fenomeno e la sempre maggiore presenza di bufale da latte negli allevamenti del settentrione scaturiscono, oltre che da una politica limitante la produzione di latte vaccino operata dalla CEE, anche dal vantaggio economico ottenibile dalla trasformazione del latte bufalino. L'interesse ad applicare le biotecnologie come l'uso dell'rbST nelle specie ad attitudine lattifera, al fine di migliorarne le performance produttive, si amplifica quando si tratta di soggetti caratterizzati da produzioni ridotte. La bufala italiana, oltre a produrre limitate quantità di latte anche se qualitativamente superiore se confrontato con quello bovino, incorre nel periodo estivo, corrispondente al momento di maggior richiesta di mozzarella da parte del mercato, in un calo produttivo obbligato dalla stagionalità dei parti tipica di questa specie. Per tali motivi notevole interesse assume la possibilità di incrementare la produzione lattea delle bufale mantenendone però inalterate la caratteristiche qualitative al fine di non comprometterne la resa alla caseificazione. La somministrazione di ormone somatotropo determina un netto incremento produttivo sia nelle bovine (3) che nelle bufale (8) da latte. Come emerso da altre sperimentazioni, la somministrazione di rbST nelle bovine da latte induce una condizione fisiologica simile a quella della prima fase di lattazione caratterizzata da un bilancio energetico ed azotato negativi, conseguenza dell'improvviso e rapido aumento produttivo non sostenuto da una adeguata assunzione di sostanza secca (3).

Se attraverso un appropriato *management* nutrizionale sia il bilancio azotato che quello energetico vengono mantenuti positivi le caratteristiche qualitative del latte rimangono invariate (5,10). Va ugualmente rilevato che l'impiego dell'ormone somatotropo determina una mobilizzazione delle riserve corporee con conseguente aumento del tenore lipidico del latte, come riportato da Bertoni *et al.* (2).

L'impiego del rbST e quello dei saponi di calcio hanno un effetto sulle frazioni azotate del latte non sempre univoco. Barbano *et al.* (1) non hanno osservato nessuna variazione della percentuale di caseina del latte in bovine trattate con rbST, mentre Kindstedt *et al.* (7) riportano una diminuzione significativa della proteina totale, della proteina vera e della caseina al 7° giorno dal trattamento. Jenkins e Jenny (6) rilevano una diminuzione della caseina del latte in bovine a cui venivano somministrati grassi protetti mentre Salimei *et al.* (9) non hanno osservato variazioni nell'attitudine alla coagulazione del latte impiegando saponi di calcio.

SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo della presente ricerca è stato quello di valutare l'effetto dell'impiego di rbST e dei saponi di calcio sulla produzione e sulla qualità del latte di bufale italiane, con particolare attenzione alle frazioni proteiche, vista la scarsità di dati disponibili in letteratura.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate 40 bufale italiane alimentate con la tecnica dell'*unifeed* ed alloggiate in una stalla del nord Italia a stabulazione libera. L'adattamento alla razione sperimentale è stato effettuato nelle due settimane precedenti l'inizio della prova durante le quali gli animali sono stati sottoposti a controlli produttivi per costituire quattro gruppi omogenei per produzione (kg/d) e stadio di lattazione (d): gruppo C = dieta di controllo (7.72.7; 172115); gruppo CAS = dieta con 0.3 kg/d di saponi di calcio (7.12.4; 182118); gruppo rbST = dieta di controllo + rbST (7.82.8; 17593); gruppo rbst + SAP = dieta con 0.3 kg/d di saponi di calcio + rbST (7.92.8; 144111).

La composizione e l'analisi chimica delle razioni è riportata nella tabella 1.

Alle bufale dei gruppi rbST e rbST + SAP è stato somministrato rbST a lento rilascio (Somidobove Ely© Lilly Italia) alla dose di 320 mg/capo ogni 21 giorni e per quattro cicli con iniezione sottocutanea nella regione della fossa ischio-rettale.

La quantità di latte prodotta è stata registrata settimanalmente in corrispondenza di due mungiture consecutive (mungiture della sera e del mattino seguente). Contemporaneamente sono stati prelevati i campioni di latte per determinare il contenuto in grasso e proteina. Limitatamente al secondo ciclo di trattamento e su 5 animali per gruppo è stata effettuata l'analisi delle caseine e delle sieroproteine su campioni prelevati ai giorni 0, 7, 14, 21.

Due punteggiatori hanno rilevato settimanalmente la condizione corporea di 7 bufale per gruppo, secondo quanto indicato dalla tecnica ADAS (1986).

I dati ottenuti, covariati per i giorni di lattazione e per i valori rilevati due settimane prima dell'inizio della sperimentazione, sono stati elaborati mediante analisi della varianza a due fattori (trattamento alimentare, rbST) e a due livelli.

Per quanto riguarda le frazioni azotate i dati sono stati covariati per i giorni di lattazione e per i valori relativi al giorno zero.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come ampiamente dimostrato da altri autori (4,8) la somministrazione di rbST e dei saponi di calcio ha determinato un aumento significativo della produzione di latte e di latte corretto al 4% di grasso (tabella 2).

In corrispondenza del settimo giorno di ogni ciclo di trattamento si è osservato un picco della produzione di latte seguito da una graduale diminuzione. Tale andamento conferisce alla curva di lattazione un aspetto seghettato tipico degli animali trattati con rbST (5). Non è stato osservato alcun effetto dell'ormone somatotropo e dei saponi di calcio sul tenore lipidico del latte (8,10).

L'inclusione di grassi esogeni protetti sembra quindi soddisfare la maggiore richiesta ossidativa conseguente all'aumentata produzione di latte senza esercitare una azione diretta sul contenuto in grasso del latte (4). È stata comunque osservata una flessione del tenore lipidico del latte in corrispondenza del settimo giorno di trattamento in disaccordo con quanto riportato da Bertoni *et al.* (2).

Per quanto concerne il tenore proteico del latte va ricordato che i valori medi dei quattro gruppi nel controllo pre sperimentale, utilizzati nell'analisi della covarianza, erano differenti (C = 4.771.2; SAP = 4.780.94; rbST = 4.511.07; rbST + SAP = 4.941.12).

L'impiego di rbST non ha influenzato la percentuale di proteina del latte (tabella 2) anche se è stata osservata una flessione in corrispondenza del settimo giorno di trattamento, momento coincidente con la massima risposta produttiva. Tale diminuzione può essere spiegata come conseguenza della diluizione della quota proteica a seguito della maggiore quantità di latte prodotta e di una probabile situazione di bilancio azotato negativo in corrispondenza del picco di produzione (10).

Come riportato da Jenkins e Jenny (6), l'inclusione di grassi protetti nella dieta ha ridotto significativamente il tenore proteico del latte (tabella 2).

Non è stato osservato nessun effetto significativo dei saponi di calcio sulle frazioni proteiche del latte (tabella 3).

L'impiego di rbST ha invece provocato una diminuzione significativa della quota proteica e della caseina anche se limitatamente al gruppo di soggetti considerato per l'analisi delle frazioni proteiche del latte. Comunque la quota di caseina non è variata se considerata come percentuale della proteina totale (tabella 3), in accordo con quanto osservato da Kindsted *et al.* (7).

L'impiego di rbST ha causato una diminuzione della condizione corporea (C = 3.11; SAP = 3.01; rbST = 2.85; rbST + SAP = 2.90) la cui entità è stata ridotta dall'inclusione nella dieta dei saponi di calcio.

In conclusione, nell'ambito della nostra sperimentazione, sia l'impiego di ormone somatotropo che quello di saponi di calcio hanno incrementato considerevolmente le performance delle bufale senza modificare il tenore lipidico del latte. I saponi di calcio hanno ridotto significativamente il tenore in proteina mentre non è stato osservato alcun effetto sulle frazioni proteiche del latte. Pur avendo determinato una diminuzione significativa della percentuale di caseina, il trattamento con rbST non ne ha influenzato il contenuto nel latte dal momento che la caseina, espressa come percentuale della proteina totale, è rimasta invariata. Tale aspetto fa presupporre che l'impiego di rbST nella bufala non influenzi le caratteristiche casearie del latte, condizione di importanza fondamentale visto che tale prodotto è destinato totalmente alla trasformazione in mozzarella.

Tabella 1 - Ingredienti e composizione delle razioni.

Alimenti	C	CaS
Insilato di loietto	17.5	17.5
Insilato di mais 33%	8.0	8.0
Pastone mais granella	3.0	3.0
Liquid feed	2.0	2.0
Polpe di bietola essiccate	1.0	1.0
Trebbie di birra essiccate	1.0	1.0
Fieno di loiessa	1.5	1.5
Paglia di frumento	1.5	1.5
Panello di lino	0.8	0.8
Farina di estrazione di soia	2.4	2.4
Integratore minerale 2:1	0.3	0.3
Glicole propilenico	0.1	0.1
Saponi di calcio	—	0.3
Analisi (% S.S.)		
Sostanza secca	49.5	51.5
Proteina grezza	17.5	17.5
Estratto etereo	2.8	4.5
NDF	45.3	45.3
ADF	20.8	20.8
ADL	1.7	1.7
CENERI	8.9	9.0

* S.S. 57%, PG 36% S.S., EE 0.1% S.S., Ceneri 16% S.S.

Tabella 2 - Effetto dell'rbST e saponi di calcio sulla quantità e qualità del latte.

	TRATTAMENTO				
Parametri	C	CaS	rbST	rbST* CaS	SE
Latte kg/d (1)(2)	6.28	7.23	7.35	8.86	.16
FCM, kg/d (1)(2)(4)	10.98	12.65	12.74	14.86	.27
Grasso, %	9.16	9.24	9.01	8.84	.07
Proteina, % (3)	4.80	4.74	4.66	4.75	.02

(1) Effetto significativo del rbST ($P < .001$)
(2) Effetto significativo dei CaS ($P < .001$)
(3) Effetto significativo dei CaS ($P < .05$)
(4) Effetto significativo del rbST * CaS ($P < .01$)

Tabella 3 - Effetto dell'rbST e saponi di calcio sulle frazioni azotate del latte (%).

Parametri	TRATTAMENTO				
	C	CaS	rbST	rbST* CaS	SE
Proteine totali (5)	5.31	5.21	5.06	4.88	.09
Caseine (7)	4.03	3.79	3.87	3.62	.11
Sieroproteine/ Proteine totali (6)	21.02	17.10	17.01	19.37	.98
Caseine/Proteine totali	75.61	76.26	76.36	74.10	1.2
NPN/azoto totale	35.31	42.49	42.30	41.70	2.3

(5) Effetto significativo del rbST ($P<.01$)
(6) Effetto significativo del rbST* CaS ($P<.01$)
(7) Effetto significativo del rbST ($P<.05$)

BIBLIOGRAFIA

1) Barbano D.M., Lynch J.M., Bauman D.E., Haertnell G.F., Hintz R.L., Nemeth M.A. (1992) J. Dairy Sci. *75*, 1775.
2) Bertoni G., Piccioli Cappelli F., Lombardelli R., Maianti M.G., Brambilla E. (1992) Scienza e Tecnica Lattiero Casearia *43 (1)*,18.
3) Chalupa W., Galligan D.T. (1989) J. Dairy Sci. *72*, 2510.
4) Cheli F., Boni R., Pastorino P., Dell'Orto V. (1991) Atti Soc. It. Sc. Vet. *45*.
5) Dell'Orto V. (1991) Atti IX Convegno Nazionale ASPA, 1205.
6) Jenkins T.C. and Jenny B.F. (1992) J. Dairy Sci. 75:796.
7) Kindsted P.S., Peel A.N., Rippe J.K., Tsang D.S., Hartnel G.F. (1991) J. Dairy Sci. *74*, 72.
8) Ludri L.S., Uppadhyay R.C., Mahendra S. (1989) J. Dairy Sci. *72*, 2283.
9) Salimei E., Savoini G., Toppino P., Contarini G., Dell'Orto V. (1992) Zoot. Nutr. Anim. *18*, 241.
10) Savoini G., VanVuuren A.M., Van Dar Koelen C.J. (1992) J. Anim. Phisiol. Anim. Nutr. *68*, 185.

P. WHITE, K.A. BURTON, D. CATTANEO[1] A.P. HARRISON, M.J. DAUNCEY

APPLICAZIONE DI BIOTECNOLOGIE NELLO STUDIO DELLE INTERAZIONI FRA STATO NUTRIZIONALE E ACCRESCIMENTO

Department of Cellular Physiology, AFRC Babraham Institute, Cambridge, England e
[1] Istituto di Alimentazione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria - Via Celoria, 10, 20133 Milano

RIASSUNTO

È stato condotto uno studio sulla regolazione nutrizionale dell'attività dell'ormone della crescita in animali in accrescimento, mediante un approccio biotecnologico.

È stato valutato in che misura alterazioni dello stato energetico possono regolare l'espressione genica del recettore dell'ormone della crescita (*growth hormone receptor* o GHR) indiversi tessuti di suinetti in accrescimento. La quantità relativa di RNAm del recettore dell'ormone dellacrescita è stata determinata mediante la tecnica denominata *solution hybridization/RNase protection assay* e quantificata mediante autoradiografia e *image analysis*. I risultati hanno evidenziato un effetto tessutospecifico dello stato energetico sull'espressione genica di GHR: nel fegato, i livelli di RNAm del recettore dell'ormone della crescita sono risultati correlati positivamente con il tasso di crescita, mentre nel muscolo scheletrico elevati livelli di RNAm di GHR sono risultati associati con i più bassi tassi di crescita dei suinetti.

L'espressione genica di GHR nel fegato ha probabilmente influenzato direttamente la crescita, mentre nel muscolo ha svolto un ruolo metabolico, allorchè le disponibilità energetiche erano limitate.

Parole chiave: espressione genica di GHR - bilancio energetico - nutrizione - accrescimento - suinetti.

BIOTECHNOLOGICAL APPROACH TO THE STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN NUTRITIONAL STATUS AND ANIMAL GROWTH

SUMMARY

In this paper are reported some of the results of a study on the nutritional regulation of *growth hormone* action in growing animals, performed by a biotechnological approach.

It has been investigated the role of energy status in the regulation of *growth hormone* receptor (GHR) gene expression in selected tissues of young growing pigs. Relative abundance of GHR mRNA has been determined by solution hybridization/RNase protection assay and quantified by autoradiography and image analysis.

Results were tissue-specific: hepatic GHR mRNA levels were positevely correlated with growth rate, whereas high levels of skeletal muscle GHR mRNA were associa-

ted with the lowest growth rate. In liver, GHR gene expression probably had a direct influence on animal growth, whereas in muscle may have had a metabolic role when energy supplies were limited.

Key words: GHR gene expression- energy balance- nutrition- growth- piglets.

INTRODUZIONE

La principale attività biologica dell'ormone della crescita (*growth hormone* o GH) è quella di promuovere e regolare il normale accrescimento corporeo dell'individuo giovane. Oltre a stimolare la crescita, il GH presiede a numerose altre attività metaboliche nell'organismo, attraverso azioni sia dirette che indirette. Dal punto di vista delle produzioni animali, l'interesse per l'attività del GH risiede nella sua capacità di stimolo su processi produttivi di estrema importanza, quali la sintesi del latte (nei ruminanti) e le performances di crescita. La sua attività biologica sembra regolata da diversi fattori, fra i quali lo stato fisiologico e nutrizionale dell'animale.

Il primo passaggio dell'attività biologica del GH consiste nella sua interazione con specifici siti recettoriali presenti sulla membrana delle cellule bersaglio. Recettori specifici per l'ormone della crescita sono stati evidenziati a livello di diversi tessuti fra cui quelli adiposo, muscolare ed epatico (4).

Lo stato nutrizionale degli animali influenza l'attività del GH e tale regolazione sembra avvenire principalmente a livello del recettore (4). In manzi alimentati con un basso piano nutrizionale è stata evidenziata una riduzione del numero e della funzionalità dei recettori somatotropici sulle membrane epatiche, rispetto ad animali di controllo (3). Anche nei ratti, la riduzione della quota proteica alimentare ha determinato un abbassamento dei livelli di RNAm per il recettore dell'ormone della crescita nel tessuto epatico (2).

Gli studi sulla regolazione nutrizionale dell'espressione genica del GHR fino ad ora condotti hanno riguardato modificazioni estreme nello stato nutrizionale, tali da impedire il normale accrescimento degli animali. Inoltre è stata posta grande attenzione sulle modificazioni dell'attività di GHR a livello del tessuto epatico, mentre si hanno minori informazioni sulle variazioni nel muscolo scheletrico, nonostante la rilevante capacità di legame del GH evidenziata a tale livello.

Con il presente studio si è voluto valutare in che misura variazioni della quota energetica fornita con la dieta relativamente piccole, tali cioè da non impedire del tutto l'accrescimento, possono regolare l'espressione genica del recettore dell'ormone della crescita (GHR) nel fegato e nel muscolo scheletrico di suinetti in accrescimento tenuti in condizioni di neutralità termica (26°C). Inoltre, per valutare gli effetti di una maggior richiesta energetica metabolica, si è operato anche in condizioni di basse temperature ambientali (10°).

Per questo tipo di studio si è preferito impiegare il suino in quanto è in grado di sopportare ampie variazioni dell'assunzione di cibo e della temperatura ambientale, pur continuando l'accrescimento (8); inoltre il suino rappresenta un buon modello per lo studio dell'attività del GH sulle performances di crescita, in quanto proprio nel suino sono state messe in luce le maggiori risposte al GH esogeno in termini di riduzione del tessuto adiposo e aumento dello sviluppo scheletrico e muscolare

(1). Infine il suino rappresenta un buon modello metabolico anche per lo studio dell'accrescimento dei bambini, in quanto la sua temperatura critica e zona di termoneutralità sono simili a quelle dell'uomo.

Il presente lavoro è parte di un più ampio studio recentemente pubblicato (6).

MATERIALI E METODI

Animali e disegno sperimentale

Per la sperimentazione sono state impiegate sei nidiate di suinetti di razza Large White, composte ciascuna da 4 soggetti di 21 giorni di età e di sesso maschile. I suinetti venivano alloggiati individualmente per un periodo sperimentale di 4 settimane, in condizioni di assunzione di cibo e di temperatura controllate. All'interno di ciascuna nidiata il trattamento alimentare era così differenziate: in due soggetti l'assunzione di cibo era elevata (H), mentre negli altri due era bassa (L), in modo che la quota energetica assunta dai soggetti H fosse il doppio di quella assunta dai soggetti L. Il pasto veniva somministrato una volta al giorno alle ore 9:30. La quantità di alimento somministrato è stata gradualmente aumentata al crescere degli animali, ma il rapporto H:L è rimasto costante per tutta la durata della prova. L'analisi chimica dell'alimento somministrato era la seguente: 32% carboidrati; 22,5% proteine; 5,5% lipidi; 3,5% fibra; 6% ceneri, con l'aggiunta di vitamine e di sali minerali; l'energia era pari a 14 kJ/g t.q. A sette settimane di età l'assunzione giornaliera di cibo era pari a 700 g e a 350 g e l'energia fornita era pari a 9,8 MJ e 4,9 MJ, rispettivamente per le diete H e L.

Per ogni trattamento alimentare, un soggetto veniva mantenuto ad una temperatura pari a 26°C (termoneutralità) mentre per l'altro la temperatura ambientale veniva gradualmente abbassata, nell'arco di 1-2 settimane, fino a 10°C, temperatura alla quale il dispendio energetico per la termoregolazione è sensibilmente più elevato (8). All'interno di ogni nidiata vi erano quindi quattro trattamenti: 26H, 26L, 10H, 10L.

L'acqua è stata somministrata *ad libitum* per l'intera durata della prova.

I soggetti sperimentali erano tenuti per 12 ore alla luce e per 12 ore al buio.

Campionamento dei tessuti

A sette settimane di età, 20-24 ore dopo l'ultimo pasto, i soggetti sperimentali venivano sacrificati. Fegato e muscolo scheletrico venivano rimossi il più rapidamente possibile, divisi in porzioni di 5 g ciascuna, congelati in azoto liquido e conservati a una temperatura di —70°C. Il muscolo scheletrico scelto per le determinazioni analitiche era il *longissimus dorsi* in quanto costituisce gran parte dell'intera massa muscolare.

Determinazione dell'RNAm del recettore dell'ormone della crescita

Isolamento e quantificazione dell'RNA totale

L'isolamento dell'RNA totale dal tessuto congelato è stato condotto mediante estrazione con tiocianato guanidinico/fenolo-cloroformio, secondo il metodo descritto

da Chomczynsky e Sacchi (5). La quantificazione dell'RNA totale è stata effettuata mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm (1 unità di densità ottica = 40 μg RNA/ml soluzione).

Costruzione dei vettori di trasferimento

Per una descrizione dettagliata della metodica seguita per il clonaggio unidirezionale, in vettori plasmidici Bluescript (Stratagene, Cambridge, UK), degli opportuni frammenti di DNA codificanti le regioni intra e extracellulari del recettore dell'ormone della crescita si fa riferimento a Dauncey *et al.*, (6). I frammenti di DNA erano stati ottenuti per amplificazione PCR in presenza degli oligonucleotidi opportuni.

Solution hybridization/RNase protection assay

I plasmidi ricombinanti sono stati linearizzati mediante digestione con XbaI, trascritti con RNA polimerasi T7 in presenza di (alfa 32P) UTP (uridina trifosfato) per produrre sonde a RNA antisenso, marcate radioattivamente, per il riconoscimento delle regioni intra e extracellulare di GHR. La sonda per GHR intracellulare era costituita da 200 nucleotidi, dei quali 140 protetti nell'*RNase protection assay*, mentre la sonda per GHR extracellulare era costituita da 250 nucleotidi, dei quali 186 protetti. Per tutte le specie fino ad oggi studiate entrambe le sonde, extra- e intracellulare, possono essere impiegate per la determinazione dell'RNAm dell'intero recettore dell'ormone della crescita.

L'uniformità delle condizioni di ibridizzazione e di recupero degli ibridi è stata controllata mediante inclusione, in tutte le reazioni di ibridizzazione, di uno standard positivo (*lambda* C1), per la cui preparazione si veda Dauncey *et al.* (6). Le determinazioni della quantità di RNAm del GHR mediante *solution hybridization/RNase protection assay*, condotte in doppio su 50 μg di RNA totale isolato dai tessuti epatico e muscolare, sono state effettuate con metodiche analoghe a quelle descritte da Saunders *et al.* (10). Dopo l'ibridizzazione dell'RNA totale con le sonde radioattive, alle soluzioni sono stati aggiunti RNasi A e RNasi T1 per la digestione dell'RNA non ibridizzato. Gli ibridi marcati radioattivamente sono stati recuperati mediante precipitazione con etanolo, separati tramite elettroforesi su gel di poliacrilamide e successivamente rilevati mediante autoradiografia. Le intensità relative delle bande sulle autoradiografie, corrispondenti agli ibridi protetti, sono state poi quantificate tramite *image analysis* (Seescan, Cambridge, U.K.).

I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza (Genstat - Lawes Agricultural Trust, U.K.) per un disegno a blocchi randomizzati in cui i blocchi erano le nidiate e i trattamenti erano la quota energetica fornita dalla dieta e la temperatura ambientale.

RISULTATI

Tasso di crescita

Gli animali mantenuti con la quota energetica più elevata e in condizioni di termoneutralità sono cresciuti più rapidamente di quelli con livelli di ingestione alimen-

tare e di temperatura più bassi. Il peso iniziale dei soggetti, a 21 giorni di età, era simile in tutti i gruppi (circa 5 kg); al termine del periodo sperimentale di quattro settimane, i pesi medi (kg) erano i seguenti: 12,5 ± 0,3 (gruppo 26H); 8,7 ± 0,6 (gruppo 26L); 9,8 ± 0,3 (gruppo 10H); 6,3 ± 0,4 (gruppo 10L). Entrambi i trattamenti (dieta e temperatura) hanno influito significativamente sul tasso di accrescimento ($P < 0,001$).

RNA totale

La quantità di RNA totale rilevata nei tessuti dei suinetti al termine del periodo sperimentale è risultato essere circa quattro volte maggiore nel fegato rispetto al muscolo scheletrico (tabella 1). Ciò significa che se i dati relativi alla quantità di uno specifico RNAm sono espressi sull'unità di peso (e non sull'RNA totale) del tessuto, i valori per il muscolo sono considerevolmente inferiori a quelli per il fegato.

Il livello di RNA totale nel fegato non è stato influenzato dai trattamenti, mentre nel muscolo scheletrico è risultato significativamente ridotto ($P < 0,001$) quando ai suinetti era stata fornita meno energia con la dieta.

Espressione del gene del recettore dell'ormone della crescita (GHR)

Fegato

La quantità relativa di RNAm del GHR nel tessuto epatico è risultata significativamente inferiore ($P < 0,001$) nei soggetti alimentati con il più basso livello di principi nutritivi, rispetto ai soggetti che avevano ricevuto il piano alimentare più elevato. Ciò è stato evidenziato con entrambe le sonde impiegate, complementari alle regioni intra ed extracellulare del recettore del GH.

Non è stata invece riscontrata alcuna influenza significativa della temperatura ambientale; tuttavia va ricordato che la riduzione della quantità di RNAm del GHR nel tessuto epatico dei suinetti del gruppo L è stata più marcata quando la temperatura ambientale era di 10°C (—50%) rispetto a quando era stata mantenuta una condizione di termoneutralità (—34%).

Anche esprimendo i risultati sull'unità di peso del tessuto è stato evidenziato un effetto significativo della dieta ($P < 0,001$ e $P < 0,004$ rispettivamente con le sonde per GHR intracellulare e extracellulare) e nessuna influenza della temperatura ambientale (tabella 2).

Dato che i risultati ottenuti impiegando le sonde per le regioni intra e extracellulare di GHR sono stati simili, verranno qui di seguito riportati solo i dati relativi alla sonda per GHR intracellulare.

Muscolo scheletrico

In netto contrasto con i risultati relativi al fegato, la quantità relativa di RNAm del GHR nel muscolo scheletrico è risultata significativamente più elevata ($P < 0,02$) a seguito della minore assunzione di cibo. Inoltre, anche la temperatura ambientale ha significativo influito sui livelli di RNAm del GHR, che sono risultati maggiori a 10°C rispetto a 26°C ($P < 0,04$).

Quando i risultati sono stati calcolati sull'unità di peso (tabella 2), solamente l'effetto della temperatura ambientale si è mantenuto significativo ($P = 0,057$), no-

nostante le ampie variazioni individuali, mentre l'effetto della dieta non è più risultato significativo, in quanto vi era una minor quantità di RNA totale nel muscolo dei suinetti che avevano ricevuto la dieta L.

Considerando i due trattamenti estremi, i livelli di RNAm del GHR nel muscolo scheletrico sono risultati significativamente più elevati nel gruppo 10L rispetto al gruppo 26H ($P < 0,05$, *t* test).

Relazione fra espressione genica di GHR e tasso di crescita

I livelli dell'RNAm che codifica GHR nel fegato sono risultati correlati positivamente con il tasso di crescita dei suinetti ($r = 0,71$; $P < 0,001$). La correlazione non è stata perfetta, in quanto il tasso di crescita è stato influenzato sia dallo stato nutrizionale che dalla temperatura ambientale, mentre l'espressione genica di GHR nel fegato è stato influenzata solo dallo stato nutrizionale.

Contrariamente ai dati relativi al tessuto epatico, i livelli di RNAm di GHR nel muscolo scheletrico sono risultati correlati negativamente al tasso di crescita ($r = -0,62$; $P < 0,005$).

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio hanno chiarito alcuni importanti aspetti relativi ai meccanismi che regolano l'accrescimento postnatale nei mammiferi: in primo luogo è stato evidenziato il ruolo cruciale dello stato nutrizionale nel regolare la trascrizione del gene che codifica GHR in modo tessuto-specifico; inoltre sono state messe in luce funzioni differenti svolte dal recettore del GH a seconda del tessuto preso in esame.

Per quanto riguarda il ruolo dello stato energetico nella regolazione dell'espressione genica del GHR, i risultati indicano che una riduzione relativamente piccola dell'assunzione di alimento, tale cioè da non compromettere del tutto l'accrescimento, ha determinato una riduzione del livello di RNAm di GHR nel tessuto epatico, in analogia a quanto già osservato in animali in accrescimento tenuti a digiuno per 1-3 giorni (2). Al contrario, nel muscolo scheletrico è stato osservato un aumento della quantità di RNAm di GHR, quando la disponibilità di energia per l'accrescimento era limitata o per via di una bassa ingestione alimentare o di una maggiore richiesta metabolica. Dato che la quantità di un dato RNAm rilevabile in un tessuto dipende dalla rapidità del suo *turnover*, non è possibile escludere che l'influenza di fattori ambientali quali la nutrizione e la temperatura avvenga non solo a livello della fase di trascrizione, ma anche di stabilità e di traduzione dell'RNAm del recettore di GH. Si ritiene quindi utile in futuro approfondire lo studio di tali aspetti, valutando in che misura le variazioni osservate nel presente studio siano in relazione a variazioni della quantità e della distribuzione della proteina sintetizzata (GHR).

I risultati della presente indagine hanno inoltre evidenziato una risposta tessuto-specifica del recettore dell'ormone della crescita alle variazioni di stato nutrizionale. Infatti la maggiore assunzione di energia ha regolato l'espressione genica di GHR aumentandola nel fegato e diminuendola nel muscolo scheletrico. Inoltre la bassa temperatura ambientale ha determinato nel muscolo scheletrico un aumento del li-

vello dell'RNAm che codifica il GHR. In soggetti simili a quelli impiegati nel presente studio, ma mantenuti a temperature ambientali di 35°C o 10°C, è stato osservato a 10°C un aumento dell'attività di alcuni enzimi respiratori del muscolo *longissimus dorsi* (8) e una maggiore proporzione di fibre di tipo ossidativo, a lenta contrattilità (7).

Inoltre è stato ipotizzato un ruolo del GH nell'aumentare la capacità ossidativa e la proporzione delle fibre muscolari a lenta contrattilità (9). È quindi possibile che l'aumentato livello di RNAm per il recettore del GH rilevato nel muscolo scheletrico dei soggetti mantenuti a 10°C sia da mettere in relazione ad un aumento della capacità ossidativa e di resistenza alla fatica del muscolo.

In conclusione, lo stato energetico influenza in maniera cruciale e tessuto-specifica la trascrizione del gene che codifica il recettore dell'ormone della crescita; probabilmente il recettore del GH a livello del tessuto muscolare svolge un ruolo metabolico allorchè le disponibilità energetiche sono limitate, mentre a livello del tessuto epatico svolge principalmente un ruolo di regolazione della crescita.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Sig. D. Brown, Statistics Group, AFRC Babraham, per la collaborazione fornita nell'analisi statistica dei dati; P.W. Sandwich Course, Brunel University, Londra; D.C., contributo CNR, PF RAISA, Sottoprogetto 3; A.P.H., borsista AFRC.

Tabella 1 - Quantità di RNA totale nel fegato e muscolo scheletrico (mg/g di tessuto)

Tessuto	Trattamenti			
	26H	26L	10H	10L
Fegato	2,12 ±0,22	1,93 ±0,11	2,08 ±0,09	1,84 ±0,09
Muscolo[1]	0,55 ±0,02	0,45 ±0,03	0,55 ±0,04	0,41 ±0,04

(1) Effetto della dieta ($P < 0,001$)

Tabella 2 - Livelli di RNAm del recettore dell'ormone della crescita (GHR) nel fegato e nel muscolo scheletrico (unità arbitrarie di densità/g di tessuto)

Tessuto	Trattamenti			
	26H	26L	10H	10L
Fegato (intracellulare)[1]	1007 ±169	587 ±66	931 ±133	407 ±56
Fegato (extracellulare)[2]	554 ±91	294 ±37	417 ±69	219 ±30
Muscolo (intracellulare)[3]	235 ±45	280 ±31	330 ±82	387 ±32

(1) Effetto della dieta ($P < 0,001$)
(2) Effetto della dieta ($P < 0,004$)
(3) Effetto della temperatura ($P = 0,057$)

BIBLIOGRAFIA

1) Boyd R.D., Bauman D.E. (1989) *Mechanisms of action for somatotrophin in growth.* In: «Animal Growth Regulation» (Campion D.R., Hausman G.J., Martin R.J. eds.) pp 257-293, Plenum Press, New York.

2) Bornfeldt K.E., Arnqvist H.J., Enberg B., Mathews L.S., Norstedt G. (1989) *Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissue.* J. Endocrinol. *122*, 651-656.

3) Breier B.H., Gluckman P.D., Bass J.J. (1988) *The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and oestradiol-17b on hepatic high- and low-affinity somatotrophic binding sites.* J. Endocrinol. *116*, 169-177.

4) Breier B.H., Gluckman P.D. (1991) *The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. Livest. Prod. Sci. 27*, 77-94.

5) Chomczynsky P., Sacchi N. (1987) *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal. Biochem. *162*, 156-159.

6) Dauncey M.J., Burton K.A., White P., Harrison A.P., Gilmour R.S., Duchamp C., Cattaneo D. (1994) *Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression.* The FASEB J. *8*, 81-88.

7) Harrison A.P., Clausen T., Duchamp C., Dauncey M.J. (1993) *Roles of skeletal muscle morphology and activity in determining Na+, K+ -ATPase concentration in young pigs.* Am. J. Physiol., (in stampa).

8) Ingram D.L., Dauncey M.J. (1986) *Environmental effects on growth and development.* In: Control and Manipulation of Animal Growth, Buttery P.J., Haynes N.B., Lindsay D.B. eds., pp.5-20, Butterworths, London.

9) Lakehal F., Hannah M.J., Crompton L.A., Lomax M.A. (1989) *The effect of growth hormone on muscle enzyme activity and lactate dehydrogenase isoenzyme pattern.* In: Biotechnology in Growt Regulation, Heap R.B., Prosser C.G., Lamming G.E. eds., p 232, Butterworths, London.

10) Saunders J.C., Dickson M.C., Pell J.M., Gilmour R.S. (1991) *Expression of a growth hormone -responsive exon of the ovine insulin-like growth factor-I gene.* J. Mol. Endocrinol. *7*, 233-240.

La conferenza è stata realizzata nell'ambito delle manifestazioni indette per la 4ª Settimana della Cultura Scientifica Italiana, promossa dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica, con la collaborazione della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, del Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche di Milano e con il patrocinio di:

— *Università degli Studi di Milano*
— *Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano, Bologna e Napoli*
— *Istituto per la difesa e la valorizzazione del germoplasma animale - CNR*
— *CNR-Raisa*
— *Consorzio Interuniversitario Biotecnologie*
— *AISA - Federchimica*
— *Sintofarm S.p.A.*
— *Vetindustria*