

LA SELEZIONE GENETICA E LE CASEINE: COSA CI DICONO I RISULTATI DEL PSRN

di Stefania Chessa¹ e Stefano Gattolin²

1) Dipartimento Di Scienze Veterinarie, Università Degli Studi Di Torino
2) Istituto Di Biologia E Biotecnologia Agraria, Consiglio Nazionale Delle Ricerche



Nel progetto LATTeco, ANAFIJ ha dedicato una parte allo studio più approfondito sulle proteine del latte bovino, nelle razze Frisona e Jersey Italiane. Abbiamo voluto approfittare della possibilità di avere a disposizione tanti nuovi genotipi e quindi abbiamo studiato più nel dettaglio e con un data-set più ampio la variabilità genetica di queste proteine nelle due razze. Per la Jersey Italiana, è stato un primo approccio alla genomica, fondamentale per la messa a punto di un sistema di genotipizzazione e flusso dati genomici.

INTRODUZIONE

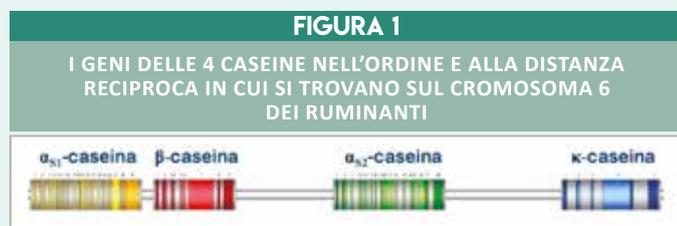
Le proteine del latte vaccino, ovvero i geni che contengono l'informazione per la loro produzione, presentano delle mutazioni che differenziano fra loro le proteine prodotte dai singoli animali. A seconda della sequenza genica, quindi, si avranno proteine con caratteristiche ed effetti diversi sulla qualità nutrizionale o tecnologica del latte. Studiare la sequenza di aminoacidi nelle singole proteine o la sequenza del DNA che è responsabile della loro produzione, non è però cosa semplice. Sono necessarie, però, specifiche tecniche biochimiche che richiedono un investimento di tempo e denaro per avere un quadro completo della variabilità genetica delle lattoproteine bovine e delle altre specie zootecniche. Questo è uno dei motivi per cui le varianti genetiche delle caseine sono state prese raramente in considerazione nei programmi di selezione. A partire dagli anni '90, dopo alcune preoccupazioni in Nuova Zelanda per i potenziali **effetti negativi del consumo di latte di β -caseina A_1 sulla salute umana**, l'azienda A_2 Corporation ha iniziato a **commercializzare latte prodotto solo da individui portatori di β -caseina A_2A_2** . Da tutte le proteine del latte, durante la digestione, vengono rilasciati dei frammenti di diverse dimensioni chiamati peptidi bioattivi, che possono avere effetto sulla salute umana (ad esempio sul sistema cardio-circolatorio

regolando la pressione, sul sistema nervoso con effetti rilassanti o stimolanti, eccetera). Fra tutti i peptidi liberati, si è ipotizzato che il peptide con proprietà oppioidi **β -casomorfina-7 (BCM7)** fosse il fattore di rischio in malattie come *il diabete di tipo 1, la dermatite atopica, malattie cardio-vascolari e disturbi neurologici*. Le varianti A_2 , A_3 e I di β -caseina differiscono dalle varianti A_1 , B e C per la sostituzione dell'amminoacido istidina (His) con una prolina (Pro) in posizione 67 nella proteina. La presenza di His67 permette agli enzimi digestivi di liberare la BCM7 dal latte di vacche portatrici delle ultime tre varianti. In seguito a queste preoccupazioni sono stati effettuati altri studi che **non sono riusciti a dimostrare una relazione diretta fra le varianti genetiche della β -caseina e queste patologie**, quindi anche **l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) nel 2009 si è espressa smentendo l'ipotesi di una relazione causa-effetto fra la BCM7 e le suddette patologie**. Nuove ricerche hanno indicato **possibili intolleranze ed effetti gastrointestinali della BCM7, associando il consumo di latte contenente la variante A_1 a transito intestinale ritardato, minore consistenza delle feci e infiammazione intestinale, effetti confermati su animali da laboratorio e studi in vitro**. Servono però ulteriori studi per comprendere il meccanismo di azione della BCM7 e per verificare se nell'uomo esistono effetti negativi generali o limitati a individui sensibili.

LATTeco: ANALISI GENOMICHE, PANNELLI DNA DISPONIBILI

Nel 2007 si è reso disponibile sul mercato uno strumento di analisi genetica in grado di agevolare lo studio del DNA di ogni singolo animale come mai prima di allora, il DNA chip. Negli ultimi anni questi DNA chip sono stati progressivamente modificati per consentire di analizzare anche le mutazioni presenti nei geni delle caseine. Non tutti i chip contengono le stesse informazioni e **comprendere quali informazioni sono contenute in cia-**

scun chip non è in realtà cosa molto semplice. LATTECO-PSRN ci ha dato la possibilità di capire quante e quali mutazioni delle caseine sono analizzabili con i chip e di poter usare queste informazioni per capire quali sono le varianti genetiche che caratterizzano ciascun animale. Da queste informazioni siamo partiti anche per ricostruire gli aplotipi caseinici. I geni delle caseine sono infatti collocati sul cromosoma 6 e sono molto vicini tra loro. Questo comporta che la variante genetica presente in ciascuno dei 4 geni di ciascuno dei 2 cromosomi venga ereditata di padre/madre in figlio/figlia così come è nella sequenza α_{s1} -, β -, α_{s2} -, e K-caseina, senza possibilità di rimescolamento fra i cromosomi e si parla quindi di aplotipo caseinico.



Quindi l'effetto di un allele di uno dei 4 geni si va a sommare all'effetto degli alleli degli altri 3 geni dello stesso cromosoma. Se una vacca ereditasse il cromosoma materno con tutti gli alleli favorevoli a tutti e 4 i geni, e il cromosoma paterno con tutti gli alleli sfavorevoli a tutti e 4 i geni, avrebbe delle produzioni intermedie. Sarebbe auspicabile quindi conoscere non soltanto gli alleli presenti in ciascun gene, ma anche come questi sono distribuiti sui 2 diversi cromosomi, ovvero conoscere i 2 aplotipi che ogni vacca e ogni toro può trasmettere alla progenie. In questo modo si potrebbe cercare di avere un individuo con tutti gli alleli più favorevoli in ciascuno dei geni delle caseine e in ciascun cromosoma, ma non è così facile averlo. A seconda della razza bovina alcuni aplotipi sono più diffusi rispetto ad altri e quando un aplotipo è poco diffuso bisogna analizzare molti animali per trovare un numero sufficiente di animali con quel particolare aplotipo.

LATTECO NEL DETTAGLIO (FRISONA E JERSEY ITALIANA)

Il progetto **LATTECO-PSRN** ha permesso di analizzare i **dati storici di 213.124** individui di razza Frisona ed è stato **possibile genotipizzare e analizzare oltre 10.531 vacche di razza Frisona e 622 di razza Jersey**. Considerando anche le mutazioni a monte e a valle dei geni delle caseine, abbiamo trovato che sui diversi chip si trovano un totale di 62 mutazioni a singolo nucleotide (SNP) riconducibili alle caseine. Di questi, 8 corrispondono in realtà a SNP in duplicato o triplicato chiamati con nomi diversi, riducendo a 54 il numero reale di SNP unici. Dei 54 SNP solo una parte determina delle differenze nelle proteine dei

sogetti di razza Frisona. Inoltre coi chip non si possono ancora analizzare tutte le mutazioni presenti sui geni. Ad esempio, gli SNP nel gene α_{s1} -caseina necessari a distinguere alcuni alleli di potenziale interesse, quali C, E, F e G non sono presenti sui chip e pertanto non è stato possibile analizzarli. Un quadro più completo della variabilità genetica si ha per **la β - e la K-caseina**. Abbiamo quindi potuto analizzare nel dettaglio queste 2 proteine e gli aplotipi β -k-caseina e vedere **come le loro frequenze sono cambiate in più di 30 anni e quale sia oggi la variabilità genetica delle caseine nella Frisona Italiana**. Nella figura 2 sono riportati i risultati delle frequenze degli alleli di β -caseina in bovini di razza Frisona nati prima del 1990, in quelli nati fra il 1990 e il 2000, in quelli nati fra il 2000 e il 2010, in quelli nati fra il 2010 e il 2017, nelle vacche Frisone e Jersey genotipizzate grazie al PSRN.

L'allele più frequente è l' A_2 , con una frequenza che nella Frisona è aumentata negli anni, dal 45,6% degli individui nati prima del 1990 al 56,4% nei campioni del PSRN. Parallelamente è diminuita la frequenza degli alleli A_1 e B. Grazie al successo del latte A_2A_2 nei Paesi anglosassoni, il seme dei tori A_2A_2 è stato usato con maggior frequenza, ma non in modo sostanziale in Italia. Infatti, si è cominciato a discutere della BCM7 e degli effetti delle 2 varianti soprattutto dopo il 2009. L'analisi dei dati storici ci dice che la frequenza dell'allele A_1 negli anni 2010-2017 rispetto alle vacche del PSRN è diminuita solo dello 0,3%. Probabilmente fra qualche anno si noterà una maggiore riduzione, soprattutto se dovessero essere confermati gli effetti sulla miglior digeribilità del latte A_2 . Nella Jersey la frequenza dell'allele A_2 è decisamente maggiore rispetto alla Frisona (73,0%), mentre la frequenza della variante A_1 è davvero bassa (4,1%) e la variante B è la seconda in termini di frequenza (17,3%). In realtà le varianti A_2 , A_3 , D, E, H_2 e I si comportano tutte nello stesso modo, ovvero non determinano la liberazione del peptide BCM7 e possiamo pertanto definirle gruppo A_2 , mentre dalle varianti A_1 , B, C, F, G, e H_1 avviene il rilascio della BCM7 e possiamo definirle come gruppo A_1 . Considerando la distribuzione dei genotipi, gli A_2A_2 totali (A_2A_2 reali e omozigoti per gli alleli del gruppo A_2) corrispondono al 36% nella Frisona, al 37% nelle vacche Frisone del PSRN, e del 63% nella Jersey, gli A_1A_1 totali (A_1A_1 reali e omozigoti per gli alleli del gruppo A_1) corrispondono al 16% nella Frisona, al 15% nelle

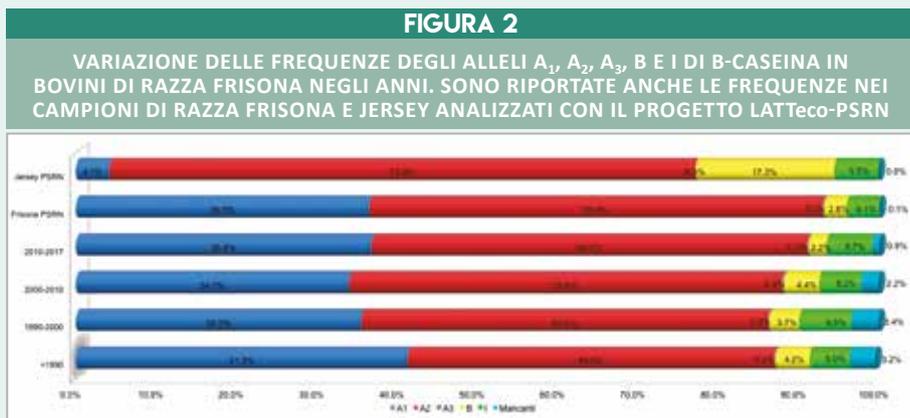
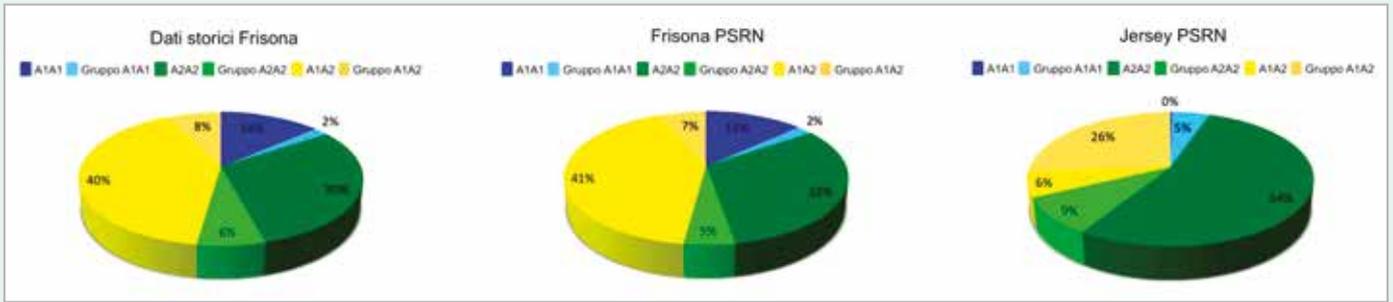


FIGURA 3

DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI A_1A_1 , A_1A_2 E A_2A_2 (REALI E DEI GRUPPI DI ALLELI RICONDUCEBILI ALLE VARIANTI A_1 E A_2 PER LA BCM7) NEI DATI STORICI DI FRISONA E NEI BOVINI DI RAZZA FRISONA E JERSEY ANALIZZATI COL PROGETTO LATTECO-PSRN



vacche Frisone del PSRN, e del 5% nella Jersey, mentre gli A_1A_2 totali (A_1A_2 reali e eterozigoti dei 2 gruppi A_1 e A_2) corrispondono al 48% nella Frisona e al 32% nella Jersey. Una grande proporzione dei bovini di razza Frisona è quindi eterozigote per il gruppo A_1A_2 (in giallo nella Figura 3) mentre quelli di razza Jersey sono soprattutto in verde, ovvero A_2A_2 .

Recentemente, De Noni e i suoi collaboratori, analizzando diversi formaggi, hanno dimostrato che non in tutti i formaggi, anche se prodotti con latti contenenti la proteina β -caseina A_1 , si trova il peptide BCM7 prima della digestione. In seguito alla digestione intestinale *in vitro* di alcuni formaggi originariamente contenenti BCM7, è risultato che la quantità finale di BCM7 non sembra comunque essere sufficiente per esercitare una potenziale attività fisiologica. Diverse ricerche sono in corso per verificare cosa succede *in vivo*, ma bisogna comunque tener presente che altri peptidi vengono rilasciati durante la digestione del formaggio e che questi potrebbero avere effetti simili, ma anche effetti opposti a quelli della BCM7.

Per quanto concerne la K-caseina, l'allele A è il più frequente nella Frisona, mentre il B nella Jersey. Si nota comunque un aumento della frequenza dell'allele B, noto per la sua associazione positiva con le caratteristiche di trasformazione casearia, nella Frisona, dove è passato da una frequenza del 18,6% a una frequenza del 32,2%. Sarebbe quindi che la selezione per l'allele B di K-caseina sia stata molto più efficace di quella per la A_2 di β -caseina. Diversi lavori hanno messo in luce come alcuni aplotipi o combinazioni

TABELLA 1

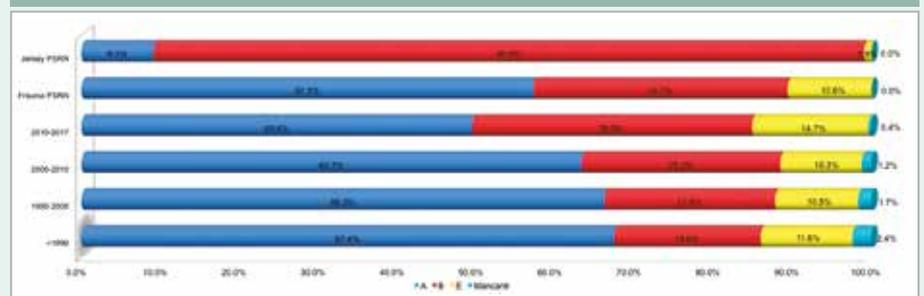
LIVELLI DI BETA-CASOMORFINA-7 IN CAMPIONI DI FORMAGGIO NON DIGERITI E DOPO DIGESTIONE GASTRICA E INTESTINALE FATTA *IN VITRO* (Modificata dal lavoro di De Noni e collaboratori pubblicato nel 2015)

FORMAGGIO	BCM7 (MG/KG) NEI CAMPIONI INDIGERITI	BCM7 (MG/KG) DOPO DIGESTIONE GASTRICA	BCM7 (MG/KG) DOPO DIGESTIONE INTESTINALE
Brie	0,60±0,00	-	-
Caprino	n.r.*	-	-
Cheddar	0,27±0,01	0,25±0,02	1,26±0,00
Emmental	0,20±0,01	-	-
Fontina	0,50±0,02	-	-
Gorgonzola	7,63±1,00	2,87±0,02	0,89±0,03
Gouda	0,59±0,01	-	-
Grana Padano	0,14±0,00	n.r.	0,12±0,00
Maasdam	0,18±0,00	n.r.	0,24±0,00
Provolone	n.r.*	-	-
Provolone piccante	n.r.*	-	-
Taleggio	0,21±0,03	-	-

* n.r. = non rilevabile

FIGURA 4

VARIAZIONE DELLE FREQUENZE DEGLI ALLELI A, B E DI K-CASEINA IN BOVINI DI RAZZA FRISONA NEGLI ANNI. SONO RIPORTATE ANCHE LE FREQUENZE NEI CAMPIONI DI RAZZA FRISONA E JERSEY ANALIZZATI CON IL PROGETTO LATTECO-PSRN



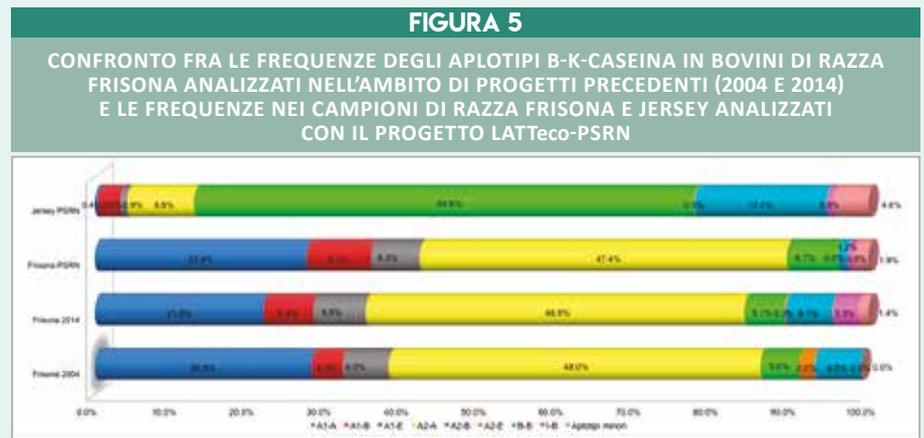
genotipiche siano positivamente associate a migliori caratteristiche di trasformazione casearia, come l'aplotipo B- A_1 -B (α_{s1} - β -k) o la combinazione BB-BB di genotipi β -k-caseina. Per questo motivo la selezione contro le varianti A_1 e B di β -caseina potrebbe portare a un peggioramento delle caratteristiche di trasformazione casearia del latte di Frisona. Abbiamo quindi ricostruito gli aplotipi β -k-caseina nella Frisona e nella Jersey del PSRN. La

frequenza degli aplotipi riscontrati dimostra come l'incremento della variante B di K-caseina stia compensando l'incremento dell'allele A_2 di β -caseina, permettendo di mantenere pressoché inalterata la proporzione degli aplotipi favorevoli alla caseificazione. Malgrado questo, la frequenza degli aplotipi B-B e I-B, associati a buone caratteristiche di trasformazione casearia, sta diminuendo fortemente e andrebbe monitorata. In particolare, avendo

individuato i soggetti portatori delle diverse combinazioni in oltre 10.000 animali, sarebbe interessante andare a confermare l'effetto di questi aplotipi sulle caratteristiche di coagulazione del latte ed eventualmente pensare di indirizzare la selezione in funzione della destinazione del latte, alimentare o da trasformare. Nella Jersey l'aplotipo predominante è risultato chiaramente l'A₂-B, ma la frequenza dell'aplotipo B-B è decisamente elevata, raggiungendo il 17,1%.

CONCLUSIONI

L'analisi condotta nell'ambito del PSRN ci ha mostrato che in Italia forze diverse dalla selezione diretta per l'allele della β -caseina A₂ sembrano essere responsabili di un cambiamento nelle frequenze alleliche delle caseine. Stiamo assistendo a un'importante riduzione della frequenza di alcuni alleli e aplotipi, come la variante B di β -caseina, inclusa in genotipi e aplotipi associati a proprietà tecnologiche favorevoli. La selezione di altri alleli in altri loci caseinici, come la variante B della



K-caseina, compensa in qualche modo la perdita di variabilità genetica e aplotipica. Sono in corso ricerche per analizzare se la variante della β -caseina A₁ sia realmente responsabile di una minore digeribilità del latte, ma la maggior parte degli studi si sta concentrando sulla singola variante, invece di considerare il latte come la complessa miscela di nutrienti che lo compongono e sono responsabili della sua proprietà. Inoltre, sembra che la quantità di BCM7 presente nei formaggi sia insufficiente per esercitare un effetto biologico in vivo. Considerando che

il latte in Italia è principalmente utilizzato per la produzione del formaggio, a meno che non vengano pubblicati nuovi studi scientifici sugli effetti negativi della BCM7 e sulla sua presenza nei formaggi, la crescente disponibilità di dati di genotipizzazione dovrebbe essere utilizzata per una migliore comprensione degli effetti reali dei genotipi e degli aplotipi della caseina sulle proprietà nutrizionali e tecnologiche del latte. In questo modo si potrebbero approntare schemi di selezione più adatti al mercato lattiero-caseario italiano.