

METODI DI DIAGNOSI DELLE MUTAZIONI NEL GENE DELLA MIOSTATINA NELLA RAZZA MARCHIGIANA

Marchitelli C. (1), Crisà A. (1), Filippini F. (2), Valentini A. (1)

(1) Dipartimento di Produzioni Animali - Università della Tuscia - Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italia

(2) ANABIC - Via Visciolo, 06070 S. Martino in Colle, Perugia, Italia

RIASSUNTO - In alcune razze bovine da carne il fenotipo a doppia coscia può essere attribuito a mutazioni nel locus della miostatina, che presenta un gran numero di varianti. L'identificazione di queste mutazioni nel gene della miostatina prevede l'utilizzazione di differenti test, alcuni dei quali piuttosto difficili, mentre il genotyping ideale di uno SNP (Single nucleotide polymorphism) dovrebbe essere accurato, poco dispendioso (riguardo ai tempi di realizzazione ed ai costi), facile da realizzare e capace di analizzare un alto numero di campioni. In questo lavoro viene riportata l'analisi dei polimorfismi nel terzo esone e nel promotore di questo gene nella razza Marchigiana, utilizzando differenti tecniche quali DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e minisequenziamento.

PAROLE CHIAVE: Marchigiana, GDF-8, SNP, DHPLC

INTRODUZIONE

Il carattere "doppia coscia" è presente con una frequenza elevata in alcune razze bovine, come nella Blu Belga e nella Piemontese, mentre in altre razze è molto bassa, fino a casi in cui si presenta solo sporadicamente. Tale carattere è causato dall'inattivazione della miostatina, un membro della famiglia dei transforming growth factor β (TGF- β), codificata dal gene GDF-8 (Growth differentiation factor 8) (Arnold *et al.*, 2001). Nei bovini, in tale gene sono state identificate numerose mutazioni, alcune delle quali sono silenti o neutrali. (Kambadur *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1998, Marchitelli *et al.*, 2003; Dunner *et al.*, 2003; Crisà *et al.*, 2003).

La Marchigiana è una tipica razza da carne allevata nell'Italia centrale, e alla fine del 2003 è stata registrata una consistenza di 46030 capi (www.anabic.it).

Nella razza Marchigiana, la mutazione che inattiva la miostatina è una transversione G>T alla posizione 871 del gene, a partire dal codone di inizio della traduzione, che determina la variazione di un codone per l'acido glutamico in un codone di stop (mutazione E291) (Cappuccio *et al.*, 1998; Marchitelli *et al.*, 2003). Nella regione del promotore del gene GDF-8 sono stati descritti due polimorfismi, (Crisà *et al.*, 2002; Crisà *et al.*, 2003) una transversione T>A alla posizione -371 (relativa al codone di inizio ATG) e una transversione G>C alla posizione 805 (relativa al codone di inizio ATG).

In questo lavoro sono state messe a punto le metodiche di analisi in DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e minisequenziamento per testare le mutazioni presenti nel terzo esone e nel promotore del gene GDF-8.

MATERIALI E METODI

Animali. Sono stati scelti 3 animali di razza Marchigiana classificati, per PCR-RFLP e sequenziamento, come omozigoti non mutati (genotipo G/G), eterozigoti (genotipo G/T), omozigoti mutati (genotipo T/T) relativamente alla mutazione E291 nel terzo esone. Gli stessi animali sono stati utilizzati per testare i polimorfismi T/A e G/C nel promotore.

Analisi in DHPLC. Questa metodica è in grado di individuare variazioni nel Dna mediante separazione degli eteroduplici dagli omoduplici attraverso una cromatografia liquida a scambio ionico a fase inversa (Oefner and Underhill, 1998). Per il terzo esone è stato utilizzato un amplicone di 187 paia di basi (bp), ottenuto con i seguenti primers: E19 5'TCTAGGAGAG ATTTTGGGCT T3', E20 5'GATGGGTATGAGGATACTTTTGC3'. Per il promotore è stato utilizzato un amplicone di 561bp per identificare l'SNP (Single Nucleotide Polymorphism) T/A

utilizzando i seguenti primers: P18 5'CTGAGGGAAAAGCATATC3', P8 CCAGCAACAA TCAGCATAAA TAG e un amplicone di 777bp per identificare l'SNP G/C utilizzando questi primers: P30 5'CCCTACAGAG GCCACTTCAA3', P18rev 5'GTTGATATGC TTTTCCCTCA G3'. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante l'utilizzazione del sistema Wave (Transgenomic, Inc., San Jose, CA) a differenti temperature di denaturazione.

Minisequenziamento. Con questa tecnica viene utilizzato un oligonucleotide posto subito a monte dell'SNP in una reazione di sequenziamento con incorporazione di una singola base. E' stato utilizzato il kit CEQ SNP-Primer Extension e le reazioni sono state processate con il sistema CEQ 8800 (Beckman Coulter, U.S.A) e successivamente analizzate con il software in dotazione. Nelle figura 1 e 2 sono riportate le sequenze dei frammenti i utilizzati per il minisequenziamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi mediante DHPLC. La figura 3 mostra l'analisi del polimorfismo G>T presente nel terzo esone. Nella razza Marchigiana i tre genotipi mostrano differenti profili DHPLC; con una differente temperatura di separazione si possono evidenziare differenti cromatogrammi solo tra le razze Marchigiana, Piemontese e Blue Belga mentre è possibile distinguere i tre genotipi della razza Marchigiana. L'analisi DHPLC della regione del promotore per identificare le trasversioni T>A e G>C permette l'identificazione degli individui omozigoti da quelli eterozigoti, ma l'omoduplice TT (o GG) ha lo stesso tempo di ritenzione dell'omoduplice AA (o CC) (Figura 4).

Minisequenziamento. Nella figure 5 e 6 sono mostrati i risultati dell'analisi della trasversione G>T nel terzo esone e della trasversione T>A nel promotore .

CONCLUSIONI

La metodica DHPLC si è rivelata una tecnica semplice, accurata e rapida per la tipizzazione di tutte le mutazioni al locus GDF-8. Comunque la primer extension identifica i differenti genotipi in uno step, mentre il DHPLC richiede più tempo per trovare la corretta temperatura di melting e per distinguere gli omozigoti.

Figura 1-Sono sottolineate le sequenze dei primers utilizzati per la reazione di PCR e per l'identificazione del polimorfismo G>T

Figure 1-Primer sequences for PCR reaction and for identification of G>T polymorphism are underlined

TCTAGGAGAGATTTTGGGCTTGATTGTGATGAACACTCCACAGAATCTCGATGCTGT
CGTTACCCTCTAACTGTGGATTTT[G/T]AAGCTTTTGGATGGGATTGGATTATTGCAC
CTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTTTTGCAA
AAGTATCCTCATACCCATC

Figura 2-Sono sottolineate le sequenze dei primers utilizzati per la reazione di PCR e per l'identificazione del polimorfismo T>A

Figure 2-Primer sequences for PCR reaction and for identification of T>A polymorphism are underlined

CTGAGGGAAAAGCATATCAACTTTTTAAGTATGAAGTGTA AATTAAGATTTATTCA
CTTAAATTATAATTTTTAAAGTTTCACATATAAAGATGAATAAGATCTAAGTGTATA
TGTTATTGTTAATAAAGTTTT[T/A]AATTTTTCGAATGTCACATACAGCCTTTATTAT
TCATAGATTTATTCTTTTTAAGAAGTAGTCAAATGAATCAGCTCACCCCTTG

Figura 3-Profilo DHPLC per il terzo esone del gene GDF-8 nella razza Marchigiana e tra le razze Marchigiana, Piemontese e Blue Belga
 Figure 3- DHPLC profiles for GDF-8 gene third exon in Marchigiana and Piemontese, Belgian Blue breed

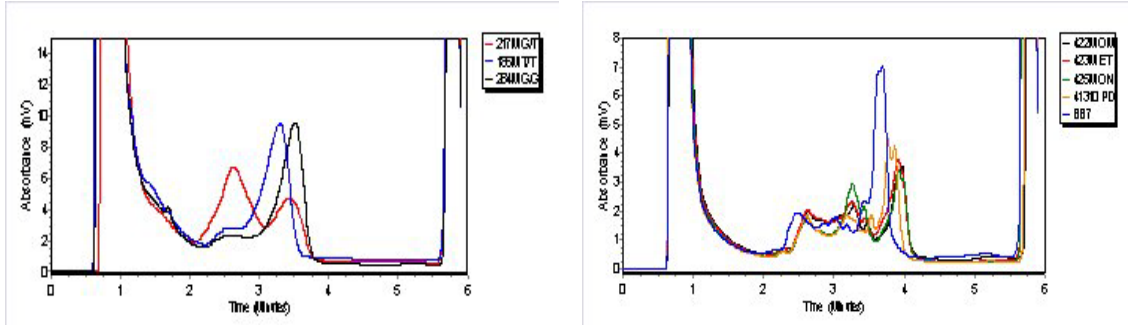


Figura 4-Profilo DHPLC per le trasversioni G>C e T>A nella regione del promotore
 Figure 4- DHPLC profile for the G>C and T>A transversion in the promoter region

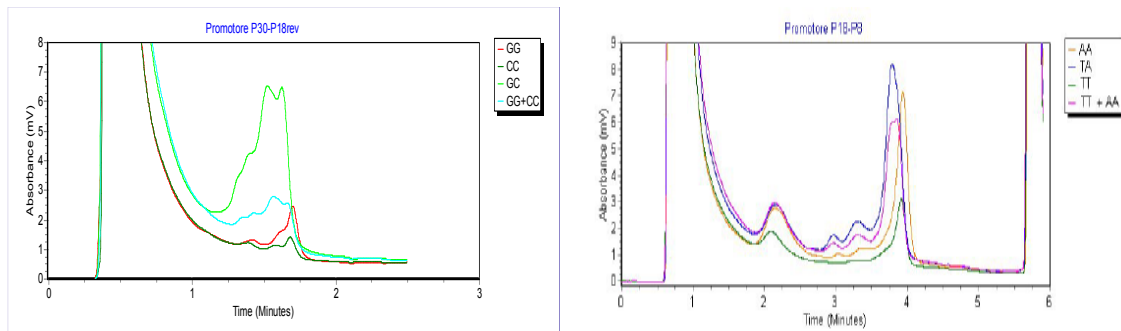


Figura 5 -Identificazione della trasversione G>T nella razza Marchigiana
 Figure 5-Identificatio of G>T transversion in Marchigiana breed

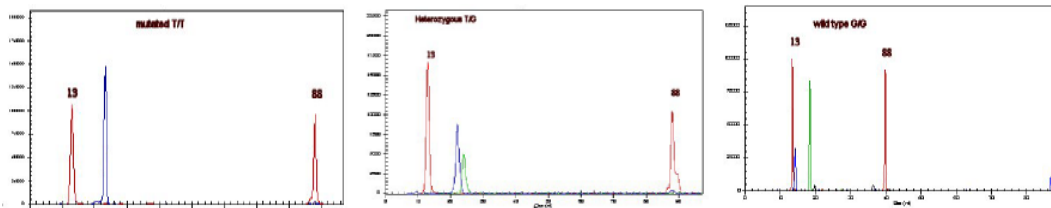
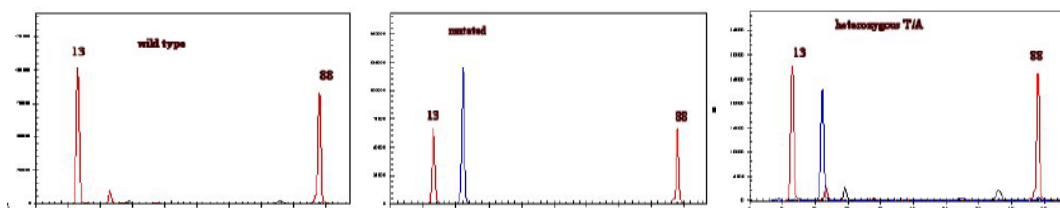


Figura 6 - Identificazione della trasversione T>A nella regione del promotore
 Figure 6-Identification of T>A transversion in promoter region



BIBLIOGRAFIA-REFERENCES

- Arnold H., Della-Fera M.A. and Baile C.A., (2001). *LifeXY* 1: 1014-22.
- Cappuccio I., Marchitelli C., Serracchioli A., Nardone A., Valentini A., (1998). *Anim. Genetics* 29 (suppl. 1): 51.
- Crisà A., Marchitelli C., Nardone A., Valentini A., (2002). XXVIII ISAG, 11-15 August 2002., p.92.
- Crisà A., Marchitelli C., Savarese M.C., Valentini A., (2003). *Cytog. Gen. Res.* 102:48-52.
- Dunner S. Miranda M.E., Amigues Y., Canon J., Georges M., Hanset R, Williams J. and Menissier F. (2003). *Genet. Sel. Evol.* 35: 103-118.
- Grobet L., Poncelet D., Royo J.L., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., (1998). *Mammalian Genome* 9, 210-213.
- Oefener P.J., Hunderhill P.A. (1998). *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli *et al.*, Eds), Wiley, New York, Suppl.19:7.10.1-7.10.12.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L., Bass J.J. (1997). *Genome Res* 7: 910-915.
- Marchitelli C., Savarese M.C., Crisà A., Nardone A., Ajmone-Marsan P., Valentini A., (2003). *Mammalian Genome* 14, 392-395.

METHODS OF DIAGNOSING THE MYOSTATIN MUTATION IN MARCHIGIANA BREED

Marchitelli C. (1), Crisà A. (1), Filippini F. (2), Valentini A. (1)

ABSTRACT - In several beef breeds double muscling can be attributed to mutations at the myostatin locus, that exhibits a large number of variants. The identification of these mutations at myostatin gene may involve several tests, some of them rather difficult, while the ideal SNP (single nucleotide polymorphism) genotyping assay should be accurate, inexpensive (time and cost), easy to perform, and capable of high throughput.

Here, we report the detection of polymorphisms in the third exon and in the promoter region of this gene, in this Marchigiana breed using different techniques, namely DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) and primer extension.

KEYWORDS: Marchigiana, GDF-8, Polymorphism, DHPLC, SNP

INTRODUCTION

"Double muscling" is a trait present in several cattle breeds with frequency varying from a quite high percentage, like in Belgian Blue and Piemontese, to almost nil in others, for which only sporadic cases are reported. This trait is caused by an inactivation of myostatin, a member of transforming growth factor β (TGF- β), encoded by the GDF-8 (Growth differentiation factor 8) gene (Arnold *et al.*, 2001). A large number of variants have been identified in cattle most of which are silent or neutral (Kambadur *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1998, Marchitelli *et al.*, 2003; Dunner *et al.*, 2003; Crisà *et al.*, 2003). Marchigiana is a typical Italian beef breed reared in Central Italy, represented in year 2003 by around 46030 heads (www.anabic.it).

In Marchigiana cattle breed, the inactivating mutation is a G>T transversion at position 871 from the start codon that changes a codon for glutamic acid into a stop codon (E291X variant). (Cappuccio *et al.*, 1998; Marchitelli *et al.*, 2003). In the promoter region of GDF-8 gene two polymorphism have been described (Crisà *et al.*, 2002; Crisà *et al.*, 2003) a T>A transversion at position -371 (relative to ATG start codon) and a G>C transversion at position -805 (relative to ATG start codon).

In this work has been analysed the polymorphisms present in the third exon and in the promoter region of GDF-8 gene by DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) and primer extension.

MATERIALS AND METHODS

Animals. We have chosen three animals of Marchigiana breed that were classified, according to sequence and PCR-RFLP, as homozygote non mutated (genotype G/G), heterozygote (genotype G/T) or homozygote mutated (genotype T/T) at E291X mutation in the third exon. The same animals was used to test the polymorphisms T/A and G/C in the promoter region.

DHPLC analysis. The technique has been described elsewhere (Oefner and Underhill, 1998), but in brief, it detects DNA variations by separating heteroduplex and homoduplex DNA fragments by ion-pair reverse-phase liquid chromatography. For the third exon we obtained an amplicon of 187 base pair (bp) with these primers: E19 5'TCTAGGAGAG ATTTTGGGCT T3', E20 5'GATGGGTATGAGGATACTTTTGC3'. For the promoter region we obtained an amplicon of 561bp to identify the T/A transversion using these primers: P18 5'CTGAGGGAAAAGCATATC3', P8 CCAGCAACAA TCAGCATAAA TAG and an amplicon of 777bp to identify the G>C transversion using these primers: P30 5'CCCTACAGAG GCCACTTCAA3', P18rev 5'GTTGATATGC TTTTCCCTCA G3'. The PCR products were analysed by Wave System (Transgenomic, Inc., San Jose, CA) at different denaturing temperatures.

Primer extension technique. In this technique, an oligonucleotide is used, to prime DNA synthesis by a polymerase, as performed in a standard sequencing reaction. The primer extension was performed using CEQ SNP-Primer Extension Kit and loaded onto the CEQ 8800 analysis system (Beckman Coulter, U.S.A). SNP data were analyzed using the fragment analysis module of the CEQ 8800 Genetic Analysis software. Fragment sequences that we used for primer extension are shown in figure 1 and figure2.

RESULTS AND DISCUSSION

DHPLC analysis. Figure 3 shows the analysis of G>T polymorphism at the third exon. In Marchigiana breed the three genotypes shown different DHPLC profiles; with a different separation temperature is possible to see differences only between Marchigiana, Blue Belga and Piemontese breeds while is not possible to distinguish the three Marchigiana genotypes.

DHPLC analysis of promoter region to identify the T>A transversion and the G>C transversion distinguishes the heterozygous from homozygous individuals, but the homoduplex TT (or GG) has the same retention time of homoduplex AA (or CC). (Figure 4).

Analysis by primer extension. G>T transversion in the third exon and T/A transversion in the promoter region are shown in figure 5 and figure 6 respectively.

CONCLUSIONS

Here we have shown that either the polymorphism in the third exon and in the promoter region of GDF-8 gene are detected by DHPLC analysis and primer extension technique.

DHPLC has proven to be a simple, accurate, rapid technique for the typing of GDF-8 locus, easily detecting all the mutations within the amplified DNA fragments. However in any case the primer extension technique identifies the different genotypes in one step, while DHPLC technique requires more time to find the correct T_m temperature and to distinguish homozygotes.

