

**Analisi del gene miostatina nel coniglio e identificazione di SNP utilizzabili per studi di associazione con caratteristiche produttive**

**Fontanesi L., Scotti E., Tazzoli M., Russo V.**

DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna, Italy

*Corresponding Author:* Luca Fontanesi, DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna, Via F.lli Rosselli 107, 42100 Reggio Emilia, Italy - Tel. +39 0522 290516 - Fax: +39 0522 290523 - Email: luca.fontanesi@unibo.it

**ABSTRACT: Investigation of myostatin gene in domestic rabbits and identification of useful SNPs for association studies with production traits.** In this study we investigated the myostatin (*MSTN*) gene in the domestic rabbit. Sequencing of the 3 exons, including the 3'-untranslated region, and part of the introns, revealed 4 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Two of them (g.446T>A e g.516C>T) were genotyped by PCR-RFLP in more than 200 animals of different breeds and within a commercial population. The second SNP (g.516C>T) showed a higher level of heterozygosity and will be analysed in a larger number of rabbits of the commercial population to evaluate its association with production traits.

Key words: Myostatin, SNP, Allele frequency, Rabbit breeds.

**INTRODUZIONE** – Lo studio di geni candidati, scelti sulla base della loro funzione e del ruolo che svolgono nei processi metabolici, di sviluppo e di accrescimento, collegati direttamente o indirettamente a caratteristiche produttive, può risultare particolarmente utile per identificare marcatori associati a caratteri oggetto di selezione nelle specie di interesse zootecnico. Diversi sono gli esempi che si possono riportare. Fra questi, il gene miostatina (*MSTN*) rappresenta uno dei casi più importanti. Questo gene codifica per una proteina del gruppo dei *transformic growth factor (TGF)-β*, repressori dello sviluppo dei muscoli scheletrici (Lee, 2004). Il gene fu caratterizzato per la prima volta in topi nei quali l'assenza del gene funzionale causava l'aumento della massa muscolare di 2-3 volte (per effetto di ipertrofia muscolare) rispetto a topi normali in cui questo gene era attivo, con conseguente riduzione o eliminazione dell'accumulo di grasso (McPherron *et al.*, 1997; McPherron e Lee, 2002). Sulla base di questi risultati nel topo, i successivi studi effettuati in alcune razze bovine da carne hanno evidenziato che l'ipertrofia muscolare degli animali con il carattere doppiacoscia era determinata da mutazioni nel gene miostatina che ne inibivano la funzionalità (Grobet *et al.*, 1997;1998; Kambadur *et al.*, 1997; Marchitelli *et al.*, 2003; McPherron e Lee, 1997).

Nel coniglio il gene *MSTN* è stato recentemente identificato a seguito del sequenziamento del genoma a livello 2X effettuato dal Broad Institute ([http://www.ensembl.org/Oryctolagus\\_cuniculus/index.html](http://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/index.html)). Comprende 3 esoni codificanti separati da due introni, come nelle altre specie. Al momento il gene *MSTN* non è stato ancora studiato nel coniglio in modo dettagliato e non sono state ancora identificate mutazioni. Questo lavoro, che si inserisce nell'ambito dello studio di diversi geni candidati nel coniglio in corso nel nostro laboratorio, ha come obiettivo l'identificazione di mutazioni nel gene *MSTN* e l'analisi delle frequenze alleliche in

diverse razze e popolazioni al fine di valutare la possibilità di utilizzo di marcatori in questo importante gene candidato in studi di associazione con caratteristiche produttive.

**MATERIALI E METODI** – Dodici conigli di diverse razze (Argentata di Champagne, 2; Bianca di Nuova Zelanda, 2; Californiana, 2; Fulva di Borgogna, 1; Gigante, 1; Gigante Pezzato, 1; Lepre Belga, 1; nani colorati, 2) sono stati utilizzati per il sequenziamento di diverse parti del gene *MSTN*. Animali appartenenti a diverse razze e ad una popolazione commerciale in selezione (Tabella 1) sono stati utilizzati per l'analisi di due mutazioni identificate nel gene. Il DNA è stato isolato da sangue e/o da bulbi piliferi utilizzando protocolli standard o seguendo le indicazioni riportate da Fontanesi et al. (2006; 2007). Quattro coppie di primers sono state disegnate sulla sequenza del gene *MSTN* di coniglio disponibile in Ensembl. Le quattro coppie amplificano completamente le regioni codificanti dei 3 esoni e la regione 3'-non tradotta (3'-UTR), oltre che ad alcune regioni introniche del gene. Le amplificazioni sono state effettuate in un volume di 20 µl contenenti 1 U di EuroTaq DNA polimerasi (EuroClone Ltd.), 1X PCR Buffer, 2,5 mM dNTPs, 10 pmol di ciascun primer e 1,0 mM di MgCl<sub>2</sub>. Il profilo PCR utilizzato, su un termociclatore PT-100 (MJ Research), è stato il seguente: 5 minuti a 95 °C; 35 cicli di amplificazione di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 57-62 °C, 30 secondi a 72 °C; 10 minuti a 72°C. I prodotti PCR sono stati utilizzati, dopo trattamento con ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB Corporation), per la reazione di sequenziamento effettuata utilizzando il kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). Le reazioni di sequenziamento, dopo alcuni passaggi di purificazione, sono state caricate su un sequenziatore a capillare (ABI3100 Avant sequencer, Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation).

Per l'analisi di due SNP sono stati messi a punto due protocolli PCR-RFLP. Il primo analizza una mutazione identificata nell'esone 2 (enzima *FspBI*) mentre il secondo analizza un polimorfismo identificato nell'introne 2 (creazione di un sito di restrizione artificiale con un primer modificato e digestione con enzima *AluI*). I prodotti delle digestioni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e colorazione con etidio-bromuro.

**RISULTATI E CONCLUSIONI** – L'attività di risequenziamento del gene miostatina ha prodotto, in totale, 22308 bp di sequenze. Dalla loro analisi sono stati identificati 4 SNP. Uno è localizzato nella regione codificante del primo esone ma non determina il cambiamento dell'aminoacido (g.194C>T, nomenclatura rispetto alla regione amplificata: EMBL accession number AM931155). Questa mutazione è stata identificata in un solo animale, e per lo più in eterozigosi. Un secondo polimorfismo è stato identificato nell'esone 2, ma anche in questo caso non causa il cambiamento di aminoacido. Dai dati di sequenziamento questa mutazione (g.446T>A; EMBL accession number AM931156) è risultata essere più polimorfa rispetto alla prima. Il terzo SNP è stato identificato nell'introne 2 (g.516C>T; AM931156), e dalle analisi di sequenziamento, è risultato quello con maggiore equilibrio tra i due alleli. Il quarto (A>G) è posizionato nella regione 3'-UTR dell'esone 3 a 194 bp dal codone di stop. Le mutazioni identificate, oltre a non determinare modifiche alla proteina, sembrano non svolgere alcuna funzione specifica. Tuttavia, ulteriori valutazioni dovranno essere effettuate per quella posizionata nella regione 3'-UTR, in quanto mutazioni con effetto

sulla regolazione della trascrizione e stabilità dell'mRNA sono state identificate in questa regione nel corrispondente gene ovino (Clop *et al.*, 2006). Sebbene non vi siano indicazioni su un coinvolgimento diretto sulla regolazione o funzionalità del gene *MSTN*, i 4 SNP possono essere utilizzati come marcatori del gene e catturare la variabilità non identificata in questo studio nel caso di linkage disequilibrium con altri polimorfismi. Per valutare la distribuzione degli alleli di due di questi quattro SNP, sono stati analizzati, mediante PCR-RFLP, conigli appartenenti a diverse razze e ad una popolazione commerciale in selezione. I risultati sono riportati in Tabella 1. Il polimorfismo g.516C>T, in generale, è risultato avere un maggiore livello di eterozigotità nella maggior parte delle razze studiate e nella popolazione commerciale. Questo polimorfismo sarà utilizzato in studi di associazione con caratteristiche produttive nei conigli in selezione.

**Tabella 1** – Frequenze alleliche per gli SNP g.446T>A e g.516C>T.

Razze	g.446T>A		g.516C>T	
	N. animali	Frequenza allele g.446T	N. animali	Frequenza allele g.516C
Argentata di Champagne	14	0.43	17	0.15
Bianca di Nuova Zelanda	9	1.00	10	0.65
Blu di Vienna	22	0.80	24	0.52
Californiana	23	0.76	23	0.15
Fulva di Borgogna	6	1.00	9	0.50
Gigante	5	1.00	8	0.56
Gigante Bianco	3	0.83	4	0.25
Gigante Pezzato	10	0.90	15	0.50
Nani colorati	7	1.00	7	0.86
Popolazione commerciale	106	0.92	134	0.32
Totale	205		251	

**BIBLIOGRAFIA** – Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., et al., 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* 36:238-243. Fontanesi, L., Tazzoli, M., Beretti, F., Russo, V., 2006. Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim. Genet.* 37:489-493. Fontanesi, L., Tazzoli, M., Russo, V. 2007. Non-invasive and simple methods for sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene mutations: a technical note. *World Rabbit Sci.* 15:121-126. Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., et al., 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome* 9:210-213. Grobet, L., Royo Martin, L.J., Poncelet, D., et al., 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17:71-74. Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., Bass, J.J., 1997. Mutations in *myostatin* (*GDF8*) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7:910-915. Lee, S.-J., 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:61-86. McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.-J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387:83-90. McPherron A.C., Lee S.-J., 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12457-12461.