

UNIVERSITA' DI PISA
Facoltà di Medicina Veterinaria



Dottorato di Ricerca in
Produzioni Animali, Sanità e Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima
Mediterraneo

Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema
sez. **Scienze Zootecniche**
Facoltà di Agraria di Pisa

**EFFETTO DEL POLIMORFISMO DELLA STEAROIL CoA-
DESATURASI SULLA COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI DEL LATTE
DI BOVINE DI RAZZA FRISONA ITALIANA**

Docente Guida
prof. Pierlorenzo Secchiari

Dottorando
dott. Giuseppe Conte

CICLO
2004-2006



“Talvolta le buone idee vengono proprio quando non le si cerca”

Mullis K. B.

Da “Le Scienze”, n. 262, giugno 1990

INDICE

Indice delle figure	5
Indice delle tabelle	6
Riassunto	7
Abstract	9
Scopo della ricerca	10
Introduzione	12
<i>1 Polimorfismi genici</i>	13
1.1 Origine degli SNP.....	16
1.2 Determinazione del polimorfismo a livello proteico.....	17
1.3 Determinazione del polimorfismo a livello del DNA.....	18
1.4 Metodi di scansione del polimorfismo.....	19
1.4.1 Metodi basati sulla conformazione.....	19
SSCP.....	20
DGGE.....	20
Analisi eteroduplex.....	21
1.4.2 Metodi basati sul taglio chimico ed enzimatico del DNA.....	22
RNasi-assay.....	23
EMC (Enzyme Mismatch Cleavage).....	23
CCM (Chemical Cleavage Mismatch).....	24
1.5 Sequenziamento.....	25
1.6 Metodi di genotipizzazione.....	26
1.6.1 Metodi basati sull'ibridazione.....	26
DNA microarray.....	26
Ibridazione omogenea.....	27
1.6.2 Metodi basati sull'attività enzimatica.....	28
RFLP.....	28
AS-PCR.....	29
OLA.....	30
Pirosequenziamento.....	30
PEA (Primer Extension Analysis).....	31
1.7 Conclusione.....	33
<i>2 Il Latte</i>	35
2.1 Sintesi dei lipidi nei ruminanti.....	41
2.2 Sintesi degli acidi grassi.....	44
2.3 I lipidi del latte dei ruminanti.....	48
2.4 Trigliceridi nel latte.....	48
2.5 I fosfolipi del latte.....	51
2.6 Gli acidi grassi del latte.....	52
<i>3 Enzimi chiave del metabolismo lipidico</i>	58
3.1 Acetil CoA Carbossilasi (ACC).....	58
3.2 Sintasi degli acidi grassi (FAS).....	61
3.3 LipoProtein Lipasi (LPL).....	62
3.4 Diacil Glicerol Acil Transferasi.....	63
<i>4 Stearoil-CoA Desaturasi (SCD)</i>	66
4.1 Caratteristiche biochimiche.....	66
4.2 Struttura genica.....	68
4.3 Regolazione dell'espressione genica.....	71
4.4 Sintesi endogena dei CLA.....	77

4.5 SCD nella ghiandola mammaria.....	80
4.6 SCD nei bovini.....	81
4.7 SCD negli ovini.....	83
4.8 SCD nei caprini.....	83
4.9 SCD nei suini.....	84
Materiali e metodi	86
1 <i>Campionamento</i>	87
2 <i>Determinazione del polimorfismo</i>	89
2.1 Estrazione del DNA genomico.....	89
2.2 Amplificazione del frammento d'interesse.....	90
2.3 PCR-SSCP.....	92
2.4 OLA (Oligo Ligation Assay) Microarray.....	94
2.5 Sequenziamento del DNA.....	100
3 <i>Determinazione della composizione degli acidi grassi</i>	101
3.1 Estrazione dei lipidi totali dal latte.....	101
3.2 Analisi al gas-cromatografo.....	101
4 <i>Determinazione dell'attività desaturasica mammaria</i>	103
5 <i>Analisi statistica</i>	104
Risultati	105
1 <i>Effetto dei componenti del modello lineare</i>	106
2 <i>Determinazione del polimorfismo del gene SCD</i>	107
3 <i>Effetto del polimorfismo SCD sull'attività desaturasica della ghiandola mammaria</i>	112
Discussione	117
1 <i>Polimorfismo SCD</i>	118
2 <i>Effetto del polimorfismo SCD</i>	120
Conclusioni	125
Ringraziamenti	127
Bibliografia	128

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 : Esempio di SNP	pag.13
Figura 1.2 : Schema di un minisatellite e di un microsatellite	15
Figura 1.3 : Schema del processo di replicazione del DNA	17
Figura 1.4 : Schema della metodologia DGGE	21
Figura 1.5 : Schema della metodologia DHPLC	22
Figura 1.6 : Schema dell'attività della RNasi	24
Figura 1.7 : Schema del sequenziamento Sanger	25
Figura 1.8 : Schema dell'ibridazione omogenea	27
Figura 1.9 : Schema della metodologia RFLP	28
Figura 1.10 : Schema della AS-PCR	29
Figura 1.11 : Schema della metodologia PEA	32
Figura 2.1 : Organizzazione della ghiandola mammaria	38
Figura 2.2 : Schema della sintesi e secrezione del latte	40
Figura 2.3 : Modalità di sintesi e secrezione del latte	41
Figura 2.4 : Vie metaboliche per la sintesi degli acidi grassi volatili	42
Figura 2.5 : Sintesi mammaria degli acidi grassi	45
Figura 2.6 : Sintesi degli acidi grassi n-6 e n-3	46
Figura 2.7 : Globuli di grasso dispersi nel latte	49
Figura 2.8 : Struttura di un trigliceride	50
Figura 4.1 : Sistema desaturasi nella ghiandola mammaria	67
Figura 4.2 : Struttura del gene della SCD	68
Figura 4.3 : Allineamento delle sequenze del promotore del gene scd	70
Figura 4.4 : Schema della regolazione dell'espressione SCD	73
Figura 4.5 : Schema del taglio della componente matura del SREBP	74
Figura 4.6 : Processo di bioidrogenazione ruminale	79
Figura 4.7 : Sequenze aminoacidiche di SCD di alcune specie	82
Figura 4.8 : Aplotipi del gene scd bovino	83
Figura 5.1 : Posizione dei primer nel gene scd	91
Figura 5.2 : Gel di agarosio con i prodotti di PCR	91
Figura 5.3 : Schema della SSCP	93
Figura 5.4 : Schema della reazione LDR	95
Figura 5.5 : Schema del chip universale	99
Figura 6.1 : PCR-SSCP	107
Figura 6.2 : Risultati del sequenziamento	108
Figura 6.3 : Chip microarray ibridizzati	109
Figura 6.4 : Tendenza dell'attività desaturasica dei 5 rapporti	114
Figura 6.5 : Effetto del contributo dell'aplotipo A	114
Figura 7.1 : Relazione tra l'acido vaccenico e l'acido rumenico	122

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1 : Riepilogo delle tecnologie per la genotipizzazione	pag. 34
Tabella 2.1 : Composizione del colostro	35
Tabella 2.2 : Composizione del latte in alcune specie	36
Tabella 2.3 : Confronto tra la composizione del latte e del plasma	39
Tabella 2.4 : Distribuzione posizionale degli acidi grassi nei trigliceridi	50
Tabella 2.5 : Composizione in acidi grassi del latte delle principali ruminanti	54
Tabella 4.1 : Fattori che regolano l'espressione della SCD	71
Tabella 5.1 : Elenco delle aziende dove è stato condotto il campionamento	87
Tabella 6.1 : Effetto dei giorni di lattazione sulla composizione degli acidi grassi nel latte	106
Tabella 6.2 : Frequenze genotipiche del gene scd nei campioni	111
Tabella 6.3 : Test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg	111
Tabella 6.4 : Relazione del polimorfismo SCD con la composizione in acidi grassi	112
Tabella 6.5 : Relazione del polimorfismo SCD con i rapporti Prodotto/substrato	113

RIASSUNTO

La composizione degli acidi grassi, del latte bovino, è il risultato della combinazione di fattori esogeni ed endogeni. I primi sono caratterizzati dal tipo di alimentazione e dal sistema di gestione aziendale condotti dall'allevatore. Quelli endogeni, invece, dipendono dall'attività degli enzimi lipogenici attivi a livello della ghiandola mammaria.

La Stearoil CoA-Desaturasi (SCD) è uno degli enzimi chiave del metabolismo lipidico; la sua attività è quella di inserire un doppio legame in posizione *cis*- $\Delta 9$ in un largo spettro di acidi grassi a media e lunga catena.

Nella specie bovina, sono state individuate due forme del gene *scd*. Le differenze tra una forma e l'altra sono dovute a tre polimorfismi puntiformi (SNP), localizzati a livello del quinto esone. I tre SNP sono ereditati insieme, pertanto vanno a costituire due aplotipi distinti. Solo il terzo dei tre polimorfismi comporta la sostituzione di un aminoacido nella sequenza peptidica, precisamente una valina con un'alanina in posizione "293". L'aplotipo che codifica per l'aminoacido valina è detto *tipo V* mentre quello che codifica per l'alanina è detto *tipo A*.

In questo lavoro sono stati genotipizzati 297 vacche di razza Frisone Italiana, applicando la metodologia SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism). I risultati hanno rilevato una maggiore diffusione del tipo A sul tipo V (57% contro 43%) nella popolazione testata.

I tre genotipi rilevati (AA, AV, VV) sono stati messi in relazione con la composizione in acidi grassi del latte e con i rapporti acidi grassi *cis*- $\Delta 9$ monoinsaturi/saturi. Questi rapporti sono stati utilizzati, perché rappresentano un valido sistema per valutare l'attività desaturasica a livello della ghiandola mammaria.

Il latte prodotto dalle vacche con il tipo A del gene *scd* mostra un più alto valore del rapporto acido miristoleico/acido miristico e un maggior contenuto di acido oleico e acidi grassi monoinsaturi totali, rispetto al tipo V. Il contenuto di CLA nel latte varia tra 0.15 e 0.82 g/100g di grasso, ma il polimorfismo SCD non ha mostrato un effetto significativo di variabilità.

I dati emersi rivelano che il genotipo SCD non è l'unico fattore genetico che contribuisce a definire la composizione in acidi grassi del latte, ma può essere considerata una delle cause della variazione del grasso nel latte.

ABSTRACT

The composition of milk fatty acids in dairy cows is the result of exogenous and endogenous effects. The formers are characterized by feeding and management system, whereas the latter are due to the activity of the mammary lipogenic enzymes.

Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) is a key enzyme in the mammary lipid metabolism, since it is able to add a double bond in the *cis*- Δ 9 position in a large spectrum of medium and long-chain fatty acids (FA).

Two forms of this gene in bovine have been observed, in which three Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were individualized in the ORF (Open Reading Frame), precisely in the fifth exon. Only the third SNP cause an amino acid replacement from valine (type V) to alanine (type A) at the 293th residue of peptidic chain.

This work outlines a method to genotype the SCD gene based on Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis. We classified 297 Holstein Italian Friesian cows into three genotypes: VV, AV and AA. Type A shown an higher frequencies then V one (57% vs 43%).

This classification was compared with individual milk fatty acids composition and with the *cis*-9 unsaturated/saturated FA ratios. These ratios represent a useful proxy of mammary desaturase activity.

Milk from cows with SCD type A gene showed a higher myristoleic/myristic ratio and a higher content of oleic acid and total monounsaturated fatty acids (MUFA) than that from cows with type V.

Milk CLA content varied from 0.15 to 0.82 g/100 g lipid, but the SCD polymorphism did not result a significant source of variation. The SCD genotype was not the only genetic factor that contributes to milk fatty acid composition, but it may be considered one of the genetic causes of variation in milk fat composition.

SCOPO DELLA RICERCA

Lo sviluppo delle tecnologie di genetica molecolare, nell'ultimo ventennio, ha permesso di ottenere un'enorme quantità di informazioni sul genoma delle specie animali di interesse zootecnico. L'utilizzo di queste informazioni riveste una particolare importanza per quanto riguarda il miglioramento genetico che, in generale, ha come obiettivi finali il miglioramento della quantità e della qualità dei prodotti zootecnici. Ai fini del miglioramento genetico, lo sfruttamento delle nuove conoscenze, che derivano dalla genetica molecolare, si attua attraverso la selezione degli animali basata sulle informazioni di marcatori del DNA, la così detta selezione assistita da marcatori o Marker Assisted Selection (MAS).

Attualmente, sebbene l'impiego della MAS nei programmi di selezione sia ancora nella sua fase iniziale, gli studi compiuti per sviluppare risorse genetiche e identificare geni o regioni del genoma capaci di influenzare i caratteri di interesse economico, rappresentano il punto di partenza per l'identificazione delle strategie future di ricerca e per le applicazioni in campo zootecnico (Secchiari et al.; 2006). L'approccio alla MAS, come strumento di selezione, può essere applicato seguendo due strade diverse: l'individuazione di QTL e l'approccio del gene candidato.

I QTL sono *loci* aventi un effetto statisticamente significativo sui caratteri quantitativi. La presenza di marcatori, posti sui cromosomi in prossimità di determinati QTL, fa sì che, in virtù di tale vicinanza, si crei fra essi uno stretto legame che li porta ad essere ereditati insieme (salvo l'eventualità di "crossing-over" e quindi ricombinazioni).

Questa condizione ha portato ad un aumento delle conoscenze sulle regioni genomiche che marcano specifici QTL ed ha permesso di avviare programmi di miglioramento genetico, utilizzando la Selezione Assistita da Marcatori (MAS) e l'Introgressione di geni Assistita da Marcatori (MAI) (Cappio-Borlino et al., 1995; Russo e Fontanesi, 2001).

Queste prospettive sono particolarmente idonee per quei caratteri che mostrano difficoltà di miglioramento con i sistemi di selezione convenzionale, a causa della

bassa ereditabilità, delle difficoltà a valutare i fenotipi e dell'elevata lunghezza del ciclo vitale degli animali (Dekker e Hospital, 2002).

Un approccio alternativo ai classici schemi di identificazione dei QTL è rappresentato dallo studio dei geni candidati per identificare direttamente marcatori associati con caratteri produttivi. La scelta dei geni candidati viene fatta sulla base del loro ruolo biologico che, direttamente o indirettamente, è collegato con il carattere produttivo preso in considerazione. Dato che il numero di potenziali geni candidati è spesso molto elevato, l'integrazione dell'approccio del gene candidato con le informazioni ottenute dal mappaggio di QTL permette di ridurre notevolmente il numero dei possibili geni da studiare e aumenta le probabilità di identificare marcatori effettivamente associati con i caratteri, oggetto di studio.

In questo lavoro è stato studiato il polimorfismo di un gene del bovino, che può essere considerato, a tutti gli effetti, un gene candidato: la Stearoil CoA-Desaturasi, che riveste un ruolo chiave nella sintesi degli acidi grassi monoinsaturi.

INTRODUZIONE

1. POLIMORFISMI GENICI

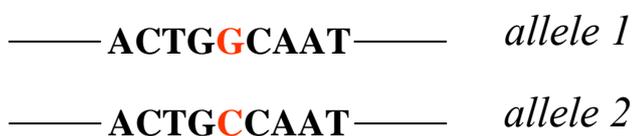
I polimorfismi sono differenze chimico-strutturali di una molecola che comportano la presenza in differenti forme della stessa.

I tipi di polimorfismo più diffusi e più utilizzati sono due: polimorfismi proteici, legati alla sostituzione di uno o più aminoacidi nella sequenza peptidica e che, se riguardano un enzima, possono dare origine ad isoenzimi (enzimi differenti che catalizzano la medesima reazione) e il polimorfismo genico. Il polimorfismo genico fa riferimento a differenze nelle sequenze di DNA, causate da mutazioni, deiezioni o inserzioni di uno o più nucleotidi.

Un polimorfismo è considerato tale quando la forma meno diffusa presenta una frequenza superiore all'1% all'interno della popolazione; per valori inferiori non è possibile parlare di polimorfismo ma di una contaminazione allelica destinata ad estinguersi.

Il tipo più semplice di polimorfismo è lo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) derivante della sostituzione di un singolo nucleotide (figura 1.1). Altri modelli di polimorfismo sono l'inserzione o la delezione di frammenti di DNA costituiti da centinaia di nucleotidi, che possono riguardare piccole ripetizioni di sequenze (mini- e microsatelliti), oppure grosse alterazioni di DNA relativi a frammenti con oltre 500 bp. Questo tipo di modificazione genomica, che riguarda essenzialmente il cambiamento del numero cromosomico o arrangiamenti del cromosoma stesso, può essere rilevata con analisi citogenetiche, come l'ibridazione *in situ* (FISH: Fluorescent In Situ Hybridization).

Fig.1.1: Esempio di SNP.



I minisatelliti, o regioni con numero variabile di ripetizioni a tandem (VNTR), sono ripetizioni in tandem di corti motivi nucleotidici, di lunghezza compresa tra 6 e 100 bp. La variabilità risiede nel fatto che i singoli alleli constano di un

numero diverso di ripetizioni della stessa unità. All'origine di questa variabilità vi è la ricombinazione genetica tra unità ripetitive male appaiate. Sono localizzati maggiormente nelle regioni comprese tra i geni e dispersi nel genoma, particolarmente nelle regioni telomeriche e dei centromeri (Lathrop et al., 1988)(figura 1.2A).

I microsatelliti, detti anche corte ripetizioni a tandem (STR: Short Tandem Repeat), sono ripetizioni a tandem di identici motivi nucleotidici, composti da 2-4 paia di basi. Questi polimorfismi mostrano un alto livello di variazione allelica e sono molto utilizzati come marcatori. Sono diffusi sia nei genomi procarioti che in quelli eucarioti (Hancock, 1996). L'origine di questa variabilità è dovuta a "slittamenti" che avvengono durante la replicazione del microsatellite e che danno luogo a inserzioni o, meno frequentemente, a delezioni di una o più unità ripetitive. Le variazioni sono tali che non esistono due individui con la stessa combinazione di alleli microsatellitari: esaminando numerosi microsatelliti è possibile ottenere un'"impronta digitale" per ogni individuo (figura 1.2B).

I microsatelliti sono più usati come marcatori di DNA che non i minisatelliti per due ragioni. Innanzitutto, i minisatelliti non sono sparsi in maniera costante nel genoma, ma tendono ad essere localizzati più frequentemente vicino alle estremità dei cromosomi. I microsatelliti, al contrario, sono dispersi in tutto il genoma. In secondo luogo, il modo più rapido per trovare un polimorfismo di lunghezza è tramite la PCR, ma la caratterizzazione mediante PCR è molto più affidabile per frammenti di lunghezza inferiore a 300 bp. La maggior parte degli alleli minisatelliti è più lunga, poiché le unità ripetitive sono piuttosto lunghe e numerose.

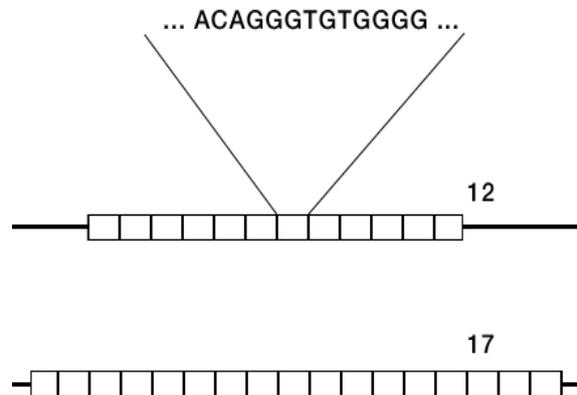
Gli SNP sono il tipo di polimorfismo più diffuso, essendo presenti sia nelle regioni codificanti che in quelle di regolazione dei geni, con una frequenza di uno ogni 1300 paia di basi nel genoma umano (Venter et al., 2001). In generale gli SNP possono essere dei polimorfismi bi-, tri- e tetra-allelici a seconda del numero di alleli che si origina in seguito alla mutazione. Considerato che gli ultimi due tipi sono molto rari, spesso il termine SNP fa riferimento ai marcatori bi-allelici (Brookes, 1999).

Gli SNP sono il risultato di fenomeni di transizione e trasversione di nucleotidi. La transizione è la sostituzione nucleotidica tra due basi puriniche (Adenina e Guanina), o tra due basi pirimidiniche (Timina e Citosina). La trasversione, invece, è la sostituzione di una purina con una pirimidina o viceversa. Le mutazioni per transizione sono molto più comuni di quelle per trasversione.

La sostituzione di un nucleotide può non avere effetti sull'espressione della proteina (mutazione silente) oppure determinare alterazioni nella sequenza aminoacidica. Nel secondo caso, si parla di mutazioni mis-senso e no-senso. La mutazione mis-senso si ha nel caso in cui lo SNP comporta la relativa sostituzione di un aminoacido nella sequenza peptidica, per la costituzione di un diverso codone. La mutazione no-senso, invece, causa la formazione di un codone di terminazione, che porta ad un arresto prematuro della sintesi proteica, con la conseguente formazione di una catena aminoacidica più corta.

Fig.1.2: A) Schema di un minisatellite; B) schema di un microsatellite

A



B

5'-atcgcgcgcgcgcgcgcgcgattt-3'

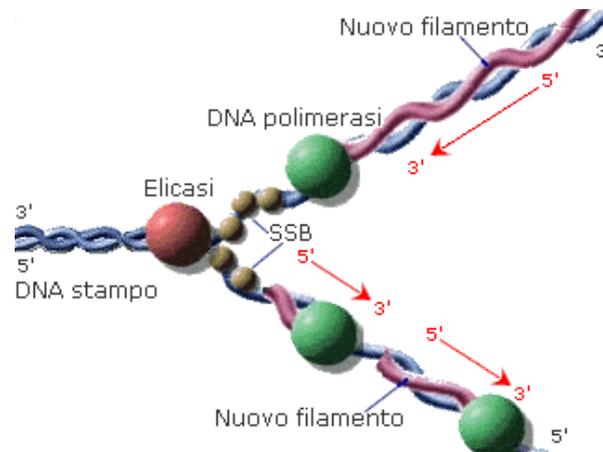
5'-atcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgattt-3'

Polimorfismi nelle sequenze di regolazione sono meno diffusi, si presume che questo sia la conseguenza di una pressione selettiva, che riduce le modificazioni in queste regioni del DNA. Secondo il punto in cui avviene lo SNP, si possono avere conseguenze differenti sul fenotipo dell'individuo. In ogni caso, molti degli SNP sono localizzati in regioni non codificanti e non comportano, pertanto, effetti diretti sul fenotipo. Questi SNP sono utilizzati come marcatori in popolazioni genetiche o coinvolti in complessi multigenici, usando il sistema del Linkage Disequilibrium (Secchiari et al., 2006).

1.1 Origine degli SNP.

La corretta replicazione del DNA è una condizione essenziale per la stabilità genetica di una cellula. Le DNA-polimerasi sono un gruppo di enzimi chiave del processo di replicazione; il loro compito è quello di incorporare, con estrema precisione, nucleotidi complementari durante la sintesi di nuovi segmenti di DNA (figura 1.3). Inoltre, le DNA polimerasi posseggono un'attività di esonucleasi che permette di correggere eventuali nucleotidi inseriti non correttamente. Nonostante l'esistenza di questo complesso sistema di replicazione, gli errori avvengono con una frequenza di 10^{-9} - 10^{-10} per base replicata (Echols e Goodman, 1991).

Le cause degli errori di replicazione sono dovuti a fattori di natura esogena ed endogena. Le reazioni endogene sono la conseguenza di particolari ricombinazioni, proprie della molecola di DNA come le trasversioni, le depurinazioni spontanee di basi (Loeb e Preston, 1986) e le deaminazioni di citosine e adenine, che portano alla sintesi di uracile e ipoxantina rispettivamente. I meccanismi esogeni di mutazione sono di varia natura e sono dovuti ad agenti esterni che possono riguardare punti diversi della sequenza nucleotidica. I fenomeni più frequenti sono la dimerizzazione di pirimidine indotta da radiazioni UV, l'azione di agenti alchilanti che creano legami tra le basi dello stesso filamento e molecole ossidanti che inducono il danneggiamento delle strutture puriniche e pirimidiniche. La maggior parte di queste alterazioni è individuata e corretta dai sistemi di riparazione del DNA.

Fig.1.3: Schema del processo di replicazione del DNA (tratto da www.molecularlab.it)

1.2 Determinazione del polimorfismo a livello proteico.

I primi studi sul polimorfismo sono stati compiuti sulle variazioni a livello proteico, che rappresentano la diretta conseguenza di una mutazione a livello genico.

Il polimorfismo delle proteine del latte è stato descritto, per la prima volta, da Aschaffenburg e Drewry (1955). Usando l'elettroforesi su carta, furono in grado di rilevare la presenza di due bande distinte di β -lattoglobulina a partire da campioni di latte bovino individuale. Analisi successive permisero di dimostrare che i due tipi erano sotto il controllo genico ed erano determinati da due alleli codominanti autosomali (Aschaffenburg e Drewry, 1957). La tecnica dell'elettroforesi su carta permise di rilevare le varianti genetiche dell' α -lattoalbumina (Blumberg e Tombs, 1958) e della β -caseina (Aschaffenburg, 1961).

Le varianti dell' α S1-caseina furono determinate con l'uso dell'elettroforesi in amido-urea (Thompson et al., 1962), mentre l'uso di agenti riducenti nel tampone di corsa o nel gel contribuì alla caratterizzazione delle due varianti della κ -caseina (Neelin, 1964; Schmidt, 1964; Woychik, 1964).

L'introduzione di tecniche analitiche con una maggiore risoluzione e sensibilità, come l'elettroforesi in gel di poliacrilammide, l'isoelettrofocalizzazione, la

cromatografia e l'elettroforesi capillare, ha permesso di individuare molte varianti genetiche nel latte di specie di interesse zootecnico.

I limiti dei metodi che rilevano i polimorfismi proteici sono legati al ristretto numero di proteine che danno una buona separazione, a causa della ridotta differenza di carica netta. Infatti, le mutazioni derivanti dalla sostituzione di un aminoacido che non determina differenze di carica netta, sono tre volte più diffuse di quelle che comportano dei cambiamenti apprezzabili su gel (Ng-Kwai e Grosclaude, 1992). A questi limiti si aggiungono gli effetti delle modificazioni post-trascrizionali, come fosforilazione e glicosilazioni, che influenzano sensibilmente la motilità della proteina.

1.3 Determinazione del polimorfismo a livello di DNA.

Il monitoraggio del polimorfismo a livello genico è stato possibile con lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante. Prima della scoperta della PCR (Reazione a Catena della Polimerasi), era necessario clonare i frammenti di DNA per ridurre la complessità dei campioni.

Una delle prime tecniche utilizzate per identificare polimorfismi derivanti da sostituzione di una base azotata fu la RFLP (Restriction Fragment of Length Polymorphism). La tecnica RFLP si basa sull'attività degli enzimi di restrizione e sull'ibridazione Southern-blot, che permettono di identificare mutazioni anche puntiformi sulla base della comparsa o scomparsa di siti di restrizione.

La possibilità di amplificare specifiche regioni del DNA genomico, mediante la PCR (Mullis e Faloona, 1987), ha permesso di individuare punti di mutazione su larga scala. La PCR si basa sull'amplificazione di frammenti d'interesse del genoma, al fine di ridurre la complessità del DNA da analizzare. L'enzima utilizzato attualmente durante la PCR è la *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerasi. La *Taq* polimerasi ha un tasso di errore compreso 10^{-4} - 10^{-5} per nucleotide (Tindall e Kunkel, 1988), che dipende dalla dimensione del frammento da amplificare e dalle condizioni della reazione (concentrazione del cloruro di magnesio e dei nucleotidi, pH, temperatura).

I metodi di identificazione delle mutazioni possono essere divisi in metodi di scansione del polimorfismo e metodi di genotipizzazione. I primi sono in grado di evidenziare la presenza di un polimorfismo senza specificarne il tipo, mentre i secondi permettono di definire anche la natura della mutazione.

1.4 Metodi di scansione del polimorfismo.

La principale strategia per l'identificazione dei punti di mutazione di questi metodi si basa, essenzialmente, su tre fasi: a) amplificazione del frammento d'interesse mediante la PCR, b) scansione della presenza della mutazione con rapide procedure, c) successivo sequenziamento dei segmenti che hanno dato esito positivo.

Le metodologie di scansione delle mutazioni si dividono in due gruppi.

Il primo gruppo si basa sulla differente migrazione di molecole mutanti, dovuta a cambiamenti conformazionali (metodi di conformazione), mentre il secondo gruppo è costituito da tecniche che ricorrono al taglio enzimatico di DNA e RNA. Le metodologie di conformazione più importanti sono la Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), la Heteroduplex Analysis (HA) e la HPLC denaturante (dHPLC); mentre tra quelle basate sul taglio enzimatico, vanno ricordate la RNasi-assay, la EMC (Enzyme Mismatch Cleavage) e la CCM (Chemical Cleavage Mismatch).

1.4.1 Metodi basati sulla conformazione.

Il principio su cui si basano questi metodi è molto semplice: si sfruttano le differenti proprietà di conformazione di due molecole che differiscono per uno o più nucleotidi. Infatti, le caratteristiche chimico-fisiche di una molecola di DNA dipendono dalla sequenza nucleotidica. La sostituzione di una singola base azotata può determinare notevoli cambiamenti nella natura della molecola.

Il limite di queste metodologie è l'impossibilità di localizzare la posizione del polimorfismo individuato.

SSCP

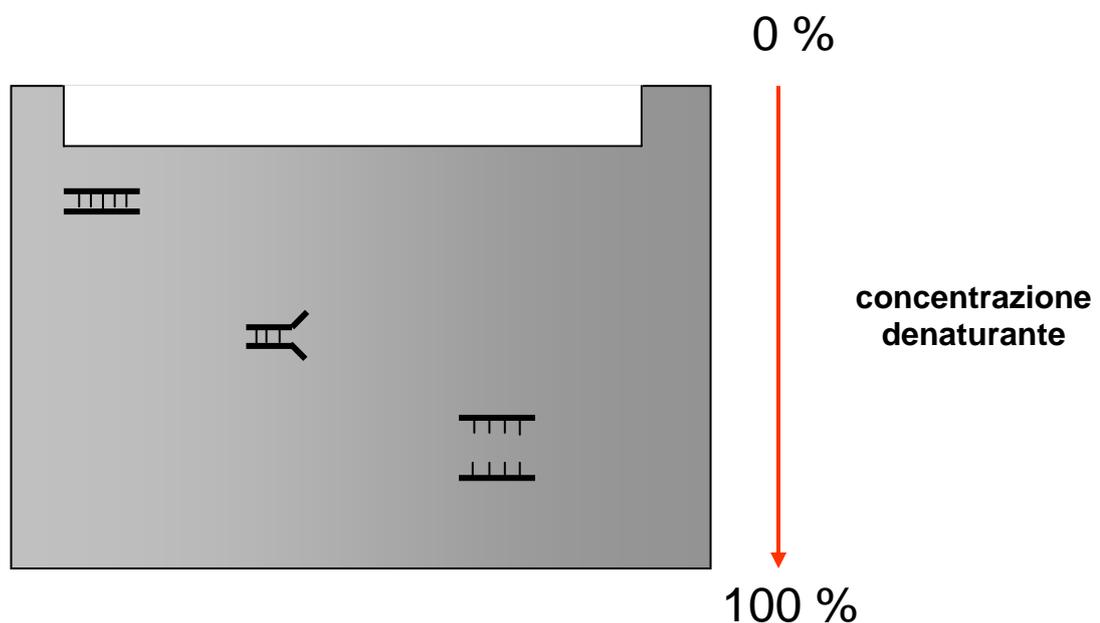
La SSCP è uno dei metodi più semplici e maggiormente utilizzati per l'identificazione di un polimorfismo (Orita et al., 1989). La metodologia prevede tre fasi consequenziali: prima di tutto, si amplifica la regione d'interesse mediante PCR, il prodotto viene denaturato ad alte temperature per ottenere DNA a singolo filamento (ssDNA); la separazione viene fatta con una corsa su un gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti. I frammenti a singolo filamento tendono a ripiegarsi, assumendo una struttura tridimensionale che è funzione della sequenza nucleotidica. La presenza di una mutazione, anche quella puntiforme (SNP), determina una differente struttura tridimensionale con conseguente diversa motilità nel gel di poliacrilammide. In condizioni ottimali, il 70-95 % delle sostituzioni di base può essere individuato, usando prodotti di PCR corti (≤ 200 bp) (Sheffield et al., 1993; Gross et al., 1999). Questa metodologia sarà spiegata dettagliatamente nella sezione Materiali e Metodi, in quanto è stata utilizzata per la realizzazione del lavoro di tesi.

DGGE

La DGGE, come la SSCP, sfrutta le diverse proprietà biochimiche di due molecole di DNA che differiscono per uno o più nucleotidi. In questo caso, la caratteristica discriminante è la denaturazione della doppia elica, valutata mediante migrazione in un gel denaturante (Fisher e Lermann, 1983). Il DNA a doppio filamento (dsDNA) viene fatto correre in un gel, nel quale è stato creato un gradiente di concentrazione crescente di un agente denaturante (urea o formammide) (figura 1.4). Migrando lungo il gel, le molecole di DNA vanno incontro a condizioni di denaturazione crescenti, questo comporta la separazione della molecola nei due filamenti. Il processo di degradazione è sequenza-specifico

e comporta un rallentamento della motilità del DNA. Il potere di risoluzione della metodica può essere migliorato legando ad uno dei due primer una sequenza arricchita in GC (Myers et al., 1985; Sheffield et al., 1989). La lunghezza massima dei frammenti che si possono analizzare con la DGGE, è di 1000 bp. I vantaggi della DGGE sono l'elevata precisione d'analisi e i bassi costi di produzione. In compenso, la tecnica richiede una gran mole di lavoro a monte per disegnare i primer dei prodotti di PCR migliori.

Fig.1.4: Schema della metodologia DGGE.



Analisi eteroduplex

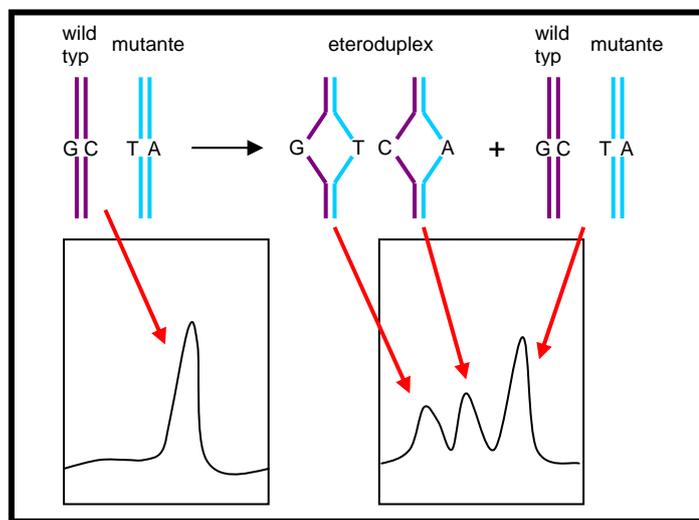
Il principio su cui si basa l'eteroduplex è molto simile a quello della SSCP. Il metodo si fonda sull'individuazione di molecole eteroduplex, derivanti dall'appaiamento dei singoli filamenti dei due segmenti polimorfici.

La presenza della molecola eteroduplex sta ad indicare che il campione testato contiene entrambe le isoforme che caratterizzano quel determinato polimorfismo. L'eteroduplex può essere rilevato con la comparsa di una banda dopo una corsa su

un gel di poliacrilammide non denaturante. La lunghezza ottimale per l'individuazione di uno SNP oscilla tra 200 e 600 bp e il tasso di rilevamento del polimorfismo è dell'80% (Cotton, 1993). Il metodo richiede un tempo di corsa di 14-30 h che è funzione delle dimensioni del frammento da analizzare; questo comporta che il metodo non si presta per lavori con un numero consistente di campioni.

Una variante dell'eteroduplex molto utilizzata è la DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) (figura 1.5) dove la fase con elettroforesi è stata rimpiazzata con una colonna cromatografica (Underhill et al., 1997). Gli eteroduplex sono separati dagli omoduplex sottoponendo le molecole ad una temperatura che denatura parzialmente il punto dove non si ha appaiamento. L'uso della DHPLC permette di analizzare un numero maggiore di campioni rispetto all'eteroduplex tradizionale, inoltre il tasso di mutazioni che è in grado di identificare oscilla tra il 95 e il 100% (O'Donovan et al., 1998; Gross et al., 1999).

Fig. 1.5: Schema della metodologia DHPLC.



1.4.2 Metodi basati sul taglio chimico ed enzimatico del DNA

I metodi basati sul taglio della molecola del DNA, con strumenti chimici ed enzimatici, si basano sull'individuazione di molecole eteroduplex derivanti da

filamenti denaturati delle due isoforme polimorfiche. In questo caso, la presenza dell'eteroduplex viene individuata mediante il taglio della molecola nel punto di mismatch dove è localizzato lo SNP. I vantaggi nell'uso dei metodi basati sul taglio sono la relativa facilità nel determinare i polimorfismi e la possibilità di analizzare frammenti di DNA piuttosto lunghi.

RNasi-assay

Questa metodica è utilizzata per individuare dei mismatch in molecole a doppio filamento RNA:DNA (Myers et al., 1985a) e RNA:RNA (Winter et al., 1985). L'RNasi, che controlla le molecole di RNA a singolo filamento, digerisce i mismatch ibridizzati con una sonda a DNA (figura 1.6).

Le mutazioni di purine sono tagliate difficilmente e spesso non vengono tagliate affatto; ne deriva che solo il 50% circa dei polimorfismi può essere rilevato (Myers et al., 1985a). La scarsa efficacia del metodo e l'elevata possibilità che vengano tagliati siti differenti dal mismatch, non permettono a questa metodica di poter essere utilizzata per uno screening di popolazione.

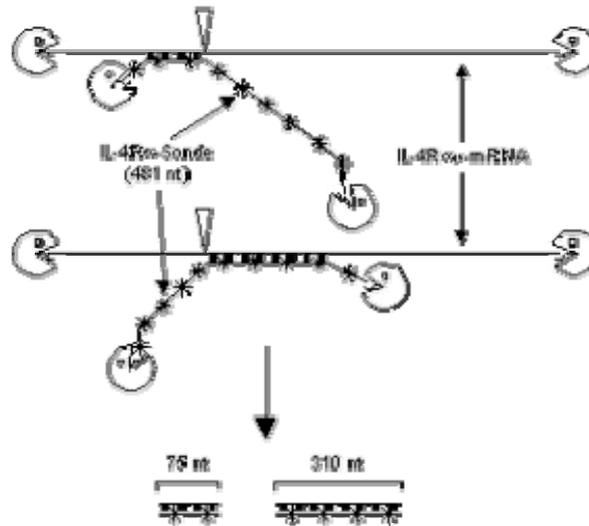
In commercio è disponibile una variante del metodo (NIRCA: NonIsotopic Rnase Cleavage Assay; Ambiom). NIRCA analizza ibridi RNA-RNA generati da una trascrizione *in vitro* di prodotti di PCR derivanti dalle due isoforme polimorfiche. I frammenti tagliati sono separati con una corsa elettroforetica in un gel non denaturante (Nash e Inderlied, 1996).

EMC (Enzyme Mismatch Cleavage)

Il mismatch generato nel DNA eteroduplex può essere tagliato da *risolvasi* di batteriofagi come endonucleasi VII T₄ e endonucleasi I T₇ (Mashal et al., 1995; Youil et al., 1995; Del Tito et al., 1998). Questi enzimi tagliano, *in vivo*, le ramificazioni di DNA che si formano durante la replicazione dei fagi; inoltre è stata dimostrata la capacità di tagliare il DNA nei siti di mismatch (Solaro et al.,

1993). I prodotti ottenuti dalla digestione possono essere visualizzati su gel di agarosio o mediante elettroforesi capillare. Il metodo è conosciuto come Enzyme Mismatch Cleavage o EMC. Al pari della RNasi-assay, i limiti di questa metodica sono legati alla difficoltà di individuare tutti i possibili polimorfismi e l'elevato tasso di errore che si può commettere durante l'analisi.

Fig.1.6: Schema dell'attività della RNasi. L'enzima digerisce i mismatch ibridizzati con una sonda a DNA (tratto da www.edoc.hu-berlin.de)



CCM (Chemical Cleavage Mismatch)

La tecnica CCM consiste nel taglio del sito mismatch dell'eteroduplex con sistemi chimici e non enzimatici. Il sito di mismatch è modificato mediante trattamento con idrossilamina e tetrossido di osmio, che reagiscono rispettivamente con la citosina e la timina del sito di mismatch. Gli eteroduplex modificati, vengono tagliati con la piperidina e i prodotti della reazione sono separati con una elettroforesi in gel di poliacrilammide. Questa metodica permette di analizzare frammenti di dimensioni superiori a 2 Kb (Cotton, 1993) e non ha grossi limiti nell'individuare un polimorfismo. Il limite di questa tecnica è la notevole pericolosità dei reagenti che vengono utilizzati.

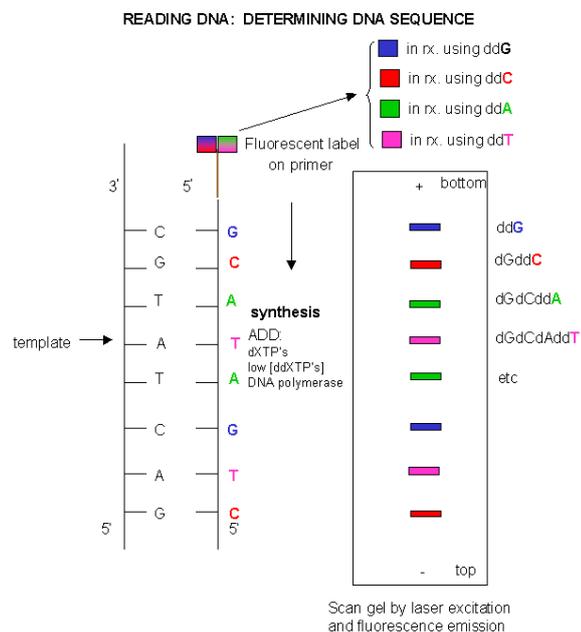
1.5 Sequenziamento

Il sequenziamento di un frammento di DNA è il sistema più efficace e più accurato per individuare una mutazione. La metodica permette di conoscere la sequenza nucleotidica della molecola e di risalire, quindi, alla natura del polimorfismo (figura 1.7).

I limiti di questo sistema sono essenzialmente due: non è possibile utilizzarlo per analisi di grandi popolazioni, perché richiede tempi operativi molto lunghi; inoltre ha una bassa sensibilità e non permette di determinare polimorfismi presenti in una frazione minore del DNA totale.

Il sequenziamento viene utilizzato come tecnica complementare ai metodi di scansione per risalire al tipo di polimorfismo.

Fig. 1.7: Schema del sequenziamento secondo la metodologia di Sanger. La sequenza di interesse viene amplificata con una PCR dove ai soliti nucleotidi si aggiungono 4 deossinucleotidi marcati che saranno letti da un laser. Quando viene inserito un deossi nucleotide l'allungamento della catena si blocca.



1.6 Metodi di genotipizzazione.

I metodi di genotipizzazione sono numerosi, ma differiscono l'uno dall'altro per poche caratteristiche. Queste tecniche utilizzano metodologie per rilevare SNP e sistemi di rilevamento capaci di quantificare il prodotto allele-specifico (fluorescenza, spettrometria di massa, DHPLC ecc.). Al pari dei metodi di scansione, i metodi di genotipizzazione possono essere divisi in due gruppi, quelli basati sull'ibridazione e quelli che utilizzano l'attività di specifici enzimi.

1.6.1 Metodi basati sull'ibridazione.

La specificità di queste metodologie, dipende dalla sequenza nucleotidica contenente lo SNP e dalle condizioni di ibridazione.

DNA microarray

Il sistema DNA microarray, specifico per il rilevamento di SNP, si basa sul principio di "sequenziamento mediante ibridazione", in cui sono utilizzate specifiche sonde di DNA capaci di discriminare un allele da un altro. Il sistema permette di determinare lo SNP con estrema precisione. La metodica, utilizzata in questo lavoro ed ampiamente spiegata nei materiali e metodi, consiste nella sintesi di prodotti di PCR marcati con specifiche molecole fluorescenti (fluorofori), uno per ogni allele. Le sonde vengono distribuite su un chip dove sono ancorati degli oligonucleotidi complementari alle sonde sintetizzate. Secondo il fluoroforo che si accende, sarà possibile stimare quali alleli sono presenti.

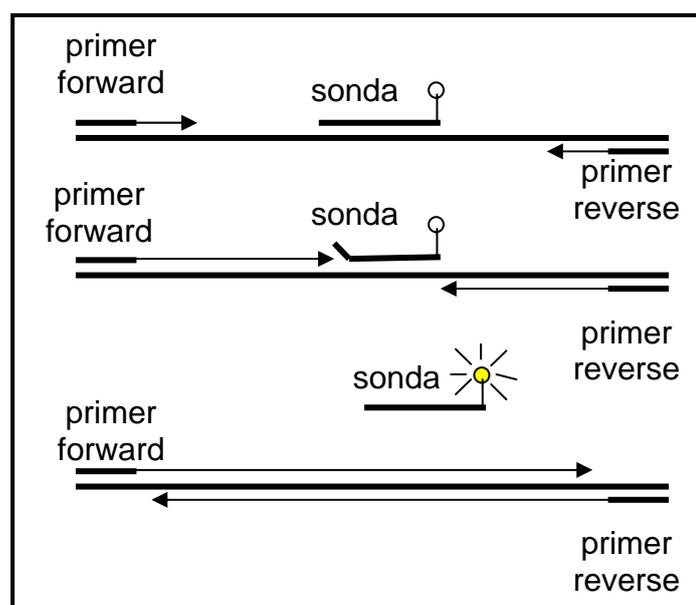
Il DNA microarray permette di determinare contemporaneamente centinaia di polimorfismi. I limiti riguardano i lunghi tempi richiesti per la sintesi dei molteplici prodotti di PCR e l'elevato costo dei macchinari per la sua applicazione.

Ibridazione omogenea

L'ibridazione omogenea permette di rilevare uno SNP durante una reazione di Real-Time PCR, una tecnica nata in realtà per quantizzare il prodotto di PCR.

Per la determinazione dello SNP, sono disegnati due comuni primer che comprendono la regione d'interesse e due oligonucleotidi marcati allele-specifici, complementari alla regione a valle di quella dello SNP (uno per ogni primer) (figura 1.8). La sintesi delle sonde viene fatta bloccando l'estensione della sequenza all'estremità 3', marcandola con una molecola fluorescente. Nella fase d'annealing della PCR, le sonde si legano nella regione specifica che contiene lo SNP. Durante la fase d'estensione della PCR, la sonda che si appaia perfettamente viene tagliata dall'attività 5' esonucleasica della *Taq* DNA polimerasi, determinando un incremento del segnale di fluorescenza. Le sonde che formano un sito di mismatch (indice della presenza dell'altro allele che caratterizza lo SNP), vengono rimosse senza degradazione, lasciando legata l'estremità marcata. La conseguenza sarà che il segnale di fluorescenza sarà ridotto. Si evince che la genotipizzazione del polimorfismo sarà stimata sulla base dell'intensità di fluorescenza (un omozigote darà un segnale maggiore dell'altro, mentre l'eterozigote sarà intermedio).

Fig.1.8: Schema dell'ibridazione omogenea



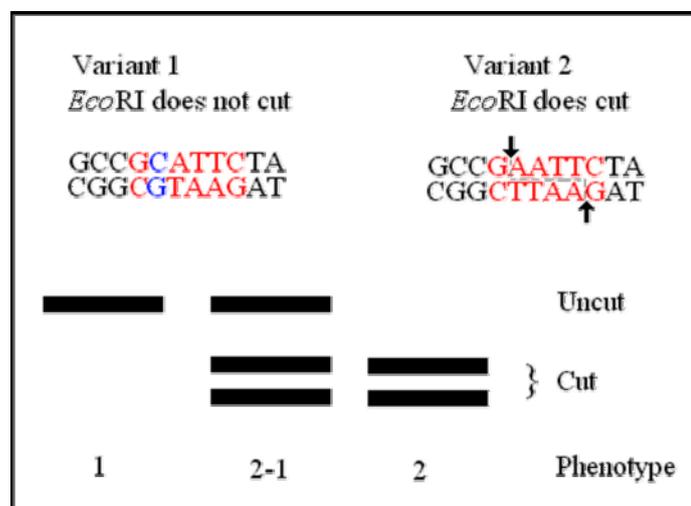
1.6.2 Metodi basati sull'attività enzimatica.

I metodi enzimatici permettono di rilevare molteplici tipi di polimorfismo e non hanno tutti i limiti dei metodi d'ibridazione. Questi metodi includono RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Allele-Specific PCR (AS-PCR), OLA (Oligonucleotide Ligation Assay), il pirosequenziamento e la PEA (Primer Extension Assay).

RFLP

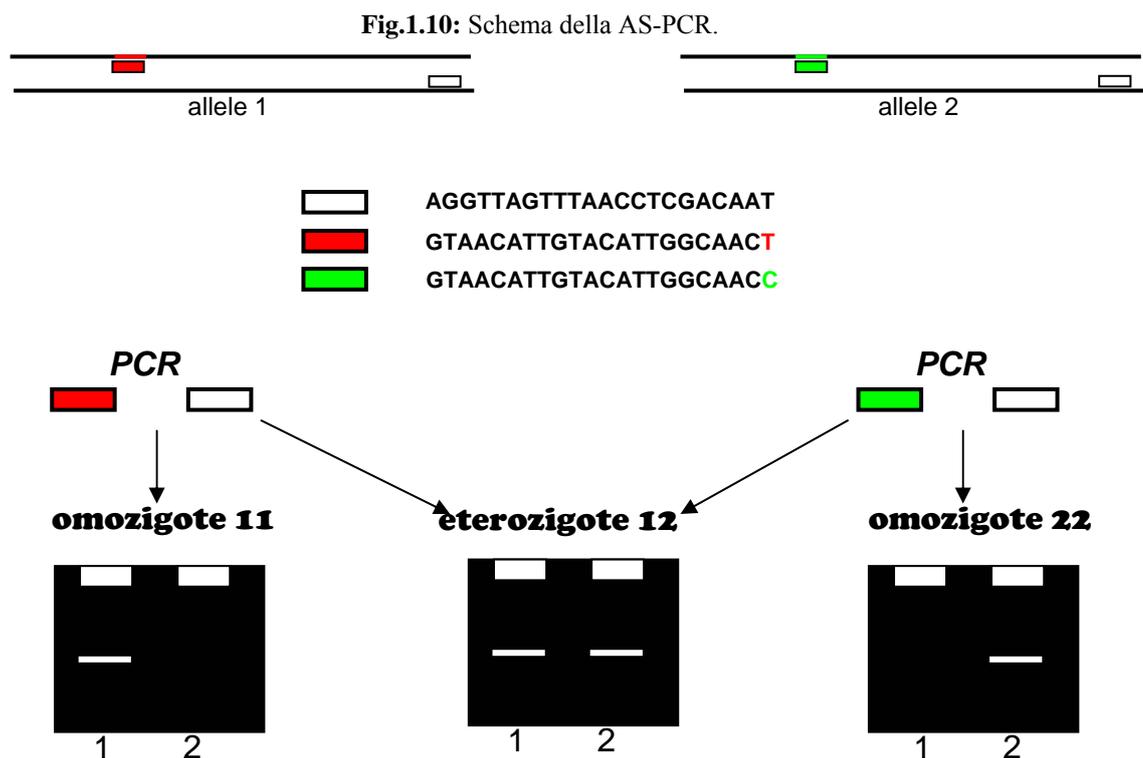
La PCR-RFLP è uno dei metodi più utilizzati per la genotipizzazione, grazie alla sua estrema semplicità d'applicazione. Il principio della RFLP sfrutta la presenza di siti di restrizione, presenti nella sequenza nucleotidica e l'attività di specifici enzimi (endonucleasi) che tagliano tali sequenze (figura 1.9). La sostituzione di un nucleotide può alterare un sito di restrizione; la specifica endonucleasi, non riconoscendo la sequenza non taglia la molecola. I due alleli saranno distinguibili perché dopo una corsa su gel di agarosio formeranno bandeggi differenti, dovuti al diverso tipo e numero di frammenti formati. Il limite di questo metodo è l'impossibilità di rilevare tutti i polimorfismi, ma solo quelli che sono in grado di alterare i siti di restrizione.

Fig.1.9: Schema della metodologia RFLP(tratto da www.ucl.ac.uk)



AS-PCR

Il metodo sfrutta l'azione della DNA-polimerasi durante la fase di estensione. La reazione di PCR è ripetuta in due reazioni tra loro indipendenti. Per le due amplificazioni sono disegnati tre primer: un primer reverse comune ad entrambi gli alleli e due primer forward che differiscono in 3' per un nucleotide, precisamente, quello che caratterizza lo SNP (Newton et al., 1989; Wu et al., 1989). Per le due reazioni di amplificazione si utilizzeranno primer forward diversi e lo stesso primer reverse. La DNA polimerasi amplificherà le regione di interesse, solo se l'appaiamento del primer sarà perfetto; in caso di mismatch in 3' l'enzima non opererà l'estensione. L'AS-PCR ha il vantaggio di essere molto semplice e veloce da applicare (è sufficiente una PCR e una corsa su gel di agarosio per rilevare il polimorfismo) (figura 1.10).



OLA

L'Oligonucleotide Ligation Assay si basa sulla capacità della DNA-*ligasi* di evidenziare punti di mismatch nel sito del polimorfismo (Laendegren et al., 1988; Alves e Carr, 1988).

La metodica prevede l'uso di tre oligonucleotidi: uno complementare alla regione a valle dello SNP, detto "common probe" e due oligonucleotidi complementari alla regione a monte dello SNP con il nucleotide in 3' corrispondente al sito polimorfico detti "discriminating-oligo"; i due primer, che differiscono per il nucleotide in 3', sono marcati in 5' con due fluorofori diversi.

La DNA ligasi lega un discriminating-oligo al common probe, solo se i due primer si appaiano perfettamente. I prodotti che si ottengono da questa reazione, vengono separati in un gel di agarosio. L'uso di una ligasi termostabile permette di operare la reazione durante un'amplificazione (Ligation Detection Reaction, LDR) (Barany, 1991). Si rimanda a materiali e metodi per una descrizione particolareggiata della metodica.

Pirosequenziamento

Il pirosequenziamento utilizza il principio del "sequenziamento mediante sintesi" e si basa sulla stima dell'impulso luminoso, rilasciato dal pirofosfato durante l'incorporazione di un nucleotide (Nyren et al., 1993; Ronaghi et al., 1996).

Il processo d'incorporazione nucleotidico rilascia una molecola di pirofosfato, che viene convertita in ATP (ad opera dell'ATP sulfurilasi) in presenza di 5'-fosfosolfato. Il segnale rilasciato durante la reazione, catalizzata dalla sulfurasi, è captata da un fotodetector. L'impulso che si sprigiona viene convertito da un elaboratore in un grafico (l'altezza del picco sarà proporzionale al numero di nucleotidi incorporati).

I dNTP non incorporati e l'eccesso di APT sono degradati da una apirasi. A degradazione ultimata, si aggiunge un altro nucleotide. Il genotipo dello SNP si deduce dall'inserimento sequenziale e dalla degradazione dei nucleotidi. Siccome

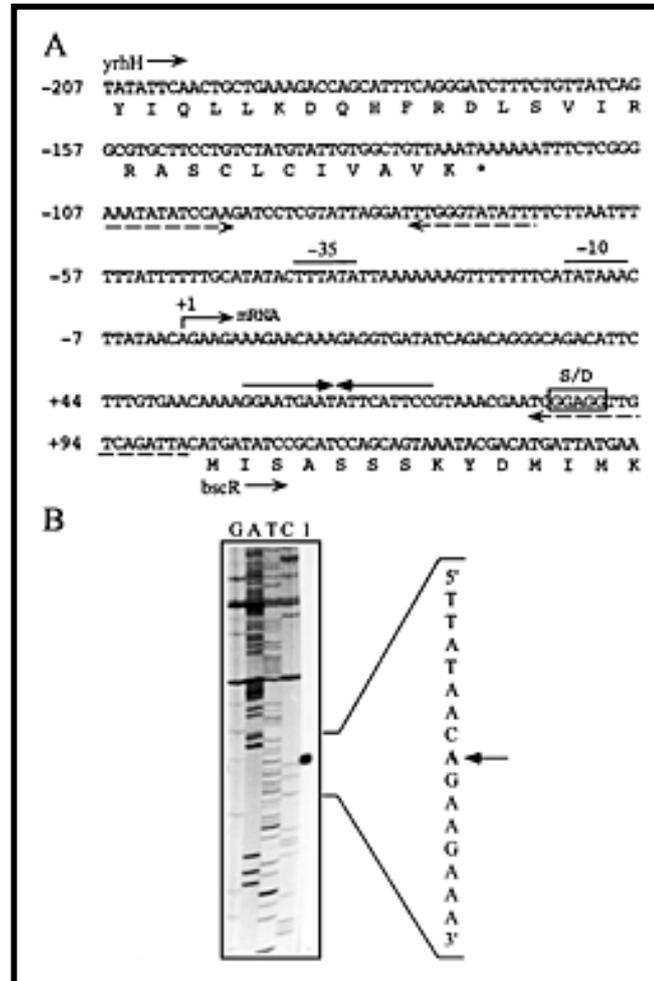
la DNA polimerasi (responsabile dell'inserimento dei nucleotidi) e l'apirasi (responsabile della degradazione) competono per lo stesso substrato, è importante ottimizzare le condizioni cinetiche della reazione, per ottenere risultati qualitativamente ottimi. Il metodo è in grado di analizzare frammenti di DNA corti (30-50 bp), ma ha un'alta capacità di rilevare molteplici SNP per reazione.

PEA (Primer Extension Analysis)

La Primer Extension Analysis è una delle metodiche più semplici e utilizzate per la genotipizzazione degli SNP.

Il metodo si basa sull'estensione di una singola base, ad opera di una DNA polimerasi (Sokolov, 1990; Syvanen et al., 1990). La metodica prevede l'utilizzo di un primer non marcato che si appaia nella regione a monte del sito polimorfico (figura 1.11A) e dideossinucleotidi marcati con fluorofori di fluorescenza diversa. La polimerasi inserisce nucleotidi al primer durante la fase di estensione. La fluorescenza che si sprigiona corrisponde a quella del dideossinucleotide che è stato inserito. In questo modo è possibile apprezzare anche il polimorfismo presente nella regione d'interesse mediante una corsa su gel di poliacrilammide (figura 1.11B). I vantaggi di questa tecnica sono la semplicità di applicazione e la precisione nel distinguere i genotipi omozigoti dagli eterozigoti.

Fig.1.11: Schema della PEA. A) Esempio di come vengono scelti i primer per la reazione di replicazione. B) Corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide: su ogni linea è stato caricato un amplificato con il dideoossi nucleotide diverso. La sequenza viene letta a partire dalle bande più basse. Il polimorfismo è indicato da una freccia e da un punto nero (tratto da www.soc.nii.ac.jp).



1.7 Conclusione

Le tecnologie utilizzate per determinare il polimorfismo sono molteplici, come riportato nelle pagine precedenti.

Tutte presentano vantaggi e svantaggi (tabella 1.1) e si può concludere dicendo che non esiste una metodica ottimale per tutte le applicazioni. La scelta appropriata di una tecnica e il suo utilizzo richiedono l'attenta considerazione di una serie di fattori come, il disegno sperimentale (numero di SNP in relazione alla lunghezza del frammento d'interesse), il tipo di campione, la semplicità di applicazione e i costi.

Il livello di esperienza di una metodica e la disponibilità di strumentazione sono fattori secondari, ma comunque di notevole importanza.

Riguardo alla precisione e sensibilità per la determinazione di una mutazione, ci sono notevoli differenze a seconda che si conosca o meno il tipo di mutazione.

Le metodiche di scansione sono procedure molto rapide che si completano se combinate con un sequenziamento; ma il potenziale di scansione si riduce in alcuni casi (per esempio nei campioni dove il mutante è poco diffuso).

Al contrario, le metodiche di genotipizzazione riducono se non eliminano gli errori commessi dalle tecniche di scansione. Il loro limite riguarda gli alti costi e l'elevata richiesta di conoscenze della tecnica.

Tab. 1.1: Riepilogo delle tecnologie più utilizzate per la determinazione di una mutazione puntiforme.

METODI	VANTAGGI	LIMITI
Metodi di scansione		
Sequenziamento (metodo Sanger)	Elevata precisione (100%)	<ul style="list-style-type: none"> • Richiesta di molteplici reazioni per grandi geni. • Non è applicabile per lo studio di grandi popolazioni.
SSCP	Semplicità di applicazione. È in grado di determinare il 75-90% delle sostituzioni nucleotidiche.	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata automazione. • Confonde le mutazioni silenti da quelle missenso.
DGGE	Semplicità di applicazione. È in grado di determinare il 100% delle sostituzioni nucleotidiche.	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata automazione. • Confonde le mutazioni silenti da quelle missenso.
DHPLC	Semplicità di applicazione. È in grado di determinare il 100% delle sostituzioni nucleotidiche.	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata automazione. • Confonde le mutazioni silenti da quelle missenso.
Rnasi Assay	Localizza le mutazioni. Identifica le mutazioni missenso, no-senso e frame-shift.	<ul style="list-style-type: none"> • Genera un alto background e non rileva le mutazioni di basso livello.
EMC	Localizza le mutazioni. Identifica le mutazioni missenso, no-senso e frame-shift.	<ul style="list-style-type: none"> • Genera un alto background e non rileva le mutazioni di basso livello.
CCM	Localizza le mutazioni. Identifica le mutazioni missenso, no-senso e frame-shift.	<ul style="list-style-type: none"> • Genera un alto background e non rileva le mutazioni di basso livello. • Pericolosità dei reagenti
Metodi di genotipizzazione		
DNA microarray	Elevata capacità di rilevare polimorfismi. Determina centinaia di polimorfismi contemporaneamente.	<ul style="list-style-type: none"> • Elevati costi di applicazioni. • Lunghi tempi richiesti per la sintesi dei differenti prodotti di PCR.
Ibridazione omogenea	Elevata capacità di rilevare polimorfismi.	<ul style="list-style-type: none"> • Elevati costi di applicazioni. • Elevata richiesta di esperienza dell'operatore.
RFLP	Semplice ed economica	<ul style="list-style-type: none"> • Rileva un numero di mutazioni ridotto
AS-PCR	Semplice ed economica	<ul style="list-style-type: none"> • Affidabilità ridotta.
OLA	Elevata precisione	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede molteplici fasi di applicazione.
Pirosequenziamento	Individua mutazioni in piccoli prodotti di PCR. Individua mutazioni per inserzione e delezione.	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede strumentazione specifica.
PEA	Semplicità di esecuzione e precisione nel determinare il polimorfismo.	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede strumentazione specifica.

2. IL LATTE

Il latte è “il prodotto della mungitura regolare, completa e ininterrotta della mammella di animali che siano in buono stato di salute, di nutrizione e non affaticati dal lavoro” (R.D. 994 del 09.05.1929). La definizione, così com'è riportata, fa riferimento al latte vaccino; per quello derivante da altre specie, è necessario affiancare l'origine (es. latte di pecora, latte di capra, latte di bufala ecc.).

Il latte è un liquido di complessa composizione, bianco e opaco, dal sapore dolce e con un pH vicino alla neutralità.

Il primo liquido secreto dalla ghiandola mammaria, subito dopo il parto, è il colostro. Questo prodotto si presenta piuttosto denso, di colore giallognolo e modifica le sue caratteristiche chimico-fisiche in 6-7 giorni dal parto, divenendo latte. Il colostro è indispensabile al nascituro, poiché manifesta funzioni immunitarie (a livello intestinale) e nutritive. La composizione del colostro varia da una specie all'altra (tabella 2.1).

Tab. 2.1: Composizione del colostro di alcune specie (fonte Biochemist's Handbook, 1968)

	Vacca	Pecora	Capra	Bufala	Scrofa	Cavalla	Donna
Acqua (g/L)	733	588	812	711	698	851	872
Solidi totali (g/L)	267	412	188	289	302	149	128
Lipidi (g/L)	51	177	82	39	72	24	29
Lattosio (g/L)	22	22	34	22	24	47	53
Proteine (g/L)	176	201	57	214	188	72	27
Ceneri (g/L)	10	10	9	11	6	6	3

Il costituente principale del latte è l'acqua, che è presente con una percentuale superiore all'80%. Il resto è costituito dal residuo secco, che è la risultante di un complesso polifasico, originato dalla natura dei suoi costituenti: lipidi e vitamine liposolubili (presenti nella fase di emulsione); proteine e sali minerali legati alle micelle (presenti nella fase in sospensione); glucidi solubili, minerali, sostanze azotate non proteiche e vitamine idrosolubili (presenti nella fase in soluzione).

La quantità di latte prodotta da un individuo e la sua composizione presentano variazioni importanti, in funzione di molteplici fattori (Alais, 2000):

- Fattori fisiologici: evoluzione durante la lattazione;
- Fattori alimentari: livello energetico e composizione della razione;
- Fattori climatici: stagioni e temperatura;
- Fattori genetici: variazioni a livello di specie (tabella 2.2), razza e individuo;
- Fattori zootecnici: sono numerosi e legati al tipo di tecnica di allevamento utilizzato e al tipo di mungitura.

Le latte-proteine sono costituite dalle caseine (80%) e dalle sieroproteine (20%). La frazione delle caseine è l'insieme di tre fosfoproteine calcio sensibili (α_{s1} , α_{s2} , β) e di una glicoproteina nota col nome di κ -caseina. Le caseine sono organizzate in micelle, nelle quali la κ -caseina si dispone all'esterno, consentendo alla micella di rimanere in sospensione, grazie alla sua idrofilicità. Le sieroproteine sono costituite da albumine (75%), immunoglobuline (15%) e proteoso-peptoni (10%). Le due frazioni maggiormente rappresentate sono quelle delle β -lattoglobuline e delle α -lattoalbumine.

Tab.2.2: Confronto sulla composizione del latte in alcune specie animali (Fonte Pulina e Nudda,2001)

	Ovini	Caprini	Bovini	Bufalini	Donna
Acqua %	82.5	87.0	87.5	80.7	87.5
Residuo secco %	17.5	13.0	12.5	19.2	12.5
Grasso %	6.5	3.5	3.5	8.8	4.4
Sostanze Azotate Totali (Nx6.38)	5.5	3.5	3.2	4.4	1.1
Caseine %	4.5	2.8	2.6	3.8	0.4
Sieroproteine %	1.0	0.7	0.6	1.1	0.7
Lattosio %	4.8	4.8	4.7	4.4	6.9
Ceneri %	0.92	0.80	0.72	0.80	0.30
Ca mg/L	193	134	119	190	32
Valore energetico kcal/L	1050	650	700	1100	690
Densità	1.037	1.032	1.032	1.030	1.015
Acidità °SH	8.5	8.0	7.1	10.0	-
pH	6.65	6.60	6.50	6.67	6.85
Punto crioscopico °C	-0.59	-0.57	-0.55	-0.58	-

Il grasso del latte è formato prevalentemente da trigliceridi che rappresentano circa il 95-98%; il resto è costituito da fosfolipidi e steroli.

La frazione minerale del latte è ricca di potassio (0.15%), calcio (0.12%) e fosforo (0.09%).

Le vitamine sono trasferite direttamente dal sangue. La frazione idrosolubile è costituita da quantità significative del complesso B, dalla vitamina H, PP, acido pantotenico e acido ascorbico. Le vitamine liposolubili sono ben rappresentate dalla vitamina A (retinolo) e, solo in alcune specie, dal suo precursore (β -carotene), dalla vitamina D e dalla E.

L'organo responsabile della sintesi del latte è la mammella, ghiandola tubulo-alveolare, di natura ectodermica, posta nella regione pubica nei ruminanti (Secchiari et al., 2005). Il numero delle mammelle, varia da una specie all'altra: due nella giumenta equina ed asinina, nella pecora e nella capra, quattro nella vacca, otto nella gatta, da otto a dieci nella cagna e da dieci a dodici nella scrofa. L'unità secernente della ghiandola mammaria è l'alveolo che è rivestito da tessuto connettivale e cellule mioepiteliali. Ogni alveolo è costituito da uno strato di cellule epiteliali, che rappresentano il vero sito di sintesi del latte (figura 2.1).

Nella mammella della vacca, gli acini sono riuniti in grappoli, che vanno a formare i lobuli; questi ultimi comunicano, attraverso un tubo collettore ramificato, con la cisterna (seno galattoforo), situata alla base della mammella. La ghiandola mammaria dei bovini è notevolmente irrigata da due grossi nodi capillari alimentati dall'arteria esterna.

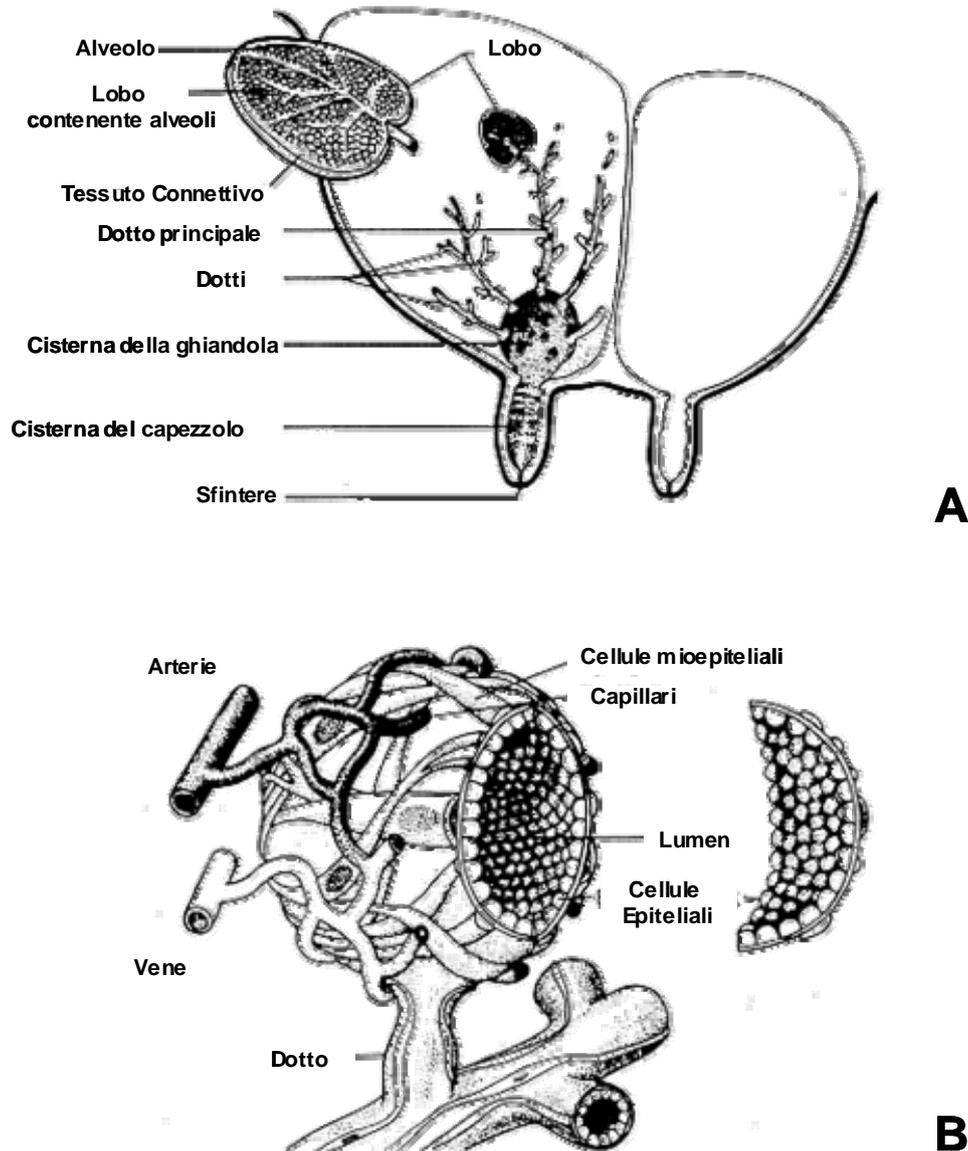
La produzione di latte è sostenuta da un flusso di sangue che varia da 5 a 9 litri al minuto. È stato stimato che sono necessari 500 volumi di sangue per generare un volume di latte (Secchiari et al., 2005). Questa quantità può essere molto più elevata nel caso di vacche mediocri, anziane o malnutrite, e può superare i 1000 litri (Alais, 2000).

Il processo fisiologico, che porta alla sintesi del latte, è detto lattazione. Le fasi che caratterizzano questo processo sono la secrezione, l'eiezione e l'estrazione.

La cellula mammaria, durante la sintesi del latte, preleva sostanze dal sangue e le rielabora per la sintesi dei vari componenti (lattosio, lipidi e proteine), ai quali aggiunge sali minerali e componenti minori (azoto non proteico e vitamine) (figura 2.2). Pur essendo separati da una parete sottilissima, il sangue e il latte presentano una composizione completamente diversa (tabella 2.3). Questa

differenza si riduce nei latti anomali, sia fisiologici che patologici, per una diminuzione della capacità di filtrare i costituenti dal plasma sanguigno.

Fig.2.1: A) Organizzazione di una ghiandola mammaria. B) Particolare di un alveolo.



Un'altra causa di anomalie nella composizione è la diminuzione dell'attività di sintesi della mammella in alcune malattie; la conseguenza è una diminuzione del tenore in lattosio, grasso, caseina e un aumento del tenore in albumina, globulina e cloruri (Alais, 2000).

Tab. 2.3: Composizione del latte e del plasma sanguigno (medie) (Fonte Alais, 2000)

	g/litro	
	Latte	Sangue
Grasso	35	3
Lattosio	49	0
Caseina	27	0
α -lattoalbumina + β -lattoglobulina	4	0
Albumina + Globulina	1.5	75
Acido citrico	2	0
Cloruri	1.6	6
Fosfati (in P ₂ O ₅)	2.5	0.3

La secrezione è il meccanismo con il quale i composti, sintetizzati nelle cellule mammarie, vengono riversati nel lume alveolare. L'attività secretoria della mammella dipende da un complesso ormonale lattogeno elaborato dall'antipofisi, che interviene dopo la scomparsa della follicolina e del progesterone.

Gli ormoni che possiedono un'attività lattogena dimostrata sono la prolattina, l'ormone della crescita e l'ormone placentario lattogeno. La secrezione si arresta quando la pressione raggiunge un certo valore all'interno della mammella, dell'ordine di 40 mm di mercurio per la vacca (Alais, 2000).

Gran parte delle sostanze prelevate dal sangue è veicolata nel lume attraverso vescicole secretorie che migrano verso l'apice delle cellule e riversano il contenuto all'esterno per esocitosi (Barman et al., 2006) (figura 2.3).

Il contenuto di acqua è regolato dalla pressione osmotica che è data dal lattosio. I lipidi sono liberati all'interno di vescicole, la cui membrana è costituita da fosfolipidi (MFGM= membrana del globulo di grasso del latte). La concentrazione dei minerali è notevolmente differente tra sangue e latte: il secondo ha un maggiore contenuto di potassio, calcio e fosforo e un minor quantitativo di sodio e cloro. Queste differenze sono legate all'attività di tre "pompe": una Na-K, che consente l'osmolarità fra citoplasma e latte; una del Ca, responsabile del trasferimento dell'elemento dalla membrana basale al citosol; un'altra, sempre riferita al Ca, localizzata nell'apparato del Golgi, che rende disponibile il Ca per la formazione della micelle caseiniche (Pulina e Nudda, 2001).

L'eiezione è il passaggio del latte dagli alveoli alla cisterna della mammella. Il processo è regolato da un meccanismo neuroendocrino, originato dalla stimolazione del capezzolo con la poppata o la mungitura. I segnali nervosi di questi processi giungono all'encefalo e, quindi, sono trasferiti ai nuclei ipotalamici (sede della sintesi dell'ossitocina) e da qui all'ipofisi (sede del suo accumulo) da cui il neuroormone viene rilasciato nel flusso sanguigno. L'ossitocina agisce sulle cellule mioepiteliali provocando una contrazione e quindi lo svuotamento (Pulina e Nudda, 2001). L'assenza di ossitocina non consentirebbe il completo svuotamento della mammella; nella vacca si riuscirebbe ad estrarre appena il 30-40% del latte totale (Alais, 2000).

La contrazione degli alveoli incrementa la pressione endomammaria, ma non è in grado di vincere la resistenza dello sfintere del capezzolo; questa sarà vinta solo dalla suzione o dalla mungitura (Pulina e Nudda, 2001). Questa fase rappresenta l'estrazione vera e propria del latte.

Il latte secreto dalla ghiandola mammaria può essere estratto naturalmente dai lattanti, oppure artificialmente con la mungitura.

Fig.2.2 – Schema semplificato dei processi di sintesi e secrezione dei grassi nel latte. LPL= lipoprotein lipasi; FA= acidi grassi; ACC= acetyl CoA carboxylasi; FAS= acido grasso sintasi; TG= trigliceridi; MFG= globulo di grasso del latte.

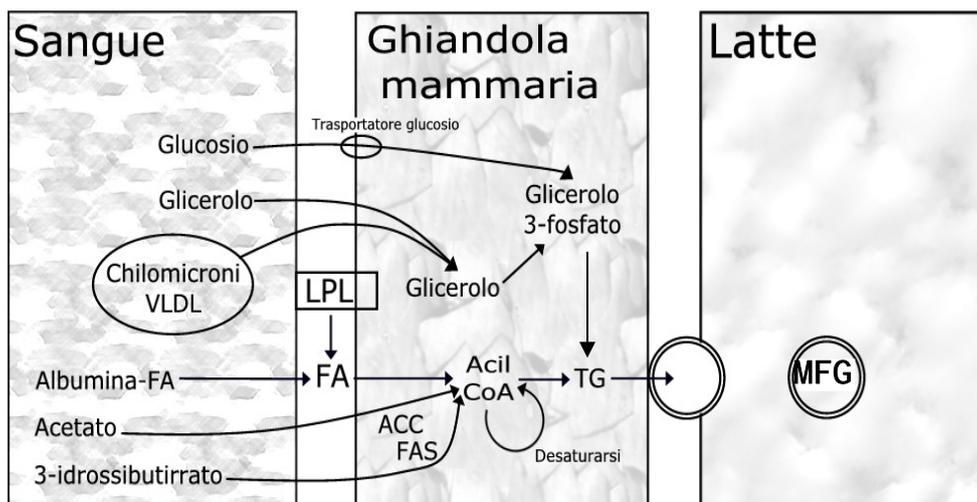
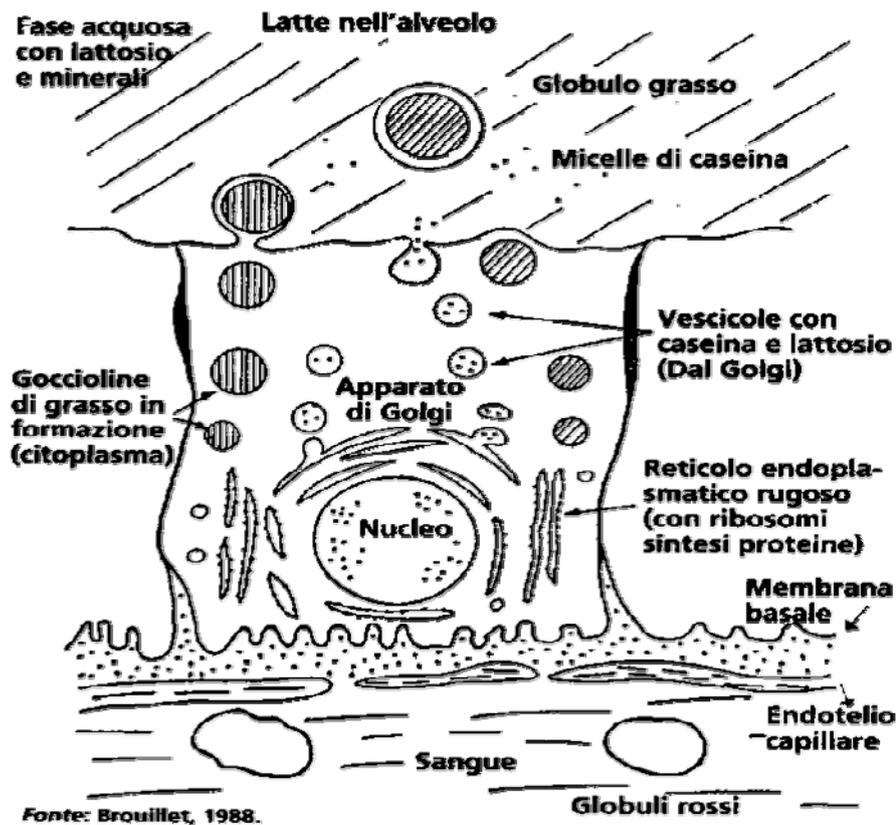


Fig 2.3: Modalità di sintesi e secrezione del latte (fonte Brouillet, 1998)



2.1 Sintesi dei lipidi nei ruminanti

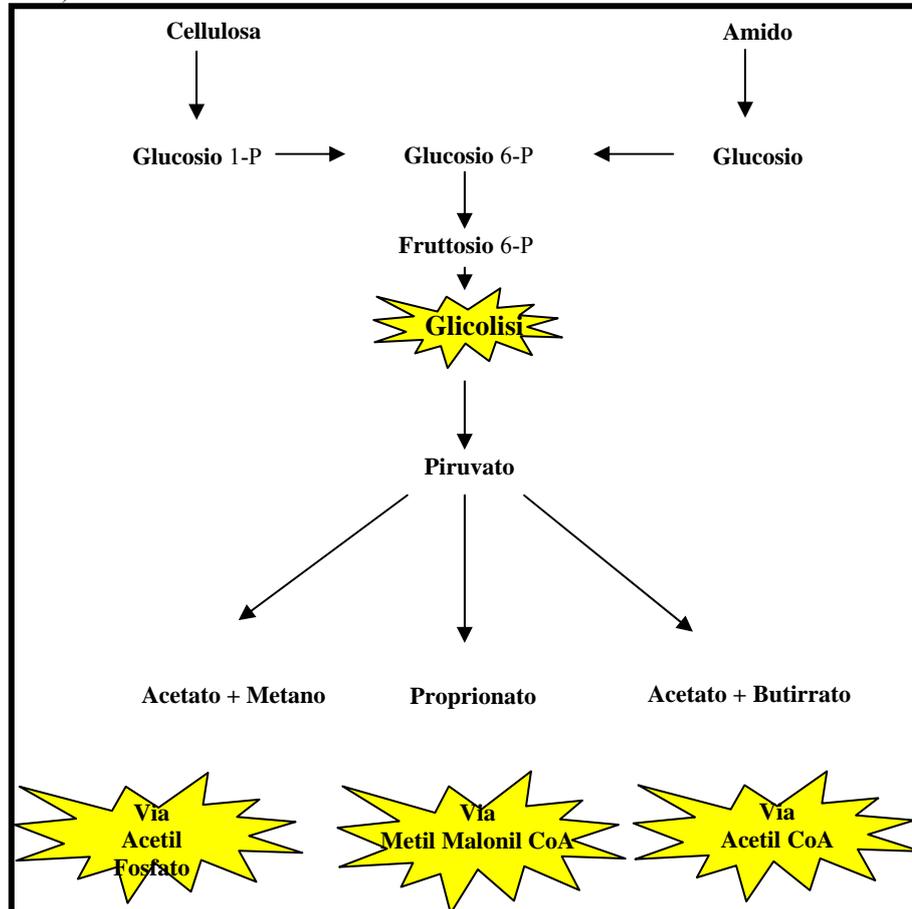
I ruminanti sintetizzano i lipidi a partire da precursori, che giungono alla ghiandola mammaria attraverso due vie: la via delle fermentazioni ruminali e quella delle attività digestive post-ruminali, a partire dai lipidi della dieta.

La flora batterica, presente nel rumine, degrada parte dei nutrienti assunti dall'animale durante l'alimentazione. I carboidrati, in particolare, subiscono fermentazioni che portano alla formazione di acidi grassi volatili (AGV) quali l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido butirrico, che si presentano nella forma anionica.

I tre prodotti dell'attività ruminale, hanno origine da tre processi metabolici diversi, ma tutti hanno come punto di partenza la sintesi del fruttosio 6-fosfato e, successivamente, del piruvato (figura 2.4). Da quest'ultimo si ottiene l'acetato

attraverso la *via dell'Acetil-fosfato*, il propionato attraverso la *via del Metil-malonil CoA* e il butirrato tramite la *via dell'Acetil CoA*.

Fig.2.4: Vie metaboliche per la sintesi degli acidi grassi volatili nel rumine (Fonte Secchiari et al., 2005).



L'acetato e il butirrato sono i precursori degli acidi grassi a media e corta catena nel latte e nel tessuto adiposo (Chilliard et al., 2000).

I trigliceridi presenti nell'alimento sono idrolizzati dalle *lipasi* microbiche, rilasciando gli acidi grassi che le costituiscono. La lipasi idrolizza completamente i trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo, con piccoli accumuli di mono- e digliceridi. Analisi microbiologiche hanno permesso di rilevare la presenza di 74 ceppi batterici, capaci di idrolizzare legami esterei (Fay et al., 1990) ed alcuni di essi hanno evidenziato bassa attività idrolitica (*A. lipolitica* e *fibrisolvens*) (Mele et al., 2005).

I lipidi presenti nel rumine non sono fermentati, ma subiscono un processo di idrogenazione ad opera di batteri ruminali (Antongiovanni e Gualtieri, 1998). La loro digestione avviene nella fase post-ruminale in un *medium* bifasico costituito da una parte particellare alla quale aderiscono gli acidi grassi liberi ed i fosfolipidi e da una micellare contenente gli acidi disciolti.

Quando il contenuto di fibra della razione diminuisce a favore di un maggior contenuto di concentrati, si riduce il numero di batteri cellulolitici che sono responsabili dei processi lipolitici e di bioidrogenazione (Mele et al., 2005). Questo tipo di alimentazione favorirebbe il tasso di lipidi che riescono ad attraversare la barriera ruminale senza subire riduzione, in particolare acido oleico e linoleico che sono maggiormente rappresentati nella granella. Altri fattori capaci di ridurre la bioidrogenazione e la lipolisi sono l'utilizzo di foraggi ad elevato stadio di maturazione e di alimenti troppo finemente macinati. In queste condizioni, infatti, diminuisce l'aderenza dei batteri alle particelle di alimento ed aumenta la loro velocità di transito (Mele et al., 2005).

Durante il transito ruminale, è stata stimata una perdita di acidi grassi a causa di alcune vie metaboliche (Mele et al., 2005). L'acido oleico, ad esempio, viene assorbito dalle cellule epiteliali del rumine per il 31.5%, mentre solo l'8.2% viene trasportato nel plasma (Jenkins, 1993). Il palmitico, invece, viene metabolizzato a corpi chetonici e convertito a C15:0 mediante α -ossidazione e a C13:0 e C11:0 con la β -ossidazione (Jesse et al., 1992). Da una stima generalizzata, si può concludere che mediamente l'87% degli acidi grassi ingeriti giunge alla bocca del duodeno; la quota mancante viene compensata dalla sintesi *ex novo* dei microrganismi ruminali (Mele et al., 2005).

Gli acidi grassi liberi presenti nel bolo alimentare vengono trasferiti nella micella, durante il transito nel tratto intestinale. Il rilascio degli acidi grassi è consentito grazie alla produzione di detergenti.

La bile, secreta dal fegato, induce l'interazione degli acidi grassi con i fosfolipidi di membrana, formando una fase liquido-cristallina. L'aumento del pH favorisce la dispersione della fase in micelle, le quali vengono solubilizzate ad opera dell'enzima pancreatico fosfolipasi A2. Questa reazione favorisce l'assorbimento degli acidi grassi ad opera dei villi intestinali.

I trigliceridi, i fosfolipidi, il colesterolo e specifiche apoproteine vengono assemblati in chilomicroni nella mucosa intestinale, quindi drenati nel sistema linfatico.

In seguito, i chilomicroni sono smontati nel fegato e gli acidi grassi che si ottengono, vengono utilizzati in vario modo (ossidazione, desaturazione, allungamento riesterificazione).

Gli acidi grassi trasportati nel sangue in chilomicroni e lipoproteine (LDL, HDL, VLDL), giungono nella ghiandola mammaria e negli altri tessuti, dove vengono utilizzati per la sintesi del grasso.

2.2 Sintesi degli acidi grassi

La sintesi degli acidi grassi nel latte dei ruminanti ha due origini: alcuni vengono prelevati dal flusso sanguigno e possono avere origine dalla dieta o dalle riserve del tessuto adiposo; altri vengono sintetizzati *de novo* nelle cellule dell'epitelio mammario (Bauman e Griinari, 2003).

Al contrario dei monogastrici, nei ruminanti il sito di maggiore sintesi degli acidi grassi non è il fegato ma il tessuto adiposo. Durante la lattazione, invece, è la ghiandola mammaria a svolgere la maggiore attività biosintetica (Vernon e Flint, 1988).

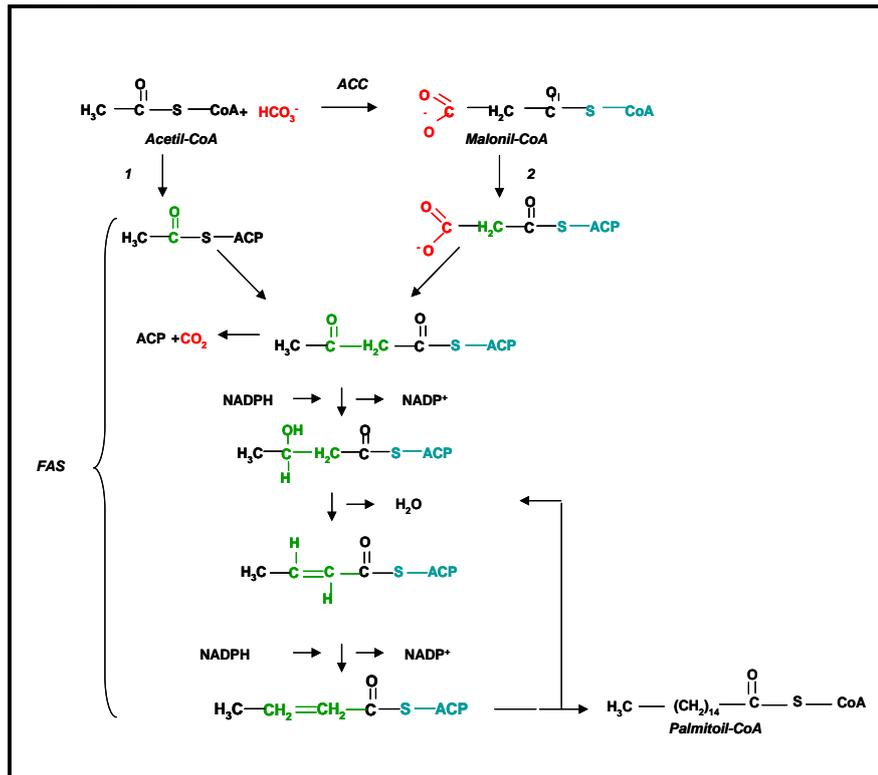
I meccanismi responsabili della sintesi degli acidi grassi sono due: uno citoplasmatico, che rappresenta la via principale e con maggiore attività, mentre l'altro è quello mitocondriale che perfeziona la precedente (Secchiari et al., 2005). La sintesi degli acidi grassi fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma; il processo metabolico vede l'intervento di alcuni enzimi chiave quali l'Acetil CoA Carbossilasi (ACC) e la Sintasi degli acidi grassi (FAS) (Chilliard et al., 2000) (figura 2.5).

L'ACC catalizza la formazione del malonil-CoA a partire dall'acetil-CoA, e rappresenta l'enzima chiave del processo della sintesi degli acidi grassi.

Il FAS, invece, catalizza la condensazione ciclica del malonil-ACP con molecole di acetato (Barber et al., 1997). La reazione di condensazione si ripete per un certo

numero di volte sino alla formazione del palmitoil-CoA (C16), che rappresenta in genere il prodotto finale della sintesi. Nella ghiandola mammaria, al contrario degli altri tessuti, la sintesi può terminare anche con il miristoil-CoA (C14), mentre l'acido palmitico non può essere convertito in acido stearico (C18) (Moore e Christie, 1981).

Fig.2.5: Sintesi mammaria degli acidi grassi. Legenda 1=Acetil-Transacilasi; 2=Malonil-Transacilasi.



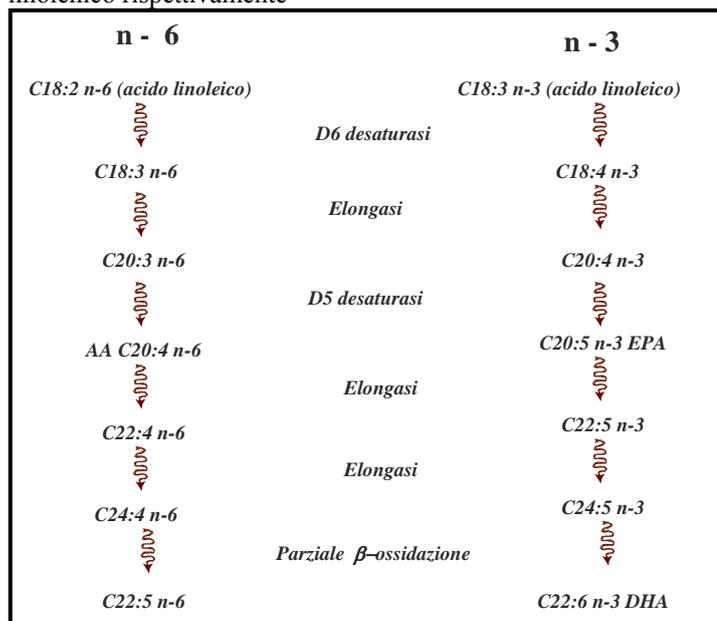
Negli altri tessuti, la sintesi mitocondriale opera l'allungamento dell'acido palmitico, sino ad arrivare a catene aciliche di 22 atomi di carbonio. I microsomi, invece, sono il sito dove gli acidi grassi possono essere allungati e/o desaturati, nel caso in cui abbiano almeno 18 atomi di carbonio.

Gli acidi grassi preformati, provenienti dalla dieta o dalle riserve corporee, vengono prelevati direttamente dal circolo sanguigno se sono presenti nella forma non esterificata, oppure captati dall'enzima Lipoproteinlipasi (LPL), a livello della membrana basale della cellula alveolare se sono presenti nei chilomicroni o nelle VLDL.

Il prelievo mammario di queste lipoproteine dipende dalla loro concentrazione ematica (Gagliostro et al., 1991). La ghiandola mammaria, pur non essendo in grado di sintetizzare acidi grassi a catena più lunga di 16 atomi di carbonio, riesce a convertire l'acido stearico in acido oleico, grazie all'attività della Stearoil-CoA Desaturasi (SCD) (Kinsella, 1971). Questo enzima introduce un doppio legame in posizione *cis*- $\Delta 9$ della catena carboniosa.

I mammiferi hanno perso la capacità di introdurre doppi legami tra la posizione n-9 e il carbonio ω ; non possono quindi sintetizzare gli acidi linoleico e α -linolenico capostipiti, rispettivamente, della serie n-6 e n-3. Gli acidi grassi essenziali sono assorbiti inalterati a livello intestinale, ma possono essere allungati e desaturati nelle cellule (figura 2.6).

Fig 2.6: Sintesi degli acidi grassi n-6 e n-3 a partire dai loro precursori ac. linoleico e ac. α -linolenico rispettivamente



La dimensione del globulo di grasso varia a seconda della specie, quella bovina – per esempio – presenta una dimensione media dei globuli (3.60-5.32 μm) superiore rispetto all'ovina (3.20-4.95 μm) e alla caprina (3.10-4.89 μm). Un latte con una netta prevalenza numerica di globuli piccoli è più ricco di materiale di membrana, a parità di percentuale di grasso, rispetto ad uno in cui prevalgono i globuli grossi.

I precursori dei globuli di grasso del latte sono piccole gocce di trigliceridi che si originano nel reticolo endoplasmatico rugoso del citosol della cellula alveolare che si fondono tra loro aumentando progressivamente di taglia. Una volta che le goccioline lipidiche raggiungono la zona apicale della cellula alveolare sono gradualmente rivestite dalla membrana plasmatica, fino al completo distacco del globulo nel lume; in alcuni casi può succedere che nel globulo secreto rimangano frazioni di citoplasma, i “crescenti”, la cui presenza è legata alla specie.

La membrana del globulo di grasso e la membrana plasmatica sono biochimicamente simili ma non identiche.

L'MFGM costituisce dal 2 al 6% dell'intera massa del globulo di grasso; è costituita soprattutto da proteine, lipidi e carboidrati presenti in un rapporto 4:3:1; la somma di lipidi e proteine rappresenta oltre il 90% del peso secco.

La composizione chimica è influenzata da fattori legati all'animale (specie, razza, stadio di lattazione, stato sanitario della mammella) e da fattori esterni quali l'alimentazione, il metodo di separazione del globulo di grasso, i processi che il latte subisce durante la conservazione e la lavorazione. La frazione più soggetta a variazioni è quella dei lipidi neutri, in particolare dei trigliceridi.

Le proteine presenti nella MFGM rappresentano l'1% circa di quelle totali del latte e il 25-60% del peso secco della membrana stessa.

Per quanto riguarda la frazione lipidica della MFGM relativa al latte di vacca, questa costituisce lo 0,5-1% del totale; il 95-98% proviene dal core del globulo ed il resto 1,5-4% dal siero del latte. I maggiori costituenti della frazione lipidica dell'MFGM sono i lipidi neutri, i quali sono rappresentati prevalentemente da trigliceridi. Confrontando la composizione acidica dei trigliceridi della membrana e quelli del grasso del latte, emerge che i primi sono caratterizzati da una maggiore presenza di acidi grassi saturi a lunga catena (C16:0 e C18:0) e da un minor contenuto di acidi grassi a corta catena (C<12) e di acido oleico (C18:1); studi di spettroscopia all'infrarosso hanno evidenziato che i trigliceridi associati alla membrana presentano catene aciliche più rigide rispetto a quelli del core del globulo, e da ciò dovrebbe dipendere la stabilità dell'MFGM.

La MFGM agisce come un'emulsionante naturale, permettendo a molecole idrofobe (i trigliceridi del core del globulo) di rimanere disperse in un ambiente

acquoso, il plasma del latte; la membrana del globulo (in particolare la frazione fosfolipidica) agisce come barriera protettiva dello stesso. Infine la MFGM rappresenta una barriera fisica naturale che protegge i trigliceridi del latte dall'azione della lipasi, un enzima naturalmente presente nel latte.

Gli acidi grassi, sia quelli di neo-sintesi che quelli provenienti dalla dieta, sono utilizzati dalla ghiandola mammaria e dagli altri tessuti per la sintesi dei trigliceridi e dei fosfolipidi.

2.3 I lipidi del latte dei ruminanti

Il grasso del latte dei ruminanti è presente in concentrazione che varia secondo la specie (tabella 2.1). E' costituito da trigliceridi che rappresentano la frazione più abbondante con il 98-99%, da fosfolipidi e dalla frazione insaponificabile che è costituita da steroli e altre sostanze liposolubili.

Le cellule epiteliali della ghiandola mammaria sintetizzano i lipidi del latte partendo da un corredo di acidi grassi che derivano per il 40-50% dalla neo-sintesi tissutale e per il 50-60% dal flusso ematico.

I lipidi del latte si trovano sottoforma di globuli sferici che sono secreti direttamente dalle cellule epiteliali della ghiandola mammaria. Questi globuli sono costituiti da un core di trigliceridi rivestito da una membrana chiamata membrana del globulo di grasso o Milk Fat Globule Membrane (MFGM) (figura 2.7).

Nel latte di vacca i lipidi sono distribuiti per il 95-98% nel core del globulo, per lo 0.5-1% nella MFGM ed il resto nel siero (1.5-4%) del latte.

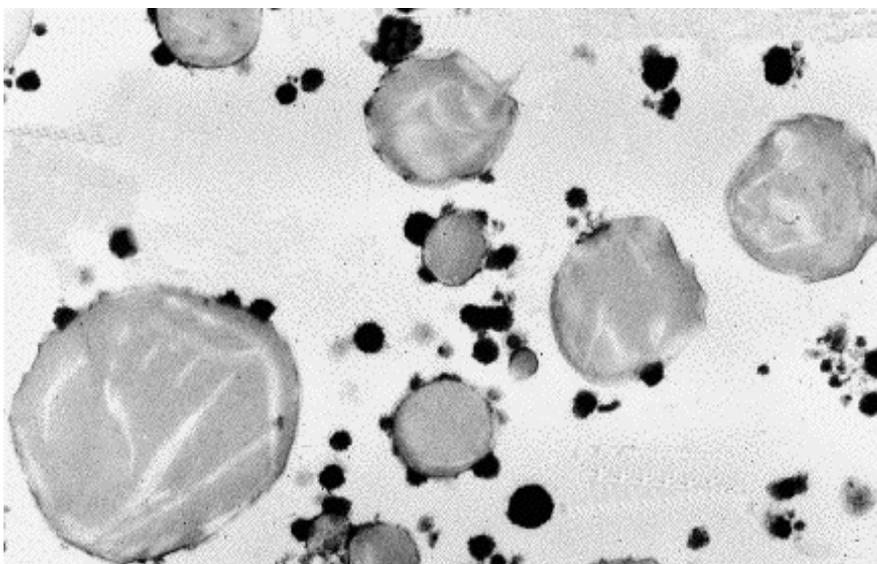
2.4 Trigliceridi del latte

I trigliceridi, come detto, sono la componente più abbondante dei lipidi del latte.

Il punto di partenza per la loro sintesi è la formazione del glicerolo 3-fosfato che si origina dal diidrossiacetone-fosfato e in minor misura dalla fosforilazione del glicerolo (figura 2.1).

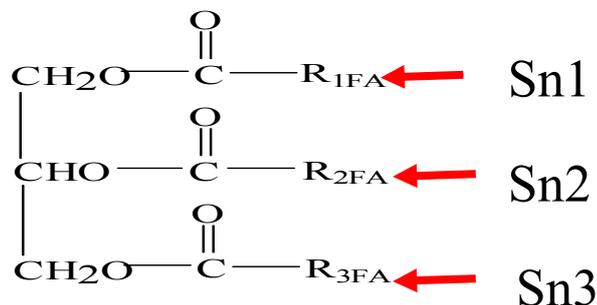
Il glicerolo 3-fosfato viene esterificato tre volte, una per ogni gruppo alcolico, ad opera di tre enzimi diversi detti comunemente *acil-transferasi*: il *glicerol 3-fosfato aciltransferasi* (GPAT) inserisce un acile in posizione 1, successivamente interviene l'*acido lisofosfatidico aciltransferasi* (LPAAT) che esterifica la posizione 2, infine la *diacilglicerofosfato aciltransferasi* (DGAT) che aggiunge un gruppo acilico in posizione 3. Questi enzimi sono associati nel *complesso della triacilglicerolo sintetasi*, che è legato alla membrana del reticolo endoplasmatico.

Fig 2.7: Globuli di grasso dispersi nel latte.



La struttura dei trigliceridi gioca un ruolo molto importante sia sulle proprietà tecnologiche del latte che sulla digeribilità del grasso. La struttura dei trigliceridi dipende dall'acido grasso che lo compone e dal sito della glicerina (sn1, sn2, sn3) in cui lo stesso si va a legare (figura 2.8).

Nel grasso del latte sono stati identificati 400 acidi grassi; ipotizzando che gli acidi grassi si distribuiscano casualmente nelle tre posizioni della glicerina, il numero massimo di trigliceridi possibile sarebbe 400^3 , vale a dire 64 milioni di combinazioni (Jensen et al., 1991). In realtà la distribuzione degli acidi grassi non è casuale, quindi il numero dei trigliceridi è notevolmente ridotto e si attesta al di sotto delle cento unità.

Fig 2.8: Schema raffigurante la struttura di un trigliceride.

Ciò che definisce le caratteristiche del latte, non è il numero totale di trigliceridi, ma il tipo di trigliceride. Nel latte bovino, i triacilgliceroli più rappresentati sono *sn* 16:0-16:0-4:0 (4%), e *sn* 16:0-16:0-18:1 (3%). Altri trigliceridi presenti in quantità apprezzabile sono *sn* 16:0-16:0-18:0 (1%) e il *sn* 16:0-16:0-16:0 (0.9%). Gli acidi grassi, inoltre, non si distribuiscono casualmente nei tre siti alcolici della glicerina, ma hanno posizioni preferenziali (tabella 2.4): ad esempio il C4:0 esterifica solo in posizione *sn*-3 come gli altri acidi grassi a corta catena (Christie e Clapperton, 1982).

Tab. 2.4: Distribuzione posizionale degli acidi grassi nei trigliceridi del latte bovino (fonte Secchiari et al., 2002)

Acido Grasso	Trigliceridi	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3
C _{4:0}	11.8	-	-	35.4
C _{6:0}	4.6	-	0.9	12.9
C _{8:0}	1.9	1.4	0.7	3.6
C _{10:0}	3.7	1.9	3.0	6.2
C _{12:0}	3.9	4.9	6.2	0.6
C _{14:0}	11.2	9.7	17.5	6.4
C _{15:0}	2.1	2.0	2.9	1.4
C _{16:0}	23.9	34.0	32.3	5.4
C _{16:1}	2.6	2.8	3.6	1.4
C _{17:0}	0.8	1.3	1.0	0.1
C _{18:0}	7.0	10.3	9.5	1.2
C _{18:1}	24.0	30.0	18.9	23.1
C _{18:2}	2.5	1.7	3.5	2.3
C _{18:3}	tracce	-	-	-

Ancora oggi non è chiaro quale sia il meccanismo che regoli questa distribuzione preferenziale.

Uno degli enzimi chiave di questo processo è sicuramente l'acil transferasi dell'acido lisofosfatidico (LPAAT), che catalizza l'esterificazione dell'acido grasso in posizione sn-2. Questa è una posizione strategica perché le lipasi pancreatiche attaccano principalmente le altre due posizioni, generando molecole di 2-monogliceridi che vengono assorbite velocemente e in via preferenziale dalle pareti intestinali (Small, 1991).

La composizione degli acidi in posizione sn-2 può essere modificata con la dieta oppure agendo direttamente a livello dell'attività enzimatica, anche se quest'ultima ipotesi non è ancora pienamente attendibile.

L'incremento della disponibilità di PUFA a livello della mammella, può determinarne una maggiore inclusione in posizione Sn-2. Il secondo sistema di regolazione, si basa sugli effetti endogeni che regolano l'espressione del gene per la LPAAT.

Nelle bovine da latte è stato dimostrato che l'enzima LPAAT ha un'elevata specificità per C16:0, C14:0, C12:0, C18:2 (De Peters et al., 2001).

2.5 I fosfolipidi del latte

I fosfolipidi sono una componente presente in quantità limitate nel latte, ma rappresenta una frazione molto importante della membrana del globulo di grasso (Secchiari et al., 2002).

I fosfolipidi sono sintetizzati a livello della ghiandola mammaria e rappresentano i siti preferenziali per l'esterificazione di acidi grassi essenziali. Il loro ruolo nel latte è duplice, infatti fungono da stabilizzatori della membrana del globulo di grasso e da agenti emulsionanti.

Nel latte bovino, i fosfolipidi sono associati per il 55-70% alle gocce di grasso e per il 35-45% alla frazione magra (Patton e Jensen, 1975).

Nel latte sono stati individuati 2 tipi di fosfolipidi: i glicerofosfatidi e le sfingomieline.

I glicerofosfatidi hanno una struttura simile a quella del grasso propriamente detto, ma una delle funzioni del glicerolo è esterificata dall'acido fosforico che a sua volta è legato ad una base organica azotata (es. lecitina e cefalina).

Le sfingomieline presentano al posto del glicerolo un di alcol aminato insaturo, la sfingosina. Una sola molecola di acido grasso è legata con un legame amide, più resistente agli agenti idrolitici che il legame estere.

Le principali classi di sfingomieline presenti nel latte sono la sfingomielina, la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina e il fosfatidilinositolo, di queste le prime tre sono più rappresentate nella membrana del globulo di grasso (Bitman e Wood, 1990).

Il lavoro condotto sul latte di pecora ha mostrato che la Fosfatidiletanolamina rappresenta in media il 37%, la Sfingomielina il 27% e la Fosfatidilcolina il 17.5% degli acidi grassi (Secchiari et al., 2003).

La composizione di Sfingomielina e Fosfatidilcolina si mantiene praticamente costante; al contrario, le altre tre frazioni si modificano in funzione della disposizione di acidi grassi (Secchiari et al., 2003).

2.6 Gli acidi grassi del latte

La composizione acidica del grasso del latte è molto ampia ed in continua evoluzione. Essa è il risultato della combinazione di fattori genetici ed ambientali. L'alimentazione è sicuramente il fattore che concorre maggiormente a determinare il corredo di acidi grassi del latte, sia perché fornisce la materia prima per la sintesi *de novo* di quelli a corta e media catena, sia perché gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) provengono dai lipidi della dieta.

Il contenuto di acidi grassi sintetizzati *de novo* diminuisce proporzionalmente (1-5%) con l'aumentare del grasso nella dieta (Palmquist et al., 1993).

La quantità di grasso della dieta trasferito direttamente nel latte dipende da tre fattori: bioidrogenazione ruminale, assorbimento (digeribilità) e deposizione nel tessuto adiposo (Palmquist et al., 1993).

L'incremento di olio di mais nella dieta, per esempio, riduce la sintesi *de novo* di acidi grassi (C₄-C₁₄) (Griinari et al., 1998).

Un aspetto interessante dell'effetto alimentazione è la sindrome da riduzione di grasso nel latte o Milk Fat Depression (MFD). Gli alimenti responsabili del fenomeno sono stati divisi in due gruppi (Bauman e Griinari, 2003).

Il primo gruppo è costituito da alimenti con un'elevata concentrazione di carboidrati digeribili e ridotto contenuto di fibra. Il secondo gruppo è rappresentato da supplementi alimentari ricchi di acidi grassi polinsaturi (Bauman e Griinari, 2003).

Sono state formulate diverse teorie per spiegare la MFD indotta dall'alimentazione. La prima conclusione fu dedotta da Powell, il quale affermò che *“esiste, apparentemente, una correlazione positiva tra l'attività del rumine e la produzione del grasso del latte”*. In seguito si comprese che le alterazioni dell'attività ruminale con diete povere di fibra e ricche di PUFA coinvolgono sia la fermentazione dei carboidrati che la bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi (Bauman e Griinari, 2003).

Le alterazioni ruminali comportano cambiamenti nel rapporto degli acidi grassi volatili, in particolare di quello acetato:propionato (Bauman e Griinari, 2003). Molte teorie sono state proposte per spiegare il fenomeno della MFD, ma solo tre sono quelle che continuano ad essere supportate dalla letteratura scientifica: i) l'alterazione delle fermentazioni ruminali comporta un'inadeguata produzione di acetato e butirato, che si ripercuote sulla sintesi del grasso del latte; ii) l'incremento del propionato, associato con l'aumento della gluconeogenesi a livello epatico, causa una maggiore sintesi di insulina, che riduce l'apporto di precursori della sintesi del grasso del latte; iii) la sintesi mammaria è inibita unicamente da acidi grassi che sono prodotti come risultato dell'alterazione della bioidrogenazione ruminale (Bauman e Griinari, 2003).

All'alimentazione si aggiungono gli effetti della specie, della razza e dello stato fisiologico dell'individuo.

I latti di pecora e di capra sono caratterizzati da un maggior contenuto di acidi grassi a corta catena (C4-C10) e da più bassi livelli di acidi a media catena (C12-C16), rispetto al latte bovino e bufalino (Secchiari et al., 2001). La frazione degli acidi grassi monoinsaturi, al contrario, ed il contenuto di acido oleico (C_{18:1 cis9}), in particolare, risultano inferiori nel latte caprino e pecorino, rispetto a quello di

vacca e di bufala. Il latte di pecora, a sua volta, presenta un maggior contenuto di isomeri *trans* del C_{18:1} (TFA), di isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) e di acidi grassi polinsaturi (PUFA) rispetto a quello di vacca e di capra (Jahreis et al., 1999; Precht et al., 2001).

Queste differenze tra una specie e l'altra sono legate, da un lato alla necessità dell'animale di mantenere lo stato di fluidità opportuno per la secrezione e, dall'altro, ai differenti sistemi di allevamento adottati (Fontecha et al., 2000). Un quadro completo delle differenze interspecifiche è riportato nella tabella 2.5.

Per quanto riguarda i parametri genetici, che concorrono a definire la variabilità del contenuto di acidi grassi nelle diverse popolazioni di animali domestici, le conoscenze sono abbastanza limitate.

I valori di ereditabilità e ripetibilità per i singoli acidi grassi sono quelli tipici dei caratteri legati alla produzione quanti-qualitativa di latte, tra 0 e 0.37 per la prima e tra 0.05 e 0.26 per la seconda. (Karijord et al., 1982; Palmquist et al., 1993).

Tab.2.5: Composizione in acidi grassi del latte delle principali specie di ruminanti (Secchiari et al., 2005)

Acido Grasso	Vacca	Bufala	Pecora	Capra
C _{4:0}	3.29	5.10	3.73	3.34
C _{6:0}	2.08	2.54	2.68	3.21
C _{8:0}	1.32	1.36	2.63	3.34
C _{10:0}	3.20	1.54	7.58	12.58
C _{12:0}	4.05	2.08	4.88	6.45
C _{14:0}	12.13	9.50	12.75	12.42
C _{14:1}	1.88	0.57	0.26	0.39
C ₁₅	1.22	1.16	1.56	0.83
C ₁₆	30.74	28.17	26.37	26.02
C _{16:1}	2.11	1.80	0.96	0.56
C ₁₇	0.57	0.50	0.85	0.76
C ₁₈	9.70	10.35	9.09	10.12
Tot C _{18:1} <i>trans</i>	1.90	2.24	3.72	2.68
Tot C _{18:1} <i>cis</i>	19.70	18.67	17.50	15.46
C _{18:2}	3.10	1.45	1.54	2.83
Tot CLA	0.56	0.65	1.75	0.57
C _{18:3} n-3	0.60	0.23	1.10	0.35
C ₂₀	0.21	0.19	0.29	0.11
C _{20:1}	0.05		0.05	0.05

La correlazione genetica fra acidi grassi e contenuto di grasso nel latte è risultata positiva ed estremamente alta (~ 1) per la frazione a corta catena, più bassa ma positiva per gli acidi a media catena (0.48), molto elevata ma inversa per quelli a lunga catena (Renner e Kosmack, 1974; Palmquist et al., 1993).

La razza esercita un ruolo rilevante sulla composizione degli acidi grassi del latte. Studi compiuti nel 1964, confermati da altri condotti più recentemente, hanno rilevato che le vacche di razza Holstein avevano livelli più bassi di $C_{10:0}$, $C_{12:0}$ e $C_{16:0}$ e un maggior contenuto di $C_{16:1}$ e $C_{18:1}$ rispetto a bovine di razza Guernsey e Jersey (Carrol et al., 2006; Karijord et al., 1982; Gibson, 1991). Palmquist e Beualieu (1992), in un loro lavoro, mostrano che il contenuto di C_6 e C_{14} è più alto nella Jersey rispetto alla Holstein di 8% e 42%; i dati hanno confermato che queste differenze non sono dovute alla dieta.

Altre differenze sono state rilevate tra Holstein e razza Bruna; le vacche di questa ultima, presentano una maggiore concentrazione di acidi grassi a corta e media catena e di acido oleico (De Peters et al., 1995; Polidori et al., 1993). Queste differenze si possono attribuire sia ad eventuali variazioni nell'attività della SCD sia a possibili polimorfismi (Medrano et al., 1999).

Lo stadio di lattazione è tra i principali fattori di variazione della composizione acidica del latte. All'inizio della lattazione, come è noto, le bovine sono in bilancio energetico negativo e questo comporta una mobilitazione delle riserve adipose e l'incorporazione nel grasso del latte degli acidi grassi in esse contenuti. L'incremento di questi acidi grassi nella ghiandola mammaria, riduce la sintesi *de novo* degli acidi a corta catena. Il fenomeno si riduce con il progredire della lattazione (Palmquist et al., 1993; Secchiari et al., 2002).

L'acido butirrico è l'unico acido grasso a corta catena a non risentire dell'effetto inibitore della mobilitazione di riserve lipidiche. Il motivo di questo diverso comportamento è legato all'origine dell'acido butirrico; C_4 si forma a partire dalle fermentazioni ruminali (paragrafo 2.1) ed è indipendente dal ciclo dell'ACC (Palmquist et al., 1993).

Glucosio, acidi grassi e glicerolo, insieme con acetato e idrossibutirrato, per i ruminanti, sono i substrati per la sintesi degli acidi grassi nella ghiandola mammaria (Neville e Picciano, 1997).

Il glucosio che entra nelle cellule alveolari, subisce tre destini: può essere convertito in acetil-CoA attraverso la sintesi del piruvato e del citrato inducendo la formazione di malonil CoA (questa via, in ogni modo, è tipica dei monogastrici), può essere convertito in ribulosio-5-fosfato, attraverso la via dei pentosi fosfato generando potere ossido riduttivo, oppure essere convertito in glicerol fosfato, che è un precursore della sintesi dei trigliceridi (Neville e Picciano, 1997).

Il glucosio è trasportato all'interno delle cellule alveolari attraverso una proteina di membrana, chiamata *Trasportatore di glucosio insulino-insensibile* e codificata dal gene GLUT1 (Neville e Picciano, 1997).

La ghiandola mammaria, come detto in precedenza, è in grado di sintetizzare acidi grassi a media catena (C₆-C₁₄). La particolare predisposizione alla sintesi di questa classe di acidi grassi è legata ad una modificazione tessuto specifica della reazione catalizzata dalla FAS. Una delle componenti della FAS, la *tioesterasi I*, è responsabile del rilascio degli acil-CoA, quando questi hanno raggiunto la lunghezza di sedici atomi di carbonio. Questo enzima non è in grado di staccare gli acil-CoA dal sistema della FAS, quando la lunghezza degli stessi è inferiore alle sedici unità di carbonio (Barber et al., 1997; Neville e Picciano, 1997).

Il processo metabolico regolato dalla *tioesterasi I*, avviene in tutti i tessuti escluso quello della ghiandola mammaria, dove si è definito un sistema alternativo, che permette di rilasciare nel citosol acidi grassi con una catena di atomi di carbonio minore di sedici. In realtà si sono definiti due sistemi alternativi, uno per i ruminanti e un altro per i non ruminanti.

Nella ghiandola mammaria dei ruminanti esiste una forma alternativa di *tioesterasi I*, dovuta ad una modificazione strutturale della molecola, capace di rilasciare acil-CoA con un numero di atomi di carbonio inferiore a 16.

Le cellule mammarie dei non ruminanti, al contrario, presentano un'ulteriore *tioesterasi*, chiamata *tioesterasi II*, esterna al sistema FAS e presente nel citoplasma. Questa *tioesterasi* segue parallelamente la reazione catalizzata dalla FAS ed è in grado di staccare acil-CoA di lunghezza diversa man mano che procede il processo di allungamento della catena acilica.

Questi due sistemi di regolazione della sintesi degli acidi grassi, permettono di regolare la fluidità del latte, agendo sulla lunghezza degli acidi grassi neosintetizzati (Barber et al., 1997).

La lattazione è un momento tipico nella regolazione del metabolismo lipidico; infatti, in corrispondenza del picco di lattazione, il tasso di sintesi degli acidi grassi, si riduce notevolmente a livello del tessuto adiposo, per incrementare nella ghiandola mammaria. Questa situazione si ripercuote sull'espressione di alcuni geni chiave come la FAS, l'ACC, la SCD, il DGAT1 e LPL (Barber et al. 1997).

3 ENZIMI CHIAVE DEL METABOLISMO LIPIDICO

Gli enzimi chiave del metabolismo lipidico mammario sono stati studiati approfonditamente, perché il loro polimorfismo e la regolazione dell'espressione sono fattori determinanti nella definizione della composizione acidica del latte.

In questo paragrafo, saranno elencati alcuni concetti fondamentali riguardanti l'ACC, la FAS e il DGAT1, mentre la SCD riceverà un'ampia trattazione nel capitolo successivo. A questi enzimi si aggiungerà anche l'approfondimento della LPL che ha un ruolo importantissimo nell'approvvigionamento degli acidi grassi dal flusso ematico.

3.1 Acetil CoA Carbossilasi (ACC)

L'ACC è un enzima che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del processo lipogenico. Molti studi hanno attribuito a quest'enzima un ruolo chiave nel ripartire i principi nutritivi dell'alimentazione tra il fegato e gli altri tessuti animali. Si presume che questo fenomeno sia una strategia adattativa ai bisogni fisiologici (alimentazione, ricovero, lattazione) (Barber et al. 1997).

Durante la lattazione, ACC favorisce la captazione dei precursori degli acidi grassi nella ghiandola mammaria, soddisfacendo così la crescente domanda metabolica legata alla secrezione del latte (Clegg et al., 2000). La conferma di quest'attività di regolazione viene dal grado di espressione di questo enzima a livello della mammella: nel periodo precedente il parto, il contenuto di mRNA di ACC nella ghiandola mammaria incrementa 30-40 volte, per poi diminuire già nella seconda settimana post-parto (Barber et al. 1997).

L'attività dell'ACC è controllata da un complesso sistema di modulazione allosterica, costituito da diversi siti di fosforilazione e da cambiamenti dell'espressione genica (Lopèz-Casillas et al., 1992).

L'attività e l'espressione di questo enzima sono diventate ancora più complesse dopo la scoperta di due isoenzimi ACC α (265 KDa) e ACC β (280 KDa), derivanti dall'espressione di due geni correlati tra loro.

L'espressione di questi geni è tessuto-specifica; infatti, ACC α è presente principalmente nel tessuto adiposo, nel fegato e nella ghiandola mammaria, mentre ACC β la ritroviamo in tessuti dove avviene la β -ossidazione acilica, come fegato, cuore e muscolo scheletrico.

Lavori condotti sull'argomento fanno supporre che l'azione regolatrice sia mediata da ACC α , la quale modula il tasso di ossidazione degli acidi grassi, agendo sulla concentrazione di malonil-CoA.

Quest'ultimo agisce come effettore di CPT-I, che regola l'ingresso degli acidi grassi nella matrice mitocondriale (Clegg et al., 2000).

La conferma del ruolo chiave della ACC α nel metabolismo lipidico, si nota nelle cellule epiteliali della ghiandola mammaria, durante il periodo di lattazione. In questa fase fisiologica, la sintesi di acidi grassi necessari per la formazione dei lipidi del latte aumenta considerevolmente; questo incremento coincide con la crescita del contenuto e l'attività della ACC che corrisponde con quella della concentrazione di mRNA di ACC α (Lopez-Casillas et al., 1992).

L'analisi molecolare del gene ACC α in topo, mostra la presenza di varianti di mRNA ottenute da un sistema di due promotori e da un alternativo splicing del trascritto primario.

L'attivazione del gene mediante il promotore I (PI) avviene nel tessuto adiposo e nel fegato, mentre il promotore II (PII) è attivo negli altri tessuti compresa la ghiandola mammaria. Il significato della diversità dei due trascritti di ACC α , che all'apparenza danno la medesima proteina, non è chiaro, anche se esperienze *in vitro* suggeriscono possibili differenze nell'efficienza della traduzione (Lopez-Casillas et al., 1992).

Il PII contiene un elaborato sistema di *cis*-attivazione, che include gli elementi di risposta all'insulina, al glucosio e ai glucocorticoidi (Neville e Picciano, 1997). Una struttura genomica simile è stata trovata nella regione del promotore del gene ACC α ovino e bovino dove, pur essendo presente una regione omologa dell'esone 3, questa non appare funzionale. Inoltre è stato individuato un terzo promotore (PIII) che genera un trascritto codificante per un enzima con un'estremità N alternativa; quest'ultima viene codificata da un nuovo esone chiamato 5A (Barber

et al., 1997; Mao e Seyfert, 2002). Il trascritto ottenuto a partire dal PIII è esclusivamente espresso a livello della ghiandola mammaria.

Il PI contiene al suo interno il CAAT-box e il TATA-box, la potenziale regione di risposta all'insulina (IRE) ed un repressore, costituito da 28 ripetizioni del dinucleotide CA. La soppressione della sintesi mediata dal PI può essere dovuta ad un legame del CAAT enhancer-binding protein (C/EBP) con il CAAT-box (Barber et al. 1997).

Il promotore PII non contiene le regioni TATA-box e CAAT-box, ma è caratterizzato da un'alta frequenza del motivo dinucleotidico CG e da numerosi siti di trascrizione Sp1 vicino alla regione di inizio (Barber et al. 1997).

Nella ghiandola mammaria ovina sono stati individuati i trascritti ottenuti dal PII e dal PIII; che incrementano durante la lattazione (Barber et al., 1997) e quella derivante da PI che si esprime labilmente e sembra non avere nessuna relazione con la produzione di latte.

La risposta dei due trascritti al periodo di lattazione, suggerisce che i rispettivi promotori contengono enhancer che rispondono alla presenza di ormoni lattogenici; tra questi la prolattina si è rivelata la più attiva.

L'ormone della crescita (GH) agisce da regolatore del metabolismo lipidico favorendo l'accumulo di grasso nel latte. Questo ormone agisce a livello del tessuto adiposo inibendo gli stimoli lipogenetici dell'insulina e favorendo i processi della lipolisi. Questo garantisce che l'apporto dei nutrienti con l'alimentazione non siano accumulati nel tessuto adiposo ma nella ghiandola mammaria. In seguito al parto si ha un incremento della concentrazione di mRNA di ACC a livello della ghiandola mammaria; in particolare, i trascritti derivano dall'attivazione del gene, mediata dal promotore PII (Ponce-Castañeda et al., 1992).

L'ACC è considerato un enzima chiave nella sintesi dei grassi e, in generale, nel metabolismo lipidico, visto che risulta essere l'unica via che innesca la sintesi degli acidi grassi. Questo ruolo comporta che l'attività di questo enzima sia regolata in maniera precisa da una serie di fattori.

Le modificazioni dell'attività dell'ACC sono regolate da ormoni e da alcuni prodotti metabolici come citrato e acil-CoA di acidi grassi a lunga catena.

L'effetto di regolazione si manifesta direttamente a livello della sintesi di mRNA (Lopez-Casillas et al., 1992).

La differenza di espressione tissutale del gene ACC α dipende dal promotore; infatti il PI, tipico del tessuto adiposo, non è attivo durante la trascrizione (Mao e Seyfert,, 2002).

La sequenza del cDNA di ACC α bovina mostra un'elevato grado di similarità con quello ovino, mentre la similarità delle sequenze proteiche di queste due specie con quello di ratto è del 97% circa. Questi dati dimostrano che la sequenza del gene ACC α si è conservata nel tempo (Mao e Seyfert,, 2002).

Il gene ACC α è stato studiato ultimamente per valutare eventuali siti polimorfici da utilizzare come marcatori. Moiola et al.(2005) hanno identificato 3 polimorfismi puntiformi (SNP) nel gene ovino mediante DHPLC: G→A in posizione 4413; G→C in posizione 4485; T→C in posizione 4507.

3.2 Sintasi degli acidi grassi (FAS)

La FAS (ACS, EC 6.2.1.3) degli eucarioti è un complesso multienzimatico, costituito da due tipi di catene polipeptidiche, con una composizione in subunità $\alpha_6\beta_6$. La catena α contiene la proteina trasportatrice di acili, l'enzima condensante è la β -chetoacil reduttasi, mentre la catena β contiene l'acil transacilasi, la malonil transacilasi, la β -idrossiacil deidratasi e l'enoil reduttasi. La FAS dei mammiferi è un dimero costituito da due subunità.

La FAS è l'altro enzima chiave del metabolismo lipidico, al pari dell'ACC.

In generale, il metabolismo dei grassi è regolato da enzimi altamente coordinati tra loro. Questo suggerisce che gli inibitori lipogenici che sopprimono l'espressione della FAS, hanno un'alta probabilità di sopprimere anche quella di ACC.

La sintesi degli acidi grassi nei ruminanti in lattazione è virtualmente assente nel fegato, mentre nei polli si concentra per il 90% a livello epatico. Nei maiali, benché il sito di maggior attività lipogenica si concentra nel tessuto adiposo, sono

stati ritrovati alte concentrazioni di mRNA FAS nel fegato e la sua quantità è regolata da ormoni (insulina, glucorticoidi, T₃).

L'attività della FAS è strettamente legata a quella dell'ACC, i fattori che influiscono su una, si ripercuotono anche sull'altra. Un valido esempio è fornito dal fenomeno della depressione del grasso del latte (MFD) nei ruminanti. Durante questo processo si ha una riduzione della lipogenesi della ghiandola mammaria; gli enzimi che manifestano la riduzione (50%) più marcata della loro attività sono appunto la ACC e la FAS (Bernard et al., 2006), mentre SCD, DGAT, LPL manifestano un decremento di circa il 40%.

3.3 LipoProtein Lipasi (LPL)

L'enzima LPL è quello che garantisce l'utilizzo, da parte dei tessuti, degli acidi grassi presenti in circolo, sottoforma di trigliceridi legati a lipoproteine (chilomicroni e VLDL). L'LPL catalizza l'idrolisi dei trigliceridi, tagliando in maniera selettiva gli acidi grassi presenti in posizione 1 e 3 (Barber et al. 1997).

LPL viene sintetizzato a livello delle cellule parenchimali.

Al pari di ACC, si notano modificazioni nell'attività di LPL durante la lattazione. Subito dopo il parto, la concentrazione di trascritti LPL aumenta a livello della ghiandola mammaria e diminuisce nel tessuto adiposo (Barber et al. 1997). Alcuni studi suggeriscono che l'incremento dell'attività di LPL a livello della ghiandola mammaria sia dovuto all'effetto della prolattina, che ne determina l'incremento subito dopo il parto e lo mantiene costante durante la lattazione (Barber et al. 1997; Neville e Picciano, 1997).

Gli acidi grassi sembrano influenzare l'attività della LPL almeno in tre vie: i) alterandone la sintesi a livello degli adipociti, ii) riducendo l'attacco della LPL ai proteoglicani eparin-solfati, iii) inibendo direttamente l'espressione del rispettivo gene (Neville et Picciano, 1997).

La LPL presenta da quattro a sei siti di legame con gli acidi grassi, con un'affinità piuttosto variabile. Questa considerazione non fa altro che confermare il ruolo di

regolazione degli acidi grassi nei confronti dell'espressione di questo enzima, soprattutto durante il periodo di digiuno (Neville et Picciano, 1997).

La LPL riveste particolare interesse nella sintesi del tessuto muscolare, perché gestisce la distribuzione di acidi grassi tra il tessuto adiposo e il muscolo. Questa attività di regolazione fa accrescere l'interesse per questo enzima, quale fattore per la definizione della qualità della carne.

3.4 DiacilGlicerol Acil Transferasi (DGAT)

Il DGAT catalizza l'ultima fase della sintesi dei trigliceridi. La reazione comporta l'esterificazione dei diacilgliceroli con acil-CoA. L'enzima esterifica preferibilmente in posizione 3-, ma può esterificare anche in posizione 1- nel ciclo dei monoacilgliceroli.

L'attività del DGAT si esprime in molti tessuti, particolarmente nell'intestino e nel fegato. Nell'intestino e negli adipociti di topo e nella ghiandola mammaria bovina, la DGAT utilizza una vasta gamma di acidi grassi e diacilgliceroli (Lehner e Kuksis., 1996).

Questo enzima svolge un ruolo fondamentale negli eucarioti, in particolare per i processi metabolici che coinvolgono i trigliceridi: assorbimento intestinale dei grassi, costituzione delle lipoproteine, formazione del tessuto adiposo e lattazione. Lavori condotti *in vivo* hanno mostrato che, l'attività del DGAT nel fegato e nel tessuto adiposo è regolata da meccanismi di fosforilazione/defosforilazione (Lehner e Kurkis, 1996).

Epatociti incubati in una soluzione di glucagone hanno manifestato una riduzione dell'attività del DGAT pari al 53%; valori simili (46%) si notano con un eccesso di MgCl₂ e ATP. Simili cambiamenti, al contrario, non si notano per le altre acil-trasferasi (Lehner e Kurkis, 1996).

Lavori condotti sul genoma bovino hanno dimostrato la presenza di un gene candidato, DGAT1, che presenta un polimorfismo a livello proteico dove, in posizione 232, si nota la sostituzione non conservativa di una lisina (K) con un'alanina (A) (*K232A*).

Il DGAT1 è localizzato sul cromosoma 14 bovino nella zona del QTL che è associato con molte caratteristiche chimiche e produttive del latte.

La zona in cui è contenuto questo QTL è compresa tra i marcatori microsatellitari BULGE13-BULGE9 e i dati ottenuti da Grisart et al. suggeriscono che il DGAT1 sia il candidato associato a questo QTL o il QTL stesso (Grisart et al., 2001).

La sostituzione aminoacidica deriva da una mutazione dinucleotidica a livello dell'ottavo esone (ApA→GpC).

Questo polimorfismo ha manifestato un forte effetto sul contenuto di grasso nel latte e su altre caratteristiche del latte nelle razze Jersey, Ayrshire e Holstein-Frisian neozelandese, olandese, tedesca, israeliana e polacca (Grisart et al. 2001; Spelman et al. 2002; Thaller et al. 2003; Weller et al. 2003).

Studi condotti sul *locus* hanno mostrato che l'allele K comporta una V_{MAX} superiore all'allele A, inoltre esprime un maggior contenuto di grasso nel latte (+0.35%) e una maggiore produzione (+10 Kg) (Grisart et al., 2001; Spelman et al. 2002).

Dall'analisi delle sequenze presenti in banca dati (GenBank n° d'accesso AW446985) si è rilevata l'esistenza di uno splicing alternativo. Questo comporta la comparsa di due trascritti che differiscono per la loro lunghezza. Il più lungo utilizza la parte terminale dell'ottavo introne, precisamente 6 bp a monte del sito polimorfico *K232A*, con una conseguente "intronificazione" dell'ottavo esone. Amplificando la regione comprendente il sito di splicing alternativo, è stato possibile verificare che la variante più corta è associata con l'allele K del *locus K232A* (Grisart et al., 2001).

Analisi fatte sulla sequenza del gene DGAT1, hanno mostrato l'esistenza di altri polimorfismi oltre al *K232A*: due SNP (A→G; C→T) a livello dell'introne 12 chiamati rispettivamente *N984+8(AG)* e *N984+26(CT)*; ed uno SNP (C→T) nella regione 3'UTR chiamato *Nt-1501* (Grisart et al., 2001).

Il gene DGAT1 ha una lunghezza di 8.6 Kb; è costituito da 17 esoni che hanno una lunghezza media di 121.8 bp. Il gene e la rispettiva proteina del bovino, mostrano un alto tasso di similarità con quelli umani, rispettivamente, 89,5 % e 92.5% (Grisart et al., 2001).

Topi transgenici in cui è stata bloccata l'espressione del DGAT1, manifestavano una riduzione del grasso corporeo e problemi alla lattazione, ma avevano un contenuto di trigliceridi normale nel flusso sanguigno. Questo ha suggerito una via alternativa per la sintesi di triacilgliceroli nell'intestino e nel fegato; la conferma è arrivata dopo la scoperta di un secondo gene chiamato DGAT2 (Cases et al., 2001).

La proteina DGAT2 contiene tre potenziali siti di glicosilazione, sei potenziali siti di fosforilazione della proteina chinasi C e una sequenza che mostra una similarità con un putativo dominio dei fosfolipidi, ritrovato anche in altre aciltransferasi (GPAT, LPAAT) (Cases et al., 2001).

Riguardo alla specificità nei confronti degli acidi grassi, non si sono notate differenze tra DGAT1 e DGAT2, anche se appartengono a famiglie di geni che non mostrano omologia (Cases et al., 2001).

4 STEAROIL-COA DESATURASI (SCD)

4.1 Caratteristiche biochimiche

La Stearoil-CoA Desaturasi (SCD) (EC 1.14.99.5) è un enzima appartenente alla super-famiglia delle desaturasi di acili, presente sia nel mondo animale che vegetale e responsabile dell'inserimento di un doppio legame *cis*- in posizione Δ^9 . I substrati dell'enzima sono molteplici, ma quelli che manifestano una maggiore specificità, sono l'acido palmitico e l'acido stearico, che sono convertiti rispettivamente in palmitoleato e oleato (Ntambi, 1995).

L'ipotesi più comune sulla reazione di desaturazione prevede che l'enzima rimuova prima l'idrogeno del C-9 e, successivamente, quello del C-10 (Ntambi e Miyazaky, 2004).

L'acido palmitoleico e l'acido oleico sono i composti maggiormente rappresentati nei fosfolipidi di membrana, quindi la SCD svolge un ruolo determinante nel definire la fluidità delle membrane cellulari e regolare le interazioni tra due cellule contigue (Heinemann e Ozols, 2003; Ntambi, 1995; Ntambi, 1999).

In proposito, è stato rilevato che la fluidità di membrana può essere stimata dal rapporto acido stearico-acido oleico. Questo valore è specifico per ogni cellula e una sua alterazione può essere messa in relazione alla comparsa di numerose patologie quali cancro, diabete, obesità, ipertensione, malattie neurologiche, vascolari e del cuore (Ntambi, 1995).

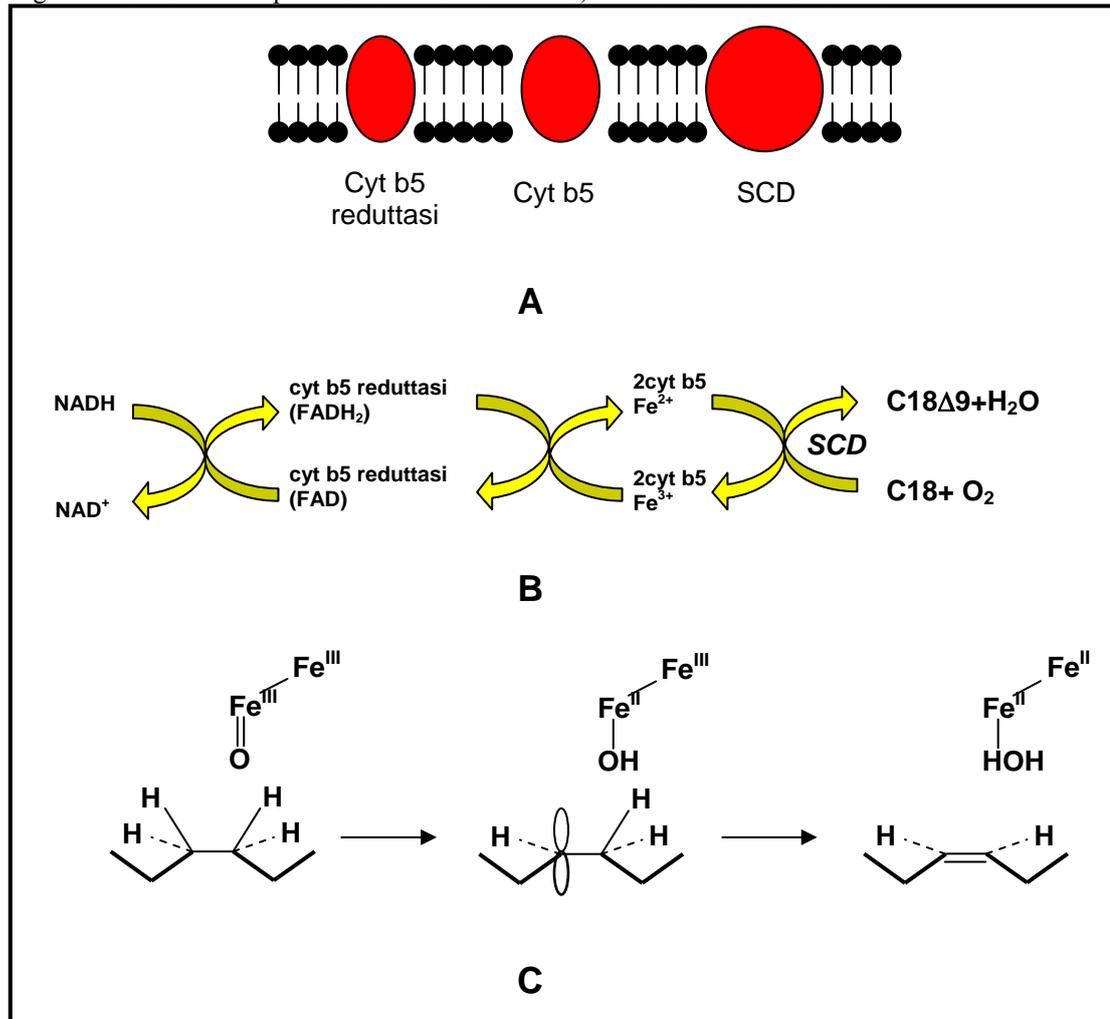
I MUFA hanno un ruolo sull'apoptosi e nella mutagenesi di alcuni tumori (Ntambi e Miyazaki, 2004). L'acido oleico, o per meglio dire l'oleato, è un acido grasso essenziale per la sintesi di trigliceridi ed esteri del colesterolo a livello epatico.

Queste molecole sono necessarie per l'assemblaggio e la secrezione delle lipoproteine di bassa densità (VLDL), pertanto la SCD è un importante strumento di regolazione del livello di VLDL nel siero e per la prevenzione di malattie cardiovascolari (Heinemann e Ozols, 2003).

Il sistema Desaturasi è costituito da tre elementi, di cui uno è la SCD che è coadiuvata dalla *Citocromo b5-reduttasi* e dal *Citocromo b5*.

Il processo di desaturazione è consentito da una catena di trasporto di elettroni che vede come donatore iniziale il NADH e come accettore finale l'ossigeno che viene convertito in acqua (Heinemann e Ozols, 2003; Ntambi, 1995) (figura 4.1).

Fig. 4.1: A) Schema del sistema desaturasi nella membrana microsomiale. B) Catena di trasporto degli elettroni durante il processo di desaturazione. C) Meccanismo di desaturazione.



Il processo di desaturazione inizia con l'attivazione del C-9, che diviene un gruppo radicale e perde un atomo d'idrogeno. La reazione è piuttosto veloce ed è garantita dalla presenza del gruppo bi-ferrico che cattura lo ione H⁺. La seconda fase è relativamente più lenta e comporta l'ossidazione del C-10 che cede il secondo atomo di idrogeno (figura 4.1) (Behrouzian e Buist, 2003).

La proteina è costituita da tre regioni dette "istidiniche" per via dell'elevato numero di residui istidinici (1° regione= HxxxxH, 2° regione=HxxHH,

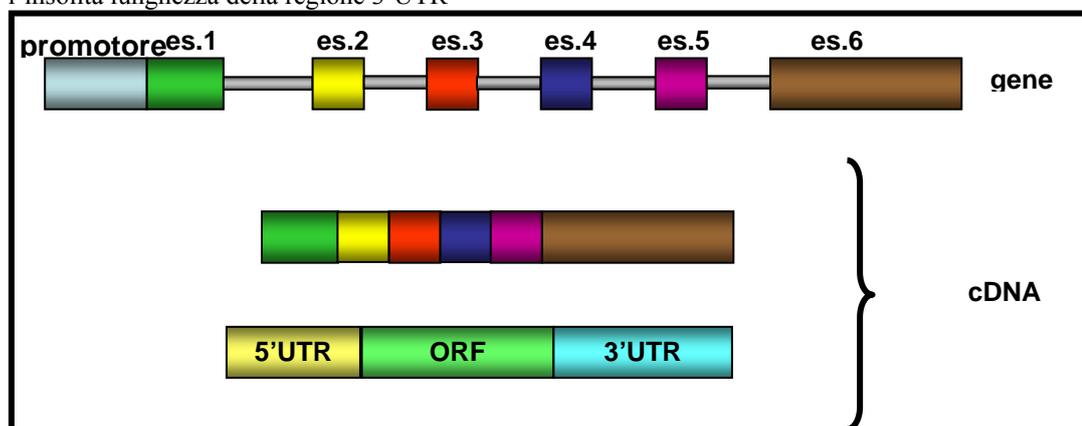
3° regione=HxxHH). Le tre regioni, nell'insieme, rappresentano il sito di catalisi dell'enzima, dove si lega lo ione ferrico. La conferma viene dal fatto che le tre regioni sono altamente conservate in tutte le specie (figura 4.6) (Heinemann e Ozols, 2003).

4.2 Struttura genica

La prima sequenza nucleotidica di SCD ad essere descritta, fu quella del cDNA di topo. In cellule murine di preadipociti (3T3-L1), che si convertivano in adipociti, furono isolate due sequenze di cDNA, chiamate rispettivamente SCD₁ e SCD₂ (Ntambi, 1995).

Lavori successivi portarono al sequenziamento del cDNA umano che mostrava una similarità del 93% e 92% con SCD₁ e SCD₂. Il gene *scd* è costituito da 6 esoni e 5 introni (figura 4.2).

Fig. 4.2: Struttura del gene e del cDNA della SCD. Come si può rilevare dalla figura spicca l'insolita lunghezza della regione 3'UTR



Tra gli animali di interesse zootecnico sono stati sequenziati le *scd* di bovino (gene completo; Medrano et al., 2003), di ovino (cDNA completo; Ward et al., 1998) di capra (cDNA parziale; Bernard et al., 2001), di suino (cDNA completo; Ren et al., 2004) e di pollo (cDNA completo; Lefevre et al., 2001).

Le specie, in cui è stata determinata la sequenza completa o parziale, mostrano una regione 3'UTR insolitamente lunga, derivante da un unico esone (Ntambi,

1995; Bernard et al., 2001). In questa regione sono stati individuati 4 motivi AUUUA detti elementi ricchi di AU (ARE), che conferiscono instabilità al trascritto, quindi possono svolgere un ruolo importante nella regolazione dell'espressione del gene *scd* (Ntambi, 1999; Taniguchi et al., 2004).

Sino ad oggi, non è chiaro perché i topi hanno due geni SCD, mentre i ruminanti solo uno. L'ipotesi più attendibile è quella di un diverso sistema di regolazione del metabolismo lipidico, tra le varie specie (Ward et al., 1998).

I roditori esibiscono delle marcate differenze nell'approvvigionamento del cibo durante il giorno, con un contenuto di grasso variabile (Ward et al., 1998). La conseguenza è una specializzazione tissutale, che permetta di ottimizzare l'utilizzo degli acidi grassi, tramite l'attivazione di geni diversi che catalizzano la stessa reazione (Ward et al., 1998).

I ruminanti, al contrario, tendono ad avere una dieta costante che permette una gestione più standardizzata dei principi alimentari assimilati con la dieta (Ward et al., 1998).

Riguardo la regione del promotore, sono state isolate e sequenziate quelle dell'uomo, del topo, del pollo e del bovino. In tutti i casi citati, è stata notata la presenza di una regione altamente conservata, la *PUFA response element* (PUFA-RE) (figura 4.3).

Questa regione svolge un ruolo importante nella regolazione dell'espressione del gene (vedi oltre) (Keating et al., 2005). È interessante notare come le regioni responsabili della regolazione dell'espressione genica (SRE= Sterol Regulator Element, NF = Nuclear Factor Y, RFX-1= X-box-binding regulatory factor 1, FSE= Fat Specific Element, AP-1= sito di legame dei fattori di trascrizione, HNF4 e TATA-box,), siano altamente conservate nelle tre specie (Keating et al., 2005).

I vari siti di espressione sono distribuiti in due regioni ben definite del promotore. Nella prima regione sono compresi due sequenze TATA-box (da -37e da -119), FSE (da -77 a -86), AP-1 (da -64 a -68), NF-1 (da -102 a -109) e HNF-4 (da -116 a -119). La seconda regione è caratterizzata dalla presenza di NF-Y (da -313 a -317), NF-1 (da -333 a -336), SRE (da -366 a -376) (Fig.6). La seconda regione, nel suo complesso (da -313 a -390), costituisce il PUFA-RE (Keating et al., 2005).

4.3 Regolazione dell'espressione della SCD.

Lavori condotti su topi hanno dimostrato che dei tre elementi del sistema desaturasico, solo la SCD risente dell'effetto di fattori ambientali, come cambiamenti della dieta, bilancio ormonale, cambiamenti della temperatura, presenza di metalli, alcoli e composti fenolici (tabella 4.1) (Pasturi e Joshi, 1982; Prasad e Joshi, 1978; Ntambi e Miyazaki, 2004).

La tabella 4.1 mostra, il notevole impatto dei componenti della dieta sull'espressione del gene *scd*. Variando il tipo di concentrato nella dieta, ad esempio, si notano evidenti differenze nell'espressione dei principali enzimi lipogenici (ACC, FAS e SCD).

In particolare, la somministrazione di concentrati contenenti grassi insaturi protetti, determina una riduzione dell'attività desaturasica a livello della ghiandola mammaria di capra e di bovino (Bernard et al., 2005; Delbecchi et al., 2001). Il tutto è correlato con il livello di bioidrogenazione ruminale, che determina il tipo di acidi grassi che arrivano alla mammella (vedi oltre).

Tab. 4.1: Fattori che regolano l'espressione della SCD (Ntambi e Miyazaki, 2004).

Fattori della dieta	Ormoni	Altri
▲ glucosio	▲ insulina	▲ perossisomi
▲ fruttosio	▲ ormone della crescita	▲ temperatura
▲ vitamina A	▲ estrogeni	▲ ferro
▼ colesterolo	▲ androgeni	▲ agonisti dell'accettore X del fegato
▲ vitamina D	▼ leptina	▲ TGF- β
▼ PUFA	▼ glucagone	▲ luce
▲▼ alcol	▼ ormone tiroideo	▼ β -amiloidi
▲▼ CLA	▲▼ deidroepiandrosterone	▼ cadmio
		▼ TNF- α
		▼ acido sterculico

Uno dei fattori di maggiore interesse è la concentrazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA); l'effetto riguarda esclusivamente le frazioni n-6 e n-3 (Bernard et al., 2005; Nakamura e Nara, 2002; Ntambi e Benè, 2001).

Questi acidi grassi regolano l'espressione di molti geni e non solo della SCD; in particolare bloccano l'attivazione dei geni lipogenici e favoriscono quella dei geni della β -ossidazione (Ntambi e Benè, 2001).

La repressione dell'attività della SCD, ad opera dei PUFA, riduce il contenuto di colesterolo trasportato dal fegato agli altri tessuti periferici, grazie al fatto che viene limitata la disponibilità di acido oleico e degli acidi grassi in generale (Ntambi, 1999).

I PUFA reprimono l'espressione dei geni che codificano per enzimi con azione lipogenica. Analisi più approfondite hanno mostrato la possibilità che la repressione della SCD sia legata solo ad alcuni PUFA e non a tutti (Ntambi, 1999). L'effetto inibente dei PUFA sull'attività della SCD è stato riscontrato in diversi tessuti, il fegato, il cervello e il tessuto adiposo.

I progressi della biologia molecolare hanno permesso di determinare il meccanismo di repressione dei PUFA. Si conoscono due meccanismi di controllo, uno trascrizionale e l'altro post-trascrizionale (Ntambi, 1999).

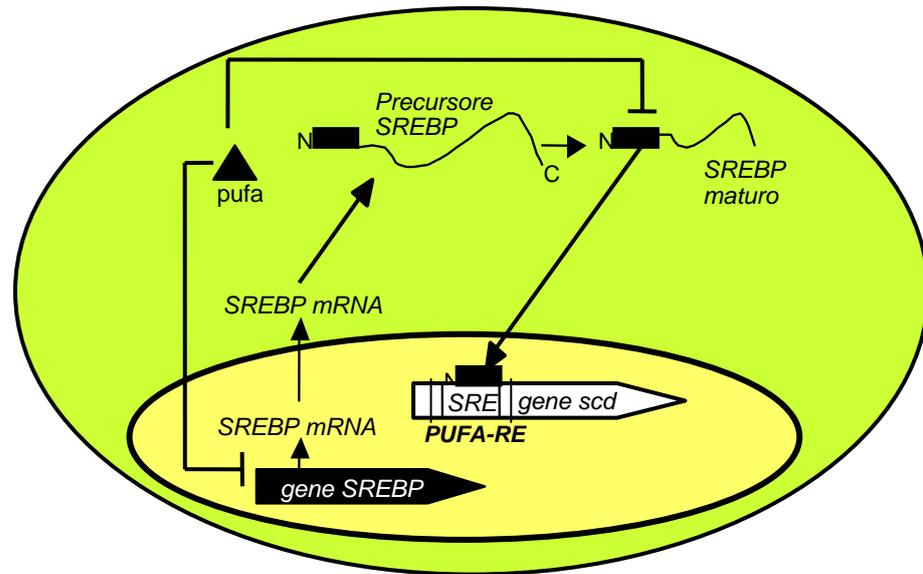
Nella regione del promotore del gene *scd* è stata individuata una regione altamente conservata lunga 60 bp, detta PUFA-RE (PUFA Responsive Element) (figura 4.3).

La presenza dei PUFA favorisce l'incremento di fattori che, legandosi al PUFA-RE, bloccano la trascrizione del gene (Ntambi, 1999).

L'effetto dei PUFA a livello post-trascrizionale non è stato ancora individuato, ma si presume essere correlato con le regioni ARE del trascritto *scd*.

Il colesterolo riduce l'espressione della SCD al pari dei PUFA, anzi si presume che il meccanismo di repressione sia identico.

Alcuni lavori compiuti sull'effetto del colesterolo hanno dimostrato che, l'inibizione si ha a livello del tessuto adiposo e della ghiandola mammaria; mentre nel fegato è stato notato un incremento dell'attività desaturasica, in seguito a somministrazione di colesterolo (Landau et al., 1997; Ntambi 1999).

Fig. 4.4: Schema della regolazione dei PUFA sull'espressione della SCD (tratto da Ntambi, 1999).

Il gene *scd*, al pari di altri geni lipogenici, presenta nel promotore l'elemento sensibile agli steroli (SRE: Sterol Responsive Element), presente all'interno della regione PUFA-RE (Ntambi, 1999) (figura 4.4).

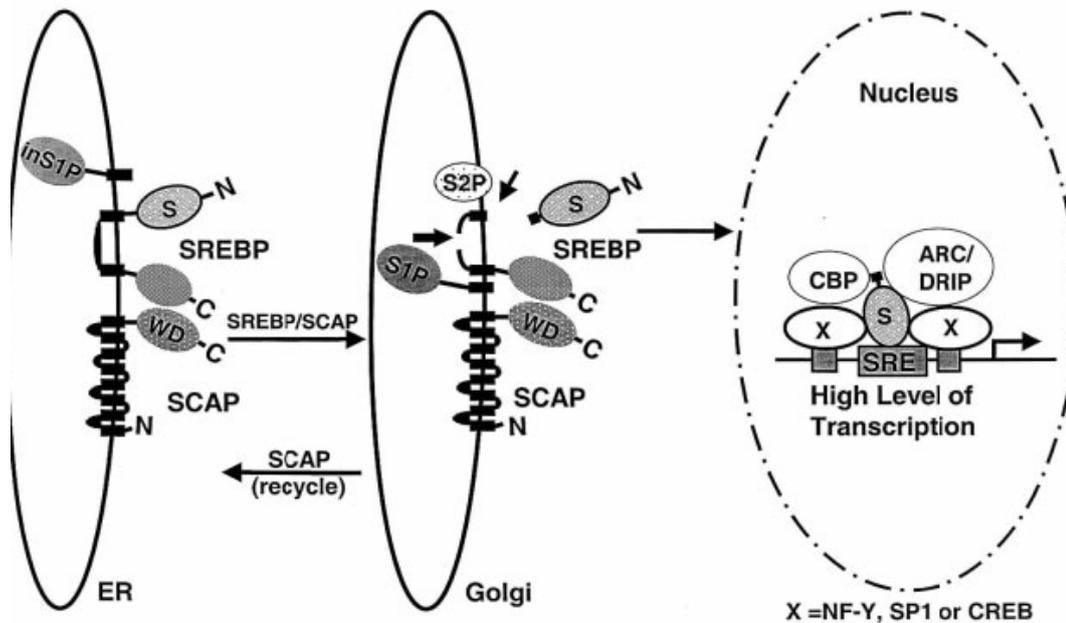
Nella regione SRE si lega la forma matura della proteina Sterol Regulator Element Binding Protein (SREBP). La SREBP è una proteina di membrana presente nel reticolo endoplasmatico di molti tessuti con un peso molecolare di circa 125 kDa (Edwards et al., 2000).

Questa proteina è organizzata in tre domini: dominio N-terminale di 500 aminoacidi che contiene la regione helix-loop-helix-leucine zipper che si lega al DNA; due segmenti trans-membrana di natura idrofobica; un dominio C-terminale di 600 aminoacidi orientato nella regione citosolica (Heinemann e Ozols, 2003; Sakai et al., 1998).

La SREBP viene processata nel citoplasma attraverso un taglio proteolitico che libera la parte N-terminale, detta anche SREBP maturo. La molecola viene "trascinata" dalla proteina di attivazione del taglio (SCAP) nel complesso di Golgi, dove sono presenti due proteasi (SP1 e SP2) (Heinemann e Ozols, 2003; Miyazaky e Ntambi, 2003; Ntambi e Benè, 2001; Sakai et al., 1998). Inizialmente la SREBP viene tagliata dalla SP1 nella parte mediana del loop idrofilico, successivamente la SP2 taglia la regione N-terminale che viene liberata nel

citoplasma (Heinemann e Ozols, 2003). A taglio completato, la SCAP ritorna nel reticolo endoplasmatico (Edwards et al., 2000) (figura 4.5).

Fig. 4.5: Schema del taglio della componente matura del SREBP e attivazione del gene SCD. Lo SCAP trascina l'SREBP verso il complesso di Golgi dove subisce il taglio di S1P e S2P. (Edwards et al., 2000).



La componente matura entra nel nucleo dove si va a legare con SRE di geni coinvolti nella sintesi di colesterolo, trigliceridi e acidi grassi, tra i quali è compreso il gene *scd* (figura 4.3) (Ntambi, 1999; Sakai et al., 1998).

L'incremento della concentrazione di PUFA e colesterolo, impedisce che sia liberata la componente matura della SREBP, la conseguenza è che non può essere attivata la trascrizione del gene *scd* (Ntambi, 1999).

Addirittura, PUFA e colesterolo svolgono un'azione più diretta inibendo la trascrizione della proteina SREBP a livello del nucleo, ma il meccanismo d'azione non è ben chiaro.

Sono state individuate tre isoforme di SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2). Le tre isoforme sono codificate da due geni, vale a dire che due delle tre (SREBP-1a e SREBP-1c) derivano dallo stesso gene per un diverso inizio della trascrizione (Clarke et al., 2002; Heinemann e Ozols, 2003; Miyazaki e Ntambi, 2003). In realtà il gene SREBP-1 è caratterizzato dalla presenza di due promotori distinti

che confluiscono in un unico punto della catena nucleotidica, una sorta di gene ramificato (Osborne, 2000).

Il rapporto tra le due proteine varia da un organo all'altro, ad esempio nel fegato e nel tessuto adiposo l'mRNA 1c è 9 volte più abbondante del 1a, mentre nella milza si ha la situazione opposta (Osborne, 2000). Il motivo di questa differente espressione del gene SREBP-1 non è stato ancora chiarito. Analisi condotte specificamente sulle singole isoforme di SREBP, hanno portato alla conclusione che SREBP-1 è coinvolta nell'attivazione dei geni della lipogenesi, mentre SREBP-2 è più selettiva per i geni dell'omeostasi del colesterolo (Osborne, 2000; Ntambi e Benè, 2001).

Fra i PUFA in grado di inibire l'espressione della SCD sembra essere compreso anche un isomero coniugato dell'acido linoleico (CLA), quale il t10 c12 CLA.

La somministrazione per via abomasale di tale acido grasso ha determinato una riduzione dell'espressione degli enzimi lipogenici, SCD compresa (Peterson et al., 2004). È stato proposto che il processo di inibizione dell'espressione possa essere simile a quello compiuto da altri PUFA, ossia verrebbe bloccata la reazione che porta alla sintesi della componente matura del SREBP (Peterson et al., 2004).

La SCD risente dell'effetto inibente dell'acido grasso C18:2 *trans*10-*cis*12, al pari degli altri enzimi lipogenici, che rappresenta il principale responsabile del fenomeno noto come Milk Fat Depression (MFD).

L'incremento di questo acido grasso comporta una riduzione del contenuto di grasso nel latte (Davis e Brown, 1970) legato ad una riduzione dell'attività dei principali acidi lipogenici.

L'infusione abomasale di C18:2 *trans*10-*cis*12 in vacche in lattazione ha comportato una riduzione del 21% dell'attività della SCD (Loor e Herbain, 2003). Peterson et al. (2004) hanno dimostrato che anche per il C18:2 *trans*10-*cis*12, la regolazione dell'espressione della SCD è legata al SREBP.

Cellule mammarie di bovino (MAC-T) sono state immerse in una soluzione contenente C18:2 *trans*10-*cis*12; l'effetto che si è rilevato è stata una riduzione sia del contenuto di mRNA di SREBP che della rispettiva proteina matura (Peterson et al., 2004). Questo dimostra che l'effetto regolatore del C18:2 *trans*10-*cis*12 è simile a quello dei PUFA, già descritto in precedenza.

Recenti studi hanno dimostrato che la SCD è coinvolta nel processo di riduzione del peso corporeo, mediato dalla leptina (Cohen et al., 2002; Heinemann e Ozols, 2003). L'effetto della leptina potrebbe essere quello di inibire la SCD per bloccare la sintesi e l'ossidazione degli acidi grassi, con il fine di ridurre l'accumulo di adipe (Cohen et al., 2002).

A topi omozigoti recessivi per il gene leptina (*ob/ob*, individui affetti da obesità) in cui la stessa è stata somministrata, si è notata la riduzione dell'espressione dei più importanti geni lipogenici (Cohen e Friedman, 2004). Tra questi, la SCD è l'enzima che ha mostrato la maggiore repressione sotto l'effetto della leptina, valutato in un valore pari a 7 volte quello di individui non trattati (Cohen e Friedman, 2004).

La leptina, infatti, riduce il livello di RNA della SCD e di conseguenza anche l'attività enzimatica (Heinemann e Ozols, 2003; Kakuma et al., 2002).

La sua funzione primaria sembra essere quella di collegamento fra la periferia e il sistema nervoso centrale, nella regolazione del bilancio energetico (Cohen et al., 2002). In altri termini, dà segnali al cervello sul livello delle riserve di grasso, regolando l'assunzione di cibo e la spesa energetica degli animali adulti (Houseknecht et al., 1998; Casanueva e Dieguez, 1999)

La leptina è stata ritrovata negli adipociti della ghiandola mammaria durante la gravidanza e nelle cellule epiteliali mammarie nel periodo di lattazione (Feuermann et al., 2004; Chilliard et al., 2001).

La sua espressione, a livello della ghiandola mammaria, è stimolata dall'incremento di prolattina, i cui effetti si ripercuotono sul metabolismo lipidico mammario (Feuermann et al., 2004).

L'effetto ormonale sull'espressione della SCD è un altro aspetto interessante della regolazione di quest'importante enzima. Un ruolo decisivo è svolto dall'insulina e dal glucagone: la prima incrementa l'espressione di enzimi lipogenici, SCD compresa, mentre il secondo la reprime (Daniel et al., 2003; Waters et al., 1997). È stato dimostrato che l'insulina e il glucosio giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della sintesi e della secrezione dei lipidi (Avramoglu et al., 2006).

Il trattamento di espianti di tessuto adiposo di topo con insulina ha determinato un incremento del contenuto di MUFA, proporzionale con l'aumento del contenuto di mRNA della SCD (Daniel et al., 2003).

Il controllo del contenuto di SCD, da parte dell'insulina, sembra essere dovuto ad un effetto, dell'insulina stessa, sull'espressione del SREBP (Avramoglu et al., 2006). Tutte le isoforme SREBP sono regolate dai nutrienti presenti nella dieta, ma solo la SREBP-1c sembra mostrare una particolare sensibilità per il contenuto di insulina (Avramoglu et al., 2006; Frick et al., 2002).

Il glucosio mostra un sistema di regolazione, dei geni lipogenici, indipendente da quello dell'insulina.

4.4 Sintesi endogena dei CLA

La SCD è uno degli enzimi chiave della sintesi endogena dell'acido rumenico (RA C_{18:2} c9-t11), il CLA più abbondante nel latte dei ruminanti (Griinari et al., 2000).

I CLA sono una categoria di acidi grassi isomeri dell'acido linoleico, con i due doppi legami coniugati.

Questa categoria di acidi grassi è costituita da un numero considerevole di molecole che differiscono, sia per la disposizione dei doppi legami lungo la catena acilica (posizione 8,9,10,11 ecc.), sia per la conformazione geometrica (cis-cis, cis-trans, trans-cis, trans-trans).

Nel latte e nella carne dei ruminanti, però, la gran parte dei CLA è costituita da RA (90%) (Khanal e Dhinam, 2003; Lock e Garnsworthy, 2003).

La presenza dei CLA è nota da oltre 50 anni, ma il loro interesse è cresciuto in seguito alla scoperta dei loro potenziali effetti benefici sulla salute dell'uomo (anticarcinogenesi, antiaterogenesi, antidiabete e antiadipogenesi) (Banni et al., 2003; Khanal e Dhiman, 2004).

L'interesse della comunità scientifica verso questo composto è legato alla sua attività biologica e la National Academy of Science ha definito il CLA come

«l'unico acido grasso che mostra in maniera inequivocabile attività anticarcinogena in esperimenti condotti su animali».

Il CLA compete con l'acido linoleico (LA) riducendo la formazione dell'acido arachidonico, precursore degli eicosanoidi che svolgono un ruolo importante nella carcinogenesi. Il CLA può essere metabolizzato come l'acido linoleico originando altri acidi grassi a lunga catena che interferiscono con la sintesi degli eicosanoidi. Esperimenti *in vitro* hanno evidenziato un'esterificazione preferenziale nella posizione sn-2 del trigliceride

Fra le attività dei CLA (isomeri cis9, trans11 e trans10, cis12) si ritrovano anche attività antiaterogena ed ipocolesterolemica, infatti, si è osservata una diminuzione del tasso di colesterolo LDL nel plasma in topi sottoposti ad integrazione con i sopra citati isomeri CLA.

Gli effetti positivi sul diabete sono correlati al miglior utilizzo del glucosio presente nel plasma e ad una maggiore efficienza dell'insulina (Secchiari et al. 2005).

Il contenuto di CLA nel latte deriva da un'attività di sintesi piuttosto complessa, che ha origine nel rumine, dove sono prodotti i precursori e si completa a livello tissutale.

L'attività ruminale è condotta da microrganismi cellulolitici (*Butyrivibrio fibrisolvens*) (Kepler et al., 1966; Bauman et al., 1999; Buccioni et al., 2002; Lock e Garnsworthy, 2003, Khanal et al., 2004).

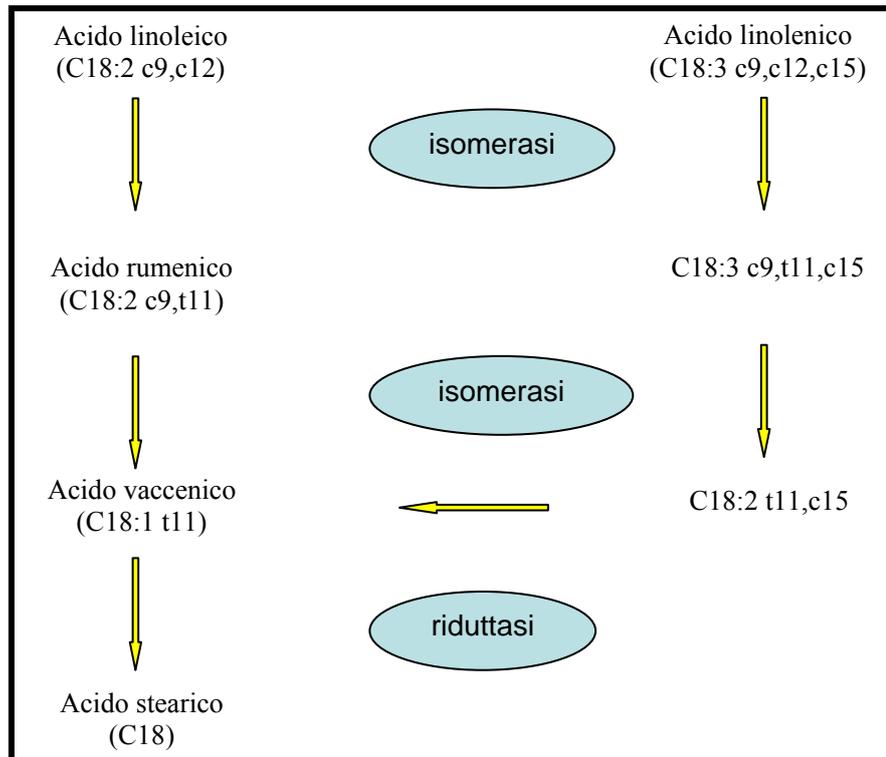
Le reazioni di bioidrogenazione sono catalizzate da una serie di isomerasi e riduttasi, che trasformano l'acido linoleico e linolenico in acido vaccenico (VA, C_{18:1} t11) ed acido stearico (figura 4.5).

Il VA tende ad accumularsi nel liquido ruminale, poiché la sua riduzione ad acido stearico è il passaggio più lento dell'intero processo di bio-idrogenazione.

I due prodotti della bioidrogenazione, dopo l'assorbimento intestinale sono trasportati a livello tissutale dove sono ossidati ad opera della SCD con la formazione dell'acido oleico a partire dallo stearico e di RA a partire dal VA.

Il processo ossidativo è particolarmente intenso a livello della ghiandola mammaria durante il periodo di lattazione (Bauman et al., 2006; Khanal e Dhinam, 2003; Secchiari et al., 2005).

Fig. 4.6: Processo di bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico e dell'acido α -linoleico (Modificato da Harfoot e Hazlewood, 1997)



Il contenuto di CLA nel latte non dipende soltanto dall'attività della SCD, ma anche da fattori ambientali, legati essenzialmente al sistema di allevamento (condizioni di stalla, stress dell'animale, malattie e alimentazione).

La dimostrazione che il CLA presente nel latte è di origine tissutale e non ruminale, si è avuta in un lavoro compiuto da Griinari et al. nel 2000, mediante la soppressione della SCD attraverso somministrazione di acido sterculico a vacche in lattazione.

Il grasso del latte e dei tessuti appartenenti alle specie ruminanti è caratterizzato da un contenuto più elevato di acido rumenico rispetto ai monogastrici benchè tale acido venga sintetizzato da entrambe le specie. Esistono differenze specie-specifiche nella capacità di convertire l'acido vaccenico in acido rumenico; in particolare, nell'ambito dei ruminanti, il latte con un contenuto di CLA maggiore è quello ovino (0,84-2,15 g/100g grasso), seguito da quello bovino (0,3-0,7 g/100g grasso) e da quello caprino (0,64-0,74 g/100g grasso); nell'ambito dei

monogastrici, è il latte di donna a contenere quantità più elevate di CLA (0,4 g/100g grasso) (Jahreis et al. 1999).

4.5 SCD nella ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria è l'organo di maggiore espressione della SCD nei ruminanti in lattazione (Ward et al., 1998).

Subito dopo il parto, si nota una riduzione dell'attività desaturasica a livello del tessuto adiposo, sito di maggiore attività della SCD, ed un incremento parallelo a livello della ghiandola mammaria (Griinari et al, 2000).

I principali substrati della SCD, a livello della ghiandola mammaria, sono il C18, il C16, il C14 e il VA, da cui si ottengono i rispettivi acidi insaturi (C18:1 cis9, C16:1, C14:1, RA).

La somministrazione di acido sterculico, un potente inibitore della SCD, comporta una notevole riduzione del contenuto dei substrati della SCD stessa nel latte (C14:1 -70%, C16:1 -60%, C18:1 cis9 -45%, C18:2 cis9-trans11 -40%) (Corl et al., 2001; Griinari et al., 2000; Kay et al., 2004).

L'attività della SCD può essere stimata sulla base del rapporto tra il prodotto e il substrato dell'enzima stesso (Lock e Garnsworthy, 2003; Bernard et al., 2005). Alla luce delle conoscenze attuali i rapporti di riferimento sono quattro, perché tali sono i substrati a livello della ghiandola mammaria.

In realtà, il migliore indicatore dell'attività desaturasica è il rapporto miristoleico/miristico, poiché l'acido miristico viene sintetizzato completamente a livello della ghiandola mammaria e di conseguenza anche il miristoleico (Lock e Garnsworthy, 2003; Bernard et al., 2005).

Gli altri prodotti della SCD possono formarsi *de novo* a livello mammario, oppure essere importati tal quali dal flusso sanguigno. La valutazione del rapporto C14:1/C14 durante l'anno, mostra come l'attività desaturasica incrementi in primavera, raggiungendo il suo massimo a maggio, per poi diminuire nei mesi successivi (Lock e Garnsworthy, 2003).

4.6 SCD nei bovini

Il gene *scd* bovino è localizzato sul cromosoma 26q21 ed ha una lunghezza di 17,088 kb. La sequenza nucleotidica del gene è stata pubblicata in banca dati da Medrano et al nel 2003 (N° di accesso AY241932).

Il cDNA è lungo 5331 bp così divisi: 367 bp della regione 5'UTR, 1080 bp della ORF (Open Reading Frame) e 3884 bp della regione 3'UTR (Taniguchi et al., 2004). Come si può notare anche nel gene bovino la regione 3'UTR si presenta insolitamente lunga come nel ratto e nell'uomo. In questa regione sono stati individuati 4 motivi "ATTTA" che hanno la funzione di ridurre la stabilità dell'RNA messaggero, come riportato per topo e uomo (Sessler et al., 1996; Zhang et al., 1999).

La proteina SCD è lunga 359 aminoacidi come in altre specie, e mostra un'alta omologia con quella di capra (93.9%), di pecora (93.6%), uomo (87.2%) e topo (80.5%) (figura 4.6) (Taniguchi et al., 2004).

Il lavoro condotto da Medrano et al. (2003), ha portato alla scoperta di tre SNP a livello del quinto esone. I primi due polimorfismi non comportano sostituzioni di aminoacidi nella sequenza proteica, mentre il terzo determina la sostituzione di una valina con una alanina a livello del 293° residuo della proteina (figura 4.7).

I tre SNP vengono ereditati contemporaneamente (linkage disequilibrium), pertanto vanno a costituire un aplotipo. Il confronto tra le sequenze peptidiche di alcune specie di mammiferi, mostra che la valina, nel 293° residuo, è altamente conservata; questo fa supporre che sia l'aminoacido ancestrale.

Al momento, i due aplotipi sono stati individuati in differenti razze (Holstein, Brown Suisse, Jersey e Japanese Black Cattle).

Il lavoro condotto da Taniguchi et al. (2004), ha permesso di individuare altri 5 SNP nella regione 3'UTR del cDNA: al 1905° bp (G/A), al 3143° bp (C/T), al 3351° bp (A/G), al 3537° bp (A/G) e al 4736° bp (A/G).

L'analisi della sequenza del promotore ha mostrato una similarità del 67% e del 59% con quelle di uomo e di topo rispettivamente (figura 4.3). In particolare, le regioni maggiormente conservate sono quelle di regolazione dell'espressione genica, vale a dire PUFA-RE e NF-Y (Keating et al., 2005).

Fig. 4.7: Confronto fra le sequenze aminoacidiche SCD di alcune specie: bovino (BAC54826), capra (AAK01666), pecora (CAA04502), uomo (AAD29870), topo (NM009127). Le tre regioni istidiniche sono evidenziate in giallo. Le lettere riportate in grassetto indicano le regioni caratterizzanti le regioni istidiniche. Le lettere in rosso rappresentano gli aminoacidi differenti rispetto alla sequenza bovina. La lettera sottolineata indica l'aminoacido che è in relazione con il 3° SNP del 5° esone bovino.

Bovino	1	MPAHLQEEISSSYTTTTITAPPSRVLQNGGGKLEKTPLYLEEDIRPEMRDDIYDPTYQ
Maiale	1	MPAHLQEEISSSYTTTTITAPSSRVLQNGGGKLEKTPQYVEEDIRPEMKDDIYDPTYQ
Uomo	1	MPAHLQDDISSSYTTTTITAPPSRVLQNGGDKLETMPLYLEDDIRPDIKDDIYDPTYK
Capra	1	MPAHLQEEISSSYTTTTITAPPSKVLQNGGGKLEKTPLYLEEDIRPEMRDDIYDPTYQ
Pecora	1	MPAHLQEEISSSYTTTTITAPPSRVLQNGGGKLEKTPLYLEEDIRPEMRDDIYDPNYQ
Topo	1	MPAHMLQ-EISSSYTTTTITAPPS---GNEREKVKTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDPTYQ
Bovino	61	DKEGPKPKLEYVWRNIILMSLLHLGALYGITLIPTCKIYTYIWLWLFYYLMGALG ITAGAH
Maiale	61	DKEGPRPKLEYVWRNIILMSLLHLGALYGIILIPTCKIYTL LLWAFAYYLLSAVG VTAGAH
Uomo	61	DKEGPSKVEYVWRNIILMSLLHLGALYGITLIPTCKFYTWLWGVFYFVSALG ITAGAH
Capra	61	DKEGPKPKLEYVWRNIILMGLLHLGALYGITLIPTCKIYTFWVWLFYVMSALG ITAGVH
Pecora	61	DKEGPKPKLEYVWRNIILMGLLHLGALYGITLIPTCKIYTFWVWLFYVVISALG ITAGVH
Topo	57	DEEGPPKLEYVWRNIILMVLLHLGLGYGIILVPSCKLYTALFGIFYMTSALG ITAGAH
Bovino	121	RLWSHRTYKARLPLR VFLIIIGNTMAFQNDV FEWSRDHRAHHKFSETDADP HNSRRGFFFS
Maiale	121	RLWSHRTYKARLPLR VFLIIANTMAFQNDV YEWARDHRAHHKFSETDADP HNSRRGFFFS
Uomo	121	RLWSHRSYKARLPLR LFLIIANTMAFQNDV YEWARDHRAHHKFSETHADP HNSRRGFFFS
Capra	121	RLWSHRTYKARLPLR VFLIIANTMAFQNDV FEWSRDHRAHHKFSETDADP HNSRRGFFFS
Pecora	121	RLWSHRTYKARLPLR VFLIIANTMAFQNDV FEWSRDHRAHHKFSETDADP HNSRRGFFFS
Topo	117	RLWSHRTYKARLPLR IFLIIANTMAFQNDV YDWARDHRAHHKFSETHADP HNSRRGFFFS
Bovino	181	HVGWLLVRKHPAVKEKSTLNLSDLRAEKLVMFQRRYYKPGVLLLCFILPTLVPWYLWDE
Maiale	181	HVGWLLVRKHPAVKEKG GLLN MSDL KAE KLVMFQRRYYKPG ILLM CFILPT IV WPWY CWGE
Uomo	181	HVGWLLVRKHPAVKEKSTL DLSDLE AEKLVMFQRRYYKPG LLL MCFILPTLVPWY FWGE
Capra	181	HVGWLLVRKHPAV REK ATL DLSD LRAEKLVMFQRRYYKPGVLLLCFILPTLVPWYL WGE
Pecora	181	HVGWLLVRKHPAV REK ATL DLSD LRAEKLVMFQRRYYKPGVLLLCFILPTLVPWYL WGE
Topo	177	HVGWLLVRKHPAVKEKG GKLD MSDL KAE KLVMFQRRYYKPG LLL MCFILPTLVPWY CWGE
Bovino	241	TFQNSLFFATLFRYALGLNVTWLVNSAAHMYGYRYPYDKTINPRENIVSLG AVGEGFHNY
Maiale	241	AFP QSLF VATFL RYA IV LNATWLVNSAAH LY GYRYPYDKT IS PRENIVSLG AVGEGFHNY
Uomo	241	TFQNS V F VATFL RYA VV LNATWLVNSAAH LF GYRYPYDK NI S PREN IVSLG AVGEGFHNY
Capra	241	TFQNSLFFATL LL RYA VV LNATWLVNSAAHMYGYRYPYDKTINPRENIVSLG AVGEGFHNY
Pecora	241	S FQNSLFFAT FL RYA VV LNATWLVNSAAHMYGYRYPYDKTINPRENIVSLG AVGEGFHNY
Topo	237	TFVNSL FV ST FL RY TL VLNATWLVNSAAH LY GYRYPYDK NI Q S RENIVSLG AVGEGFHNY
Bovino	301	HHTFPYDYSASE YRWHINFTTFFIDCMAAIGLAYDRKKVSKAAAILARIKRTGEESYKSG
Maiale	301	HHTFPYDYSASE YRWHIN L TFFIDCMAA L GLAYDRKKVSKAAAILARIKRT G DESYKSG
Uomo	301	HS FPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAA L GLAYDRKKVSKAAAILARIKRT G D GN YKSG
Capra	301	HHTFPYDYSASE YRWHINFTTFFIDCMAAIGLAYDRKKVSKAA AV LAR M KRTGEES CK SG
Pecora	301	HHTFPYDYSASE YRWHINFTTFFIDCMAAIGLAYDRKKVSKAA AV L GR MKRTGEESYKSG
Topo	297	HHTFP F DY SASE YRWHINFTTFFIDCMAA L GLAYDRKKVSKA TV LARIKRT G D G SH KS S

Fig. 4.8: Aplotipi del gene *scd* a livello del 5° esone. Le lettere in grassetto indicano i nucleotidi della regione esonica. Le lettere evidenziate di gialle rappresentano i siti dei tre SNP.

```

Aplotipo V
10081 tgtgatctctcaatgcagggtactacaaacctgggtgcctggtggtgcttcacctgcc
10141 cacactcgtggccatggtatctgtgggatgaaacgtttcaaaacagcctgtttttgccac
10201 cttattccgttagcccttgggctcaacgtcacctggctggtgaatagtgctgcccatat
10261 gtatggataccgcccttatgacaagaccatcaacccccgagagaatattctggtttccct
10321 gggagctggggtaagtcagcagtcccacagcaagaccacgtctagtggtctgctgctgcttag

Aplotipo A
10081 tgtgatctctcaatgcagggtactacaaacctgggtgcctggtggtgcttcacctgcc
10141 cacactcgtggccgtggatctgtgggatgaaacgtttcaaaacagcctgtttttgccac
10201 cttattccgttagcccttgggctcaacgtcacctggctggtgaatagtgctgcccatat
10261 gtatggataccgcccttatgacaagaccatcaacccccgagagaatattctggtttccct
10321 gggagctggggtaagtcagcagtcccacagcaagaccacgtctagtggtctgctgctgcttag

```

4.7 SCD negli ovini

Lo studio sulla SCD degli ovini non è stato così approfondito come quello condotto sui bovini. Il gene è localizzato sul cromosoma 22q21 (Bernard et al., 2001).

Ward et al. nel 1998 sono riusciti ad isolare e sequenziare il cDNA da individui di razza Finn Dorset. La sequenza ha mostrato un'omologia del 64% e del 58% con SCD1 e SCD2 di topo rispettivamente, a livello della regione 5'UTR; valori pressoché identici sono stati rilevati nella regione 3'UTR (Ward et al., 1998). L'assenza del tratto poli-A e motivi di poliadenilazione all'estremità 3', suggeriscono che la sequenza di cDNA riportata sia incompleta, soprattutto nella regione 3'UTR (Bernard et al., 2001).

La SCD ovina manifesta un'espressione, decisamente ubiquitaria, anche se i tessuti che mostrano un maggiore livello di mRNA sono il tessuto adiposo, il fegato e la ghiandola mammaria durante il periodo lattazione (Ward et al., 1998).

4.8 SCD nei caprini

Lo studio della SCD caprina, al pari di quella degli ovini, non è stato così approfondito come quello dei bovini e dei topi.

Alcuni studi hanno permesso di individuare e sequenziare il cDNA, estratto a livello della ghiandola mammaria (N° di accesso alla GeneBank AF325499) (Bernard et al., 2001).

L'omologia della sequenza del cDNA di capra è molto alta con quelle degli ovini, dei bovini e dei suini, mentre è piuttosto bassa con quelle di uomo e di topo (Bernard et al., 2001). Pur non conoscendo la sequenza completa del gene, è stato ipotizzato che siano presenti cinque introni e sei esoni, secondo la struttura già individuata nei topi, nell'uomo e nei bovini (Bernard et al., 2001).

Il gene SCD è posizionato sul cromosoma 26q21, l'individuazione è stata possibile grazie alla tecnica dell'ibridazione *in situ* (FISH) (Bernard et al., 2001).

Il trascritto del gene *scd* caprino è lungo 5,1 kb con una ORF di 1080 nucleotidi e la 3'UTR di 3,8 kb (Bernard et al., 2001).

Bernard et al. (2001) hanno rilevato la presenza di un polimorfismo a livello della regione 3'UTR. Al contrario della SCD bovina, in questo caso non si tratta di SNP, ma della presenza o assenza del motivo trinucleotidico TGT, posto tra il 3178 e il 3180 bp (Bernard et al., 2001).

4.9 SCD nei suini

Il gene *scd*, nel maiale, è localizzato a livello del cromosoma 14 (Ren et al., 2004). Sino ad oggi, si conosce la sequenza del cDNA, depositata in banca dati con il numero d'accesso AY487829.

Il cDNA è lungo 5134 bp, con una ORF di 1080 bp che codifica per una proteina di 359 aminoacidi, come nelle altre specie considerate. La regione 3'UTR è insolitamente lunga anche nel maiale con una lunghezza di 3848 bp; nella stessa sono stati individuati due siti di poliadenilazione (AATAAA) e quattro motivi pentanucleotidici di destabilizzazione dell'RNA (ATTTA) (Ren et al., 2004).

Il confronto della sequenza suina con quelle delle altre specie, ha mostrato un'elevata similarità con il cDNA di capra (82%) e bovino (77%), mentre con quello umano e murino non si supera il 60% (Ren et al., 2004).

La sequenza aminoacidica ha un alto grado di similarità con quelle delle altre specie, in particolar modo nelle tre regioni ricche di istidine (vedi Fig.9).

Ren et al. (2004) hanno individuato 5 siti polimorfici nella sequenza del cDNA: uno nella 5'UTR e quattro nella 3'UTR. I polimorfismi sono tutti SNP: G→C (nucleotide 1423), C→T (nucl. 16418), A→G (nucl. 16617), A→G (nucl. 16623), T→C (nucl. 16663).

MATERIALI E METODI

1 CAMPIONAMENTO

La prova è stata condotta su 297 campioni di latte individuale di vacche di razza Frisona Italiana. I campioni di latte sono stati prelevati durante la mungitura del mattino, in 32 aziende (9.81 ± 6 vacche per azienda), localizzate in tre province del Veneto (Venezia, Padova e Treviso) (tabella 5.1). I campioni sono stati conservati a -20°C sino al momento dell'estrazione dei lipidi, dell'analisi degli acidi grassi e dell'estrazione del DNA.

Tab. 5.1: Elenco delle aziende dove è stato condotto il campionamento.

Codice Aziendale	Località	Provincia	Data Campionamento	N° individui campionati
2010103	Carmignano di Brenta	Padova	04/02/2004	16
2010147	Carmignano di Brenta	Padova	18/05/2004	12
2011005	S. Pietro in Gù	Padova	08/06/2004	8
2012014	Grantorto	Padova	23/03/2004	8
2012040	Grantorto	Padova	25/02/2004	3
2014020	Piazzola sul Brenta	Padova	02/04/2004	16
2014028	Piazzola sul Brenta	Padova	10/03/2004	7
2015028	Villafranca Padovana	Padova	19/02/2004	4
2015030	Taggì di Sopra	Padova	05/02/2004	19
2015118	Pramaggiore	Venezia	05/03/2004	6
2022540	S. Giorgio in Bosco	Padova	20/04/2004	22
2023521	S. Giustina in Colle	Padova	08/04/2004	8
2023922	Villa del Conte	Padova	14/05/2004	14
2024026	Loreggia	Padova	02/04/2004	10
2035015	Padova	Padova	07/04/2004	12
2036005	Polverara	Padova	26/05/2004	7
2036703	S. Angelo di Piove di Sacco	Padova	15/06/2004	8
2037714	Codevigo	Padova	04/06/2004	6
2040101	Rovolon	Padova	16/03/2004	16
2210411	Treviso	Treviso	15/06/2004	9
2211605	Casale sul Sile	Treviso	20/02/2004	23
2213618	Monastier di Treviso	Treviso	24/02/2004	17
2215606	Preganziol	Treviso	20/07/2004	4
2224809	S. Zenone degli Ezzellini	Treviso	15/07/2004	1
2232002	Riese Pio X	Treviso	20/07/2004	7
2250423	Montebelluna	Treviso	05/04/2004	2
2250487	Montebelluna	Treviso	30/04/2004	6
2261209	Chiarano	Treviso	12/02/2004	5
2261211	Fossalta di Chiarano	Treviso	16/03/2004	2
2321503	Eraclea	Venezia	30/03/2004	9
2345101	Spinea	Venezia	20/01/2004	7
2350101	Mira	Venezia	07/05/2004	3
totale				297

Gli individui considerati appartengono a 21 famiglie di mezze sorelle, figlie di altrettanti tori. Per ogni toro erano disponibili mediamente 14 ± 2 figlie, di cui sono stati annotati ordine e data di parto.

2. DETERMINAZIONE DEL POLIMORFISMO

2.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto dalle cellule somatiche del latte.

L'estrazione è stata condotta utilizzando il kit GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Per la procedura d'estrazione è stato seguito il protocollo previsto dal kit, con alcune modifiche legate alla complessità del materiale su cui si è lavorato. Infatti, alcuni campioni di latte contenevano del sangue, quindi è stato preferibile operare una lisi degli eritrociti.

Il protocollo applicato è il seguente: in una provetta Eppendorf da 1.5 mL, sono stati aggiunti 300 µL di latte e 800 µL della soluzione di lisi (componente del kit: 10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA). La miscela ottenuta è stata incubata a temperatura ambiente per 5 min, quindi centrifugata a 11300 xg per 1 min. Il surnatante è stato eliminato, mentre il pellet di cellule è stato risospeso nel fluido residuo mediante agitazione con vortex. Alla provetta sono stati aggiunti 500 µL di soluzione di estrazione (componente del kit: soluzione tampone contenente sostanze caototrope e detergenti) ed il tutto è stato incubato a temperatura ambiente per 5 min. Successivamente, la miscela è stata trasferita su una colonna GFX e centrifugata a 4000 xg per 2 min. Il DNA presente sulla colonna è stato lavato una prima volta con 500 µL della soluzione di estrazione e, successivamente, con 500 µL della soluzione di lavaggio (componente del kit: tampone di Tris-EDTA diluito con alcol etilico). Entrambe le fasi sono state seguite da una centrifugazione a 11300 xg della durata di 4 min. Infine, la colonna è stata nuovamente centrifugata a 4000 xg per 2 min., per eliminare l'eccesso dei tamponi di lavaggio. La colonna GFX è stata trasferita in una provetta da 1.5 mL nuova, quindi sono stati aggiunti 100 µL della soluzione di diluizione riscaldata a 70°C, per recuperare il DNA presente sulla matrice fibrosa della stessa. Dopo 1 minuto d'incubazione a temperatura ambiente, la colonna è stata centrifugata a 5000 x g per 1min. per raccogliere il DNA nella provetta.

2.2 Amplificazione del frammento d'interesse.

Il frammento d'interesse scelto per la genotipizzazione della SCD comprende il quinto esone del gene, dove sono presenti i tre SNP che costituiscono i due aplotipi A e V (figura 4.7).

L'amplificazione è stata fatta con la reazione di PCR in un termociclatore (GeneAmp PCR 9600; Perkin Elmer Life Sciences) nelle seguenti condizioni: un preriscaldamento a 94°C per 5 min, seguito da 30 cicli di 94°C per 45 sec, 56°C per 45 sec e 72°C per 1 min. Il ciclo finale è stato seguito da un'estensione a 72°C per 7 min.

La miscela della reazione era costituita dai seguenti componenti:

Componente	Concentrazione	Volume
2X PCR Master Mix (Fermentas International Inc., Burlington, Canada)	<i>Taq</i> DNA Polymerasi 0.05 unità/μL, MgCl ₂ 4mM e dNTP 0.4 mM di ognuno	12.5 μL
Primer Forward	10 pmol/ μL	0.5 μL
Primer Reverse	10 pmol/ μL	0.5 μL
DNA	250 ng	X μL
ddH ₂ O	-	Y μL
Volume finale		25 μL

Legenda: X indica i μL della soluzione di DNA che permettono di aggiungere alla miscela 250 ng di templato (il volume può variare di volta in volta). Y indica il volume di ddH₂O necessaria per portare a volume la miscela; varia in funzione di X.

I primer specifici per l'amplificazione, sono stati disegnati a partire dalla sequenza del gene *scd* bovino presente in banca dati (N° d'accesso AY241932) (figura 5.1).

I primer disegnati sono stati i seguenti:

Nome	Sequenza
<i>SCD-9848F</i>	5'-CAGTCCTTGCTCCACCACTT-3'
<i>SCD-10572R</i>	5'-AGCATTTGTGGCTTGCTCTT-3'
<i>SCD-9961F</i>	5'-CCCATTCGCTCTTGTCTGT-3'
<i>SCD-10355R</i>	5'-GTCTTGCTGTGGACTGCTGA-3'

Fig. 5.1: Posizione dei quattro primer all'interno della sequenza del gene SCD. La parte in grassetto indica la regione del V esone

```

9721 gaaaggaagcccaaggcagaa cagaaaacccgggaaggaga actcagtctgtaatttg
9781 gaccctgtctatttccctgaagtagtaaaagagagcaatggatttagagtcaaggagatga

          SCD-9848F
          ----->
9841 aacattccagtccttgctccaccacttcctggtagtgtagccctagaaaagtcatttaac
9901 ccctcat tacctcatctcagaagtagataataaacacgtgattctcagaaaaattccttg

          SCD-9961F
          ----->
9961 ccatttcgctcttgctgctgctgccacactgtgctctcagtgtagaaagggaagcagcc
10021 ccgcctgtgagagtggaataacaggtaggctcagcgtccctctccaactcactgagcc
10081 tgtgatctctcaatgcaaggtactacaaacctggtgctctggttgcttccatcctgccc
10141 cacactcgtgccatggtatctgtgggatgaaacgcttcaaacagcctgcttcttggccac
10201 cttattcggttatgcccttgggctcaacgtcacctggtggtgaatagtgctgcccatat
10261 gtatggataccgccccttatgacaagaccatcaacccccgagagaaatattctggttcccct

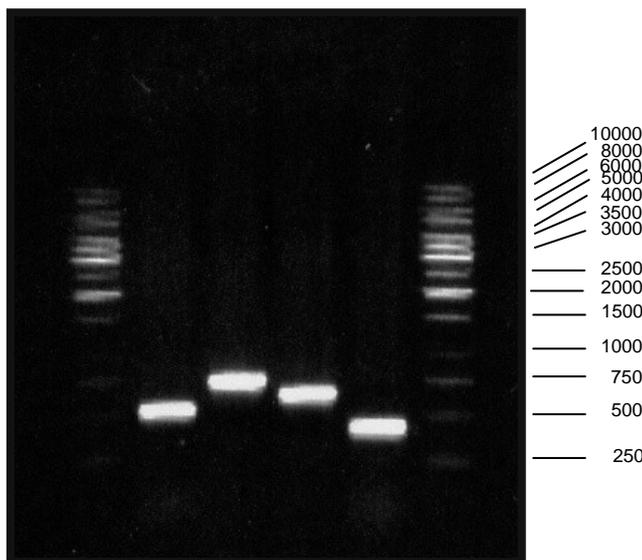
          SCD-10355R
          <-----
10321 gggagctgcgggt aagtcagcagtccacagcaagaccacgtctagtggctgctgcttag
10381 ggta ttagggt tacgtgccagaaaa ctagat tta cctg tttatgacccctctccata tg
10441 tcat tccactataaaa ctaagggacagtagtaga aaa ccc ttgaaagttaagcaacaagt

          <-----
10501 cctatgtaaagagaaaaagggtgaaaaaatgacaatgcc ttt aat tccaggttt aagagcaa

          SCD-10572R
          -----
10561 gccacaaatgcta tgtatgatgaacccttgggctgttctctcccagtcactctctgat

```

Fig. 5.2: Prodotti della PCR ottenuti dalla combinazione dei quattro primer: linea 1 e 6 GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, linea 2 prodotto SCD-9848F/SCD-10355R (508 bp), linea 3 prodotto SCD-9848F/SCD-10572R (725 bp), linea 4 prodotto SCD-9961F/SCD-10572R (612 bp), linea 5 prodotto SCD-9961F/SCD-10355R (395 bp).



I quattro primer sono stati combinati tra loro in modo da determinare il prodotto di amplificazione ottimale, da adottare nella metodiche di genotipizzazione (figura 5.2).

2.3 PCR-SSCP

La determinazione del polimorfismo, a livello del quinto esone del gene *scd*, è stata fatta con la metodologia SSCP.

È stata scelta questa tecnica perché è semplice, veloce e garantisce la genotipizzazione di un gran numero di campioni contemporaneamente. La SSCP permette di distinguere due alleli che differiscono tra loro per uno o più nucleotidi, sulla base della capacità dei singoli filamenti di ripiegarsi su se stessi. Questa caratteristica dipende dalla sequenza nucleotidica del filamento ed è sufficiente la variazione di unico nucleotide per farla modificare.

Le molecole di DNA vengono degradate a singoli filamenti mediante riscaldamento a temperature prossime ai 100°C. La diversa struttura tridimensionale dei filamenti, può essere rilevata con una corsa su gel di poliacrilamide, sfruttando la diversa motilità degli stessi (figura 5.3).

Per l'esecuzione della SSCP è stato seguito il protocollo messo a punto da Ceriotti et al. (2004). Il prodotto di 725 bp, ottenuto dalla combinazione dei primer SCD-9848F/SCD-10572R, è stato scelto per la determinazione del polimorfismo.

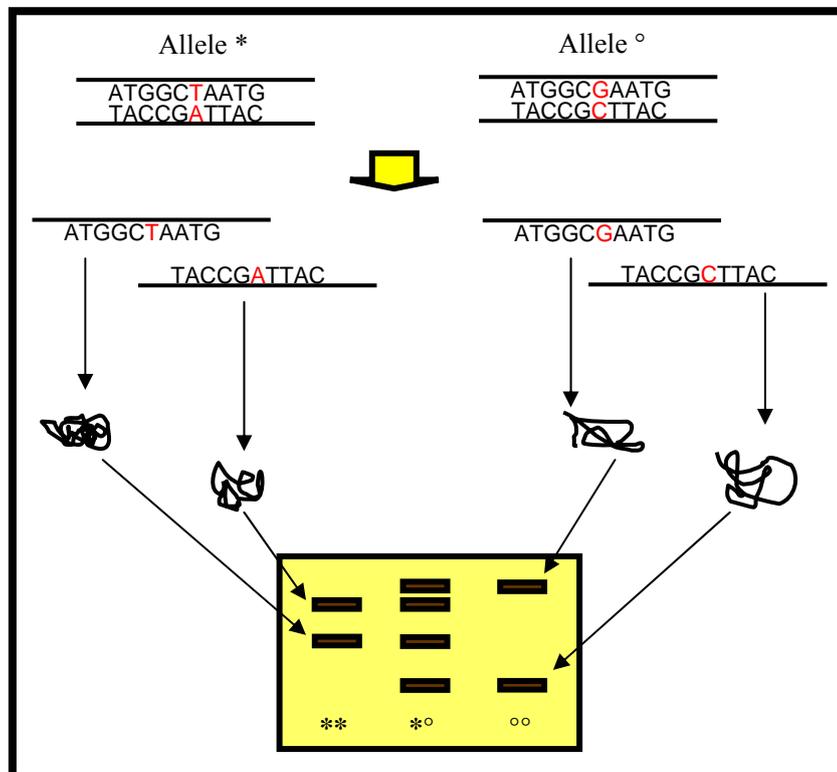
I campioni sono stati denaturati aggiungendo 6 µL della miscela di PCR a 8 µL della soluzione denaturante (0.025% di xilene-cianolo, 0.025% di blu di bromofenolo, e 0.02 M EDTA in formammide deionizzata). La miscela è stata incubata a 95°C per 8 min, quindi posta immediatamente in ghiaccio per impedire il riappaiamento dei singoli filamenti di DNA. I campioni denaturati sono stati caricati su un gel di poliacrilammide-bisacrilammide (37:1) all'8% con l'aggiunta di glicerolo (1%) e del tampone TBE (0.5X).

La corsa dei campioni nel gel è durata 16 ore con una differenza di potenziale di 280 V alla temperatura di 5°C.

La visualizzazione delle bande, sul gel, è stata fatta mediante la colorazione con nitrato d'argento, seguendo la metodica messa a punto da Bassam et al. (1991) con alcune modifiche:

- **Fissaggio:** i gel sono stati immersi in una soluzione di acido acetico al 10 % per 30 min. in agitazione;
- **Lavaggio:** i residui della soluzione di fissaggio sono stati eliminati con tre lavaggi da 5 min. in H₂O distillata;
- **Colorazione:** i gel sono stati immersi nella soluzione colorante (AgNO₃ (1g/L), formaldeide 37% (1,5 mL /L) e tenuti in agitazione per 30 min. al buio;
- **Sviluppo:** i gel sono stati immersi nella soluzione di sviluppo (Na₂CO₃ (30g/L), formaldeide 37% (1.5 mL/L), Na₂S₂O₃ 5 H₂O (2mg/L)] per 2-5 min. sino alla comparsa delle bande;
- **Stop della colorazione:** la colorazione è stata bloccata immergendo i gel nella soluzione di stop (acido acetico 10 %).

Fig. 5.3: Schema della SSCP



2.4 OLA (Oligo Ligation Assay)-Microarray

Parte dei campioni testati con la PCR-SSCP, sono stati genotipizzati con la metodologia OLA, che permette di distinguere i due alleli sulla base della specifica attività della *Pfu DNA ligasi* (Haegeman et al., 2003).

La genotipizzazione del gene *scd*, mediante questa metodica, è stata inserita in un lavoro più complesso che mirava a determinare il polimorfismo di più *loci* dello stesso individuo. A tal proposito, i prodotti ottenuti con la OLA sono stati ibridati su un chip microarray per essere processati contemporaneamente.

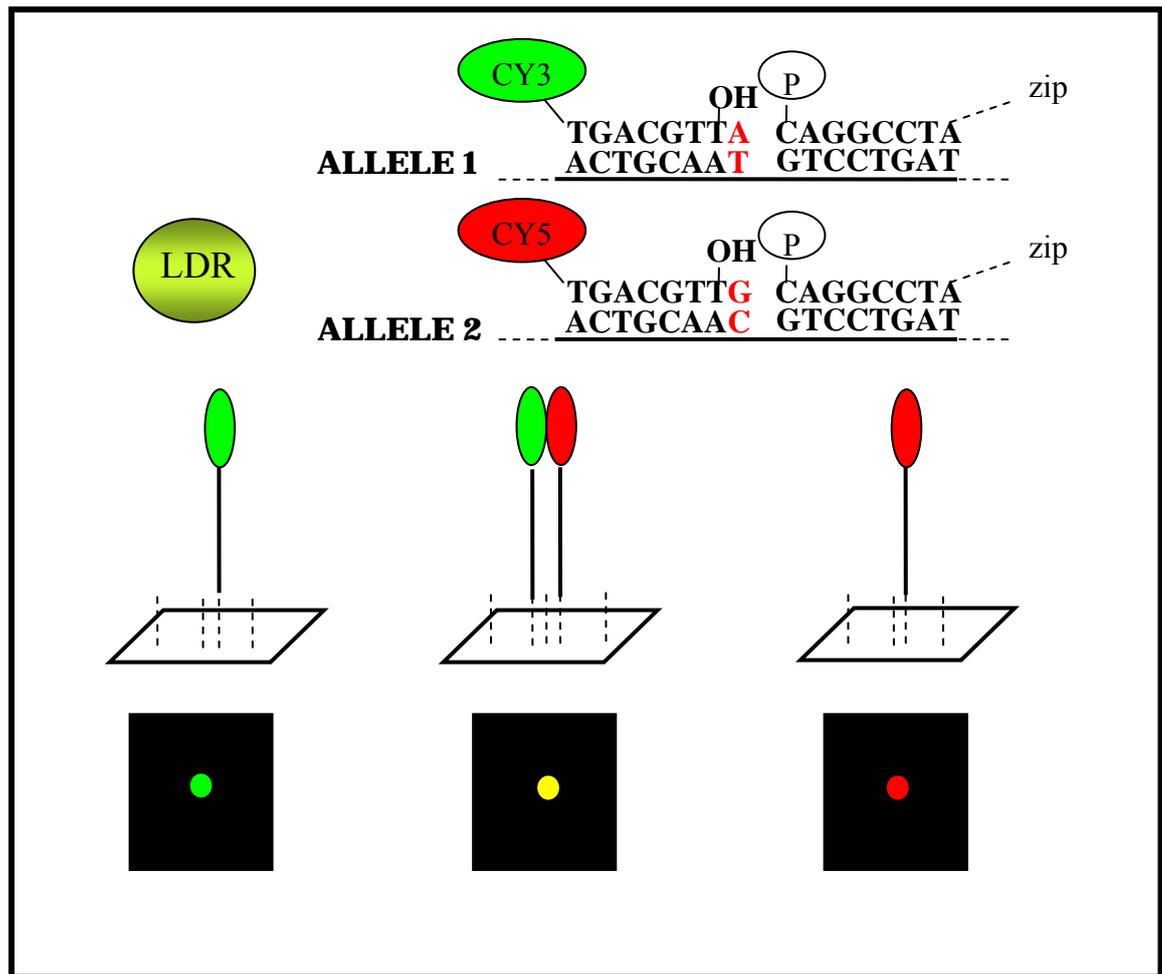
La metodologia OLA si basa sull'utilizzo di tre primer: due DISCRIMINATING PRIMER e un COMMON PROBE. I primi due sono omologhi della regione a monte dello SNP e comprendono come estremità 3', il nucleotide che definisce il polimorfismo; le differenze tra i due primer sono localizzate a livello dell'ultimo nucleotide in 3', (uno dei due nucleotidi che definiscono lo SNP per un primer e l'altro nucleotide per il secondo primer) e all'estremità 5' dove sono legate due differenti sonde (figura 5.4). Le due sonde sono costituite dalla cianina 3 e dalla cianina 5; la prima genera un segnale verde quando eccitata, mentre la seconda dà un segnale rosso.

Il common probe, invece, è omologo della regione a valle dello SNP ed è comune ad entrambe le forme alleliche; in 3' questo oligonucleotide ha una sequenza aggiuntiva, detta zip, che permette l'ancoraggio al chip del microarray (figura 5.4).

La reazione che permette di discriminare un allele dall'altro è detta Ligation Detection Reaction (LDR), catalizzata dalla *DNA ligasi*. L'enzima è in grado di legare il DISCRIMINATING PRIMER con il COMMON PROBE, solo se l'appaiamento del primo sul filamento di DNA è preciso. Pertanto si formerà il costrutto solo se il DISCRIMINATING PRIMER si appaierà con il rispettivo allele, in caso contrario non si avrà la reazione.

I prodotti della LDR vengono ancorati sul chip per essere processati con uno scanner. I due omozigoti sono riconoscibili perché sul chip ci sarà solo uno dei costrutti, quindi si rileverà un segnale verde o rosso, mentre l'eterozigote darà un segnale giallo, derivante dalla presenza di entrambi i prodotti LDR.

Fig. 5.4: Schema della reazione LDR associata con l'ibridazione su chip microarray.



Nel caso specifico, è stato utilizzato uno *Universal Oligonucleotide Array* (UA) secondo il protocollo adottato da Consolandi et al. (2004). Lo UA è un particolare tipo di chip costituito da una serie di oligonucleotidi di sequenza non presente in natura. Questi nucleotidi svolgono la funzione di zip sui quali si ancorerà uno dei prodotti della reazione LDR. Assegnando un oligonucleotide ad ognuno dei polimorfismi da determinare, è possibile genotipizzare più *loci* di un individuo contemporaneamente. La presenza di oligonucleotidi non naturali, rende questo chip universale.

Di seguito sono riportate le condizioni della LDR specifiche del polimorfismo SCD, mentre gli altri non sono stati considerati perché esulano dal lavoro di tesi.

Le sequenze dei due discriminating primer e del common probe sono riportate di seguito, a queste si aggiunge la sequenza dello zip-code che accompagna il common-probe.

Lo zip-code è omologo allo zip numero 37 sullo schema del chip (figura 5.5). I nucleotidi riportati in grassetto nei due discriminating-oligo (SCD-Cy3 e SCD-Cy5) rappresentano il sito omologo allo SNP che si vuole genotipizzare, precisamente i primer sono stati disegnati in riferimento al terzo SNP del quinto esone del gene *scd*, ossia quello che determina la sostituzione aminoacidica:

Nome	Sequenza
<i>SCD-Cy3</i>	5'-CCCCGAGACAATATTCTGGTTTCCCTGGGAGCTGC-3'
<i>SCD-Cy5</i>	5'-CCCCGAGAGAATATTCTGGTTTCCCTGGGAGCTGT-3'
<i>SCD-common probe</i>	5'-GGGTAAGTCAGCAGTCCACAGCAAGACCACGTCT-3'
<i>Zip-code</i>	5'-GTATTGGTGCTCGAGTCCGGCACGA-3'

La miscela per la reazione LDR è costituita dai seguenti componenti:

Componente	Concentrazione	Volume
Oligomix	SCD-zip (1 pmol/μL); SCD-Cy3 (1 pmol/ μL); SCD-Cy5 (1 pmol/ μL); templ. Sink czip (1 pmol/ μL); templ. Sink Cy3 (1 pmol/ μL); templ. Cy5 (1 pmol/ μL)	1 μL
Buffer <i>Pfu</i> ligasi	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 0.1% NP4O, 0.01 mM ATP, 1 mM dithiothreitol	2 μL
DNA	40 femtomol	X μL
<i>Pfu</i> ligasi	4 U/μL	1 μL
ddH ₂ O	-	Y μL
Volume finale		20 μL

Legenda: templ. Sink czip, templ. Sink Cy3, templ. Sink Cy5 sono i primer di un template di controllo.

La reazione LDR è stata fatta ponendo la miscela in un termociclatore (GenAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Foster City, CA) alle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 2 min seguita da 30 cicli di 94°C di 30 sec e 65°C di 4 min. Il ciclo finale è stato seguito da un periodo di incubazione di 10 min a 4°C. Il prodotto LDR è stato immediatamente messo a -20°C.

La fase successiva è stata la reazione di ligazione che permette di preparare il prodotto della LDR all'ibridazione sul chip. In aggiunta ai templati è stata disegnata una coppia di "probe" che si legano al template sintetico di controllo (templ. Sink). Questa coppia di probe forma un prodotto finale di 50 bp (5'-AGCCGCGAACACCACGATCGACCGGCGCGCAGCTGCAGCTTGCTCATG-3') ed è utilizzata come controllo positivo della reazione di ligation. Il controllo si legherà allo zip-code 66 (5'-GTTACCGCTGGTGCTGCCGCCGGTA-3') (figura 5.5).

La miscela di ligazione è costituita dai seguenti componenti:

Componente	Concentrazione	Volume
LDR mix	-	20 μ L
SSC	20X	16.3 μ L
DNA di sperma di salmone	10 mg/ml	0.7 μ L
Cy3 Compl. 66+63	1 pmol/ μ L	1 μ L
Cy5 Compl. 66+63	1 pmol/ μ L	1 μ L
ddH ₂ O	-	26 μ L
Volume finale		65 μL

Legenda.: DNA di sperma di salmone funge da carrier per far precipitare gli oligo. Compl. 66 e 63 sono templati particolari che si legano ai vertici del chip con la funzione di permettere di delimitare il chip.

La miscela di ligazione è stata incubata a 94°C per 2 min, quindi è stata subito messa in ghiaccio.

Il prodotto finale di queste reazioni è stato distribuito su un vetrino portaoggetti dove è presente il chip per l'ibridazione. La reazione è avvenuta mediante immersione del chip in una soluzione SSC 1X e SDS 0.1% a 65°C per 2 h.

Per la preparazione del UA, sono stati scelti zip-code già utilizzati da Consolandi et al. (2004).

Queste sequenze sono state modificate, aggiungendo all'estremità 5' una coda poli(A) di dieci nucleotidi, quindi sono state disciolte in una soluzione tampone 100 mM di fosfato (pH 8.5) ad una concentrazione finale di 50 μ M. Ogni zip-code è stato inserito su un vetrino Codeslink slide (Amersham Biosciences Europe GmbH, Milano, Italy) in 4 ripetizioni, da un *pink contact arrayer* (Microgrid II Compact, BioRobotics, Cambridge, UK) ossia una macchina munita di un braccio

robotizzato, capace di disporre in maniera precisa i vari zip-code, secondo lo schema definito. La distribuzione degli zip-code è riportata in figura 5.5.

Su ogni vetrino sono stati preparati 8 chip costituiti da 208 zip-code così distribuiti: 8 zip per il template “66”, 6 per il controllo col template “63”, 6 vuoti come bianco (B), 47 per altrettanti *loci* ripetuti in 4 copie.

Il segnale di fluorescenza è stato misurato con un ScanArray Lite laser scanning system ed elaborato con il software ScanArray Express Microarray Analysis System 2.1 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA).

La determinazione della presenza dei costrutti con Cy3 è stata fatta colpendo il chip con il laser verde (λ_{ex} 543 nm/ λ_{em} 570 nm), mentre quelli con Cy5 sono stati rilevati mediante un laser rosso (λ_{ex} 633 nm/ λ_{em} 670 nm).

Per l'analisi degli spot è stata acquisita l'immagine nel formato TIFF ed elaborata, successivamente, con il software Scan-Array Express Microarray Analysis System secondo il metodo di quantificazione scelto, ossia il “fixed circle” adottato da Chessa et al. (2007) nel loro lavoro, applicando i seguenti calcoli:

1. da ogni spot è stato sottratto l'intensità del background;
2. dei quattro spot sono stati calcolati la media e il coefficiente di variazione sia per il canale di Cy3 che per quello di Cy5;
3. per definire il genotipo è stata calcolata la frazione allelica (AF) per valutare la quantità relativa dell'allele V (marcato con Cy3) rispetto all'allele A (marcato con Cy5). $AF = Cy3 / (Cy3 + Cy5)$. È stato assegnato il genotipo VV quando il valore di AF era prossimo a 1 (visto che si aveva il solo il segnale verde), il genotipo AA quando AF era prossimo a zero, mentre gli individui AV comportavano un valore AF pari a 0.5

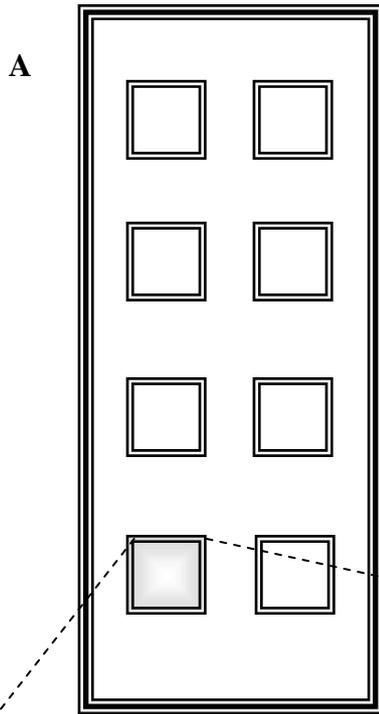


Fig. 5.5: Schema del chip universale utilizzato per la genotipizzazione. Lo schema A riproduce la disposizione degli otto chip sul vetrino porta oggetti. Lo schema B rappresenta la disposizione degli zip di un chip. Il numero 37, evidenziato in rosso, indica gli zip dove ibridizzerà il prodotto LDR della SCD; lo zip 66, in blu è di un templatato di controllo per delimitare il chip e facilitare la lettura, lo zip 63 è di un templatato di controllo positivo, B è uno zip vuoto che funge da bianco.

B

66	63	B	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	B	63	66
6	7	8	9	10	12	14	15	6	7	8	9	10	12	14	15
16	17	18	19	20	21	22	23	16	17	18	19	20	21	22	23
24	27	28	29	31	32	33	34	24	27	28	29	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	42	35	36	37	38	39	40	41	42
44	1B	3B	5B	11B	13B	15B	21B	44	1B	3B	5B	11B	13B	15B	21B
66	63	B	1	2	3	23B	25B	23B	25B	1	2	3	B	63	66
4	5	6	7	8	9	10	12	4	5	6	7	8	9	10	12
14	15	16	17	18	19	20	21	14	15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	27	28	29	31	32	22	23	24	27	28	29	31	32
33	34	35	36	37	38	39	40	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	44	1B	3B	5B	11B	13B	41	42	44	1B	3B	5B	11B	13B
66	63	B	66	15B	21B	23B	25B	15B	21B	23B	25B	66	B	63	66

2.5 Sequenziamento del DNA

Campioni di DNA che hanno mostrato un diverso bandeggio con la PCR-SSCP, sono stati sequenziati per avere un'ulteriore conferma della natura del polimorfismo individuato. È stato scelto un campione, in maniera casuale, per ogni tipo di polimorfismo supposto.

I primer utilizzati per il sequenziamento sono stati gli stessi della PCR SSCP. I prodotti della PCR sono stati sequenziati dalla PRIMM srl di Milano. Le sequenze sono state analizzate con il software Chromas 2.2.4 (Technelysium Pty Ltd.).

3 DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

3.1 Estrazione dei lipidi totali dal latte

La frazione dei lipidi totali dal latte è stata estratta adottando il Metodo Rose-Gottlieb (A.O.A.C., 1990), modificato da Secchiari et al. (2003): si aggiungono 0.4 mL di ammoniaca 25%, 2 mL di etanolo assoluto e 5 mL di esano a 2 g di latte. La miscela viene centrifugata per 15' a 1500 rpm a 2°C dopo una breve agitazione con *vortex*. La fase superiore viene raccolta in un pallone, mentre sul resto si ripete un secondo lavaggio con 1 mL di etanolo assoluto e 5 mL di esano. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 15' la fase superiore si raccoglie e si aggiunge nel pallone con quella ripresa nel primo lavaggio. Si ripete una terza estrazione aggiungendo 5 mL di esano; il campione viene centrifugato nuovamente e la fase superiore si raccoglie e si aggiunge alle precedenti. L'estratto viene essiccato con evaporatore rotante in un bagno a 35°C, quindi pesato e disciolto in esano ad una concentrazione finale di 15 mg/mL circa.

3.2 Analisi al Gas-cromatografo

L'estratto lipidico è stato sottoposto a *trans*-esterificazione con metilato sodico in soluzione 0.5N secondo la metodologia messa a punto da Christie (1982). L'estere metilico dell'acido nonadecanoico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) di concentrazione nota, è stato aggiunto come standard interno.

La composizione degli acidi grassi a media (MCFA) e lunga catena (LCFA) è stata determinata mediante gas-cromatografia, utilizzando il gas-cromatografo ThermoQuest (Milano, Italia) munito di FID e colonna capillare polare (Chrompack CP-Sil 88 Varian, Middelburg, Netherland, 100 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.20 μ m). Come carrier è stato scelto l'elio con un flusso di 1 mL/min. Il rapporto di split è 1:100.

Il programma del gas-cromatografo, adottato per l'analisi, prevede le seguenti condizioni di tempo e temperatura: la temperatura del forno è programmata a

120°C e tenuta costante per 1 min, quindi incrementa di 5°C al minuto sino a raggiungere i 180°C che vengono mantenuti costanti per 18 minuti; successivamente la temperatura incrementa di 2°C al minuto sino a raggiungere i 230°C, dopo un minuto si ha un nuovo incremento a 230°C con un tasso di 2°C/min. La temperatura si mantiene costante in queste condizioni per 19 minuti. L'iniettore e il detector sono stati programmati ad una temperatura di 270°C e 300°C rispettivamente.

Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono individuati confrontando il cromatogramma dei campioni con quello di una miscela di 37 FAME (Supelco, Bellefonte PA, USA) noti usati come standard.

Per l'identificazione dei PUFA è stata utilizzata una miscela costituita da isomeri non coniugati dell'acido linoleico, *cis*-5,8,11,14,17 C_{20:5}, *cis*-4,7,10,13,16,19 C_{22:6} (Supelco, Bellefonte, PA, USA), *cis*-6,9,12 C_{18:3} and *cis*-9,12,15 C_{18:3} (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA, USA).

L'identificazione degli isomeri del C_{18:1} si è basata sull'utilizzo di una miscela commerciale (Supelco, Bellefonte PA, USA) e sul confronto con il profilo isomerico pubblicato in letteratura da Wolff et al. (1995).

Il calcolo delle quantità degli acidi grassi è stato effettuato confrontando le aree dei rispettivi picchi degli acidi grassi con quella dello standard interno (acido nonadecanoico) considerando unitario il fattore di risposta. La composizione degli acidi grassi è espressa in g/100g di grasso.

4 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DESATURASICA MAMMARIA

Il sistema più efficace per determinare l'attività della desaturasi è quello di quantizzare il contenuto di RNA nel tessuto, quale indice dell'espressione del gene.

Il metodo ha il grosso problema di essere costoso, dato l'elevato numero di individui da analizzare, ed eccessivamente invasivo. Infatti, questo tipo di analisi richiede una biopsia del tessuto, che potrebbe pregiudicare lo stato sanitario della mammella e la produttività.

In alternativa, è stato scelto un sistema più empirico, ma efficace al tempo stesso, ossia stimare l'attività della SCD calcolando il rapporto tra il prodotto della reazione catalizzata dall'enzima, e il relativo substrato, secondo la formula (4.1) riportata di seguito:

formula 4.1

$$\frac{\text{SCD prodotto}}{\text{SCD prodotto} + \text{SCD substrato}}$$

Il rapporto che si ritiene essere più indicativo dell'attività della SCD è quello tra il C_{14:1} e il C₁₄, dato che sono due prodotti esclusivi della ghiandola mammaria, come confermato in letteratura (Bernard et al., 2006).

Nonostante queste considerazioni, sono stati stimati anche i rapporti degli altri substrati della SCD (C_{16:1}/C_{16:0}; *cis* 9, C_{18:1} /C_{18:0}; *cis* 9, *trans* 11 C_{18:2}/*trans* 11, C_{18:1}), visto che durante la lattazione l'attività della SCD è concentrata quasi esclusivamente a livello mammario.

In aggiunta ai rapporti sopra citati, è stato considerato un ulteriore parametro, ossia l'indice di desaturazione (ID) che rappresenta una media di tutti i rapporti considerati, secondo la formula di Malau-Aduli et al. (1997):

formula 4.2

$$\text{ID} = 100 \times ((\text{C}_{14:1} + \text{C}_{16:1} + \text{C}_{18:1} + \text{cis}9, \text{trans}11 \text{ CLA}) / (\text{C}_{14:1} + \text{C}_{16:1} + \text{C}_{18:1} + \text{cis}9, \text{trans}11 \text{ CLA} + \text{C}_{14:0} + \text{C}_{16:0} + \text{C}_{18:0} + \text{trans}11 \text{ C}_{18:1})).$$

5 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati secondo il seguente modello lineare (SAS, 1999):

$$Y_{ijknwzq} = \mu + \text{azienda}_i + \text{ordine di parto}_k + \text{DIM}_n + \text{stagione}_w + \text{SCD}_z + \text{toro}_q + \varepsilon_{ijknwzq}$$

dove:

- $Y_{ijknwzq}$ = variabile dipendente (latte, acidi grassi e rapporto acidi grassi);
 μ = media generale;
*azienda*_{*i*} = effetto fisso dell' *i*-esima azienda (*i*= da 1 a 32);
*ordine di parto*_{*k*} = effetto fisso del *k*-esimo ordine di parto (*k*= primipare, secondipare, pluripare);
*DIM*_{*n*} = effetto fisso del *n*-esima classe dei giorni di lattazione (*n*= <100; 100-200; >200);
*Stagione di parto*_{*w*} = effetto fisso della *w*-esima stagione di parto (*w*= inverno; primavera; estate; autunno);
*SCD*_{*z*} = effetto fisso del *z*-esimo polimorfismo SCD (*z*= AA; AV; VV);
*toro*_{*q*} = effetto random del *q*-esimo toro padre (*q*=1 to 21);
 $\varepsilon_{ijknwzq}$ = errore casuale.

RISULTATI

1 EFFETTO DEI COMPONENTI DEL MODELLO LINEARE.

Lo stadio di lattazione ha influito significativamente, sul contenuto di MUFA, acido oleico, acido miristico e acido miristoleico. Le vacche che si trovavano nei primi 100 giorni di lattazione, hanno mostrato un maggior contenuto di acido oleico e una minore concentrazione di acido miristico e miristoleico (tabella 6.1). L'ordine di parto e la stagione di parto non hanno determinato, al contrario, nessun effetto significativo sulle variabili considerate.

Tab. 6.1: Effetto dei giorni di lattazione sulla composizione di acidi grassi del latte.

Acidi grassi	Giorni in lattazione			P
	< 100	100-200	> 200	
g/100 g lipidi totali				
C _{14:0}	8.04 ± 0.24 ^A	9.33 ± 0.18 ^B	9.38 ± 0.28 ^B	0.001
C _{16:0}	23.70 ± 0.56	25.09 ± 0.63	24.02 ± 0.44	0.11
C _{18:0}	9.21 ± 0.33	8.43 ± 0.39	8.63 ± 0.25	0.18
<i>trans</i> -11C _{18:1}	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.05	0.80 ± 0.02	0.12
Cis-9 C _{14:1}	0.56 ± 0.03 ^A	0.66 ± 0.04 ^{AB}	0.79 ± 0.02 ^B	0.001
Cis-9 C _{16:1}	1.09 ± 0.04	1.18 ± 0.06	1.25 ± 0.05	0.11
Cis-9 C _{18:1}	18.99 ± 0.44 ^a	17.88 ± 0.54 ^b	17.86 ± 0.35 ^b	0.04
<i>Cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.15
MUFA	21.58 ± 0.42 ^a	20.08 ± 0.48 ^{ab}	19.33 ± 0.40 ^b	0.03

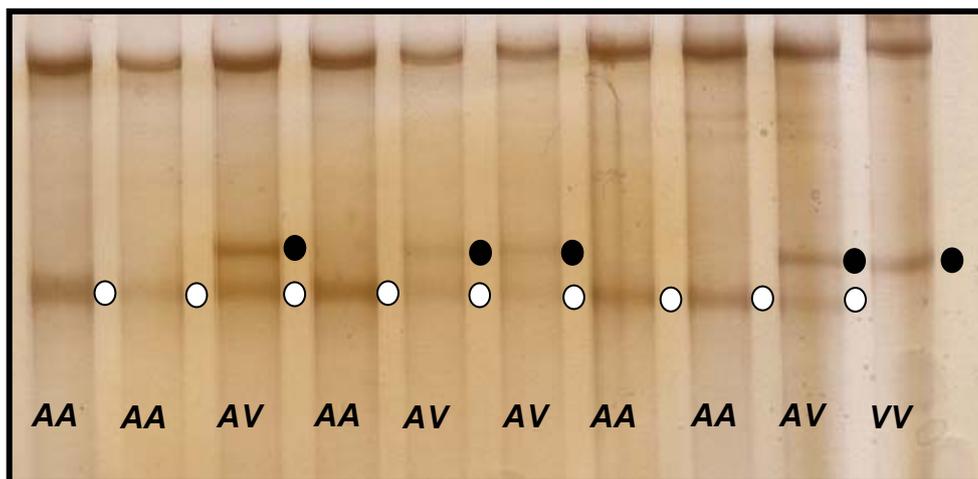
a,b=P<0.05; A,B=P<0.01

2 DETERMINAZIONE DEL POLIMORFISMO DEL GENE SCD

Il polimorfismo del gene *SCD* è stato determinato con la metodologia PCR-SSCP, a livello del quinto esone, dove sono presenti i tre SNP che definiscono i due aplotipi sinora conosciuti (A e V) (figura 4.7).

La figura 6.1 mostra che la distinzione tra i genotipi è legata alla presenza, sul gel, di due bande: gli individui omozigoti sono distinguibili quando si rileva solo una delle due bande (quella superiore per il genotipo VV e quella inferiore per il genotipo AA), mentre il genotipo eterozigote (AV) è caratterizzato dalla presenza contemporanea di entrambe le bande.

Fig. 6.1: PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) per il polimorfismo del gene *scd* a livello del V esone. Il pallino nero indica la banda che definisce l'aplotipo V, mentre quello bianco indica la banda dell'aplotipo A.

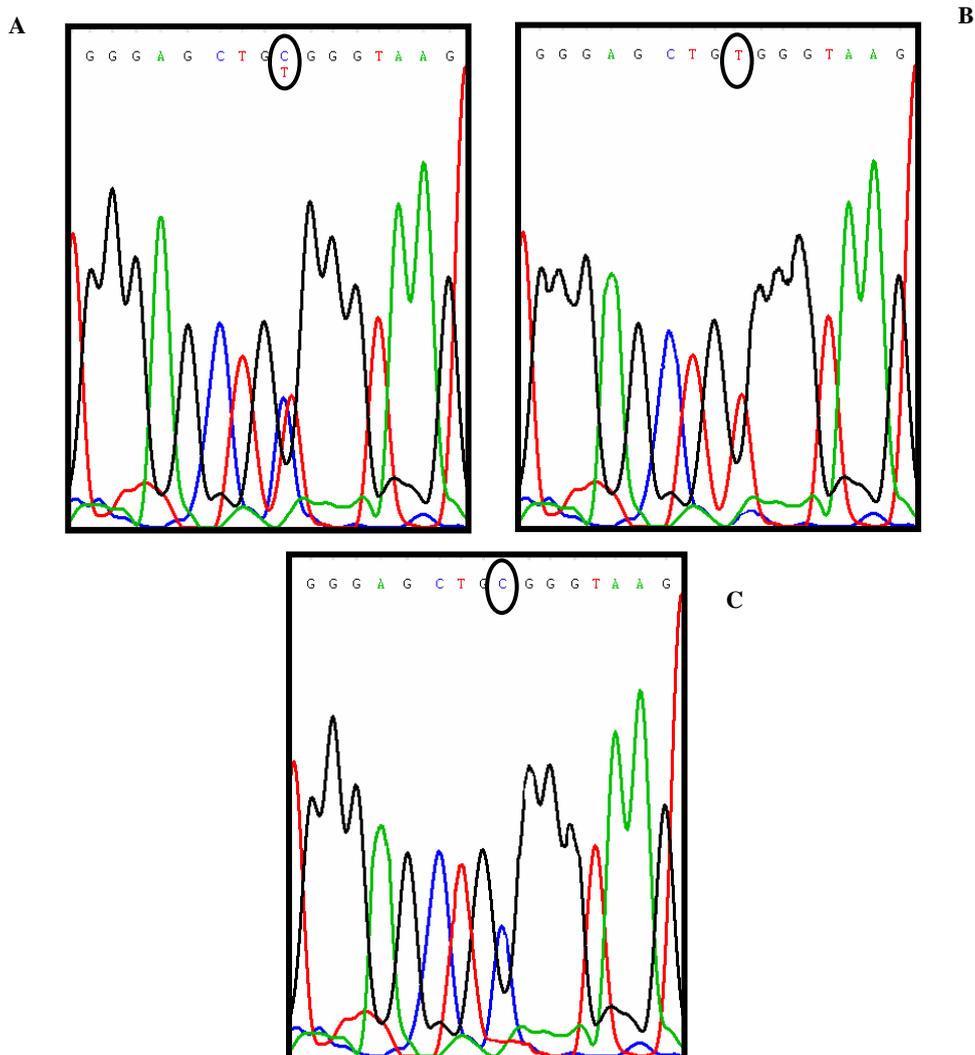


La metodologia PCR-SSCP permette di discriminare un genotipo dall'altro, ma non è in grado di rilevare il tipo di polimorfismo che differenzia un aplotipo dall'altro.

In conformità a queste considerazioni, tre campioni (uno per ogni genotipo rilevato) sono stati sequenziati. I risultati del sequenziamento (figura 6.2) hanno confermato che i polimorfismi, evidenziati con la SSCP, sono dovuti ai tre SNP già riportati in letteratura; inoltre hanno permesso di attribuire con certezza la banda superiore del gel all'allele V e quella inferiore all'allele A. Dal sequenziamento è emerso che i tre SNP vengono ereditati sempre insieme a

conferma della presenza di due soli aplotipi, mentre non sono stati rilevati combinazioni tra gli SNP di un aplotipo e quelli dell'altro; questo dato è in accordo con i risultati ottenuti in precedenti lavori (Taniguchi et al., 2004; Keating et al., 2005).

Fig. 6.2: Risultati del sequenziamento. Nella figura sono riportati i tre elettroferogrammi dei genotipi del locus SCD: AV (A), VV (B), AA (C). Per tutti e tre i casi è stata riportata solo la regione che comprende il secondo SNP, evidenziato dal cerchio nero.



Alcuni dei campioni genotipizzati con la metodologia SSCP, sono stati, a loro volta, testati con la metodologia OLA.

Questa fase, anche se non necessaria, è servita a dare un'ulteriore conferma del polimorfismo, determinato con la SSCP e il sequenziamento. L'utilizzo della metodologia OLA è stato fatto, perché la determinazione del polimorfismo SCD è

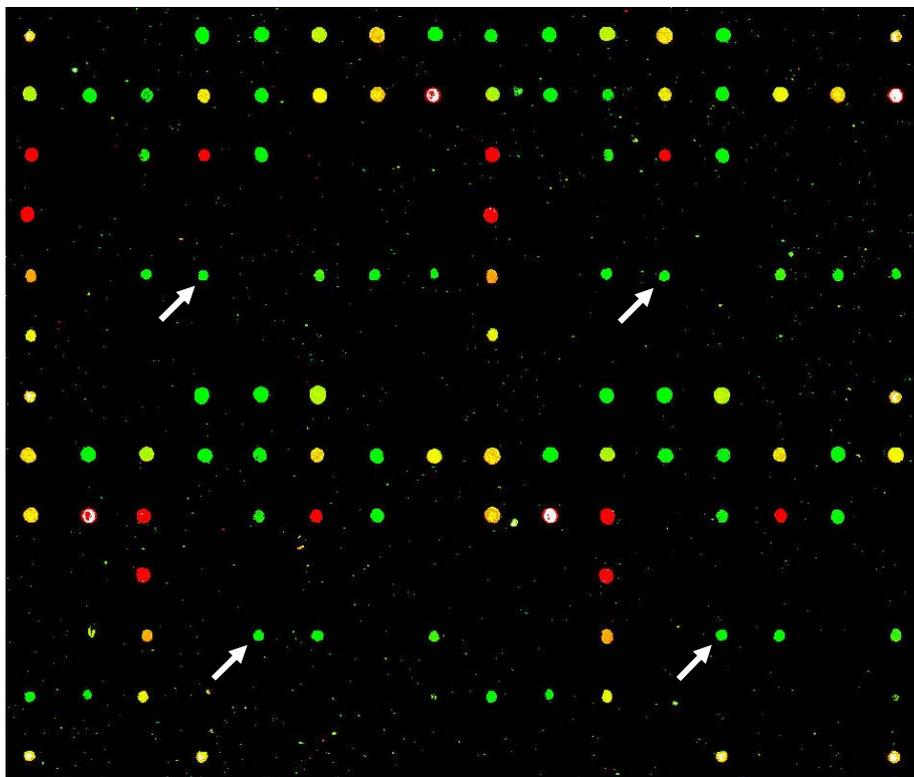
stata inserita in un progetto più ampio che prevedeva la genotipizzazione di più *loci* di un individuo, contemporaneamente.

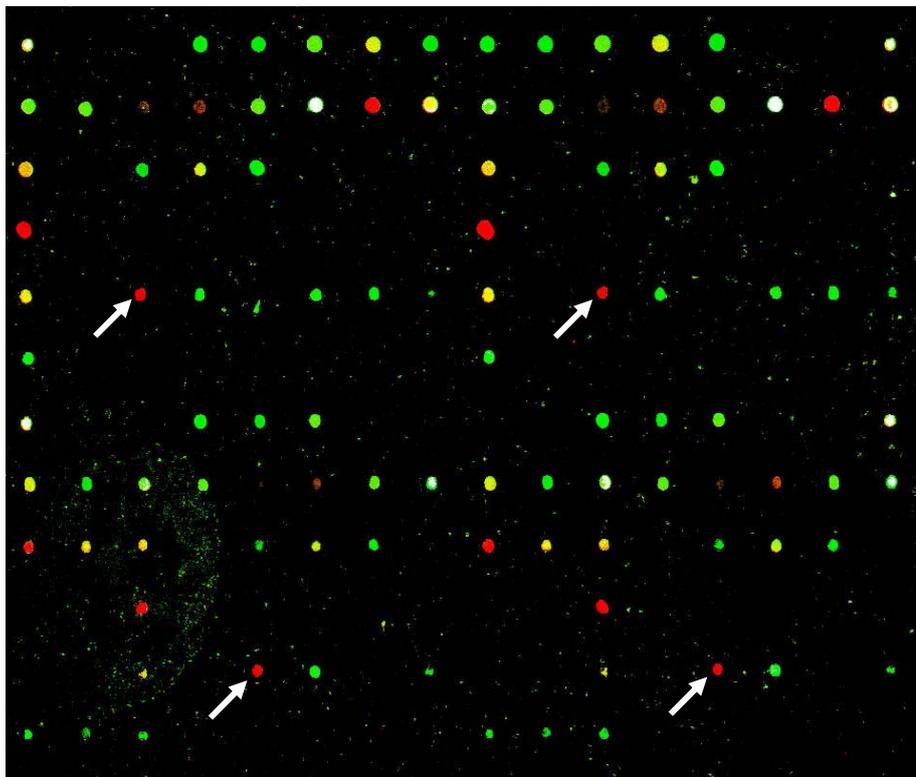
I prodotti della reazione OLA sono stati ibridizzati su un chip microarray, secondo lo schema proposto in figura 5.5.

I risultati emersi riguardo la genotipizzazione del gene *SCD*, hanno confermato che il polimorfismo rilevato con la SSCP è legato ai tre SNP del quinto esone (figura 6.3).

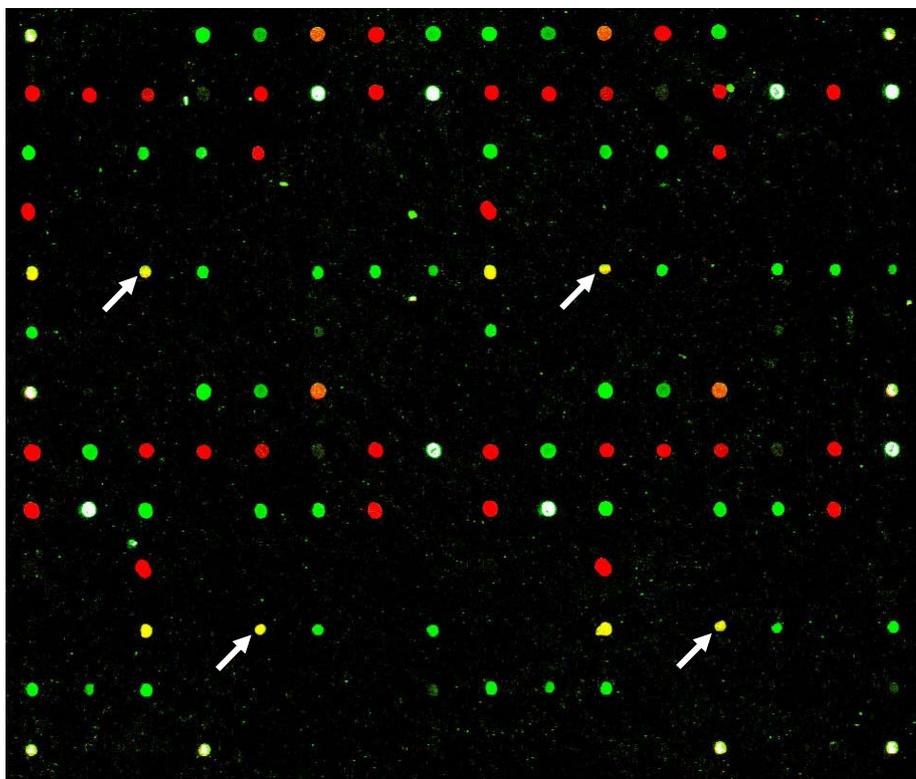
Come si può notare dalla figura, il genotipo VV dà un segnale verde sul chip, mentre il genotipo AA dà un segnale rosso, visto che ai due alplotipi sono stati assegnati, rispettivamente, i *discriminating oligo* con la Cy3 (verde) e la Cy5 (rosso). Ne deriva che il genotipo eterozigote (AV) è quello caratterizzato dal segnale giallo.

Fig. 6.3: Risultati della ibridazione dei prodotti OLA, processati su chip *Universal Oligonucleotide Array*. In figura sono riportati tre campioni, uno per ogni genotipo del *locus* SCD: VV (A), AA (B), AV (C). I diversi segnali fanno riferimento a *loci* differenti, secondo lo schema della figura 15 (ogni *locus* è stato ripetuto 4 volte). Il *locus* SCD è quello indicato dalle frecce bianche.





B



C

I risultati della genotipizzazione hanno rilevato che nelle vacche di razza Frisone Italiana, l'allele A è maggiormente diffuso rispetto all'allele V (0.57 contro 0.43) (tabella 6.2). Frequenze alleliche simili sono state individuate in un'altra razza, la Japanese Black Cattle, da Taniguchi et al. (2004) con la metodologia PCR-RFLP, dove l'aplotipo A e l'aplotipo V hanno mostrato una distribuzione del 59% e 41% rispettivamente.

Tab. 6.2: Frequenze genotipiche del gene *scd* nei campioni di vacche Frisone Italiane considerate.

Genotipo	N° di vacche	Frequenze genotipiche
AA	80	26.94
AV	179	60.27
VV	38	12.79
totale	297	100

Le frequenze geniche determinate nel campione di vacche, non erano in equilibrio di Hardy-Weinberg (tabella 6.3). Questo dato riflette la probabile pressione selettiva che è stata fatta sulle famiglie di mezzi fratelli per altri caratteri come la produzione di latte, il contenuto di grasso e proteine.

Tab.6.3: Test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. F.eff.= frequenze effettive; F.teo= frequenze teoriche. p e q sono le frequenze geniche dell'aplotipo A e V rispettivamente (p = 0.57, q = 0.43).

Genotipi	F.eff.	F.teo.	$(F.eff.-F.teo)^2$	$(F.eff.-F.teo)^2/F.teo.$
AA	80	$p^2n= 96.50$	272.09	2.82
AV	179	$2pqn=145.59$	1116.27	7.67
VV	38	$q^2n=54.91$	286.13	5.21
Totale	n=297	297		$\chi^2=15.70$
				P=0.0004
				Gradi di libertà: 1

3 EFFETTO DEL POLIMORFISMO SCD SULL'ATTIVITÀ DESATURASICA DELLA GHIANDOLA MAMMARIA

La seconda parte del lavoro ha riguardato la stima degli effetti della SCD sulla composizione degli acidi grassi nel latte.

Dai dati ottenuti con l'analisi gas-cromatografica, sono stati presi in considerazione solo alcuni acidi grassi, ossia i substrati e i relativi prodotti della SCD.

Analizzando la concentrazione di questi acidi grassi (tabella 6.4), è emerso che l'effetto del polimorfismo SCD è apprezzabile sull'acido miristoleico, sull'acido oleico e sulla frazione degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA). In particolare, è stato notato che gli individui omozigoti AA mostrano un incremento dei suddetti acidi pari al 37.9%, 11.7% e 9.3% rispettivamente, rispetto agli individui omozigoti VV. Differenze non significative sono state rilevate per gli altri acidi grassi.

Tab. 6.4: Relazione del polimorfismo SCD con la composizione in acidi grassi del latte.

Acidi grassi	Genotipo SCD			P<F
	AA	AV	VV	
	n=80	n=179	n=38	
C14	8.50 ± 0.257	8.85 ± 0.177	8.88 ± 0.310	0.293
C16	23.92 ± 0.603	24.12 ± 0.413	23.17 ± 0.725	0.447
C18	8.70 ± 0.351	8.91 ± 0.241	8.58 ± 0.422	0.677
C18-1 t11	0.76 ± 0.033	0.77 ± 0.023	0.74 ± 0.039	0.625
C14-1	0.75 ± 0.041 ^a	0.68 ± 0.029 ^b	0.61 ± 0.050 ^b	0.036
C16-1	1.17 ± 0.055	1.16 ± 0.037	1.10 ± 0.066	0.607
C18-1 c9	18.43 ± 0.442 ^A	17.68 ± 0.304 ^A	17.50 ± 0.532 ^B	0.034
C18-2 c9t11	0.37 ± 0.015	0.36 ± 0.010	0.33 ± 0.018	0.190
MUFA	20.72 ± 0.475 ^A	20.30 ± 0.326 ^A	18.95 ± 0.572 ^B	0.021

a,b=P<0.05; A,B=P<0.01

La relazione del polimorfismo SCD, con la concentrazione degli acidi grassi, rileva una maggiore attività desaturasica dell'aplotipo A rispetto all'aplotipo V. Il dato viene confermato dagli indici di desaturazione, ottenuti applicando le formule 4.1 e 4.2.

Dall'analisi della Varianza dei cinque rapporti considerati (tabella 6.5), solo quello tra l'acido miristico e l'acido miristoleico ha rilevato differenze

significative tra i tre polimorfismi. In particolare, gli individui omozigoti AA hanno mostrato un'attività desaturasica superiore del 21% e del 12% rispetto agli individui VV e AV.

Gli altri rapporti non hanno rilevato differenze significative tra i genotipi, ma comunque confermano la tendenza di una maggiore attività desaturasica dell'aplotipo A rispetto all'aplotipo V (figura 6.4).

Tab.6.5: Relazione del polimorfismo SCD con i rapporti fra i prodotti dello stesso enzima e i relativi substrati

Rapporti acidi grassi	Genotipo SCD			P<F
	AA n=80	AV n=179	VV n=38	
14-1/14	0.082 ± 0.004 ^A	0.072 ± 0.002 ^B	0.065 ± 0.004 ^B	0.001
16-1/16	0.048 ± 0.002	0.047 ± 0.001	0.045 ± 0.002	0.6409
18-1/18	0.675 ± 0.008	0.668 ± 0.006	0.658 ± 0.011	0.3045
RA/VA	0.323 ± 0.007	0.319 ± 0.006	0.309 ± 0.009	0.4181
ID	0.331 ± 0.007	0.321 ± 0.005	0.311 ± 0.009	0.111

A,B=P<0.01

14-1/14: $C_{14-1} / C_{14+} C_{14-1}$

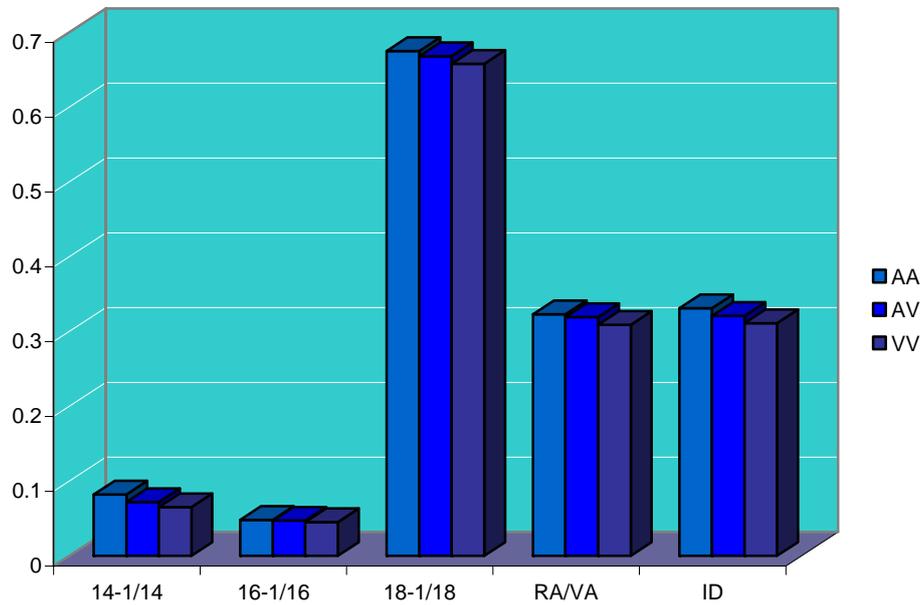
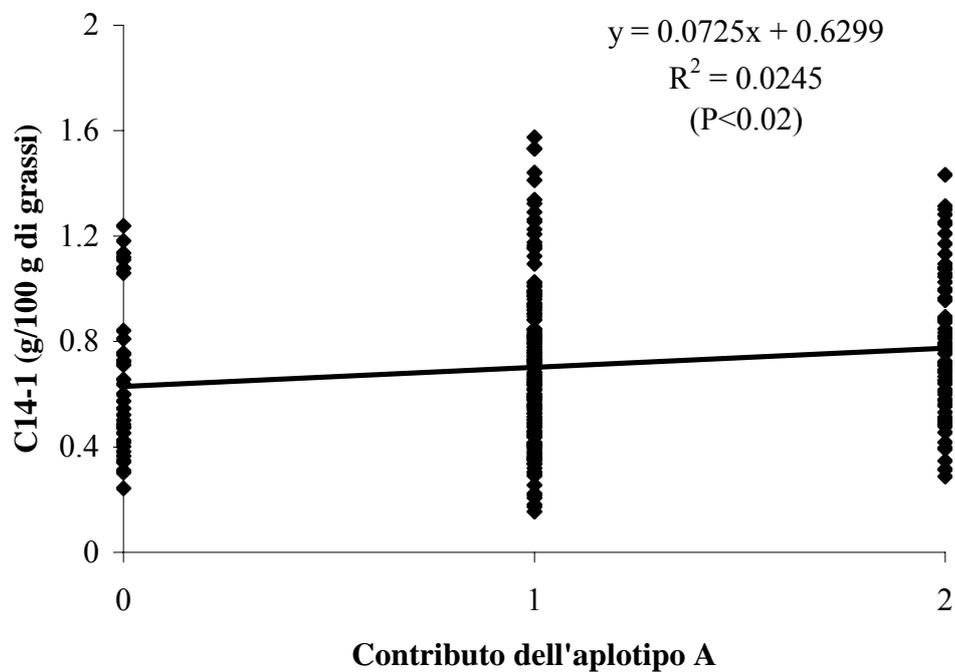
16-1/16: $C_{16-1} / C_{16+} C_{16-1}$

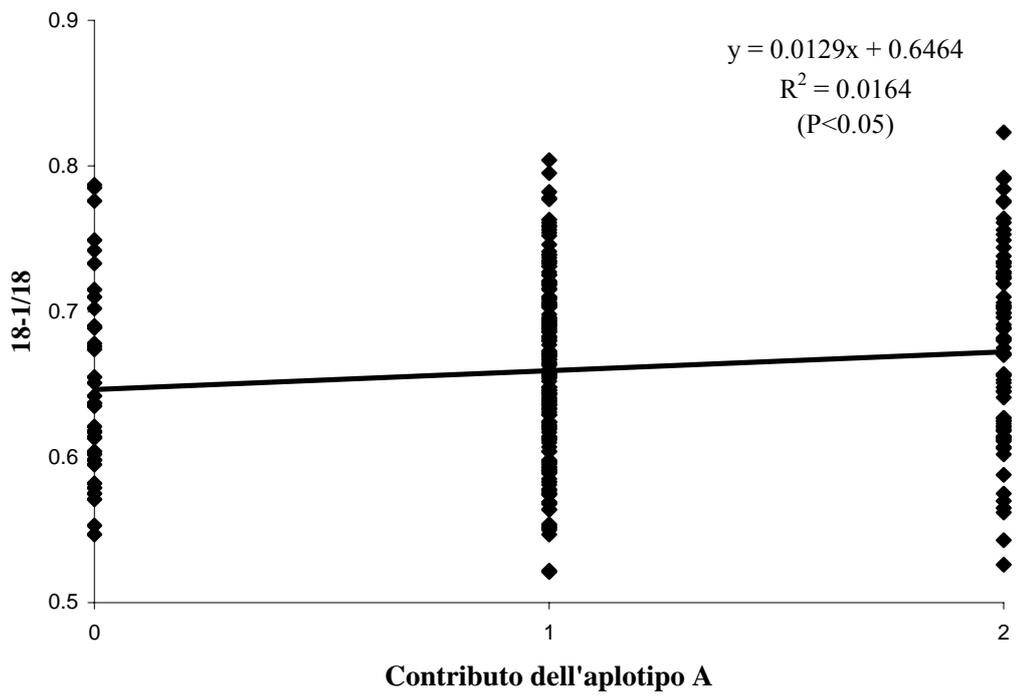
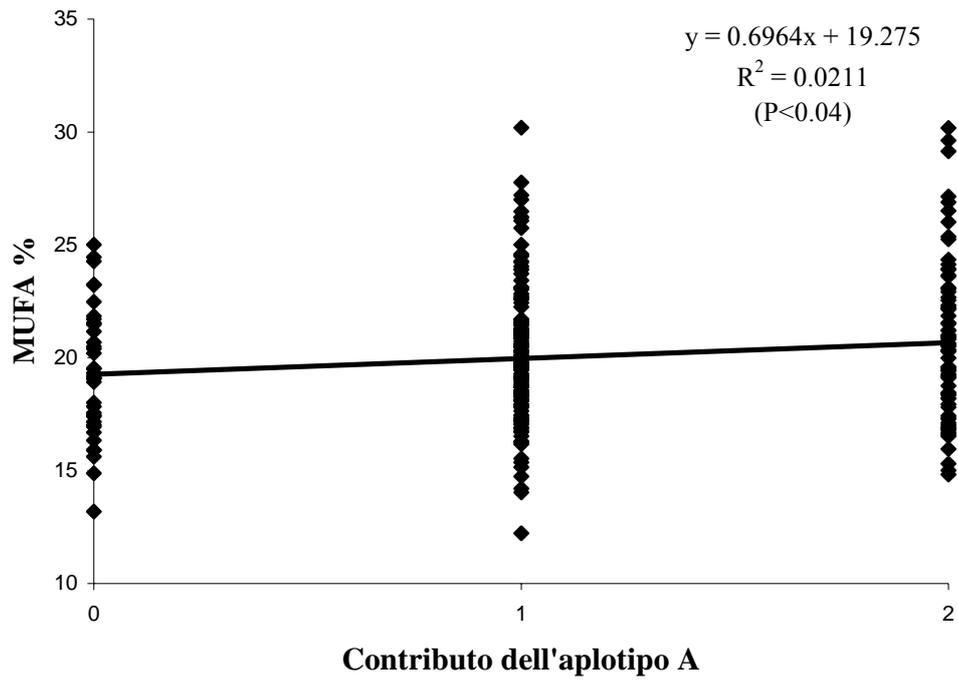
18-1/18: $C_{18-1} / C_{18+} C_{18-1}$

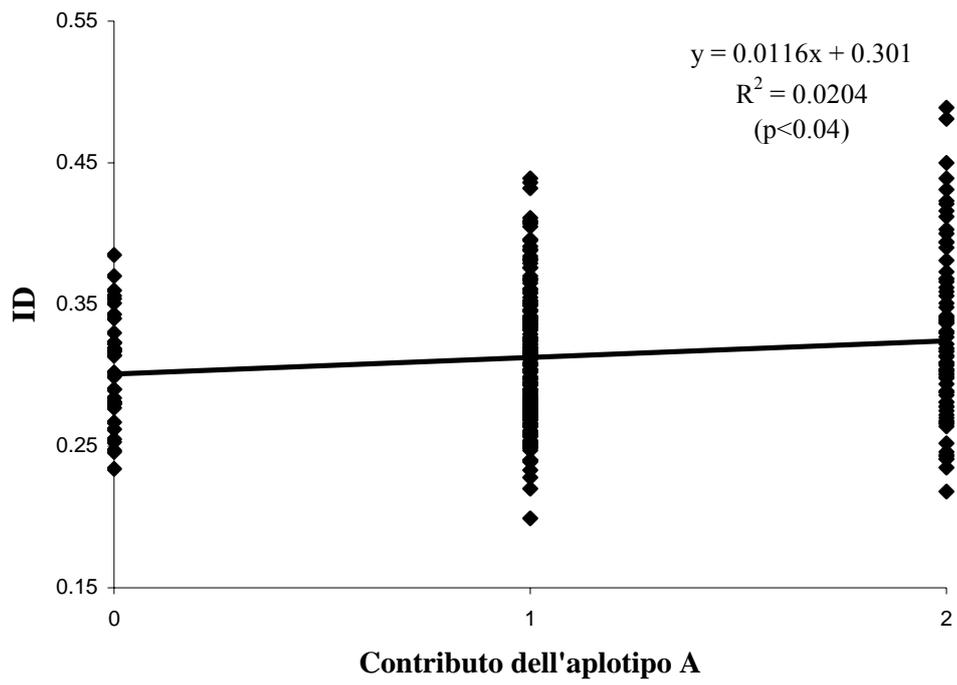
RA/VA: $C_{18-1c9t11} / C_{18-1t11} + C_{18-2c9t11}$

ID :
$$\frac{(C_{14-1} + C_{16-1} + C_{18-1} + C_{18-1c9t11})}{C_{14+} C_{14-1} + C_{16+} C_{16-1} + C_{18-1} + C_{18+} C_{18-1t11} + C_{18-2c9t11}}$$

L'analisi della regressione dell'acido miristoleico, della concentrazione dei MUFA e dei rapporti 18-1/18 e ID con i genotipi, indica una correlazione positiva e significativa (figura 6.5). Questo dato non fa altro che confermare il contributo dell'allele A sull'incremento dell'attività desaturasica dell'enzima SCD.

Fig. 6.4: Tendenza dell'attività desaturasica dei 5 rapporti considerati**Fig. 6.5:** Effetto del contributo dell'aplotipo A del gene *scd* sul contenuto di *cis* 9 C14-1 e di MUFA e sui rapporti 18-1/18 e ID. Il numero sull'asse delle ascisse corrisponde al numero di alleli A presenti nel genotipo. Ne deriva che lo 0 rappresenta VV, 1 rappresenta AV e 2 rappresenta AA.





DISCUSSIONE

1. POLIMORFISMO SCD

Lo studio del polimorfismo genico è uno degli strumenti maggiormente utilizzati, per l'individuazione di marcatori molecolari.

La ricerca in campo zootecnico è continuamente attiva, nel trovare marcatori da associare con i tratti produttivi degli animali in produzione. Lo scopo è quello di incrementare la produzione dei prodotti animali, sia da un punto di vista quantitativo, ma soprattutto qualitativo.

La prima parte del lavoro ha riguardato la determinazione del genotipo SCD in un gruppo di vacche di razza Frisona Italiana.

La genotipizzazione è stata condotta con la metodologia PCR-SSCP, applicata sul DNA estratto dalle cellule somatiche del latte di ogni individuo. L'analisi molecolare ha permesso di evidenziare la presenza di un polimorfismo nella regione del quinto esone.

Il sequenziamento ha confermato che le differenze apprezzate con la SSCP sono legate a tre SNP, come descritto in precedenza da altri autori (Medrano et al., 2003 banca dati N° accesso AY241932; Taniguchi et al., 2004). Dall'analisi dei risultati emerge come i tre polimorfismi siano ereditati tutti contemporaneamente, senza la comparsa di fenomeni di ricombinazione; questo conferma che i tre SNP costituiscono effettivamente due distinti aplotipi in linkage disequilibrium come riportato in precedenti lavori (Medrano et al., 2003 banca dati N° accesso AY241932; Taniguchi et al., 2004) (figura 4.7).

Sulla base delle conoscenze bibliografiche, questa è la prima volta che i due aplotipi sono stati rilevati nella razza Frisona Italiana e si aggiunge ai risultati già ottenuti per altre linee di Holstein, per la razza Jersey, per la Brown Swiss e per la Japanese Black Cattle (Taniguchi et al., 2004).

I dati ottenuti hanno evidenziato una maggiore distribuzione dell'allele A rispetto all'allele V, in accordo con i risultati ottenuti da Taniguchi e coll. (2004) in una razza bovina differente, la Japanese Black Cattle, dove sono state individuate frequenze alleliche pressoché identiche.

La maggiore distribuzione dell'allele A, nelle razze bovine in cui sono stati rilevati i due aplotipi, suggerisce che anche a livello di specie ci sia una maggiore

frequenza di A su V. Tenendo conto che l'aplotipo V è quello ancestrale, allora si può concludere che il processo evolutivo della specie bovina ha favorito lo sviluppo dell'aplotipo A che è comparso successivamente.

2. EFFETTO DEL POLIMORFISMO SCD

Il profilo degli acidi grassi del latte, riveste un ruolo importante nel definire la qualità del latte stesso. In particolare, il loro effetto è collegato alle caratteristiche organolettiche, tecnologiche e nutraceutiche, che sono argomenti di stretto interesse per quanto riguarda la qualità del prodotto.

La composizione degli acidi grassi del latte bovino è influenzata da una serie di fattori, quali la dieta (Dhiman et al., 1999), lo stato fisiologico della vacca (Clemens et al., 1973) e fattori genetici (Perry et al., 1998).

Lavori presenti in bibliografia rilevano che la modifica della composizione degli acidi grassi nel latte è sempre stata tentata modificando l'alimentazione dell'animale, mentre scarse sono le conoscenze sugli aspetti genetici che influenzano tale parametro, come ricordato in precedenza (Gibson, 2004).

Agendo sull'alimentazione è possibile ottenere effetti immediati, che scompaiono appena la causa che li ha prodotti viene a cessare. Con il miglioramento genetico, al contrario, è possibile ottenere lo stesso risultato rendendolo duraturo nel tempo, perché diviene una caratteristica intrinseca dell'animale. Il limite della genetica è che i risultati non sono immediati, ma richiedono lunghi tempi d'attesa per poter essere apprezzati.

Gli acidi grassi del latte hanno due origini: possono essere sintetizzati *de novo* oppure essere prelevati direttamente dal flusso arterioso.

Questi processi coinvolgono numerosi enzimi come LPL, ACC, FAS e SCD (Bernard et al., 2001). Tra questi un possibile gene candidato è quello per l'enzima SCD, che è diretto responsabile della sintesi di acido rumenico (il principale CLA del latte), dell'acido oleico e di altri MUFA, attraverso l'inserimento di un doppio legame in posizione *cis*- Δ^9 di un ampio gruppo di acidi grassi.

Seguendo questo approccio, il presente lavoro aveva come scopo quello di determinare un eventuale relazione tra il polimorfismo della SCD e la composizione in acidi grassi del latte.

I risultati hanno evidenziato che gli individui con l'aplotipo A della SCD hanno prodotto un latte con un contenuto di MUFA significativamente superiore a quello

degli individui con l'aplotipo V. Queste differenze sono legate in particolare al contenuto di acido miristoleico e di acido oleico.

Oltre all'effetto del polimorfismo SCD sulla composizione di acidi grassi del latte, è stato rilevato un effetto significativo legato ai giorni di lattazione. Le bovine che si trovavano nei primi 100 giorni dal parto hanno mostrato un maggior contenuto di MUFA e acido oleico e una minor concentrazione di acido miristico e miristoleico.

Queste differenze possono essere spiegate col fatto che, durante la prima fase della lattazione, le vacche, soprattutto quelle ad alto potenziale produttivo, sono in bilancio energetico negativo. In queste condizioni, l'animale trasferisce le riserve lipidiche, caratterizzate da acidi grassi a lunga catena e MUFA, dal tessuto adiposo alla ghiandola mammaria. Questo trasferimento inibisce l'attività degli enzimi lipogenici delle cellule mammarie, riducendo la sintesi degli acidi a media e corta catena e del C₁₄ e C₁₄₋₁ in particolare (Kay et al., 2005).

Questi primi risultati inducono a fare delle considerazioni riguardo l'attività della SCD.

Il diverso comportamento delle due isoforme nella ghiandola mammaria, non fa altro che confermare il ruolo chiave svolto dall'enzima SCD nel metabolismo lipidico. E' stato sufficiente la sostituzione di un aminoacido per determinare variazioni significative nella composizione acidica del latte.

Il dato viene confermato dai risultati ottenuti, che mostrano una stretta correlazione tra i substrati e i relativi prodotti della SCD, in particolare tra l'acido vaccenico e l'acido rumenico (figura 7.1).

La diversa attività catalitica delle due isoforme è giustificata dal fatto che il polimorfismo proteico è localizzato in una zona importante della sequenza peptidica, ossia all'interno della terza regione istidinica (figura 4.6). Questa, infatti, è una delle tre regioni che definiscono il sito di catalisi della SCD.

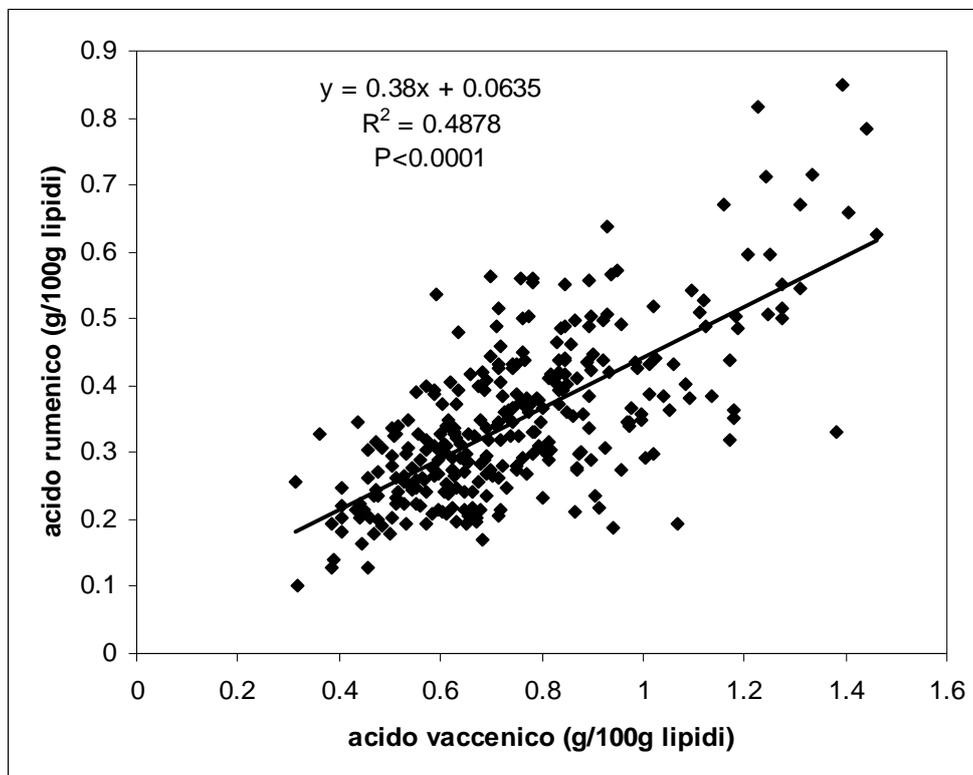
La sostituzione di un aminoacido modifica sicuramente le interazioni intermolecolari, determinando una diversa struttura tridimensionale del sito di catalisi, che si ripercuote sull'attività enzimatica.

Un aspetto interessante è quello riferito al contenuto di MUFA, nel latte dei tre genotipi. Gli individui omozigoti per l'allele A hanno prodotto un latte con un

contenuto in MUFA mediamente superiore del 2 %, rispetto agli individui VV. Risultati praticamente identici sono stati ottenuti da Taniguchi et al. (2004), che studiarono l'effetto del polimorfismo SCD sulla composizione degli acidi grassi nei lipidi intramuscolari (*Longissimus Dorsi*) in bovini di razza Japanese Black Cattle. In quel lavoro, gli individui AA presentavano un contenuto in MUFA superiore di circa 1.7 % rispetto a quello degli individui con genotipo VV.

Una stima della superiorità dell'aplotipo A sul V è stata determinata con il calcolo dell'effetto di sostituzione genica. I risultati hanno rilevato che il tipo A ha un effetto di sostituzione pari a 0.83%, 0.93% e 0.108% sul contenuto di MUFA, acido oleico e acido miristoleico rispettivamente. Anche in questo caso il dato è paragonabile con quello ottenuto da Taniguchi et al. (2004), dove l'effetto di sostituzione del gene A sui MUFA è pari allo 0.805%.

Fig. 7.1: Relazione tra l'acido vaccenico e l'acido rumenico, come indice dell'attività della SCD (n=297).



I risultati di entrambi i lavori, mostrano che la sostituzione aminoacidica ha un effetto simile in razze diverse e in tessuti diversi, pertanto, si può concludere che è riproducibile ed ubiquitario. L'effetto SCD non può essere considerato l'unico ad influenzare la composizione di acidi grassi nel latte. Infatti, i dati statistici ottenuti dal modello lineare, mostrano che l'effetto toro ha un ruolo significativo sul contenuto di MUFA, acido oleico e acido miristico del latte.

L'attività della SCD è stata stimata calcolando il rapporto tra la concentrazione del prodotto e il relativo substrato, secondo la formula 4.1 riportata in Materiali e Metodi.

I rapporti sono stati determinati per tutti e quattro i substrati della SCD (ac. miristico, ac. palmitico, ac. oleico e ac. vaccenico) e i relativi prodotti. Maggiore è il valore che si ottiene è più intensa è l'attività dell'enzima. Sono stati scelti questi parametri, come indice dell'attività desaturasica, invece della stima dell'RNA, per una serie di motivi di natura pratica già menzionati nei Materiali e Metodi.

L'effetto del polimorfismo SCD è stato rilevato solo per il rapporto $C_{14:1}/C_{14}$, dove sono state individuate differenze significative tra i tre genotipi. In particolare, l'allele con aplotipo A ha mostrato un'attività desaturasica superiore a quello con aplotipo V. Il dato è in accordo con la composizione in acidi grassi, giustificando il maggior contenuto di MUFA negli individui omozigoti AA.

Il fatto che, solo il rapporto $C_{14:1}/C_{14}$ ha manifestato differenze significative, è giustificato da caratteristiche fisiologiche e biochimiche della ghiandola mammaria. Ad esempio, il rapporto acidi *cis* $\Delta 9$ monoinsaturi/acidi saturi non è influenzato solo dalla SCD, ma anche da altri fattori come: la differente capacità della ghiandola mammaria di captare gli acidi grassi e il diverso utilizzo che questa ultima ne fa (Bernard et al., 2006).

Il $C_{14:1}/C_{14}$, al contrario è stato riconosciuto come un ottimo indicatore per la stima dell'attività desaturasica dell'SCD (Corl et al., 2001; Bernard et al., 2001; Lock e Gasworthy 2003). L'acido miristico viene sintetizzato esclusivamente a livello della ghiandola mammaria, come tutti gli acidi grassi con un numero di atomi di carbonio minore di 16. Il suo corrispondente acido monoinsaturo, ossia il miristoleico, viene ottenuto direttamente ed esclusivamente ad opera della SCD (Bernard et al., 2006).

In merito ai fattori nutraceutici che caratterizzano il latte, è necessario soffermarsi sull'effetto della SCD nei confronti dell'acido rumenico. Come già ampiamente descritto nell'introduzione, questo acido è il maggior rappresentante dei CLA, una classe di acidi grassi con numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo. La SCD è l'enzima responsabile della sintesi tissutale dell'acido rumenico a partire dall'acido vaccenico. Il contenuto di CLA nel latte è influenzato da numerosi fattori, primo di tutti l'alimentazione. Tuttavia, la variabilità del contenuto di CLA nel latte è stata riscontrata anche in gruppi di animali alimentati con la stessa dieta (Bauman et al., 2001; Chilliard et al., 2001; White et al., 2001; Secchiari et al., 2003). Queste osservazioni hanno suggerito l'ipotesi che potesse esistere anche una fonte di variazione genetica relativamente al contenuto di CLA nel latte. Inoltre, le ragioni di queste differenze possono essere legate a meccanismi ruminali che influenzano la disponibilità di CLA e dei loro precursori, alla regolazione dell'espressione dello stesso gene e alla diversa struttura dell'enzima dovuta al polimorfismo, oppure in fattori che influiscono sull'interazione enzima substrato.

I dati ottenuti in questo lavoro non evidenziano differenze significative sul contenuto di acido rumenico tra i tre genotipi della SCD, malgrado si evidenzi una tendenza ad un maggior contenuto di CLA nel latte delle bovine AA ($P = 0.190$). La mancanza di questa relazione tra il polimorfismo SCD e il contenuto di CLA nel latte, può essere spiegata dal fatto che il contenuto di questa classe di acidi grassi nel latte, come già ricordato, risente dell'effetto di molti fattori e, inoltre, dalle ridotte dimensioni del campione considerato.

CONCLUSIONI

Il miglioramento della qualità degli alimenti di origine animale è uno degli obiettivi principali, per tutti i segmenti della filiera produttiva. In questo scenario, gioca un ruolo fondamentale la ricerca scientifica, la quale può mettere in campo una serie di strumenti per definire e valorizzare i caratteri che determinano la qualità degli alimenti.

Uno di questi strumenti è sicuramente la genetica, che permette al ricercatore di definire in maniera precisa i processi biochimici che determinano la composizione dei prodotti forniti dall'animale (latte, carne ecc.).

Il lavoro di questa tesi si è concentrato sullo studio del polimorfismo genico come effetto sulla composizione degli acidi grassi del latte. Il gene considerato è stato la Stearoyl CoA Desaturasi (SCD) in vacche di razza Frisona Italiana, che ha un ruolo chiave nel metabolismo lipidico della ghiandola mammaria.

I risultati hanno messo in mostra l'esistenza di due forme geniche che differiscono per tre sostituzioni nucleotidiche, a livello del quinto esone. Queste differenze a livello nucleotidico, determinano un diverso comportamento dell'enzima durante la catalisi della reazione.

Dal lavoro è emerso che la presenza di una delle due forme determina differenze nella composizione degli acidi grassi del latte.

In particolare, è stato rilevato che il tipo A della SCD ha un effetto positivo sul contenuto di acidi grassi monoinsaturi e sul rapporto acido miristoleico/acido miristico. Quest'ultimo dato è considerato, dalla letteratura scientifica, un valido strumento per valutare l'attività della desaturasi a livello della ghiandola mammaria. La relazione tra il polimorfismo SCD e il rapporto C14:1/C14 sottolinea che, la sostituzione di un aminoacido nella sequenza peptidica, determina un evidente cambiamento dell'attività desaturasica dell'enzima.

L'effetto di variazione del contenuto di MUFA da parte del genotipo SCD è risultato non molto elevato, ma comunque altamente significativo.

I risultati del presente lavoro, pertanto, possono essere di aiuto per lo sviluppo di strategie di selezione assistita da marcatori, per il miglioramento della qualità nutrizionale del latte bovino.

Un'attenta considerazione va fatta riguardo il contenuto di CLA nel latte, altra frazione di acidi grassi con importanti effetti nutraceutici per la salute umana. Al contrario dei MUFA, non si sono rilevati effetti del polimorfismo SCD sul contenuto di CLA, ma il livello di significatività raggiunto fornisce indicazioni incoraggianti in merito alla possibilità di evidenziare un effetto significativo nell'ambito di una popolazione di dimensioni più ampie. La variazione della quantità di acido rumenico e di acido vaccenico nel latte è comunque molto influenzata dall'alimentazione e, in particolare, dalla presenza di acidi grassi polinsaturi nella razione.

Al fattore alimentazione, che riveste il ruolo principale, si uniscono anche fattori legati direttamente alla SCD come la regolazione dell'espressione dell'enzima, le differenze nella struttura molecolare dovuta al polimorfismo e da fattori che possono influenzare l'interazione substrato-enzima (ad esempio la fosforilazione).

RINGRAZIAMENTI

Giunto a conclusione della trattazione della mia tesi di dottorato, non posso esimermi dal ricordare e ringraziare tutte le persone che, direttamente e/o indirettamente, hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro.

La prima persona che voglio ringraziare è il prof. Pierlorenzo Secchiari che ha sempre creduto nelle mie capacità e mi ha offerto questa grande opportunità di crescita culturale.

A questa crescita hanno dato un grosso contributo Marcello e Andrea; grazie a loro ho potuto approfondire le mie conoscenze sul metabolismo lipidico, necessarie per la realizzazione della mia tesi. Non posso comunque dimenticare il loro rapporto amichevole che ha permesso di sentirmi a mio agio nei tre anni di dottorato.

I risultati di questo lavoro vanno divisi con Massi, collega ma soprattutto amico, con cui ho trascorso tanti momenti di lavoro e di divertimento.

Ogni lavoro di ricerca ha alle spalle il contributo di un gruppo di persone che ti aiutano in ogni momento; anche per me è valsa la stessa cosa quindi non posso dimenticare Laura, Piera, Gino, il dott. Alessandro Pistoia, il prof. Guido Ferruzzi, Alice e Jacopo con i quali ho lavorato in piena sintonia e serenità.

Voglio ringraziare i colleghi di Milano: la dott.ssa Bianca Castiglioni, la dott.ssa Stefania Chessa, la dott.ssa Patrizia Bolla, il prof. Giulio Pagnacco e la prof.ssa Anna Caroli. Grazie al loro aiuto ho potuto approfondire le conoscenze sulla parte di biologia molecolare del mio lavoro. Non posso dimenticare, inoltre, il dott. Paolo Leone; grazie alla sua ospitalità, la permanenza a Milano è stata più familiare.

Il mio ringraziamento speciale va ai miei genitori e a mia sorella Mary, ai quali voglio dedicare questa tesi. Il loro sostegno e l'entusiasmo con cui hanno seguito il mio lavoro mi hanno permesso di andare avanti con maggiore slancio.

Pisa, li 12/06/2007

BIBLIOGRAFIA

-
- ALAIS C. (2000): *Scienza del latte* 3° Edizione. Ed. TECNICHE NUOVE.
 - ALVES A.M., CARR E.J. (1988): *Dot blot detection of point mutations with adjacently hybridizing synthetic oligonucleotides probes*. Nucleic Acids Research, 16 pp. 8723.
 - ASCHAFFENBURG R. (1961): *Inherited casein variants in cow's milk* Nature, 192 pp. 431-432.
 - ASCHAFFENBURG R., DREWRY J (1955): *Occurrence of difference of β -lactoglobulin in cow's milk*. Nature, 176 pp. 218-219.
 - ASCHAFFENBURG R., DREWRY J (1957): *Genetics of β -lactoglobulin of cows' milk*. Nature 180 pp.376-378.
 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. OFFICIAL Methods of Analysis of the A.O.A.C. 1990 15th ed. AOAC Arlington, Va, USA.
 - AVRAMOGLU R.K., BASCIANO H., ADELI K. (2006): *Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states*. Clinica Chimica Acta, 368 pp. 1-19.
 - BANNI S., HEYS C.S.D., WAHLE K.W.J. (2003): *Conjugated linoleic acid as anticancer nutrients: studies in vivo and cellular mechanisms*. In J.Sebedio, W.W. Christie e Adolf R.: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol 2 pp.267-281.
 - BARANY F. (1991): *Genetic disease detection and DNA amplification used cloned thermostable ligase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 88 pp. 189-193.
 - BARBER M.C., CLEGG R.A., TRAVERS M.T., VERNON R.G. (1997): *Lipid metabolism in the lactating mammary gland*. Biochim. Biophys. Acta 1347 pp.101-126.
 - BASSAM B.J., CAETANO-ANÒLLES G., GRESHOFF P.M. (1991): *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels*. Analytical Biochemistry, 196 pp. 80-83.
 - BAUMAN D.E., BAUMGARD L.H., CORL B.A., GRINARI J.M. (1999): *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminant*. Proc. American Society of Animal Science.
 - BAUMAN D.E., GRINARI J.M. (2003): *Nutritional regulation of milk fat synthesis*. Annu. Rev. Nutr. 23 pp. 203-227.
 - BAUMAN D.E., MATHER I.H., WALL R.J., LOCK A.L. (2006): *Major advances associated with the biosynthesis of milk*. J. Dairy Sci., 89 pp. 1235-1243.

- BEHROUZIAN B., BUIST P.H. (2003): *Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 68 pp. 107-112.
- BERNARD L., LEROUX C., CHILLIARD Y. (2006): *Characterization and nutritional regulation of the main genes in the lactating mammary gland*. In: (Eds.) Sejrsen K., Hvelplund T., Nielsen M.O. : Ruminant Physiology. Wageningen Academic Publisher (Wageningen Nth.), pp. 295-326.
- BERNARD L., LEROUX C., HAYES H., GAUTIER M., CHILLIARD Y., MARTIN P. (2001): *Characterization of the caprine stearoyl- CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon*. Gene, 281 pp. 53-61.
- BERNARD L., ROUEL J., LEROUX C., FERLAY A., FAULCONNIER Y., LEGRAND P., CHILLIARD Y. (2005): *Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids*. J. Dairy Sci., 88 pp. 1478-1489.
- BITMAN J., WOOD D.L. (1990): *Changes in milk fat phospholipids during lactation*. J. Dairy Sci., 73 pp. 1208-1216.
- BLUMBERG B.S., TOMBS M.P. (1958): *Possible polymorphism of bovine α -lactalbumine*. Nature, 181 pp. 683-684.
- BROOKES A.J. (1999): *The essence of SNPs*. Gene, 234 pp. 177-186.
- BUCCIONI A., PETACCHI F., ANTONGIOVANNI M. (2002): *Attività ruminali e presenza di acidi grassi trans e di CLA nei lipidi del latte e della carne*. Firenze Accademia dei Georgofili Quaderni I pp. 97-128.
- CARROL S.M., DEPETERS E.J., TAYLOR S.J., ROSENBERG M., PEREZ-MONTI H., CAPPS V.A. (2006): *Milk composition of Holstein, Jersey and Brown Suisse cows in response to increasing levels of dietary fat*. Animal Feed Science and Technology 131 pp. 451-473.
- CAPPIO-BORLINO A., PULINA G., ROSSI G. (1995): *A non-linear modification of Wood's equation fitted to lactation curves of Sardinian dairy ewes*. Small Ruminant Research, 18 pp. 75-79.
- CASES S., STONE S.J., ZHOU P., YEN E., TOW B., LARDIZABAL K.D., VOELKER T., FARESE R.V. (2001): *Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members*. J. Biol Chem. 276 pp. 38870-38876.
- CASANUEVA F.F., DIEGUEZ C. (1999): *Neuroendocrine regulation and actions of leptin*. Front. Neuroendocrinol., 20 pp. 317-363.

- CERIOTTI G., CHESSA S., BOLLA P., BUDELLI E., BIANCHI L., DURANTI E., CAROLI A. (2004) : *Single nucleotide polymorphism in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction.single strand conformation polymorphism*. J. Dairy Sci., 87 pp.2606-2613.
- CHESSA S., CHIATTI F., CERIOTTI G., CAROLI A., CONSOLANDI C., PAGNACCO G., CASTIGLIONI B. (2007): *Development of a Single Nucleotide Polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk portein genetic polymorphisms*. J. Dairy Sci. 90 pp. 451-464.
- CHILLIARD Y., BONNET M., DELAVAUDE C., FAULCONNIER Y., LEROUX C., DJIANE J., BOCQUIER F. (2001): *Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration*.
- CHILLIARD Y., FERLAY A., FAULCONNIER Y., BONNET M., ROUEL J., BOCQUIER F. (2000): *Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants*. Proc. Nutr. Soc., 59 pp. 127-134.
- CHRISTIE W.W. (1982). *A simple procedure of rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters*. J. Lipid Res., 23 pp. 1072-1075.
- CHRISTIE W.W., CLAPPERTON (1982): *Structures of cow's milk, fortified milks (including infanf formula) and human milk*. J. Soc. Dairy Technol., 35 p. 22.
- CLARKE S.D., GASPERIKOVA D., NELSON C., LAPILLONNE A., HEIRD W.C. (2002): *Fatty acids regulation of gene expression. A genomic explanation for the benefit of the Mediterranean Diet*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 967 pp. 283-298.
- CLEGG R.A., BARBER M.C., POOLEY L., ERNENS I., LARONDELLE Y., TRAVERS M.T. (2000): *Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects*. Livestock Production Science 70 pp. 3-14.
- CLEMENS E., ARTHAUD V., MANDINGO R., WOODS W. (1973): *Fatty acids composition of bulls and steers as influenced by age and dietary energy level*. J. Anim. Sci., 37 pp. 1326-1331.
- COHEN P., FRIEDMAN J.M. (2004): *Leptin and the control of metabolism: role for Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD-1)*. J.Nutr., 134 pp. 2455S-2463S.
- COHEN P., MIYAZAKI M., SOCCI N.D., HAGGE-GREENBERG A., LIEDTKE W., SOUKAS A.A., SHARMA R., HUDGINGS L.C., NTAMBI J.M., FRIEDMAN J.M. (2002): *Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss*. Science, 297 pp. 240-243.
- CONSOLANDI C., FROSINI A., PERA C., FERRARA G., BORDONI R., CASTIGLIONI B., RIZZI E., MEZZELANI A., BERNARDI L.R., DE BELLIS G., BATTAGLIA C. (2004): *Polymorphism analysis within the HLA-A locus by universal oligonucleotide array*. Human Mutation, 24 pp.428-434.

- CORL B.A., BAUMGARD L.H., DWYER D.A., GRINARI J.M., PHILLIPS B.S., BAUMAN D.E. (2001): *The role of Δ^9 -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA*. Journal of Nutritional Biochemistry, 12 pp. 622-630.
- COTTON R.G. (1993): *Currents methods of mutation detection*. Mutation Research, 285 pp. 125-144.
- DANIEL Z.C.T.R., RICHARDS S.E., SALTER A.M., BUTTERY P.J. (2003): *Insulin and dexamethasone regulate stearyl-CoA desaturase mRNA levels and fatty acid synthesis in ovine adipose tissue explants*. J. Anim. Sci., 82 pp. 231-237.
- DAVIS C.L., BROWN R.E. (1970): *Low milk-fat syndrome*. In: Phillipson A.T. (Ed.), Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriel Press Newcastle upon Tyne, U.K. pp.545-565.
- DEKKERS J.C.M., HOSPITAL F. (2002): *The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations*. Nature Review Genetics 3 pp.22-32.
- DELBECCHI L., AHNADI C.E., KENNELLY J.J., LACASSE P. (2001): *Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein Cows fed protected or unprotected Canola seeds*. J. Dairy Sci., 84 pp. 1375-1381.
- DE PETERS E.J., GERMAN J.B., TAYLOR S.J., ESSEX S.T., PEREZ-MONTI H. (2001): *Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil*. J. Dairy Sci., 84 pp.929-936.
- DEL TITO B.J., POFF III H.E., NOVOTNY M.A., CARTLEDGE D.M., WALKER II R.I., EARL C.D., BAILEY A.L. (1998): *Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection*. Clinical Chemistry 44 pp. 731-739.
- DHIMAN T.R., ANAND G.R., SATTER L.D., PARIZA M.W. (1999): *Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diet*. J. Dairy Sci., 82 pp. 2146-2156.
- ECHOLS H., GOODMAN M.F. (1991): *Fidelity mechanism in DNA replication*. Annual reviews of Biochemistry, 60 pp.477-511.
- EDWARDS P.A., TABOR D., KAST H.R., VENKATESWARAN A. (2000): *Regulation of gene expression by SREBP and SCAP*. Biochimica et Biophysica Acta , 1529 pp. 103-113.
- FAY J.P., JAKOBER K.D., CHENG K.J., COSTERTON J.W. (1990): *Esterase activity of pure cultures of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate*. Can. J. Microb. 36 pp.585.

- FEUERMANN Y., MABJEESH S.J., SHAMAY A. (2004): *Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland*. J. Dairy Sci., 87 pp. 2941-2946.
- FONTECHA J., RIOS J.J., LOZADA L., FRAGA M.J., JUAREZ M. (2000): *Composition of goats' milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS*. Int. Dairy J., 10 pp.119-128.
- FISHER S.G., LERMANN L.S. (1983): *DANN fragments differing by single base pairs substitution are separated in denaturing gel: correspondence with melting theory*. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 80 pp. 1579-1583.
- FRICK F., LINDÉN D., AMÉEN C., EDEN S., MODE A., OSCARSSON J. (2002): *Interaction between growth hormone and insulin in the regulation of lipoprotein metabolism in the rat*. Am. J. Physiol. Endocrinol Metab., 283 pp. E1023-E1031.
- GIBSON J.P. (1991): *The potential for genetic change in milk fat composition*. J. Dairy Sci., 74 pp.3258-3266.
- GIBSON R.A. (2004): *Docosa-hexaenoic acid (DHA) accumulation is regulated by the polyunsaturated fat content of the diet: Is it synthesis or is it incorporation?*. Asia Pac J. Clin. Nutr., 13 pp S78.
- GRIINARI J.M., CORL B.A., LACY S.H., CHOUINARD P.Y., NURMELA K.V.V., BAUMAN D.E. (2000): *Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase*. J. Nutr., 130 pp. 2285-2291.
- GRIINARI J.M., DWYER D.A., MC GUIRE M.A., BAUMAN D.E., PALMQUIST D.L., NURMELA K.V.V. (1998): *Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows*. J. Dairy Sci. 81 pp. 1251-1261.
- GRISART B., COPPERTIES W., FARNIR F., KARIM L., FORD C., BERZI P., CAMBISANO N., MNI M., REID S., SIMON P., SPELMAN R., GEORGES M., SNELL S. (2001): *Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of missense mutation in the bovine DGAT1 gene with the major effect on milk yield and composition*. Genome Res. 12 pp. 222-231.
- GROSS E., ARNOLD L., GOETTE J., SCHWARTZ-BOEGER U., KIECHLE M. (1999): *A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP e DHPLC*. Human Genetics, 105 pp. 702-708.
- HAEGEMAN A., VAN ZEVEEREN A., PEELMAN L.J. (2003): *Development of a multigenic oligoligation assay test in relation to meat and carcass traits in cattle*. J. Anim. Breed. Genet., 120 pp. 417-424

- HANCOCK J.M. (1996): *Simple sequences in a "minimal" genome*. Nature Genetics, 14 pp. 14-15
- HARFOOT C.G., HAZLEWOOD G.P. (1988): *Lipid metabolism in the rumen*. In P.N.Hobson: The Rumen Microbial Ecosystem pp. 285-322 Elsevier Londra.
- HEINEMANN F.S., OZOLS J. (2003): *Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms*. Prostaglandins Leukotrienes and Fatty Acids, 68 pp. 123-133.
- HOUSEKNECHT K.L., BAILE C.A., MATTEI R.L., SPURLOCK M.C. (1998): *The Biology of leptin: a review*. J.Anim. Sci., 76 pp. 1405-1420.
- JAHREIS G., FRITSCHÉ J., MOCKEL P., SCHONE F., MOLLER U., STEINHART H. (1999): *The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid cis-9, trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman*. Nutr. Res., 19 pp. 1541-1549.
- JENKINS T.C. (1993): *Lipid metabolism in the rumen*. J. Dairy Sci. 76 pp. 3851-3863.
- JENSEN R.G., FERRIS A.M., LAMMI-KEEFE C.J. (1991): *The composition of milk fat*. J. Dairy Sci., 74 pp.3228-3243.
- JESSE B.W., SOLOMON R.K., BALDWIN R.L. (1992): *Palmitate metabolism by isolated sheep rumen ephytelian cells*. J. Anim. Sci.
- JONES B.H., STANDRIDGE M.K., CLAYCOMBE K.J., SMITH P.J., MOUSTAÏD MOUSSA N. (1998): *Glucose induces expression of Stearoyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem. J., 335 pp. 405-408.
- KAKUMA T., LEE Y., UNGER R.H. (2002): *Effects of leptine, troglitazone and dietary fat on stearoyl-CoA desaturase*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 297 pp. 1259-1263.
- KARIJORD O., STANDAL N., SYRSTAD O. (1982): *Sources of variation in composition of milk fat*. Z. Tierz. Zuechtungsbiol, 99 p. 81.
- KASTURI R., JOSHI V.C. (1982): *Hormonal regulation of Stearoyl CoA desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. Tha Journal of Biological Chemistry, 20 pp. 12224-12230.
- KAY J.K., MACKLE T.R., AULDIST M.J., THOMSON N.A., BAUMAN D.E. (2004): *Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleico acid in dairy cows fed fresh pasture*. J. Dairy Sci., 87 pp. 369-378.
- KEATING A.F., STANTON C., MURPHY J.J., SMITH T.J., ROSS R.P., CAIRNS M.T. (2005): *Isolation and characterization of the bovine stearoyl-CoA desaturase*

- promoter and analysis of polymorphism in the promoter region in dairy cows. Mammalian Genome*, 16 pp. 184-193.
- KEPLER C.R., TUCKER W.P., TOVE S.B. (1966): *Intermediates and products of linoleic acid by Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, 241 pp. 1350-1354.
 - KHANAL R.C., DHIMAN T.R. (2004): *Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (2) pp. 72-81.
 - LAENDGREN U., KAISER R., SANDERS J., HOOD L. (1988): *A ligase-mediated gene detection technique*. *Science*, 241 pp. 1077-1080.
 - LANDAU J.M., SEKOWSKI A., HAMM M.W. (1997): *Dietary cholesterol and the activity of stearoyl CoA desaturase in rats: evidence for an indirect regulatory effect*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1345 pp. 349-357.
 - LATHROP M., NAKAMURA Y., O'CONNELL P., LEPPERT M., WOODWARD S., LALOUUEL J.M., WHITE R. (1988): *A mapped set of genetic markers for human chromosome 9*. *Genomics*, 3, pp. 361-366.
 - LEFEVRE P., TRIPON E., PLUMELET C., DOUAIRE M., DIOT C (2001): *Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 280 pp. 25-31.
 - LEHNER R., KUKSIS A. (1996): *Biosynthesis of triacylglycerols*. *Prog. Lipid Res.* 35 pp. 169-201.
 - LOCK A.L., GARNSWORTHY P.C. (2003): *Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows*. *Livestock Production Science*, 79 pp. 47-59.
 - LOEB L.A., PRESTON B.D. (1986): *Mutagenesis by apurinic/apymiridic sites*. *Annual reviews of genetics*, 20 pp. 201-230.
 - LOOR J.J., HERBEIN J.H. (2003): *Reduced fatty acids synthesis and desaturation due to exogenous trans10-cis12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil*. *J. Dairy Sci.*, 86 pp. 1354-1369
 - LOPÈZ-CASILLAS F., PONCE-CASTEÑEDA M.V., KIM K.H. (1992): *Acetyl coenzyme A carboxylase mRNA metabolism in the rat liver*. *Metabolism* 41 pp. 201-207.
 - MALAU-ADULI A.E.O., SIEBERT B.D., BOTTEMA C.D.K., PITCHFORD W.S. (1997): *A comparison of the fatty acids composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousine and Jersey cattle*. *Austr. J. Agric. Res.*, 48 pp. 715-722

-
- MAO J., SEYFERT H.M. (2002): *Promoter II of the bovine acetyl-coenzyme A carboxylase- α -encoding gene is widely expressed and strongly active in different cells*. Biochimica et Biophysica Acta 1576 pp. 324-329.
 - MASHAL R.D., KOONTS J., SKLAR J. (1995): *Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophages resolvase*. Nature Genetics, 9 pp. 177-183.
 - MELE M., BUCCIONI A., SERRA A., ANTONGIOVANNI M., SECCHIARI P. (2005): *I lipidi del latte di capra: Meccanismi di sintesi e principali fattori di variazione*. Capitolo 3 in L'alimentazione della capra da latte, G.Pulina Ed. Avenue media pp. 45-69
 - MIYAZAKY M., NTAMBI J.M. (2003): *Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 68 pp. 113-121.
 - MOIOLI B., NAPOLITANO F., ORRÙ L., CATILLO G. (2005): *Single nucleotide polymorphism detection in promoter I of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in sheep*. Small Ruminant Research 59 pp.49-53.
 - MOORE J.H., CHRISTIE W.W. (1981): *Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals*, in Christie W.W. (Ed.), *Lipid metabolism in ruminant animals*, Pergamon Press, pp.227-277.
 - MULLIS K.B., FALOONA F.A. (1987): *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed reaction*. Methods in Enzymology, 155 pp. 335-350.
 - MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S., MANIATIS T. (1985): *Nearly all single-base substitution by in DNA fragments joined to GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acids Research, 13 pp. 3131-3145.
 - MYERS R.M., LARIN Z., MANIATIS T. (1985a): *Detection of single base substitution by ribonuclease cleavage at mis-match in RNA:DNA duplexes*. Science, 230 pp. 1242-1246.
 - NAKAMURA M.T., NARA T.Y. (2002): *Gene regulation of mammalian desaturases*. Biochemical Society Transaction, 30 pp.1076-1079.
 - NASH K.A., INDERLIED C.B. (1996): *Rapid detection of mutation associated with macrolide resistance in *Micobacterium avium* complex*. Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 40 pp. 1748-1750.
 - NEELIN J.M. (1964): *Variants of κ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis*. Journal of Dairy Science, 47 pp.506-509.

- NEVILLE M.C., PICCIANO M.F. (1997): *Regulation of milk lipid secretion and composition*. Annu. Rev. Nutr. 17 pp. 159-184.
- NEWTON C.R., GRAHAM A., HEPTINSTALL L.E., POWELL S.G., SUMMERS C. ET AL. (1989): *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Research, 17 pp. 2503-2516.
- NG-KWAI H.K.F., GROSCLAUDE F. (1992): *Genetic polymorphism of milk proteins*. In: *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1 Proteins* (Ed. P.F. Fox) London, Elsevier Applied Science pp.405-455.
- NTAMBI J.M. (1995): *The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD)*. Prog. Lipid Res., 34 pp. 139-150.
- NTAMBI J.M. (1999): *Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol*. Journal of Lipid Research, 40 pp.1549-1558.
- NTAMBI J.M., BENÈ H. (2001): *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*. J. Molecular Neuroscience, 16 pp. 273-278.
- NTAMBI J.M., MIYAZAKI M. (2004): *Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism*. Progress in Lipid Research, 43 pp. 91-104.
- NYREN P., PETTERSSON B., UHLEN M. (1993): *Solid phase DANN minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay*. Analytical Biochemistry, 208 pp. 171-175.
- O'DONOVAN M.C., OEFENER P.J., ROBERTS S.C., AUSTIN J., HOOGENDOOM, B., GUY C., SPEIGHT G., UPADYAYA M., SOMMER S.S., MCGUFFIN P. (1998): *Blind analysis of denaturing high performance liquid chromatography as a tool for mutation detection*. Genomics, 52 pp. 42-49.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HATASHI K., SEHIYA T. (1989): *Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism*. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 86 pp. 2766-2770.
- OSBORNE T.F. (2000): *Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBP): Key regulator of nutritional homeostasis and insulin action*. JBC papers.
- PALMQUIST D.L., BEAULIEU A.D. (1992): *Differences between Jersey and Holstein cows in milk fat composition*. J. Dairy Sci. 75 (Suppl. 1) pp. p. 292 (Abstract).
- PALMQUIST D.L., BEAULIEU A.D., BARBANO D.M. (1993): *ADSA foundation symposium: Feed and animal factors influencing milk fat composition*. J. Dairy Sci. 76 pp. 1753-1771.

- PATTON S., JENSEN R.G. (1975): *Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland*, in Holman R.T. (Ed.), *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, Pergamon Press, Oxford, (vol. XIV) part 4 pp. 163-277.
- PERRY D., NICHOLLS P.J., THOMPSON J.M. (1998): *The effect of sire breed on the melting point and fatty acid composition of subcutaneous fat in steers*. J.Anim. Sci., 76 pp. 87-95.
- PETERSON D.G., MATITASHVILI E.A., BAUMAN D.E. (2004): *The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1*. Journal of Nutrition, 134 pp. 2523-2527.
- POLIDORI P., MAGGI G.L., MORETTI V.M., VALFRÈ F. (1993): *Caratteristiche dimensionali e composizionali dei globuli di grasso di bovine di razza Frisone Italiana e Bruna*. Atti 10° Congr. Naz. ASPA pp. 241-246.
- PRASAD M.R., JOSHI V.C. (1978): *Regulation of rat hepatic stearyl Coenzyme A desaturase*. The journal of Biological Chemistry, 254 pp. 997-999.
- PRECHT D., MOLKENTIN J., DESTAILLANTS F., WOLFF R.L. (2001): *Comparative studies on individual isomeric 18:1 acids in cow, goat, ewe milk fats by low temperature high resolution capillary gas-liquid chromatography*. Lipids, 36 pp. 827-832.
- PULINA G., NUDDA A. (2001): *La produzione del latte* Cap.1 del Libro "L'alimentazione degli ovini da latte" di Pulina G. pp.9-31.
- REN J., KNORR C., HUANG L., BREINIG B. (2004): *Isolation and molecular characterization of the porcine stearyl-CoA desaturase gene*. Gene, 340 pp. 19-30.
- RENNER E., KOSMACK U. (1974): *Genetic aspects of fatty acid composition of milk fat.3. Genetic correlations with fat content and fat yield*. Zuegtungskunde, 46 p. 257.
- RONAGHI M., KARAMOHAMED S., PETERSON B., UHLEN M., NYREN P. (1996): *Real Time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. Analytical Biochemistry, 242 pp. 84-89.
- RUSSO V., FONTANESI L. (2001): *Il miglioramento genetico animale: potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare*. Zootecnica e Nutrizione Animale 27 pp. 253-284.
- SAKAI J., NOHTURFFT A., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1998): *Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires*

- interaction with SREBP cleavage-activating protein. J. Biological Chemistry, 273 pp. 5785-5793.*
- SCHMIDT D.G. (1964): *Starch gel electrophoresis of κ -casein. Biochimica and Biophysica Acta, 90 pp.411-414.*
 - SECCHIARI P., ANTONGIOVANNI M., MELE M., BUCCIONI A., SERRA A., FERRUZZI G. (2001): *Effects of dietary fat on milk fat acidic composition of ewes and cows. Liv. Prod. Science, 70 p.175.*
 - SECCHIARI P., ANTONGIOVANNI M., MELE M., SERRA A., BUCCIONI A., FERRUZZI G., PAOLETTI F., PETACCHI F. (2003). *Effect of kind of dietary fat on quality of milk fat from Italian Friesian cows. Livest. Prod. Sci., 83, pp. 43-52.*
 - SECCHIARI P., CONTE G., FONTANESI L., MACCIOTTA N.P.P., MELE M., PIERAGOSTINI E., STEFANON B. (2006): *Acquisizioni della genetica e prospettive della selezione animale: Relazione Introduttiva. Quaderni dei Georgofili (In corso di stampa).*
 - SECCHIARI P., SERRA A., MELE M. (2005): *Il latte* Cap. 14 del Libro “Alimenti e salute” di Cocchi M., Mordenti A.L. pp.347-403.
 - SECCHIARI P., PAOLETTI F., MELE M., SERRA A., BUCCIONI A., ANTONGIOVANNI M. (2003): *Characterization of phospholipids ovine milk fat globule membrane (MGFM). Atti del Congresso Annuale “European Association for Animal Production—Roma 31 Agosto-3 Settembre 9 p.327.*
 - SESSLER A.M., KAUR N., PALTA J.P., NTAMBI J.M. (1996): *Regulation of stearyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem., 271 pp. 29854-29858.*
 - SHEFFIELD V.C., BECK J.C., KWITECK A.E., STONE E.M. (1993): *The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitution. Genomics, 16 pp. 325-332.*
 - SHEFFIELD V.C., COX D.R., LERMAN L.S., MYERS R.M. (1989): *Attachment of 40-base pair GC-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by PCR results in improved detection of single base changes. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 86 pp. 232-236.*
 - SMALL D.M. (1991): *The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. Annu. Rev. Nutr., 11 pp. 413-434.*
 - SOKOLOV B.P. (1990): *Primer extension technique for the detection of single nucleotides in genomic DNA. Nucleic Acids Research, 18 pp. 3618.*

- SOLARO P.C., BIRKENKAMP K., PFEIFFER P., KEMPER B. (1993): *Endonuclease VII of phage T₄ triggers mis-match correction in vitro*. Journal of Molecular Biology, 230 pp. 868-877.
- SPELLMAN R.J., FORD C.A., MCELHINNEY P., GREGORY G.C., SNELL R.G. (2002): *Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population*. J. Dairy Sci. 85 pp. 3514-3517.
- SYVANEN A.C., AALTO-SETÄLÄ K., HARJU L., KONTULA K., SÖDERLUND H (1990): *A primer guide nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E*. Genomics, 8 pp. 684-692.
- TANIGUCHI M., UTSUGI T., OYAMA K., MANNEN H., KOBAYASHI M., TANABE Y., OGINO A., TSUJI S. (2004): *Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acids composition in Japanese Black cattle*. Mammalian Genome, 14 pp.142-148.
- THALLER G., KRAMER W., WINTER A., KAUPE B., ERHARDT G., FRIES R. (2003): *Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds*. J. Anim. Sci. 81 pp. 1911-1918.
- THOMPSON M.P., KIDDY C.A., PEPPER L., ZITTLE C.A. (1962): *Variation in the as-casein fraction of individual cow's milk*. Nature, 195 pp. 1001-1002.
- TINDALL K.R., KUNKEL T.A. (1988): *Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase*. Biochemical Journal, 27 pp. 6008-6013.
- UNDERHILL P.A., JIN L.A., LIN A.A., MEHDI S.Q., JENKINS T., VOLLRATH D, DAVIS R.W., CAVALLI-SFORZA L.L., OEFENER P.J. (1997): *Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphism by denaturing high performance liquid chromatography*. Genomics, 7 pp.996-1005.
- VENTER C ET AL. (2001): *The sequence of human genome*. Science, 291 pp.1304-1351.
- VERNON R.G., FLINT D.J. (1988): *Lipid metabolism in farm animal*. Proc. Nutr. Soc., 47 pp. 287-293.
- WARD R.J., TRAVERS M.T., RICHARDS S.E., VERNON R.G., SALTER A.M., BUTTERY P.J., BARBER M.C. (1998): *Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome*. Biochimica et Biophysica Acta, 1391 pp.145-156.
- WELLER J.I., GOLIK M., SEROUSSI E., EZRA E., RON M. (2003): *Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population*. J. Dairy Sci. 86 pp. 2219-2227

- WINTER E.F., YAMAMOTO C., ALMOGUERA C., PERUCHO M. (1985): *A method to detect and characterized point mutations in transcribed genes: amplification and over expression of the mutant c-Ki-ras allele in human tumor cells.* Proceedings of the National Academy of Science of USA, 82 pp. 7575-7579.
- WOJCHIK J.H. (1964): *Polymorphism in κ -casein cow's milk.* Biochimica and Biophysica Acta Research Communication, 16 pp. 267-271.
- WOLFF R.L., BAYARD C.C. (1985): *Improvement in the resolution of individual trans 18-1 isomers by capillary gas liquid chromatography : use of a 100 m CP Sil-88 column.* J. AOCS, 72 pp. 1197-1201.
- WU D.Y., UGOZZOLI L., PAL B.K., WALLACE R.B. (1989): *Allele-specific enzymatic amplification of Beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickel cell anemia.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 86 pp. 2757-2760.
- YOUIL R., KEMPER B.W., COTTON R.G. (1995): *Screenign for mutation by enzyme MISMATCH cleavage with T_4 endonuclease VII. The EMC method.* Genomics, 32 pp. 87-91.
- ZHANG L., PARISMOO L.G., STENN K., PROUTY S.M. (1999): *Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcript generated from a single gene by usage of tandem polyadenilation sites.* Biochem J., 340 pp. 255-26