

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

**Dottorato di Ricerca in
Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
XXI ciclo – 2005/2008**

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,
dell’Ambiente e delle Produzioni Animali

TESI DI DOTTORATO

*Analisi della variabilità genetica al locus
della Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) nella
Bufala Mediterranea Italiana*

Dott.ssa Annalisa D’Avino

Relatore:
Prof. Luigi Ramunno

Coordinatore:
Prof.^{ssa} Maria Luisa Cortesi

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Origine del bufalo allevato in Italia.....	4
1.1.1 La Bufala Mediterranea Italiana.....	9
1.2 Il latte.....	16
1.2.1 Latte di bufala.....	21
1.3. La Mozzarella di Bufala Campana.....	27
1.4 Il grasso.....	30
1.4.1 Sintesi del lipidi.....	33
1.4.2 Sintesi degli acidi grassi.....	36
1.4.3 I CLA (Conjugated Linoleic Acid).....	40
1.5 Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD).....	45
1.5.1 Regolazione dell'espressione della Stearoyl-CoA Desaturasi..	49
1.5.2 Struttura genica.....	55
1.6 Fonte della variabilità genica.....	59
1.6.1 Origine degli SNP.....	65
2. OBIETTIVO.....	68
3. MATERIALI E METODI.....	69
3.1 Campionamento.....	69
3.2 Preparazione dei campioni di mRNA.....	69

3.3 Sintesi del cDNA mediante RT-PCR (Reverse Trascrizione- Polymerase Chain Reaction).....	70
3.4 Preparazione dei campioni di DNA.....	72
3.5 Disegno dei primer.....	73
3.6 Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).....	75
3.7 Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR.....	76
3.8 Sequenziamento dei frammenti amplificati.....	77
3.9 Metodica della PCR-RFLP al promotore.....	78
4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	80
4.1 Analisi dei trascritti.....	80
4.2 Struttura del gene che codifica per la Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) nella specie bufalina.....	86
4.2.1 Analisi del sesto esone.....	98
4.2.2 Analisi delle regioni introniche.....	100
4.3 Analisi del promotore.....	101
4.3.1 PCR-RFLP al promotore.....	106
5. CONCLUSIONI.....	108
6. BIBLIOGRAFIA.....	112

1. INTRODUZIONE

1.1 Origine del bufalo allevato in Italia

I bufali appartengono alla classe Mammiferi, ordine Artiodattili, sottordine Ruminanti, famiglia Bovidi, sottofamiglia Bovini, genere *Bubalus*, specie *bubalis*.

In origine tali animali venivano allevati allo stato brado o semiselvatico e spesso erano impiegati per arare i terreni più compatti, grazie alla loro rustica costituzione, o come animali da soma nelle zone più acquitrinose, dove i loro zoccoli lunghi e larghi non affondavano troppo.

Il bufalo presenta pelo scarso, pelle quasi nuda, spessa, coriacea, ricca di ghiandole sebacee (la pelle è untuosa al tatto) e limitate ghiandole sudoripare. Per questa ultima particolarità, esso si protegge dalla calura bagnandosi e coprendosi di fango (figura 1). La colorazione della pelle è nera con tendenza al rossiccio o grigio ardesia (più chiara sul ventre). Gli zoccoli sono appiattiti e allargati alla base, facilitando l'avanzamento nei terreni paludosi.



Fig. 1. Bufalo in acqua

Si distinguono due sottogeneri: bufalo asiatico e bufalo africano (figura 2). Il primo (*Bubalus bubalis* detto anche *water buffalo*) è diffuso nell'India orientale e settentrionale, mentre il secondo (*Syncerus caffer*) è diffuso nell'Africa occidentale, centrale ed orientale. Il bufalo indiano, *Bos bubalus* di Linneo, detto anche Arni, diretto progenitore del bufalo asiatico (Anoa), africano ed europeo, comprende il bufalo di fiume (*River buffalo*, assetto cromosomico $2n=50$) ed il bufalo di palude (*Swamp buffalo*, $2n=48$) derivato dal primo per una traslocazione cromosomica a tandem. Il bufalo africano include il *Syncerus caffer* ($2n=52$) ed il *Syncerus caffer nanus* ($2n=54$).



Fig. 2. Bufalo africano – bufalo asiatico

La presenza del bufalo in Italia ha radici molto antiche, com'è testimoniato dal ritrovamento di resti fossili nel Lazio e nell'isola di Pianosa (arcipelago toscano), probabilmente risalenti al periodo pre-romano.

Gli eventi climatici hanno successivamente portato all'apparente estinzione di questi animali, assenti al tempo dell'impero romano, per poi ricomparire nuovamente tra il VI ed il VII secolo d. C. .

Secondo alcuni, il bufalo fu introdotto in Italia in epoca longobarda, con le invasioni barbariche del VI secolo, e precisamente nel 596 d.C.. Secondo altri, furono i re normanni a diffonderlo in tutta l'Italia meridionale, intorno all'anno 1000, ed era già presente in Sicilia grazie agli Arabi.

Al di là delle varie ipotesi sulla sua introduzione, esistono inconfutabili testimonianze della presenza del bufalo in Italia a partire dal XII - XIII secolo. In particolare, la bufala si affermò in Campania nelle zone paludose della piana del Volturno e del Sele a causa dell'impossibilità di destinare quei terreni per fini agricoli.

In questi anni, il patrimonio bufalino italiano è andato incontro ad una continua espansione passando da una consistenza pari a circa 14080 capi controllati nel 1990 a 44430 capi controllati dall'ANASB nel 2007 (figura 3). Tali distribuzioni si concentrano prevalentemente in Campania (105 allevamenti con una media di 203 capi per allevamento) e nel Lazio (120 allevamenti con una media di 114 capi per allevamento) (figure 4 e 5).

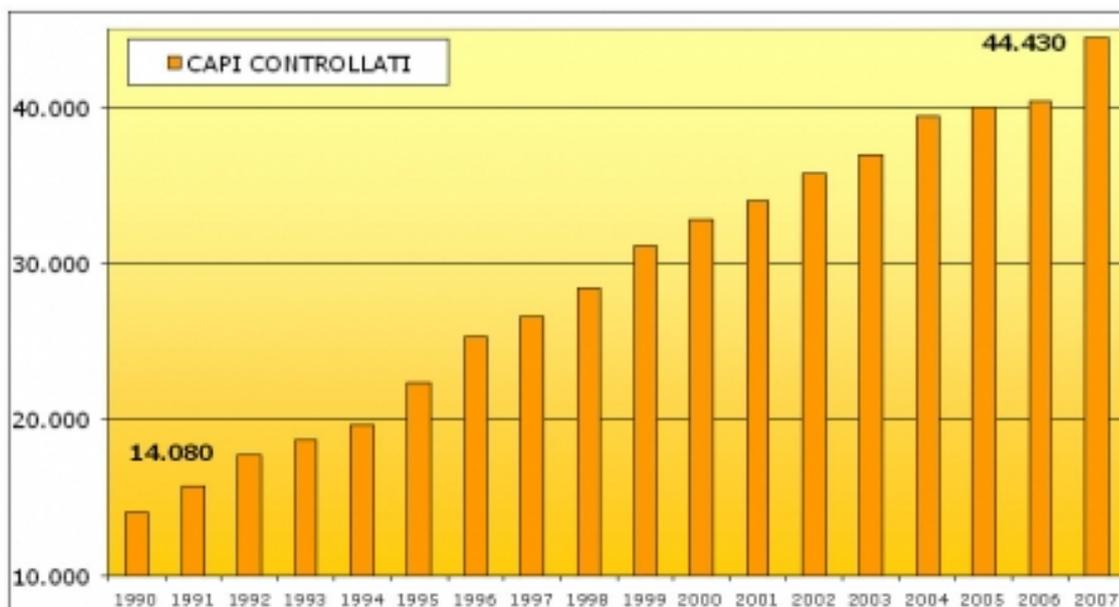


Fig. 3. Andamento dei capi controllati dal 1990 al 2007 (dati ANASB).

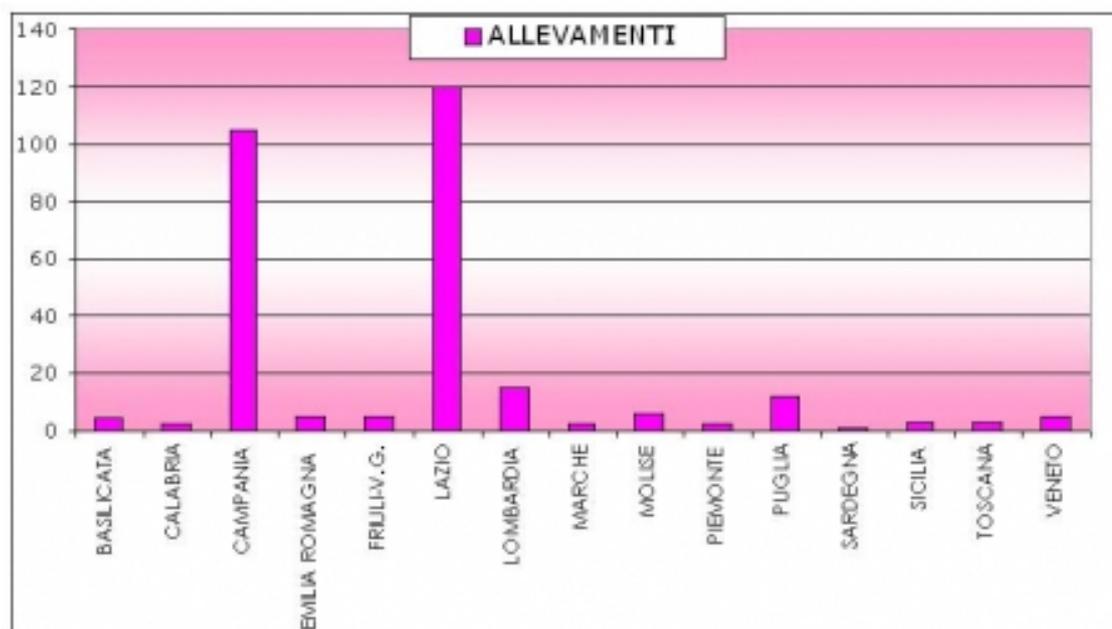


Fig. 4. Distribuzione degli allevamenti nelle regioni italiane (dati ANASB-2007).



Fig.5. Media dei capi per allevamento per ciascuna regione (dati ANASB-2007).

In Campania, in particolare, l'allevamento bufalino si localizza in provincia di Caserta, nell'area del basso Volturno-Garigliano, mentre nel Salernitano si estende dalla media e bassa valle del Sele fino alle pendici dei monti Alburni e del Cilento. Gli allevamenti napoletani sono situati, in gran parte, nei pressi del lago di Licola e dei Regi Lagni.

E' possibile affermare che la crescita della popolazione bufalina in Italia sia stata determinata principalmente dall' aumento del consumo della mozzarella ottenuta con latte di bufala e di Mozzarella di Bufala Campana a marchio DOP, un prodotto di alta qualità, con sapore caratteristico riconoscibile dai consumatori (De Stefano, 1999).

1.1.1 La Bufala Mediterranea Italiana

La bufala allevata in Italia si inquadra nella grande famiglia del tipo River. Fino a pochi anni fa essa era definita bufalo di tipo mediterraneo, mentre nel 2001 il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali le ha attribuito la denominazione “Bufala Mediterranea Italiana” (decreto ministeriale 201992 del 5/7/2001). Tale traguardo è stato raggiunto grazie al lungo isolamento e alla mancanza di incroci con altri tipi genetici. Per questo motivo, la bufala allevata in Italia può vantare un grado di “purezza” e delle caratteristiche di rusticità e produttività del tutto particolari, frutto di un’evidente differenziazione morfo-funzionale (figura 6):



Fig. 6. Bufala di razza Mediterranea Italiana

- Testa: armonica, leggermente allungata, con ampio sincipite a profilo convesso, coperto di peli folti. Fronte breve e larga con profilo

convesso molto accentuato nel maschio, naso largo e lungo a profilo rettilineo; padiglioni auricolari larghi e spessi, portati orizzontalmente con apertura in avanti, rivestiti di peli corti e radi all'esterno e lunghi ed abbondanti all'interno. Occhi grandi, neri, ravvicinati, vivaci, mobili con sopracciglia e ciglia lunghe. Bocca larga con mascelle forti (figura 7).



Fig. 7. Testa della Bufala Mediterranea Italiana

- Corna: di colore bruno, simmetriche, lunghe 50-60 cm nel maschio e più nella femmina, dirette lateralmente ed all'indietro, con sezione triangolare alla base nei maschi ed ovale nelle femmine, con solchi e rilievi trasversali sulla faccia craniale.

- Collo: poco voluminoso nella femmina, ricco di pliche verticali, con margine dorsale leggermente incavato e ventralmente rettilineo, convesso e privo di giogaia.

- Petto: forte ed ampio per contribuire ad aumentare la cavità toracica, con plica cutanea a forma di borsa voluminosa, più o meno carnosa negli animali anziani di entrambi i sessi.

- Garrese: esteso, lungo e bene arcuato, non molto largo, con rilievo mediano in corrispondenza delle apofisi spinose delle vertebre dorsali più pronunciato nei maschi.

- Dorso: lungo, largo, armonicamente fuso con le regioni adiacenti.

- Groppa: armonicamente sviluppata, tendente alla forma quadrata.

Lievemente inclinata verso il posteriore con vertebre sacrali e coccigee leggermente rilevate ma non alte; attacco della coda non rientrato.

- Coda: larga alla base, giustamente lunga.

- Torace: largo e profondo, armonicamente fuso con le regioni adiacenti.

- Spalle: forti e ben attaccate.

- Lombi: larghi, robusti, allineati con il dorso.

- Addome: voluminoso non cadente, fuso col torace.

- Fianchi: pieni e profondi.

- Arti: brevi nella porzione libera e ben muscolosi; tra loro ben distanziati, unghioni ben serrati e compatti, con suola alta, specie al tallone.

Pastoie corte e forti.

- Mantello e pigmentazione: mantello dal bruno chiaro (aleardo) al marrone bruciato quasi nero, di colore più carico in corrispondenza della parte anteriore del tronco; peli radi, lunghi, più abbondanti nella parte libera degli arti.

- Pelle: di colore ardesia o grigio scuro che scolora verso il rosso in corrispondenza delle pliche cutanee, specialmente nelle facce interne delle cosce e dell'attaccatura della mammella; musello, contorno degli occhi, orecchie, ano, vulva, prepuzio, scroto e unghioni neri.

- Mammella: ben conformata, distesa in avanti, di tessitura morbida, spugnosa, elastica, con pelle fine, untuosa e glabra, caudalmente ricca di pliche dopo la mungitura. Quarti regolari ed armonicamente sviluppati. capezzoli piuttosto lunghi, ben distanziati, verticali, vene addominali grosse ad andamento sinuoso, con fontane ampie, vene mammarie ben rilevate e visibili (figura 8).

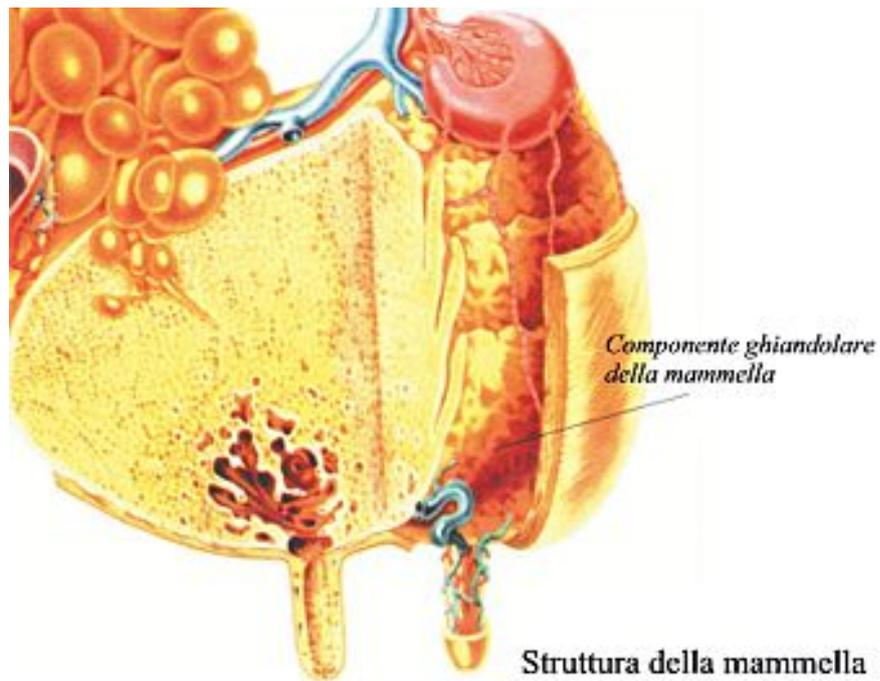


Fig. 8. Struttura della mammella

I difetti più gravi riguardano:

1. la statura: se i soggetti sono piccoli, avendo una capacità toracica ridotta, non daranno mai ottime produzioni;
2. la testa: se voluminosa, è indice di un animale grossolano ed essendo un carattere ereditario può causare problemi al parto;
3. tronco e spalle: se leggeri sono un grave difetto;
4. la groppa: se inclinata troppo all'indietro può determinare facilmente prolassi;
5. la linea dorsale: è un difetto se presenta una marcata insellatura;
6. gli arti posteriori: se pesanti e grossi è ridotto lo spazio per un buon attacco della mammella e quindi non sarà una buona lattifera; se leggeri vuol dire che l'animale è debole;

7. la mammella: la sua corretta morfologia è correlata con la produttività.

Nel confronto bufala/vacca, nella prima è evidente la minore proiezione anteriore e un attacco posteriore più basso. Infatti, se i quarti anteriori sono più globosi si può verificare un rilassamento dei legamenti con conseguente sbilanciamento. I quarti posteriori possono presentare uno sviluppo ridotto, se è stretta non aderisce bene agli arti ed è quindi traballante. Se i legamenti sono deboli ci possono essere dei problemi in fase di mungitura e la mammella può subire frequenti traumi. I difetti che si riscontrano a livello dei capezzoli possono essere svariati, si ricordano: capezzoli larghi, divergenti, molto ravvicinati oppure troppo grossi o troppo piccoli, di forma anomala e, spesso, in soprannumero.

La durata della lattazione è in media di 277 giorni. Essa raggiunge i periodi più lunghi quando il parto avviene nei mesi che vanno da Gennaio a Maggio, mentre le lattazioni più brevi si riscontrano quando il parto avviene nel periodo Agosto-Ottobre. I quantitativi di latte prodotti dalle bufale allevate in Italia si attestano mediamente intorno ai 19-20 q.li per lattazione, risultando quasi sempre superiori a quelli riscontrati in altri paesi europei (17-18 q.li).

Secondo i dati elaborati dall'Associazione Italiana Allevatori (AIA, 2004), la produzione di latte delle bufale iscritte al libro genealogico è aumentata dal 1995 al 2004 quasi del 10%, la percentuale di grasso è diminuita dello 0,02 % circa e la percentuale di proteine è aumentata dello 0,13 % circa (tabella 1).

ANNO	PRIMIPARE				SECONDIIPARE				TERZIPARE ED OLTRE				TOTALE			
	CAPI N.	LATTE KG.	GRASSO %	PROTEINE %	CAPI N.	LATTE KG.	GRASSO %	PROTEINE %	CAPI N.	LATTE KG.	GRASSO %	PROTEINE %	CAPI N.	LATTE KG.	GRASSO %	PROTEINE %
1977	48	1.427	6,71		156	1.484	6,44		1.247	1.630	6,42		1.451	1.608	6,43	
1978	77	1.350	6,38		149	1.381	6,44		1.278	1.689	6,42		1.504	1.641	6,42	
1979	436	1.371	7,42		290	1.665	7,40		1.463	1.720	7,27		2.189	1.643	7,39	
1980	499	1.495	7,50		457	1.662	7,56		1.724	1.794	7,42		2.680	1.716	7,45	
1981	619	1.545	7,79		587	1.743	7,75		2.069	1.794	7,78		3.275	1.738	7,78	
1982	766	1.631	7,66		836	1.722	7,71		2.956	1.742	7,74		4.558	1.720	7,73	
1983	1.350	1.570	7,64		1.020	1.684	7,61		3.688	1.732	7,60		6.058	1.688	7,61	
1984	781	1.631	8,09		703	1.777	8,05		5.753	1.605	7,82		7.237	1.624	7,87	
1985	805	1.612	8,10		945	1.843	8,01		6.085	1.599	7,80		7.835	1.630	7,86	
1986	1.002	1.562	8,59		1.006	1.694	8,55		5.670	1.627	8,25		7.678	1.627	8,33	
1987	1.340	1.614	8,15		1.242	1.763	8,16		6.497	1.703	7,88		9.079	1.698	7,96	
1988	1.461	1.719	8,32		1.574	1.786	8,25		6.704	1.753	8,04		9.739	1.753	8,12	
1989	1.535	1.757	8,32	3,42	1.573	1.876	8,41	3,55	6.514	1.844	8,29	3,62	9.622	1.836	8,31	3,58
1990	1.549	1.791	8,23	4,38	1.608	1.979	8,26	4,37	6.727	1.896	8,03	4,40	9.884	1.893	8,10	4,39
1991	1.926	1.839	8,29	4,43	1.627	2.003	8,25	4,41	7.334	1.909	8,10	4,41	10.937	1.911	8,16	4,41
1992	2.032	1.864	8,24	4,51	1.923	2.004	8,35	4,53	8.002	1.871	8,23	4,51	11.957	1.891	8,25	4,52
1993	2.284	1.853	8,10	4,55	2.450	2.047	8,18	4,53	8.079	1.898	8,08	4,53	12.813	1.919	8,11	4,54
1994	2.479	1.801	8,25	4,55	2.389	1.993	8,27	4,55	7.544	1.896	8,18	4,53	12.412	1.896	8,21	4,54
1995	3.335	1.875	8,33	4,57	3.043	2.016	8,35	4,56	9.000	1.990	8,27	4,55	15.378	1.970	8,30	4,55
1996	3.814	1.918	8,35	4,67	3.563	2.063	8,29	4,65	10.033	2.007	8,22	4,63	17.410	1.999	8,26	4,64
1997	3.937	1.937	8,08	4,68	3.699	2.102	8,17	4,67	10.652	2.043	8,04	4,65	18.288	2.032	8,07	4,66
1998	3.978	2.011	8,40	4,74	4.004	2.116	8,42	4,73	11.407	2.063	8,36	4,72	19.389	2.064	8,38	4,73
1999	4.792	2.013	8,41	4,81	4.144	2.164	8,39	4,80	11.946	2.099	8,35	4,80	20.882	2.092	8,37	4,80
2000	5.262	2.094	8,36	4,77	4.509	2.205	8,40	4,74	12.674	2.146	8,33	4,73	22.445	2.145	8,35	4,74
2001	5.214	2.087	8,38	4,68	4.876	2.202	8,45	4,66	12.837	2.147	8,37	4,66	22.927	2.145	8,39	4,66
2002	5.502	2.088	8,33	4,75	4.815	2.230	8,33	4,75	13.687	2.178	8,24	4,72	24.004	2.168	8,28	4,73
2003	5.162	2.189	8,12	4,68	4.791	2.241	8,13	4,66	14.922	2.149	8,08	4,04	24.945	2.175	8,10	4,65
2004	2.494	2.115	8,13	4,70	5.217	2.261	8,11	4,68	18.577	2.172	8,04	4,67	26.288	2.184	8,06	4,68

Tab.1 . Produzioni medie di latte delle bufale iscritte all'AIA dal 1977 al 2004

Il latte bufalino prodotto in Italia viene completamente destinato alla trasformazione in mozzarella, la quale in Campania e nel basso Lazio, le regioni in cui si concentra la maggior parte degli allevamenti, ha il marchio DOP.

Attualmente l'allevamento della Bufala Mediterranea Italiana si sta evolvendo, anche nella realizzazione di prodotti alternativi alla mozzarella, come la ricotta di bufala campana, che possiede un disciplinare di produzione già elaborato ed in via di presentazione per il riconoscimento DOP, la carne, con imminente riconoscimento IGP, ed altri neo-prodotti caseari più diffusi nel nord Italia come lo stracchino e la robiola.

1.2 Il latte

In base al R.D. 9/5/29 n° 994 e successive modifiche, il latte (figura 9) si definisce come: “ *un liquido di colore bianco opaco o giallognolo, dal sapore dolciastro derivante dalla mungitura regolare, completa ed ininterrotta delle ghiandole mammarie di animali in buono stato di salute e di*



Fig. 9. Il latte

nutrizione”. Può essere chiamato semplicemente latte quello proveniente da bovine; per le altre specie, invece, va sempre specificata l’origine.

Si tratta di un liquido di complessa composizione, dal sapore dolce e con un pH prossimo alla neutralità. La funzione naturale del latte è quella di essere un alimento esclusivo dei giovani mammiferi durante il periodo più critico della loro esistenza, dopo la nascita, quando la crescita è rapida e le richieste nutrizionali sono alte. La notevole complessità della composizione del latte risponde a questa funzione.

Il costituente principale 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. I componenti principali del latte sono i grassi (fondamentalmente trigliceridi), i glucidi (essenzialmente lattosio), le proteine (rappresentano circa il 95% dell’azoto presente nel latte) ed i sali minerali. In quantità minime sono presenti anche altri

componenti (lecitine, vitamine, enzimi, ecc..) alcuni dei quali hanno una grande rilevanza biologica.

La struttura del latte nelle differenti specie è più o meno simile, ma può presentare delle differenze rilevanti nella composizione centesimale (tabella 2), determinando, di conseguenza, l'esistenza di proprietà a volte molto diverse. Per esempio, il latte dei ruminanti contiene molta più caseina che siero-proteina (albumina) ed è per questo detto "caseinoso". Quello di altre specie, soprattutto carnivori, al contrario, è detto "albuminoso".

	BUFALA	VACCA	PECORA	CAPRA
Acqua	81.50	87.50	82.00	86.30
Residuo intero	18.50	12.50	18.00	13.70
Residuo magro	10.30	9.00	11.00	9.50
Grasso	8.20	3.50	7.00	4.20
Lattosio	5.00	4.50	4.50	4.60
Proteine	4.30	3.40	5.70	4.10
Ceneri	1.00	1.10	0.80	0.80

Tab. 2. Composizione chimica media del latte di specie animali di interesse zootecnico(mg/100gr di prodotto) (Correale e Citro, 1995)

Il primo liquido secreto dalla ghiandola mammaria, subito dopo il parto, è il colostro mediante il quale la madre trasmette le proprie difese immunitarie al figlio, le quali lo proteggeranno nei primi mesi di vita. Si tratta di un liquido giallo, sieroso, secreto dalle ghiandole mammarie durante la gravidanza ed i primi giorni dopo il parto. Esso è composto principalmente da acqua, leucociti, proteine (fra le quali anche agenti immunologici), è ricco di vitamine, sali minerali, grassi e carboidrati. Il colore è conferito da un'abbondante presenza di carotene (precursore della vitamina A), ed è secreto dalle ghiandole mammarie durante la gravidanza e i primi giorni successivi al parto dopo i quali inizia la produzione del latte vero e proprio.

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

- *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, razza ed individuo;*
- *Fattori zootecnici: sono numerosi e legati alla tecnica di allevamento utilizzata ed al tipo di mungitura.*

Le proteine del latte sono costituite dalle caseine (80%) e dalle sieroproteine (20%). La frazione delle caseine è l'insieme di tre fosfoproteine calcio sensibili (α_1 , α_2 e β -caseina) e di una glicoproteina nota col nome di κ -caseina. Le caseine sono organizzate in micelle (figura 10), nelle quali la κ -

caseina si dispone all'esterno, consentendo alla micella di rimanere in sospensione, grazie alla sua idrofilicità.

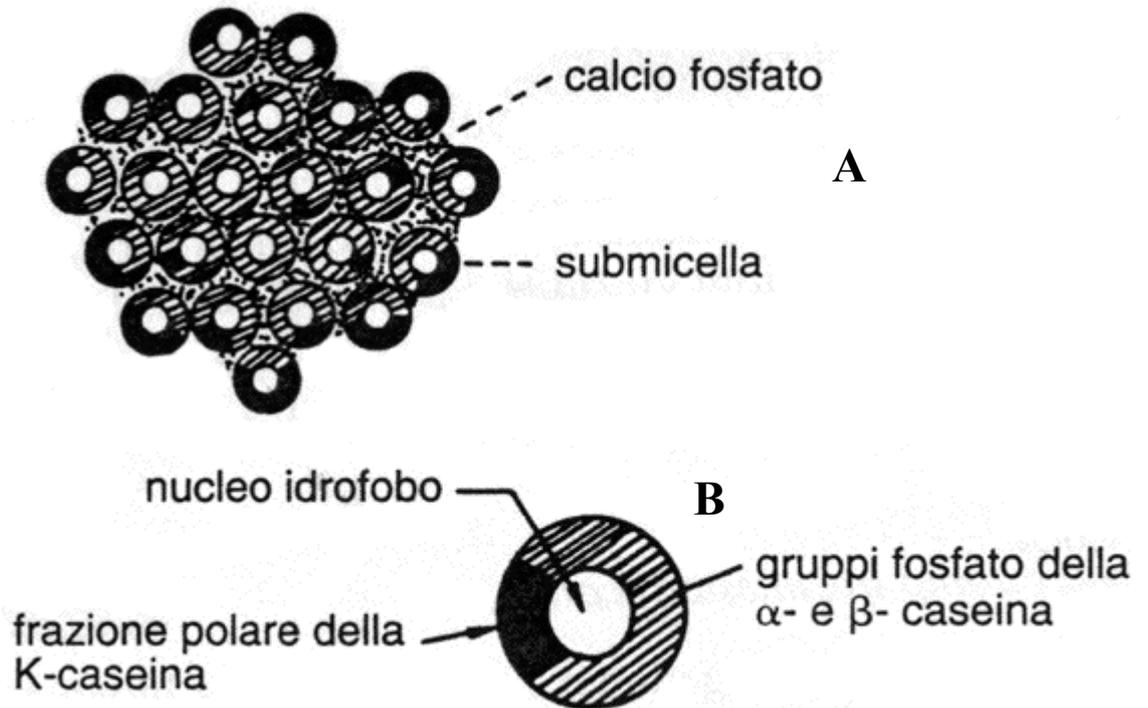


Fig. 10. Modello strutturale di una micella (A) e di una submicella (B)

Le sieroproteine sono costituite da albumine (75%), immunoglobuline (15%, più concentrate nel colostro), proteoso-peptoni (10%, derivati dall'idrolisi parziale della β -caseina) ed enzimi (ossidasi, catalasi, lipasi, lisozima, proteasi, fosfatasi, ecc.). Le due frazioni maggiormente rappresentate sono quelle delle β -lattoglobuline e delle α -lattoalbumine.

I grassi sono presenti nel latte sotto forma di globuli con diametro medio di 2-5 μm e racchiusi da una membrana di natura in parte lipidica ed in parte proteica (figura 11). Tali globuli sono costituiti per il 95-98% da trigliceridi formati da acidi grassi e glicerolo. Gli acidi grassi sono sintetizzati in parte "ex-

novo” dalla mammella (da C:8 a C:14) ed in parte derivano dalle lipoproteine plasmatiche e dai trigliceridi.

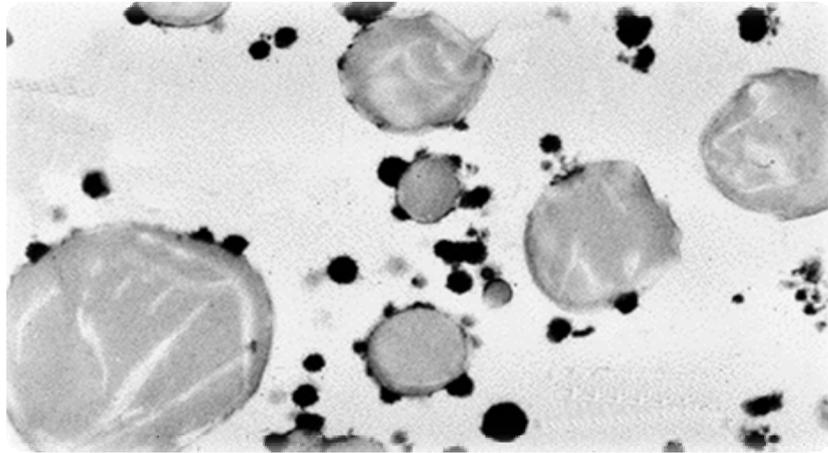


Fig. 11. Globuli di grasso dispersi nel latte

I glucidi sono rappresentati essenzialmente dal lattosio, un disaccaride che esiste soltanto nel latte. Tale zucchero concorre a mantenere l'equilibrio microbico naturale a livello del tubo digerente, trasformandosi in acido lattico per opera dei batteri lattici; talvolta il lattosio è causa di intolleranza al latte in soggetti con deficit di lattasi.

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 ed 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.

1.2.1 Latte di bufala

Il latte di bufala ha sapore dolce e colore bianco opaco dovuto all'assenza di carotenoidi. Il suo peso specifico è in media pari a 1.031 Kg/litro a 15°C mentre il punto di congelamento varia tra -0,56 e -0,57°C (Neimann *et al.*, 1992). Il pH oscilla tra 6,26 e 6,56 (Correale e Citro, 1995).

Composizione per 100 g							
	Estratto secco (totale)	Grasso	Lattosio	Sali	Totale	Sostanze azotate	
						Caseina %	N.P.N.(*)%
Latte umano	11,7	3,5	6,5	0,2	1,5	28	17
Equini							
Giumenta	10	1,5	5,9	0,4	2,2	50	-
Asina	10	1,5	6,2	0,54	1,8	45	-
Ruminanti							
Vacca	12,5	3,5	4,7	0,8	3,5	78	5
Capra	13,6	4,3	4,5	0,8	4	75	7
Pecora	19,1	7,5	4,5	1,1	6	77	5
Bufala	17,8	7,5	4,7	0,8	4,8	80	-
Renna	31,9	17,5	2,5	1,5	10,4	90	-
Suini							
Scrofa	18,3	6	5,4	0,9	6	50	8
Carnivori e roditori							
Gatto	20	5	5	1	9	33	-
Cane	24,2	10	3	1,2	10	50	-
Coniglio	29,3	12	1,8	2	13,5	70	-
Cetacei							
Focena	59,9	46	1,3	0,6	12	55	-
Balena	46,3	35	0,8	0,5	10	-	-

(*) N.P.N. = Sostanza azotata non-proteica

Tab. 3. Composizione chimica media di 100 grammi di latte di varie specie.

Il grasso è compreso tra il 6% ed il 9% con prevalenza dell'acido oleico tra gli acidi grassi insaturi e dell'acido palmitico tra gli acidi grassi saturi. Le sostanze azotate variano tra il 3,8 ed il 4,3%. Le sostanze azotate non proteiche variano tra lo 0,20 e lo 0,30%. Il lattosio varia tra il 4,5 ed il 5% (tabella 3).

La composizione chimica del latte bufalino varia nel corso della lattazione. In particolare, si assiste ad un'oscillazione del grasso tra il 7,5% ed il 12-14% dall'inizio (dopo la fase colostrale) alla fine della stessa (de Franciscis, Di Palo, 1995).

Le componenti lipidiche sono rappresentate principalmente da gliceridi (mono-, di- e tri-gliceridi, rispettivamente 0,7%, 4,1% e 95%), da acidi grassi liberi, da colesterolo e da fosfolipidi. In particolare, il latte di bufala si caratterizza per la prevalenza dell'acido oleico tra gli acidi grassi insaturi e dell'acido palmitico tra quelli saturi, situazione esattamente opposta a quella che si riscontra nel latte bovino (Malacarne *et al.*, 2001).

Le principali differenze chimiche e fisico-chimiche tra il latte bufalino e quello vaccino sono rappresentate dal contenuto in grasso e proteine, caratteri fondamentali per la caseificazione, i quali risultano in media pari rispettivamente al 7,5% ed al 4,4% nel latte bufalino ed al 3,3% e 2,7% nel latte vaccino. Rispetto al latte bovino, quello bufalino risulta, inoltre, particolarmente ricco di C:4, C:16, C:17 e C:18, ma è più povero di C:6, C:8, C:10, C:12, C:14 (Ramamurthy *et al.*, 1971). E' interessante notare, poi, che la concentrazione del colesterolo totale è più bassa: 275 (latte bufalino) vs 330

(latte vaccino) mg/100 g di grasso, mentre la frazione esterificata è più elevata (63,5 mg/100 g di latte) (Bindal *et al.*, 1981).

La frazione proteica risulta essere maggiormente rappresentata dalla caseina (α_1 , β , α_2 e k). Il contenuto totale di caseine nel latte di bufala varia tra il 4,0% e 4,6% (Amante *et al.*, 2003). Esse sono presenti secondo i seguenti valori percentuali:

- α_1 caseina → 30%
- α_2 caseina → 10%
- β caseina → 48%
- k caseina → 12%

Le sieroproteine variano tra lo 0,6% e lo 0,8% delle proteine totali (Balasini D., 1999). Esse sono presenti secondo i seguenti valori percentuali:

- sieroalbumina → 4,5%,
- β -lattoglobulina → 48,65%,
- α -lattoalbumina → 37,23%,

La frazione dei proteoso-peptoni è di norma compresa tra lo 0,15% e lo 0,20%. Delle sostanze non proteiche, il 35-40% è costituito da urea, mentre il 18-20% da amminoacidi liberi. Per questi ultimi è stata evidenziata una maggiore quantità di leucina (11,9 mg / 100 ml di latte) e di lisina (7,4 mg / 100ml di latte), rispetto al triptofano (1,3 mg / 100 ml di latte) ed alla cisteina (1,9 mg / 100 ml di latte) presenti in quantità limitata.

Per quanto concerne il contenuto glucidico, oltre all'elevata quantità di lattosio, si registrano piccole percentuali di galattosio (0,244%), galattosammina (0,231%) e acido N-acetilneuraminico (0,189%).

Tra le varie componenti vitaminiche le maggiori frazioni ponderali sono rappresentate dal contenuto in acido ascorbico (25,4%) ed acido p-aminobenzoico (26,55%), (Albonico, 1970).

Analogamente al latte di altre specie, la componente minerale (espressa in mg/100g di latte) si caratterizza per l'elevata presenza tra i macroelementi di calcio (180-210), magnesio (0,14-0,16) e fosforo (0,10-0,13), mentre i microelementi più abbondanti sono lo zinco (0,23) ed il ferro (0,1) (Proto, 1995).

Un altro aspetto della tipicità del latte bufalino è strettamente legato alla sua natura microbiologica. In condizioni normali, infatti, nel latte di bufala sono presenti alcuni ceppi di lattobacilli in concentrazioni superiori a quelle contenute nel latte vaccino. L'attività metabolica di questi batteri risulterebbe responsabile, per la maggior parte, del sapore e dell'aroma tipici del formaggio, attraverso la produzione di particolari composti, ed influirebbe notevolmente sul fenomeno di acidificazione della cagliata durante la trasformazione. Questi diversi valori contribuiscono senz'altro alla tipicità del prodotto grazie alla diversa consistenza che esso va ad assumere. Conferiscono, inoltre, una maggiore resa alla trasformazione.

Il prodotto principale che si ottiene dalla lavorazione del latte di bufala è la mozzarella secondo una resa media pari al 24,6%. Vale a dire che dalla lavorazione di un quintale di latte di bufala si ottengono oltre 24 Kg di mozzarella, contro i 13 Kg ottenuti mediamente da un quintale di latte vaccino (la resa del latte bufalino risulta, in questo caso, superiore di circa 1,8 volte rispetto a quella del latte vaccino).

Poiché dalla mungitura di una bufala si ricavano mediamente 12 litri di latte al giorno e per ottenere un chilo di mozzarella di bufala occorrono circa 4 litri e mezzo di latte, si calcola che ogni animale dà la possibilità di produrre 3 chili di mozzarella al dì.

In aggiunta, dalla trasformazione del latte di bufala si possono ottenere prodotti complementari quali il burro, la ricotta, il siero e le "acque bianche". Il siero di latte viene principalmente utilizzato per la produzione di burro e di ricotta. Pertanto, se alla produzione di burro viene associata quella della ricotta, da un quintale di latte di bufala trasformato si possono ottenere, in media, 6 kg di burro, 4 Kg di ricotta e 25 Kg di mozzarella.

Dalla trasformazione residuano anche delle "acque bianche", dette così per il colore lattiginoso assunto dall'acqua di filatura, che talvolta vengono utilizzate per il recupero del grasso presente. Per la conservazione della mozzarella viene, invece, solitamente adoperata acqua salata detta anche "salsetta" per la quale è previsto il controllo della densità e dell'acidità.

Benché la produzione di latte di bufala si prolunghi per l'intero corso dell'anno, la sua distribuzione mensile varia: si nota, infatti, una maggiore disponibilità nei mesi autunnali ed invernali ed una forte contrazione in quelli estivi. Questo fenomeno dipende dalle caratteristiche riproduttive della bufala, che trova le condizioni più favorevoli per la sua riproduzione nel semestre agosto-febbraio. Poiché la durata media della gestazione è di 310 giorni, i parti si concentrano, prevalentemente, nel semestre giugno-dicembre, e ciò spiega l'aumento delle disponibilità di latte nella stagione autunnale ed invernale. Tale fenomeno va a scontrarsi con l'andamento della domanda del consumatore e per ovviare a questo inconveniente si attua la destagionalizzazione dei parti andando ad intervenire principalmente sulle manze, in quanto il loro periodo riproduttivo è più facilmente influenzabile. Oggi esistono tecniche vantaggiose per operare la destagionalizzazione e garantire il parto di almeno il 20-30% delle bufale in primavera.

1.3 La Mozzarella di Bufala Campana



Fig.12. Mozzarella di Bufala Campana

La Mozzarella di Bufala Campana (figura 12) è uno dei più noti formaggi a “pasta filata fresca”. Questa denominazione riguarda i formaggi la cui tecnologia di produzione è caratterizzata dalla filatura conseguente alla fase di maturazione realizzata con l’acidificazione della cagliata sotto siero (Sciancalepore, 1999).

Il Consorzio è l’unico organismo riconosciuto dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali per la tutela, la vigilanza e la valorizzazione del formaggio Mozzarella di Bufala Campana.

Con il Regolamento CE n. 1107 del 1996 è stata riconosciuta a livello europeo la Denominazione di Origine Protetta (DOP) Mozzarella di Bufala Campana, a tre anni di distanza dal D.P.C.M del 10/05/1993 che riconosceva la Denominazione di Origine Controllata (D.O.C.). Con tale riconoscimento vengono istituzionalmente identificate quelle caratteristiche organolettiche e merceologiche del formaggio Mozzarella di Bufala Campana derivate prevalentemente dalle condizioni ambientali e dai metodi tradizionali di preparazione esistenti in determinate aree geografiche della regione Campania (Province di Caserta e Salerno e parte di Napoli e Benevento) e del basso Lazio (provincia di Latina, Frosinone e parte di Roma).

Il formaggio con denominazione «Mozzarella di Bufala Campana» deve recare apposto all'atto della sua immissione al consumo il contrassegno di cui alla figura 13, il quale presenta la parte superiore raffigurante un sole a raggi rossi, la parte inferiore rappresentata da un campo verde e la parte centrale recante la testa nera della bufala.



Fig. 13. Marchio della Mozzarella di Bufala Campana

Il marchio della DOP, Denominazione di Origine Protetta, invece, è un logo blu e giallo con i solchi di un campo arato al centro di un sole circondato dalle 12 stelle dell'Unione Europea (figura 14- B).

Con il Regolamento (CE) n. 628/2008 del 2 luglio 2008, l'Unione Europea ha posto rimedio ad un errore di comunicazione: il marchio DOP, prima identico al marchio IGP (tranne che per la dicitura del riconoscimento trascritta all'interno) è ora evidentemente riconoscibile per il colore rosso della circonferenza esterna dentellata e del cerchio interno (in precedenza blu); resta il

giallo nella corona circolare intermedia che contiene la dicitura “Denominazione d’Origine Protetta” (Figura 14- A).



Fig. 14. Marchio della DOP, Denominazione di Origine Protetta

Fino al 1° maggio 2010, i produttori potranno esporre ancora il vecchio marchio al fine di esaurire le confezioni già in circolazione (figura 15).



Fig. 15. Mozzarella di Bufala Campana e suo confezionamento

1.4 Il grasso

Dal greco *LIPOS* = GRASSO, si tratta di sostanze organiche animali o vegetali, chimicamente composte da tre elementi: carbonio, idrogeno ed ossigeno, costituite da un elevato numero di atomi di carbonio ed un contenuto molto basso in ossigeno; per questo motivo a parità di volume, pesano meno rispetto ai glucidi ed ai protidi (l'atomo di idrogeno è meno pesante degli atomi di ossigeno, carbonio ed azoto).

I grassi hanno la caratteristica di essere insolubili in acqua e solubili in solventi organici (acetone, etere, benzina, cloroformio ecc.), rappresentano una sorgente molto concentrata di energia, partecipano come costituenti di strutture cellulari che sono indispensabili per il trasporto e l'assorbimento delle vitamine liposolubili (A, D, E, K) e danno origine (precursori) alla formazione di ormoni e prostaglandine.

I lipidi possono essere classificati dal punto di vista:

- ✓ Chimico
- ✓ Fisico
- ✓ Funzionale
- ✓ Nutrizionale

Dal punto di vista chimico possono essere distinti in lipidi semplici (esteri di un alcool con acidi grassi) e comprendono gliceridi, steroidi e cere, e

lipidi composti (esteri di un alcool con acidi grassi e con altre sostanze come basi azotate, acido fosforico e zuccheri).

I gliceridi sono esteri del glicerolo con acidi grassi. Il glicerolo può esterificarsi con una, due o tre molecole di acido grasso dando luogo alla formazione di mono- di- triacilgliceroli. Questi ultimi, detti anche trigliceridi o grassi neutri, generalmente contengono tre molecole di acidi grassi differenti tra loro (triacilgliceroli misti) e costituiscono la forma sotto cui i grassi si depositano nei tessuti.

Appartengono alla categoria degli steroidi tutte le sostanze che derivano dal nucleo ciclopentanoperidrofenantrene come ad esempio alcuni ormoni, gli acidi biliari e le sapogenine. Quando uno steroide contiene uno o più gruppi ossidrilici e non ha gruppi carbonilici o carbossilici viene detto sterolo. Un tipico rappresentante di questa categoria è il colesterolo: esso è precursore di alcuni ormoni steroidei, quali l'aldosterone, il cortisolo, il progesterone, ecc. e della vitamina D. Il colesterolo si trova nel plasma in forma libera ed esterificata, ed è un componente delle membrane cellulari delle cellule eucarioti. Nell'uomo, oltre al colesterolo introdotto con gli alimenti, vi è quello di origine endogena, sintetizzato in particolare dal fegato, ma anche da pelle e testicoli in quantità di 1,5-2 g/die, in quantità cioè nettamente superiore a quella fornita dalla dieta (300 mg/die).

Infine, le cere sono esteri di un alcool monovalente con acidi grassi superiori.

I lipidi composti comprendono fosfolipidi e glicolipidi. I fosfolipidi sono costituenti fondamentali delle membrane cellulari. Sono acidi grassi più acido fosforico con una base azotata.

I glicolipidi contengono glucidi, acidi grassi, una base azotata ma non acido fosforico. A questo gruppo appartengono importanti costituenti delle strutture cellulari nervose.

Dal punto di vista fisico esistono lipidi che a temperatura ambiente mantengono lo stato liquido (quali gli oli vegetali), o lo stato solido (grassi animali). Lo stato fisico viene influenzato dalla lunghezza della catena degli acidi grassi, dalle isomerie di posizione e dal rapporto di acidi grassi saturi/insaturi. Generalmente i lipidi solidi a temperatura ambiente contengono acidi grassi saturi, contrariamente a quelli liquidi che contengono acidi grassi insaturi.

Dal punto di vista funzionale si possono distinguere i lipidi di deposito (lipidi semplici, composti da carbonio, idrogeno ed ossigeno) ed i lipidi strutturali (lipidi complessi formati da carbonio, idrogeno e ossigeno + azoto e fosforo).

I lipidi di deposito sono formati principalmente da trigliceridi, tre molecole di acidi grassi con una di glicerolo (il glicerolo è un alcool, la cui sorte metabolica è simile a quella dei glucidi). I trigliceridi rappresentano il 98% dei lipidi commestibili. Essi si accumulano in particolari siti (ad es. sotto cute) e rappresentano un'importante riserva di energia e di nutrienti. Vengono

immagazzinati negli adipociti e servono anche come isolante degli organi interni. Possono, all'occorrenza, essere trasformati nelle altre due forme di grasso presenti nel corpo umano (fosfolipidi e colesterolo).

I lipidi strutturali sono rappresentati prevalentemente da fosfolipidi o fosfatidi, che compongono le membrane di rivestimento cellulare ed i filamenti di mielina (guaine dei nervi). Sono indispensabili per produrre le prostaglandine ed altri eicosanoidi che influenzano la produzione ormonale e la pressione sanguigna.

Dal punto di vista nutrizionale i lipidi si dividono in visibili ed invisibili. I primi sono quelli che possono essere separati dai tessuti animali e vegetali, gli altri non possono essere separati (ad esempio il grasso dei formaggi).

1.4.1 Sintesi dei lipidi

I ruminanti sintetizzano i lipidi attraverso la via delle fermentazioni ruminali e quella delle attività digestive post-ruminali.

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. Da quest'ultimo si ottiene l'acetato attraverso la *via dell'Acetil-fosfato*, il proprionato attraverso la *via del MetilmalonilCoA* e il butirrato tramite la *via dell'Acetil CoA*. L'acetato ed 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 li costituiscono. La lipasi idrolizza completamente i trigliceridi ad acidi grassi e glicerolo, con piccoli accumuli di mono- e di-gliceridi.

I lipidi presenti nel rumine non sono fermentati, ma subiscono un processo di idrogenazione ad opera di batteri ruminanti. La loro digestione avviene nella fase post-ruminale in un *medium* bifasico costituito da una componente 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.

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).

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 (figura 16), 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).

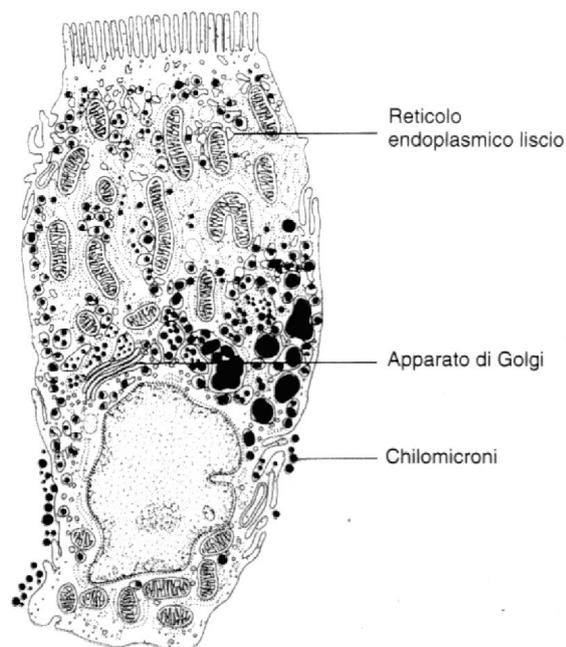


Fig. 16. Formazione dei chilomicroni.

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.

1.4.2 Sintesi degli acidi grassi

Gli acidi grassi sono acidi monocarbossilici alifatici. Rappresentano gli ingredienti costitutivi di quasi tutti i lipidi complessi e dei grassi vegetali e animali. Possono essere classificati in base alla lunghezza della catena carboniosa come:

- Acidi grassi *a catena corta* con un numero di atomi di carbonio da 1 a 4.
- Acidi grassi *a catena media* con un numero di atomi di carbonio da 8 a 14
- Acidi grassi *a catena lunga* con un numero di atomi di carbonio da 16 a 20-24.

Un'altra classificazione si basa sulla presenza o assenza di doppi legami nella catena carboniosa, da cui dipende anche la temperatura di fusione degli acidi grassi stessi, classificati come:

- Acidi grassi *saturi* se essi sono assenti (ad esempio acido caprilico C 8:0, acido palmitico C 16:0, acido stearico C 18:0).
- Acidi grassi *insaturi* se essi sono presenti, monoenoici se ne è presente uno e polienuici se ne sono presenti più di uno. (ad esempio acido oleico

C18:1, acido linoleico C18:2, acido linolenico C18:3, acido arachidonico C20:4).

Alcuni acidi grassi, essendo essenziali, vengono classificati anche in base alla loro appartenenza a determinati processi metabolici:

- omega-3: l'ultimo doppio legame è presente sul terzo carbonio a partire dalla fine (ad esempio l'acido linolenico C 18:3).
- omega-6: l'ultimo doppio legame è presente sul sesto carbonio a partire dalla fine (ad esempio l'acido linoleico C 18:2).

I meccanismi con cui gli acidi grassi di queste due famiglie agiscono sulla salute dell'uomo sono stati negli anni oggetto di numerosi studi mentre risulta già nota l'importanza del loro apporto attraverso la dieta. Ad esempio, tra i composti della serie omega-6 va sottolineata l'importanza dell'acido arachidonico, il quale, oltre ad avere un ruolo di tipo strutturale e funzionale nelle membrane cellulari e subcellulari, è anche precursore di prostaglandine, trombossani e leucotrieni.

Gli acidi grassi della famiglia omega-3 hanno, invece, effetti fisio-metabolici differenti, tra cui:

- modificazione del metabolismo delle lipoproteine con riduzione dei trigliceridi (-70%), sia di quelli a digiuno che di quelli postprandiali.
- regressione del processo arteriosclerotico grazie alla riduzione della sintesi di citochine e interleuchina.

- prevenzione della trombosi grazie all'inibizione della sintesi, nelle piastrine, del trombossano A2.
- riduzione della risposta infiammatoria.
- inibizione della risposta immune.

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).

Nei ruminanti il sito di maggiore sintesi degli acidi grassi è il tessuto adiposo. Durante la lattazione, invece, è la ghiandola mammaria a svolgere la maggiore attività biosintetica .

I meccanismi responsabili della sintesi degli acidi grassi sono due, citoplasmatico, che rappresenta la via principale, e mitocondriale. La sintesi degli acidi grassi fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma; il processo metabolico prevede l'intervento di alcuni enzimi chiave quali l'Acetil CoA Carbossilasi (ACC) e la Sintasi degli acidi grassi (FAS). L'ACC catalizza la formazione del malonil-CoA a partire dall'acetil-CoA. Il FAS, invece, catalizza la condensazione ciclica del malonil-ACP con molecole di acetato. La reazione di condensazione si ripete per un certo numero di volte sino alla formazione del palmitoil-CoA (C16), 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). 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 Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) che introduce un doppio legame in posizione *cis*- Δ^9 della catena carboniosa.

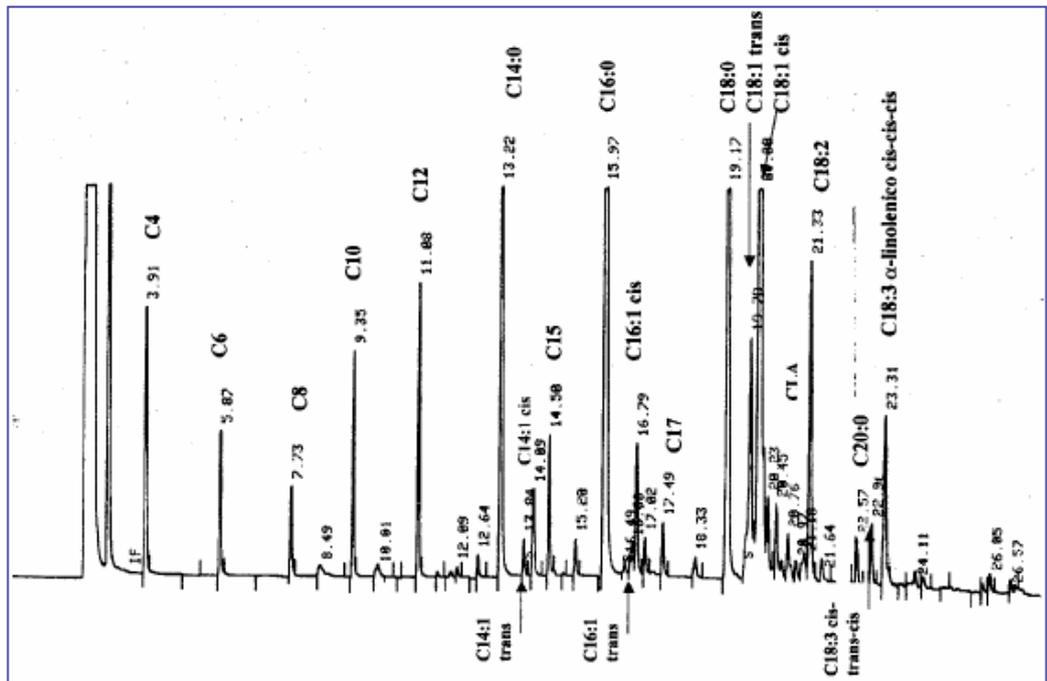


Fig. 17. Tracciato gascromatografico di un grasso lattico

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.

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, i quali 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.

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.

1.4.3 I CLA (Conjugated Linoleic Acid)

I CLA sono una categoria di acidi grassi isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (LA) e presentano un sistema di doppi legami che possono avere configurazione *cis* o *trans*. Tale categoria è rappresentata 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*).

La struttura dei due isomeri più rappresentativi è mostrata in figura 18.

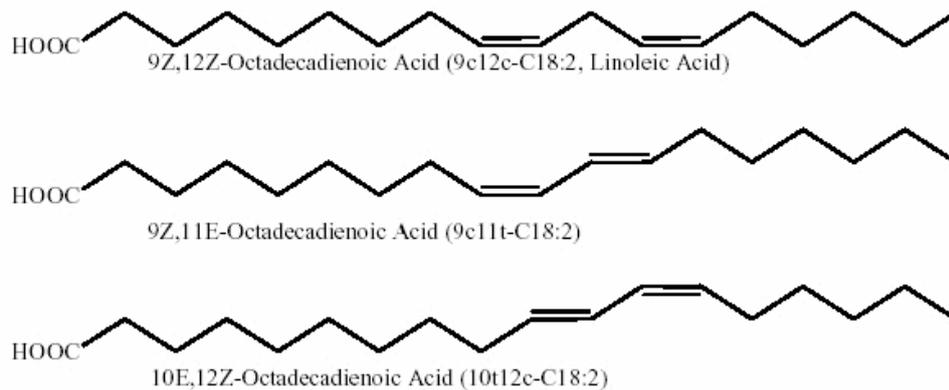


Fig. 18. Struttura chimica dell'acido linoleico e dei CLA (9c-11t; 10t-12c-C18:2)

L'interesse per i CLA è maturato in questi anni in seguito alla scoperta dei loro potenziali effetti benefici sulla salute dell'uomo, tanto che 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, infatti, compete con l'acido linoleico (LA) riducendo la formazione dell'acido arachidonico, precursore degli eicosanoidi che svolgono un ruolo importante nella carcinogenesi (McGuire *et al.*, 1999; Paria *et al.*, 2001). Diversi studi condotti *in vivo* ed *in vitro* hanno permesso di attribuire loro proprietà anti-cancerogene, anti-aterogene, anti-diabetiche e la capacità di stimolare le proprietà immunologiche (Banni *et al.*, 2001). Inoltre, alcuni ricercatori affermano che i CLA possiedono interessanti proprietà nutrizionali in quanto la loro presenza nella dieta, sia in animali giovani che adulti, sembra indurre un aumento della massa magra a scapito di quella grassa (Banni *et al.*,

2001) e sembra, infine, che esercitino un effetto protettivo nell'insorgenza della malattia arterosclerotica (Cannella *et al.*, 2000).

Tra le attività dei CLA (isomeri cis9, trans11, trans10 e cis12) si annoverano anche quelle antiaterogena ed ipocolesterolemica. Nel plasma dei topi sottoposti ad integrazione con gli isomeri CLA, infatti, si è osservata una diminuzione del tasso di colesterolo.

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.

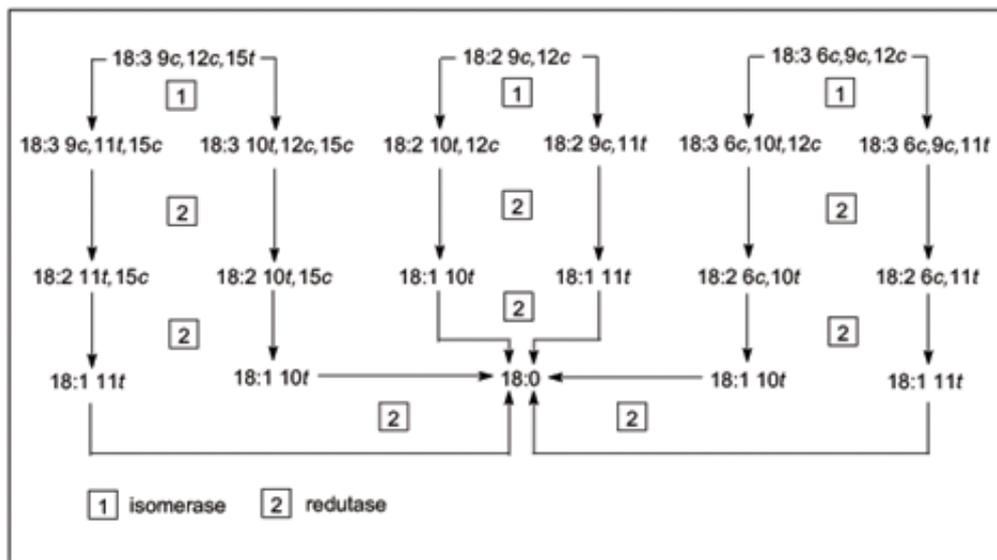


Fig. 19. Formazione degli acidi 18:1 11t e 18:1 10t nei ruminanti dagli acidi linoleico, alpha-linoleico e gamma-linoleico (Khanal e Dhinam, 2004)

Le reazioni di bio-idrogenazione sono catalizzate da una serie di isomerasi e riduttasi (figura 19), che trasformano l'acido linoleico e linolenico in acido vaccenico (C18:1 t11) ed acido stearico (18:0). I due prodotti della bioidrogenazione, dopo l'assorbimento intestinale sono trasportati a livello

tissutale dove sono ossidati ad opera della Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) con la formazione dell'acido oleico a partire dallo stearico e dell'acido rumenico (C18:2 c9-t11) a partire dall'acido vaccenico (figura 20). Il processo ossidativo è particolarmente intenso a livello della ghiandola mammaria durante il periodo di lattazione (Bauman *et al.*, 2006; Khanal e Dhinam, 2004; Secchiari *et al.*, 2005).

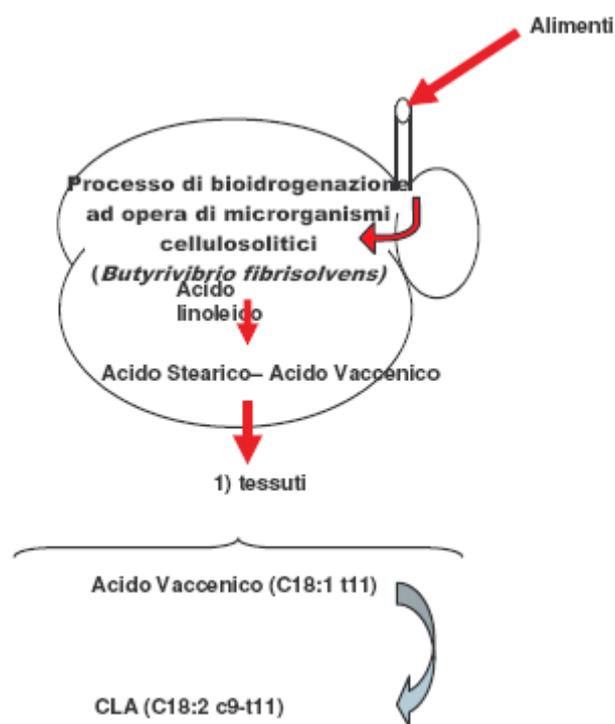


Fig. 20. Processo di bio-idrogenazione a livello ruminale e ossidazione a livello tissutale con la formazione dell'acido rumenico (C18:2 c9-t11) a partire dall'acido linoleico

Il grasso del latte e dei tessuti delle specie ruminanti è caratterizzato da un contenuto più elevato di acido rumenico rispetto ai monogastrici in relazione all'esistenza di differenze specie-specifiche nella capacità di convertire l'acido vaccenico in acido rumenico.

Tra i ruminanti, il latte con un contenuto di CLA maggiore è quello ovino (0,84-2,15 g/100g grasso), seguito da quello bovino (0,3-0,7g/100g grasso) e da quello caprino (0,64-0,74 g/100g grasso). Tra i monogastrici, invece, è il latte di donna a contenere quantità più elevate di CLA (0,4g/100g grasso) (tabella 4).

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

Nella tabella 5 viene riportato per una serie di alimenti di origine animale, tra cui il latte, il contenuto medio di CLA espresso in g di CLA/100 g dell'alimento considerato.

RUMINANTI	CLA (g/100g grasso)
Pecora	0.84 - 2.15%
Vacca	0.3 - 0.7%
Capra	0.64 – 0.74%
MONOGASTRICI	
Donna	0.4%
Cavalla	0.1%

Tab. 4. Contenuto di CLA nel latte di differenti specie (McGuire, 1999)

Alimento	Contenuto in CLA (g/100g)
Burro	0.63 – 2.02
Latte	0.46 – 1.78
Carne	0.67 – 0.99
Prosciutto	1.62 – 2.02
Pesce	0.04 – 0.28
Yogurt	0.43 – 1.12
Formaggio	0.5 – 1.7
Maiale	0.15
Tacchino	0.96

Tab.5. Contenuto medio di CLA in diversi alimenti (McGuire, 1999)

1.5 Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD)

La Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD), appartenente alla super-famiglia delle desaturasi di acili, è un enzima chiave nel metabolismo degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e gioca un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo degli acidi grassi (Heinemann *et al.* 2003) catalizzando l'inserzione di un doppio legame in posizione *cis*- Δ^9 in un largo spettro di acidi grassi a media e lunga catena (Palmquist *et al.*, 1993). 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 (figura 21) (Ntambi, 1995).

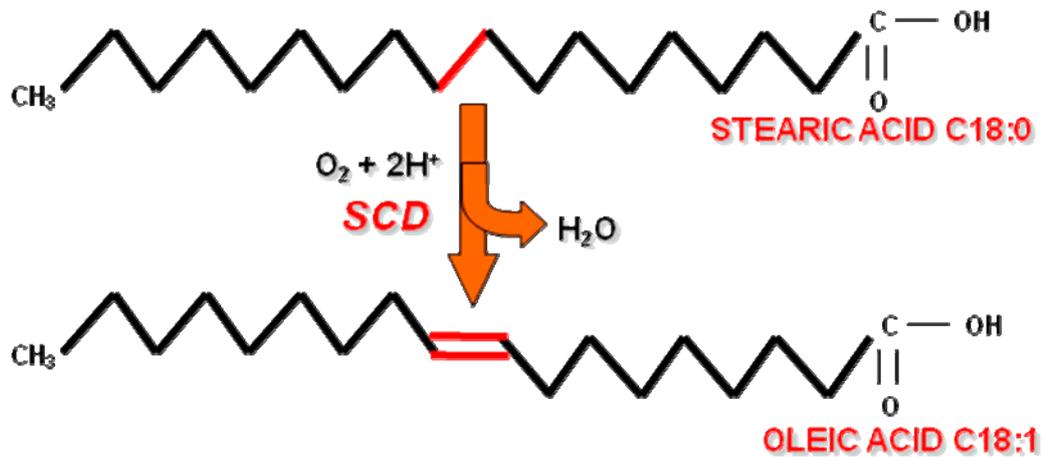


Fig. 21. Desaturazione dell'acido stearico con formazione dell'acido oleico.

L'acido palmitoleico e l'acido oleico sono i composti maggiormente rappresentati nei fosfolipidi di membrana, per cui, la SCD è responsabile del rapporto acidi grassi saturi/insaturi nella composizione dei trigliceridi e della membrana fosfolipidica e 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). Un'alterazione di tale rapporto può essere implicata in molte patologie come diabete, obesità e disturbi cardiovascolari (Heinemann *et al*, 2003).

Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA) sono coinvolti nell'apoptosi e nella mutagenesi di alcuni tumori (Ntambi e Miyazaki, 2004).

L'acido oleico è un acido grasso essenziale per la sintesi di trigliceridi ed esteri del colesterolo a livello epatico. Tali 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).

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). Tale meccanismo è consentito da una catena di trasporto di elettroni che vede come donatore iniziale l'NADH e come accettore finale l'ossigeno che viene convertito in acqua. 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.

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) dove i principali substrati sono il C18, il C16, il C14 ed il VA, da cui si ottengono i rispettivi acidi grassi insaturi (C18:1 cis9, C16:1, C14:1 ed RA) (figura 22).

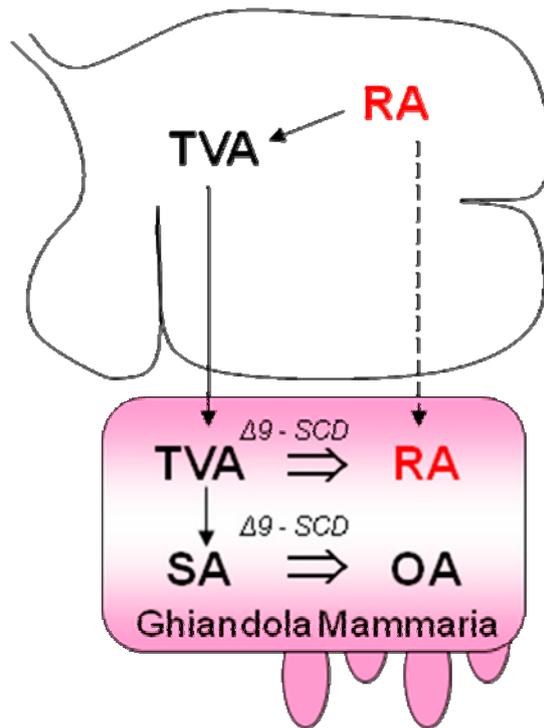


Fig. 22. Desaturazione dell'acido trans vaccenico e dell'acido stearico con formazione rispettivamente dell'acido rumenico ed oleico a livello di ghiandola mammaria

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). In particolare, può essere ritenuto il migliore indicatore dell'attività desaturasica il rapporto acido miristoleico/miristico (C14:1/C14) (figura 23), poiché entrambi vengono sintetizzati completamente a livello della ghiandola mammaria, a differenza degli altri prodotti della SCD che 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

livello a maggio, per poi diminuire nei mesi successivi (Lock e Garnsworthy, 2003).

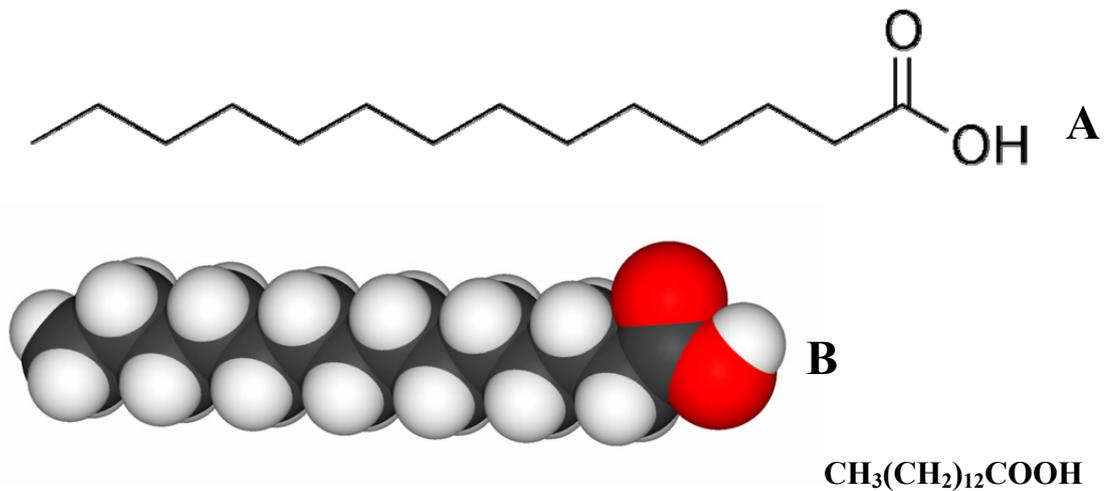


Fig. 23. Rappresentazione bidimensionale (A) e tridimensionale (B) dell'acido miristico

1.5.1 Regolazione dell'espressione della Stearoyl-CoA Desaturasi

Lavori condotti sui topi hanno dimostrato che la Stearoyl-CoA Desaturasi risente dell'effetto di fattori ambientali, come cambiamenti della dieta, bilancio ormonale, cambiamenti della temperatura, presenza di metalli, alcoli e composti fenolici.

Notevole può risultare l'impatto dei componenti della dieta sull'espressione della SCD. Variando il tipo di concentrato nella razione, ad esempio, si notano evidenti differenze nell'espressione dei principali enzimi lipogenici (ACC, FAS e SCD). Nello specifico, 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 bio-idrogenazione ruminale, che determina il tipo di acidi grassi che arrivano alla mammella.

Tra i diversi fattori, la SCD è influenzata dalla concentrazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA) i quali regolano l'espressione di molti geni. In particolare, favoriscono quella dei geni della β -ossidazione e bloccano l'attivazione dei geni lipogenici (Ntambi e Benè, 2001).

L'effetto inibente dei PUFA sull'attività della SCD è stato riscontrato in diversi tessuti quali il fegato, il cervello ed il tessuto adiposo. Analisi più approfondite hanno mostrato la possibilità che la repressione della SCD sia legata solo ad alcuni acidi grassi polinsaturi e non a tutti (Ntambi, 1999).

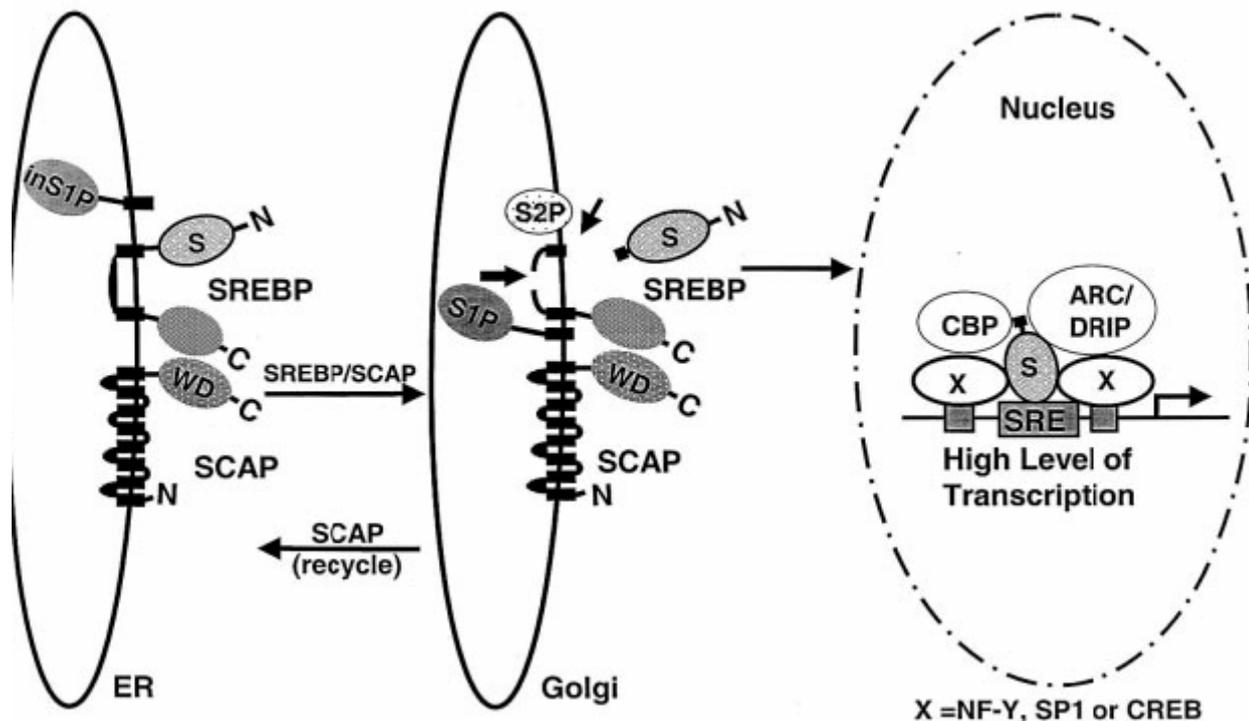
I progressi della biologia molecolare hanno permesso di determinare il meccanismo di repressione dei PUFA secondo due sistemi di controllo, uno trascrizionale e l'altro post-trascrizionale (Ntambi, 1999). Nel promotore del gene SCD è stata individuata una regione altamente conservata lunga 60 bp, detta PUFA-RE (PUFA Responsive Element). La presenza dei PUFA favorisce l'incremento di fattori che, legandosi al PUFA-RE, bloccano la trascrizione del gene (Ntambi, 1999). L'effetto degli acidi grassi polinsaturi 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 secondo un meccanismo di repressione identico a quello dei PUFA. Gli studi condotti hanno dimostrato l'effetto inibente del colesterolo a livello di tessuto adiposo e ghiandola mammaria, mentre nel fegato è stato riscontrato un incremento dell'attività desaturasica, in seguito alla sua somministrazione (Landau *et al.*, 1997; Ntambi 1999).

Il gene SCD, al pari di altri geni lipogenici, mostra nel promotore l'elemento sensibile agli steroli (SRE: Sterol Responsive Element), presente all'interno della regione PUFA-RE. 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 ed 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). La componente matura entra nel nucleo dove si va a legare con SRE di geni coinvolti nella sintesi di colesterolo, trigliceridi ed acidi grassi, tra i quali è compreso il gene SCD (Ntambi, 1999; Sakai *et al.*, 1998) (figura 24).



*Fig. 24. Schema del taglio della componente matura dell' SREBP ed attivazione del gene SCD. La SCAP trascina l'SREBP verso il complesso di Golgi dove subisce il taglio di S1P e S2P. (Edwards *et al.*, 2000).*

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, acidi

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

Fra i PUFA in grado di inibire l'espressione della SCD pare compreso anche un isomero coniugato dell'acido linoleico (CLA), il t10c12CLA. La somministrazione per via abomasale di tale acido grasso sembrerebbe aver determinato una riduzione dell'espressione degli enzimi lipogenici, SCD compresa, (Peterson *et al.*, 2004) e si presume che, analogamente a ciò che si verifica per gli altri PUFA, il processo di inibizione consista nell'andare a bloccare la reazione che porta alla sintesi della componente matura della SREBP (Peterson *et al.*, 2004).

Inoltre, al pari degli altri enzimi lipogenici, la SCD risente dell'effetto inibente dell'acido grasso C18:2 *trans*10-*cis*12, 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). L'infusione abomasale di C18:2 *trans*10-*cis*12 in vacche in lattazione ha comportato una riduzione del 21% dell'attività della SCD (Lor e Herbain, 2003).

Peterson *et al.* (2004) hanno dimostrato, inoltre, che anche per il C18:2 *trans*10-*cis*12, la regolazione dell'espressione della SCD è legata all'SREBP. Cellule mammarie di bovino sono state immerse in una soluzione contenente

C18:2 *trans*10-*cis*12 riscontrando, così, una riduzione del contenuto di mRNA di SREBP e della rispettiva proteina matura.

Studi condotti da Cohen *et al.* hanno dimostrato che la Stearoyl-CoA Desaturasi è coinvolta nel processo di riduzione del peso corporeo, mediato dalla leptina. Quest'ultima potrebbe inibire la SCD per bloccare la sintesi e l'ossidazione degli acidi grassi, con il fine di ridurre l'accumulo di adipe. Somministrando, infatti, la leptina a topi omozigoti recessivi per il gene leptina (*ob/ob*, individui affetti da obesità) si è osservata la riduzione dell'espressione dei più importanti geni lipogenici e, tra questi, la SCD è l'enzima che ha mostrato la repressione maggiore. L'azione della leptina consiste nel ridurre il livello di mRNA della SCD e, di conseguenza, anche l'attività enzimatica (Heinemann e Ozols, 2003; Kakuma *et al.*, 2002).

L'espressione della Stearoyl-CoA Desaturasi è regolata in maniera decisiva anche dall'insulina e dal glucagone: la prima incrementa l'espressione di enzimi lipogenici, SCD compresa, mentre il secondo la reprime (Daniel *et al.*, 2003).

Daniel *et al.* hanno studiato che trattando espianti di tessuto adiposo di topo con insulina, si osservava un incremento del contenuto di MUFA, proporzionale all'aumento del contenuto di mRNA della SCD, a causa dell'effetto che essa sembra avere sull'espressione del SREBP-1c. Tutte le isoforme SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2) sono, infatti, regolate dai

nutrienti presenti nella dieta, ma solo la SREBP-1c pare mostrare una particolare sensibilità per il contenuto di insulina (Avramoglu *et al.*, 2006).

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

1.5.2 Struttura genica

Il gene SCD è stato indicato come gene candidato nel cambiamento del rapporto acidi grassi saturi/insaturi e può, pertanto, influenzare la qualità del grasso nel latte e nelle carcasse (Taniguchi *et al.* 2004).

La prima sequenza nucleotidica di SCD ad essere descritta fu quella del cDNA di topo in cui sono state isolate due sequenze di mRNA, chiamate rispettivamente SCD1 e SCD2 (Ntambi, 1995). Studi successivi hanno portato al sequenziamento della SCD umana con una similarità del 93% e 92% con SCD1 e SCD2 rispettivamente.

Tra gli animali di interesse zootecnico sono state sequenziati l'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).

Non è del tutto chiaro il motivo per il quale i topi abbiano 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, infatti, mostrano 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, invece, presentano una dieta costante che permette una gestione più standardizzata dei principi alimentari assimilati con la dieta (Ward *et al.*, 1998).

Nel bovino, il gene SCD mappa sul cromosoma 26, si estende su un tratto di DNA di 17,088 Kb ed è organizzato in 6 esoni e 5 introni (figura 25).

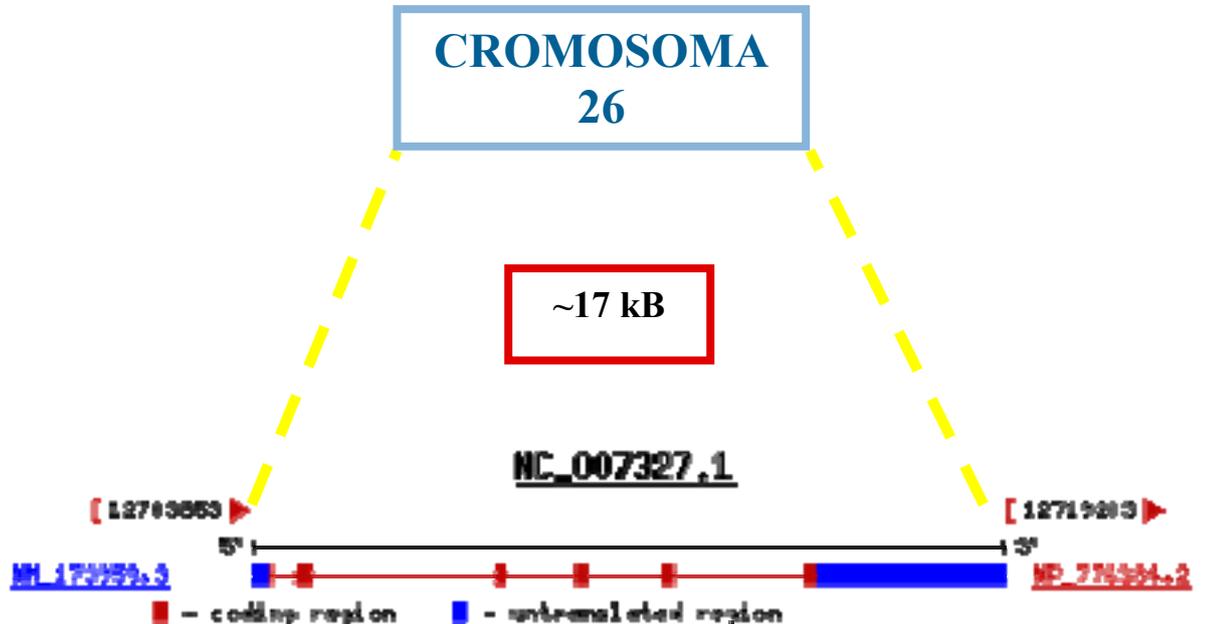


Fig. 25. Struttura del gene SCD in *Bos taurus*

La sequenza del completo mRNA bovino (EMBL acc. no. AY241933) è di 5.108 Kb così divisi: 144 bp della regione 5'UTR, 1080 bp della ORF (Open Reading Frame) e 3884 bp della regione 3'UTR (Milanesi *et al.*, 2008) e codifica per una proteina di 359 aminoacidi (Chung *et al.*, 2000). Quest'ultima mostra un'alta omologia con la proteina caprina (93.9%), ovina (93.6%), umana (87.2%) e murina (80.5%) (Taniguchi *et al.*, 2004).

Ad oggi nel bovino sono stati identificati 8 SNP, di cui tre localizzati sul quinto esone. Di questi, i primi due polimorfismi non comportano sostituzioni aminoacidiche nella sequenza proteica, mentre il terzo, rappresentato da una transizione T→C al 231° nucleotide del quinto esone, è responsabile del cambiamento aminoacidico Val→Ala (Taniguchi *et al.* 2004).

L'allele C è stato relazionata ad un più alto contenuto di MUFA nelle carcasse (Taniguchi *et al.* 2004) e nel latte risulta positivamente correlato ad una maggiore attività dell'enzima e concentrazione di MUFA nel latte (Mele *et al.* 2007)

Il confronto tra le sequenze peptidiche di alcune specie di mammiferi, mostra che la valina è altamente conservata ed è, quindi, possibile supporre che si tratti dell'aminoacido ancestrale.

I tre SNP evidenziati a livello del quinto esone vengono ereditati contemporaneamente (linkare disequilibrium), pertanto vanno a costituire due aplotipi, A e V (figura 26).

Aplotipo V

tgtgatctctcaatgcag**gt**actacaaacctgg**tg**tctctgtt**gt**gtgcttcatcctgcc
cacactog**tg**gcc**a**tggtatctgtgggatgaaacg**ttt**caaaacagcctg**ttttt**tgccac
cttattcog**tt**a**t**gcccttgggctcaacg**tc**acctgg**ct**ggtgaa**ta**gtgctgcccata**t**
gtatggataccgccc**tt**atgacaagaccatcaacccccgagagaa**ta**ttctg**gtt**tcct
gggagct**g**gggtaagtcagcagtcacagcaagaccacg**t**ctag**tg**gtctgctgcttag

Aplotipo A

tgtgatctctcaatgcag**gt**actacaaacctgg**tg**tctctgtt**gt**gtgcttcatcctgcc
cacactog**tg**gcc**g**tggtatctgtgggatgaaacg**ttt**caaaacagcctg**ttttt**tgccac
cttattcog**tt**a**c**gcccttgggctcaacg**tc**acctgg**ct**ggtgaa**ta**gtgctgcccata**t**
gtatggataccgccc**tt**atgacaagaccatcaacccccgagagaa**ta**ttctg**gtt**tcct
gggagct**g**gggtaagtcagcagtcacagcaagaccacg**t**ctag**tg**gtctgctgcttag

Fig. 26. Aplotipi del gene SCD a livello del 5° esone. Le lettere in grassetto indicano i nucleotidi della regione esonica mentre le lettere evidenziate in rosso rappresentano i siti dei tre SNP.

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

Per la Bufala Mediterranea Italiana sono disponibili poche informazioni riguardo il gene SCD ed in banca dati è stato possibile reperire solo le sequenze relative al 4°, 5° e parte del 6° esone del gene (EMBL acc. no. DQ088625; DQ646700; DQ646701).

1.6 Fonte della variabilità genica

Lo sviluppo delle tecnologie di genetica molecolare ha permesso nell'ultimo ventennio di ottenere un'enorme quantità di informazioni sul genoma delle specie animali di interesse zootecnico. L'utilizzo di queste informazioni riveste una particolare importanza ai fini del miglioramento genetico con lo scopo di potenziare la quantità e la qualità dei prodotti zootecnici.

Lo sfruttamento delle conoscenze provenienti dalla genetica molecolare, che consente, quindi, di identificare geni o regioni del genoma capaci di influenzare i caratteri di interesse economico, si attua attraverso la selezione degli animali in attinenza con le informazioni relative ai marcatori del DNA, la così detta selezione assistita da marcatori o Marker Assisted Selection (MAS).

La MAS può essere applicata come strumento di selezione seguendo l'approccio del gene candidato laddove 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.

All'origine della variabilità genica vi sono la meiosi e le mutazioni. Nel processo di meiosi la cellula eucariote con corredo cromosomico diploide dà origine a quattro cellule, i gameti, con corredo cromosomico aploide (figura 27).

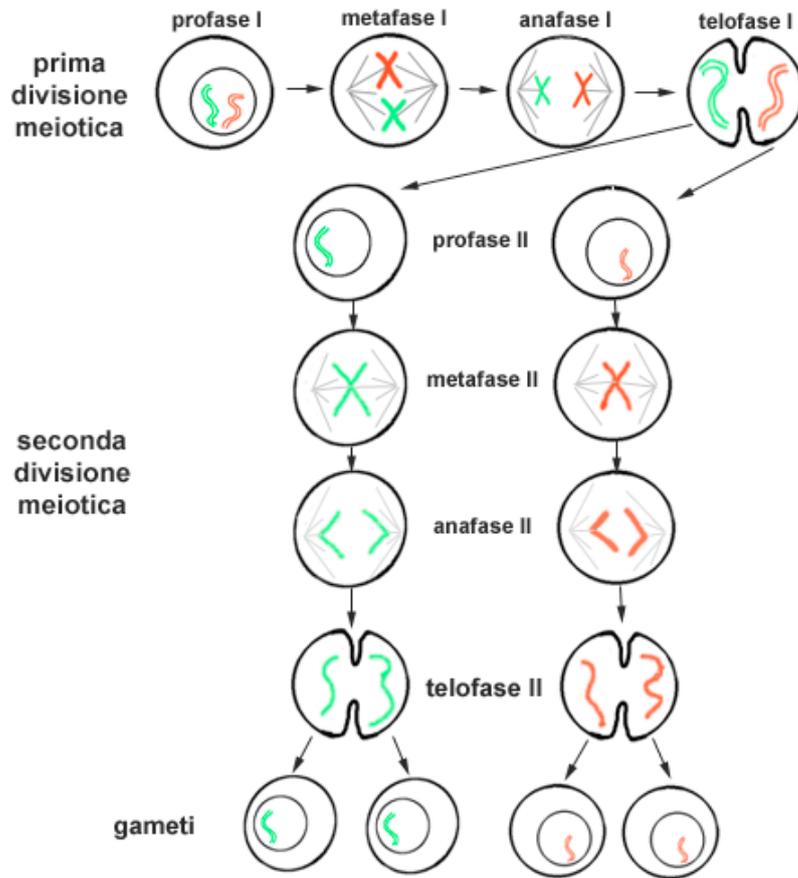


Fig. 27. Processo di meiosi

Da un punto di vista genetico, la meiosi assume una grande importanza

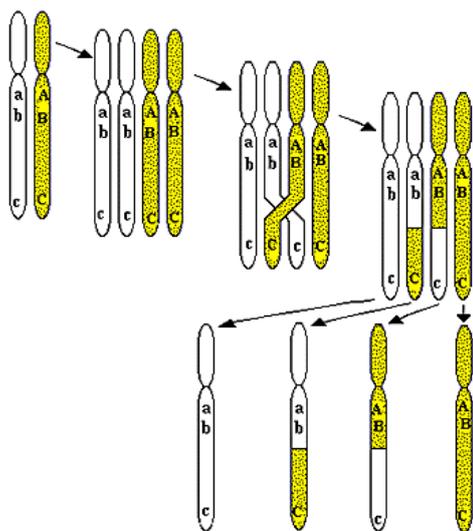


Fig. 28. Crossing over

perché rappresenta il modo in cui possono formarsi nuove combinazioni di geni e, quindi, rende possibile la variabilità genetica tra individui della stessa specie. Infatti, già con il crossing-over (figura 28), ovvero con lo scambio di porzioni di DNA tra cromatidi di due cromosomi

omologhi, al momento della profase I, avviene una prima modificazione dell'assortimento di geni rispetto a quello della cellula madre. Inoltre, occorre considerare che la divisione dei due cromosomi omologhi durante la fase di anafase I avviene in modo casuale: ciò significa che non è prestabilito il polo della cellula verso cui migrerà ciascun cromosoma. Dunque, a partire da una cellula madre, si formano con la prima divisione meiotica due cellule aploidi che sono geneticamente differenti tra loro e diverse da qualsiasi altra coppia di cellule che derivano dalla stessa cellula madre.

La variabilità genetica, oltre che dalla meiosi, è assicurata anche da meccanismi di mutazioni spontanee, intese come errori verificatisi durante la formazione dei gameti e trasmesse dai genitori.

La mutazione indica, nel senso più ampio, tutti i cambiamenti genetici:

- A livello cromosomiale
- A livello molecolare

Per quanto concerne le anomalie cromosomiche, esse sono distinte in anomalie “numeriche” e “strutturali”. Le prime, sono dovute ad errori nella divisione cellulare, di norma alla meiosi, e possono portare a poliploidia ($2n + 1$, $2n + 2$, $2n - 1$, ...). Fra le anomalie strutturali si annoverano la traslocazione, l'inversione, la duplicazione, la delezione e l'inserzione (figura 29). In particolare, la traslocazione è una fusione che può avvenire al centromero di due cromosomi omologhi o non (traslocazione robertsoniana), tra il telomero di un cromosoma ed il telomero o il centromero di un altro (fusione a tandem), oppure

può avvenire una trasposizione di segmenti cromosomici ed in tal caso la traslocazione è definita reciproca.

L'inversione, invece, consiste nel rovesciamento di due segmenti cromosomici e può avvenire intorno al centromero (pericentrica) oppure può non interessarlo (paracentrica).

La duplicazione prevede il raddoppiamento di un segmento cromosomico.

La delezione è rappresentata dalla perdita di un segmento cromosomico terminale o interstiziale, mentre l'inserzione è la risultante dell'inserimento di un segmento cromosomico.

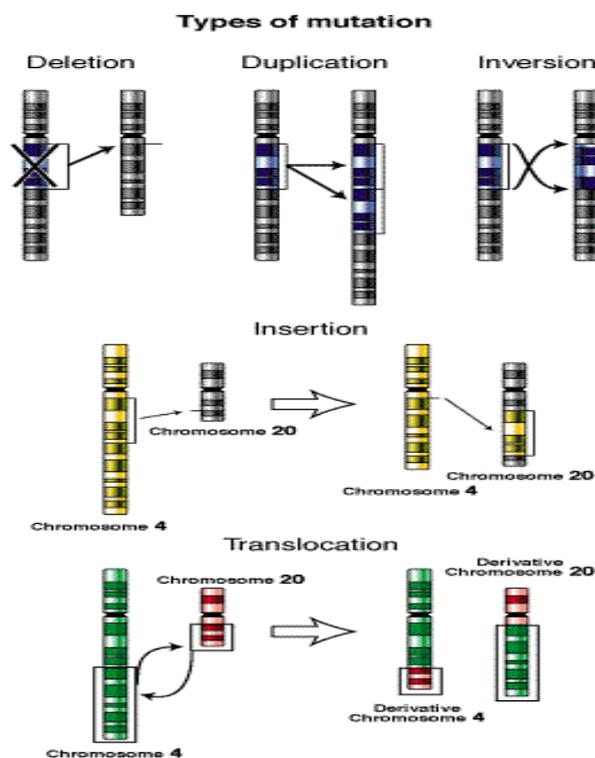


Fig. 29. Tipi di mutazioni a livello cromosomico.

Le mutazioni a livello molecolare sono rappresentate da differenze chimico-strutturali di una molecola che comportano la presenza in differenti forme della stessa. In questo ambito, è possibile distinguere mutazioni o 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 mutazioni o polimorfismi genici.

Il polimorfismo genico è dato dalla presenza di alleli multipli allo stesso *locus* e fa riferimento a differenze nelle sequenze di DNA. Esso 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.

I polimorfismi nella sequenza di DNA sono distinti in :

- Delezione: quando si verifica una perdita di materiale genetico.
- Trasposizione: indica lo spostamento di un tratto di sequenza di DNA in un nuovo sito genomico.
- Sostituzione : quando un nucleotide e' sostituito con un altro. In particolare, se una purina viene sostituita con un'altra purina (adenina con guanina, o viceversa) o una pirimidina con un'altra pirimidina (citosina con timina, o viceversa), la mutazione si chiama transizione. Tutti gli altri tipi di sostituzione nucleotidica si chiamano transversioni (figura 30).

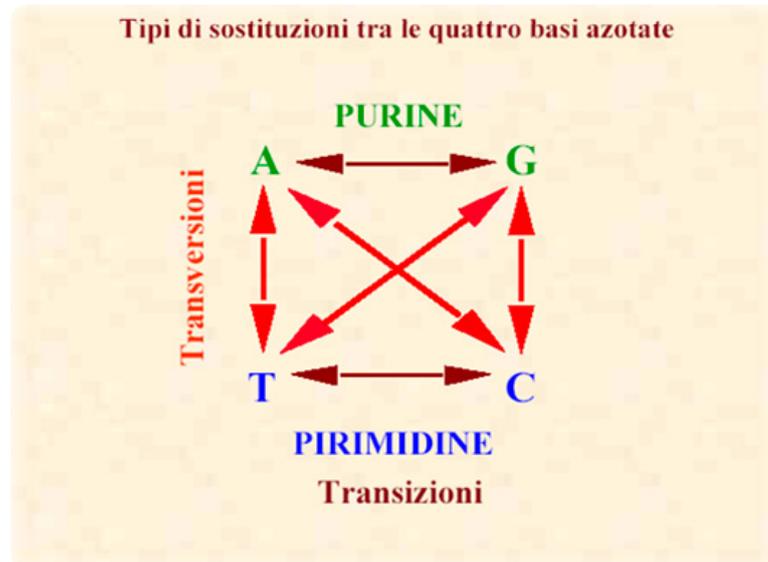


Fig. 30. Tipi di sostituzione nucleotidica.

Il tipo più semplice e più diffuso di polimorfismo è lo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) derivante dalla sostituzione, inserzione o delezione di un singolo nucleotide. Esso può essere presente 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) e può essere distinto in polimorfismo bi-, tri- e tetra-allelico a seconda del numero di alleli che si origina in seguito alla mutazione. Considerato che le ultime due tipologie sono molto rare, spesso il termine SNP fa riferimento ai marcatori bi-allelici.

La sostituzione di un nucleotide può non avere effetti sull'espressione della proteina, ossia non va ad alterare il senso della tripletta (mutazione silente) oppure può determinare alterazioni nella sequenza aminoacidica. In tal caso, si distinguono le mutazioni mis-senso e no-senso. Una mutazione è definita mis-

senso nel caso in cui lo SNP comporti la relativa sostituzione di un aminoacido nella sequenza peptidica, per la costituzione di un diverso codone (figura 31). La mutazione no-senso, invece, porta alla formazione di un nuovo codone di terminazione, che determina un arresto prematuro della sintesi proteica, con la conseguente formazione di una catena aminoacidica più corta.



Fig. 31. Esempio di mutazione silente e mutazione mis-senso

A seconda del punto in cui si verifica 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, quindi, sono utilizzati come marcatori in popolazioni genetiche o coinvolti in complessi multigenici, usando il sistema del Linkage Disequilibrium (Secchiari *et al.*, 2006).

1.6.1 Origine degli SNP

La replicazione è il meccanismo molecolare attraverso cui il DNA produce una copia di sé stesso. Ogni volta che una cellula si divide, infatti, l'intero genoma deve essere duplicato per poter essere trasmesso alla progenie.

Il meccanismo della replicazione, in cui il doppio filamento di DNA parentale funge da stampo per la sintesi di due filamenti figli complementari, è complesso e richiede l'intervento di numerosi enzimi e di proteine iniziatrici.

Vi è un singolo sito cromosomico, definito “origine di replicazione” da cui ha inizio il processo. A tale livello, la doppia elica si apre e la replicazione inizia su entrambi i filamenti. Man mano che la replicazione procede, la forca di replicazione si muove lungo il DNA.

Un filamento di DNA, detto filamento leading (filamento guida), viene sintetizzato in modo continuo; l'altro, detto filamento lagging (filamento lento), è dapprima formato da corti frammenti di DNA (i frammenti di Okazaki) di 1-3 kilobasi. In seguito i frammenti sono uniti dall'enzima DNA ligasi (figura 32).

I genomi eucariotici sono spesso assai più grandi di quelli procariotici e necessitano di origini multiple. Da ogni origine di replicazione nasce una bolla replicativa che si espande in direzioni opposte. Due bolle replicative entrate in contatto si fondono formandone una sola.

L'enzima basilare della replicazione è la DNA polimerasi, che catalizza il legame di deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP). Il compito delle DNA-polimerasi è quello di incorporare i nucleotidi complementari durante la sintesi di nuovi segmenti di DNA. Inoltre, tali enzimi 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).

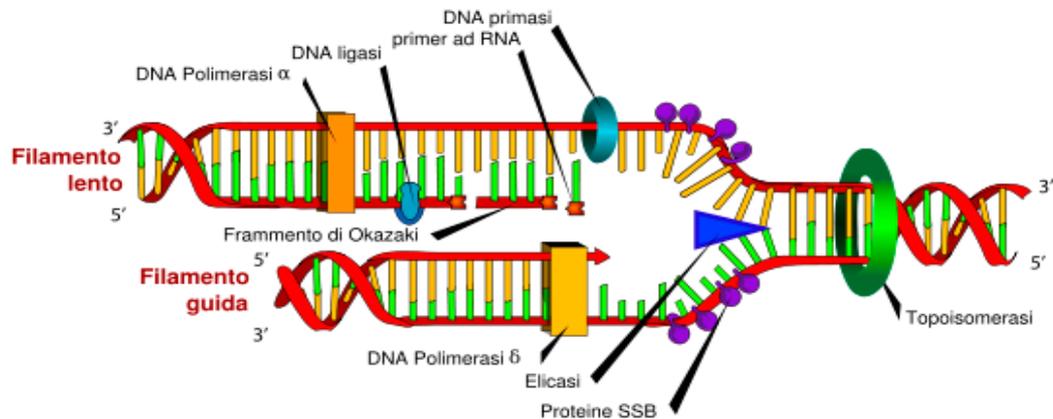


Fig. 32. Meccanismo di replicazione del DNA

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 transversioni, 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. 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.

2. OBIETTIVO

Studiare la struttura del gene della Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) nella Bufala Mediterranea Italiana ed analizzare la variabilità genetica a tale *locus* attraverso l'individuazione di marcatori molecolari.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Lo studio è stata condotto su campioni di latte e sangue individuale di bufale di razza Mediterranea Italiana, allevate nella provincia di Salerno.

La strategia di campionamento ha previsto di prelevare il latte ed il sangue di animali appartenenti allo stesso allevamento, a parità di latte prodotto, di età e di stadio della lattazione (si è stabilito, infatti, di scegliere animali che si trovassero a 100-120 giorni dal parto) in modo da minimizzare l'effetto ambientale sul carattere preso in esame e di esaltare, quindi, l'effetto genico.

3.2 Preparazione dei campioni di mRNA

L'intero mRNA è stato estratto dalle cellule somatiche presenti in 250 ml di latte di una bufala.

In fase preliminare il latte è stato centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti a 4°C al fine di determinare l'affioramento e permettere il successivo allontanamento del grasso. Dopodiché, le cellule somatiche sedimentate sono state sospese in PBS (Phosphate buffered saline-tampone fosfato salino).

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il metodo di Chomczynski e Sacchi (1987) con le modifiche descritte da Martin *et al.* (1996). Dopo la sua precipitazione in LiCl, per rimuovere i carboidrati e la grossolana

contaminazione di DNA, il lavaggio in etanolo al 70% e la risospensione in H₂O+DEPC (Di-Etil-Piro-Carbonato), la concentrazione dell'mRNA è stata determinata mediante la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro.

Infine, l'mRNA totale è stato sottoposto a digestione con DNasi I, a 37° per 30', allo scopo di degradare eventuali contaminazioni residue di DNA.

3.3 Sintesi del cDNA mediante RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

L'RT-PCR è una metodica che consente l'amplificazione selettiva di uno specifico mRNA. Comprende una prima fase di trascrizione inversa (RT) nella quale, impiegando una DNA-polimerasi RNA-dipendente ed un primer antisenso, gli mRNA selezionati dal primer sono "retrotrascritti" a DNA a singolo filamento (cDNA, DNA complementare). Nella seconda fase, una DNA polimerasi utilizza anche il primer senso amplificando il cDNA mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR).

L'RT-PCR 1°- 6° esone (figura 33) è stata eseguita utilizzando la seguente coppia di primer:

- SCD1ex (*forward*) 5'CAGCGGAAGGTCCCGA3
- SCD6ex (*reverse*) 5'TGGGTAAACGTCATCTTTAGC 3'

Le sequenze dei due primer corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 3-18 del primo esone e 290-311 del sesto esone del gene codificante la SCD bovina (EMBL: AY241932).

L'RT-PCR è stata realizzata impiegando la Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), secondo il protocollo standard di trascrizione inversa della Promega. Il programma di amplificazione ha compreso i seguenti 39 cicli (tabella 6):

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1 ciclo	95°C x 4'		
37 cicli	95°C x 45''	62°C x 45''	72°C x 1'
1 ciclo			72°C x 10'

Tab. 6. Programma di amplificazione dell'RT-PCR (esone 1-6)

I prodotti di RT-PCR sono stati analizzati su gel di agarosio al 3,0% e visualizzati con bromuro di etidio (0,5 µg/ml).

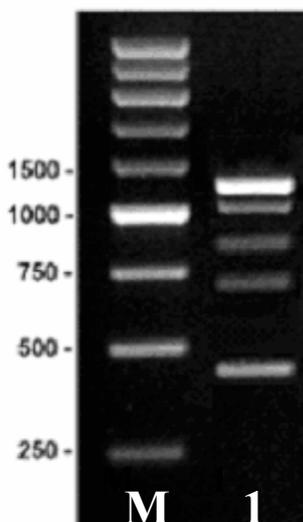


Fig. 33. RT-PCR (esone 1-6) dell'mRNA trascritto dal gene codificante la SCD bufalina. M:Marker 1000 bp (Promega); linea 1:prodotto dell' RT-PCR

3.4 Preparazione dei campioni di DNA

La ricerca è stata condotta sul DNA estratto dai leucociti recuperati da campioni individuali di sangue (40 ml) di 120 bufale appartenenti alla razza Mediterranea Italiana, allevate nella provincia di Salerno, utilizzando come anticoagulante Na₂EDTA.

Dopo il prelievo, l'estrazione è stata eseguita secondo quanto indicato da Gossens e Kan (1981).

Reagenti:

- NaCl 1,8%;
- tampone lisi I (0,1 M NaCl, 10mM Tris HCl pH 7,8);
- tampone lisi II (tampone lisi I reso 1% SDS, 0,2-0,4 mg/ml proteinasi K);
- fenolo bufferato;
- SEVAG: cloroformio-alcool isoamilico 24:1 (v/v);
- TE pH 7,6 (10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA);
- EDTA 0,5 M pH 8,0 ;
- isopropanolo.

I campioni sono stati centrifugati a 4°C a 3000 rpm per 10 minuti, in modo da separare i leucociti dagli eritrociti e dal plasma.

Con una pipetta pasteur sono stati recuperati i leucociti, i quali sono stati risospesi in 7 ml di H₂O deionizzata, in modo da lisare gli eritrociti residui;

successivamente i leucociti sono stati riportati in condizioni isosmotiche mediante l'aggiunta di 7 ml di una soluzione 1,8% NaCl e quindi nuovamente centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti.

Allontanato il surnatante, i leucociti sono stati lisati aggiungendo 7 ml di tampone di lisi I (0,1 M NaCl; 0,005 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8) e 7 ml di tampone di lisi II addizionato di 1% SDS e 0,2-0,4 mg/ml di proteinasi K.

Dopo l'incubazione over night a 37°C, i campioni sono stati sottoposti a due estrazioni, una con fenolo e l'altra con cloroformio/alcool isoamilico (rapporto 24:1) per allontanare la componente proteica.

Infine, il DNA è stato precipitato mediante l'aggiunta di un volume di isopropanolo freddo e risospeso in tampone TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8).

3.5 Disegno dei primer

I primer per l'amplificazione del cDNA e dell'intero gene codificante per la Stearoyl-CoA Desaturasi bufalina sono stati disegnati avvalendosi del software DNAsis (Hitachi) impiegando come stampo la sequenza del gene bovino e quella parziale del sesto esone bufalino depositate in Banca Dati (EMBL n° di accesso AY241932 - DQ646701). Successivamente sono stati disegnati altri primer utilizzando come stampo le regioni sequenziate nel corso della ricerca (tabella 7).

Nome del primer	Sequenza
SCD1ex(forward)	5'cagcggaaggtcccga 3'
SCD6ex(reverse)	5' tgggttaacgtcatcttagca 3'
5'SCD(forward)	5'gaaacttccccagtgcc 3'
SCD1r(reverse)	5' caagtgggccggcatc 3'
SCDint1(forward)	5' acttgctgcaagagga 3'
SCDint1(reverse)	5' ccagagataggtgtatc 3'
SCD2ex(forward)	5' aagccaagcttgagtatgt 3'
SCD3ex(reverse)	5' gtgactccacaggcgatg 3'
SCDIIex(forward)	5' atctctagctcctacac 3'
SCDIIex(reverse)	5' ccagagataggtgtatc 3'
SCDintrone2(forward)	5' tagcagaaggtcagagg 3'
SCD2intA(reverse)	5' ttcagccctcctcaag 3'
SCD2intB(forward)	5' tgctatcggcaaaccagg 3'
SCD2intC(reverse)	5' aacaagctcccaccaac 3'
SCD2intD(forward)	5' ccagagggtatgagtaga 3'
SCDintrone2(reverse)	5' aggaaagtgaagtggctg 3'
SCDint2(reverse)	5' catggattaccaagagga 3'
SCD3int(forward)	5' cgggtcttctgatc 3'
SCD3int(reverse)	5' ggatcagcatccgttctg 3'
SCD4ex(reverse)	5' ggatcagcatccgttctg 3'
SCD4int(forward)	5' agactgtagagtggggaa 3'
SCD4int(reverse)	5' ggagcaaggacggaatg 3'
SCD4intr(forward)	5' agtggtagtaggaatgga 3'
SCD4intr(reverse)	5' ttcagggaaatagacaggg 3'
SCD4introne(forward)	5' tgcccaccacaagtttc 3'
SCD5ex(forward)	5' aaaacagcctgtttttgcc 3'
SCD5ex(reverse)	5' ttcaccccacagatacc 3'
SCD5int(reverse)	5' ctaggcaggctcttctt 3'
SCD5int(forward)	5' ttgcccactaaccttct 3'
SCDintr5(forward)	5' ctgtattcagaggggcaa 3'
SCDintr5(reverse)	5' tgaggtgataaatggggag 3'
SCDintrone5(forward)	5' agcttctctttatcacctt 3'
SCDintrone5(reverse)	5' ggatgaaggacgaatgat 3'
SCDesone6(forward)	5' tgctaaagatgacgttaacc 3'
SCDesone6(reverse)	5' tatgaacaaacacaatctcagat 3'

Tab. 7. Primer utilizzati per sequenziare il gene SCD di bufala

3.6 Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è una metodica che consente l'amplificazione selettiva di sequenze di DNA attraverso una serie di duplicazioni successive mediate da una DNA polimerasi.

La specificità del frammento amplificato è data dalla coppia di oligonucleotidi (primer) che vengono utilizzati per innescare l'intero processo.

L'amplificazione si realizza attraverso la ripetizione ciclica di tre fasi: denaturazione, annealing ed estensione.

Una tipica reazione di PCR è stata effettuata in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer, 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 µM).

Il programma di amplificazione si è svolto secondo i seguenti 32-40 cicli (tabella 8):

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1 ciclo	95°C x 5'		
30-38 cicli	95°C x 45''	56 - 65,5°C x 45''	72°C x 20''-4'
1 ciclo			72°C x 10'

Tab. 8. Programma di amplificazione della PCR

Tutti i frammenti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (Biorad) (figura 34) dall' 1% al 3% in tampone TBE in presenza di bromuro di etidio.



Fig. 34. Gel di agarosio visualizzato ai raggi UV

3.7 Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR

Una successiva fase ha previsto la purificazione dei campioni di DNA dai residui di amplificazione, impiegando il kit NucleoSpin Extract fornito da Macherey-Nagel. Lo stesso kit è stato utilizzato anche per l'estrazione e la purificazione del DNA o del cDNA dal gel.

Il protocollo si basa sull'impiego di speciali buffer che in presenza di un'alta concentrazione di "chaotropic-salt", consentono un adsorbimento selettivo e quantitativo degli acidi nucleici ad una membrana di silice, mentre le contaminazioni da sali e componenti macromolecolari sono rimossi da due lavaggi con buffer a base di etanolo. Infine, attraverso una semplice eluizione è stato possibile portare il DNA in soluzione.

Ottenuta la soluzione contenente DNA puro, si è passato alla quantificazione spettrofotometrica; inoltre il campione è stato controllato sul gel di agarosio 1,5% (corsa di 30 minuti a 60 Volt), usando come tracciante il bromuro di etidio, per accertare l'assenza di RNA e DNA contaminanti.

3.8 Sequenziamento dei frammenti amplificati

Dai campioni ottenuti sono state ricavate aliquote contenenti in media 100 ng di DNA a cui sono state aggiunte 1,6 pmoli del primer corrispondente al frammento amplificato.

La soluzione è stata, quindi, inviata presso il Servizio di Sequenziamento del DNA – Istituto Nazionale di Apicoltura – di Bologna, che ha provveduto al sequenziamento del frammento d'interesse secondo il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988).

La sequenza ottenuta (figura 35) è stata, quindi, comparata con quelle riportate in letteratura e depositate alla GeneBank del National Center of Biotechnology Information (Altschul *et al.*, 1997).

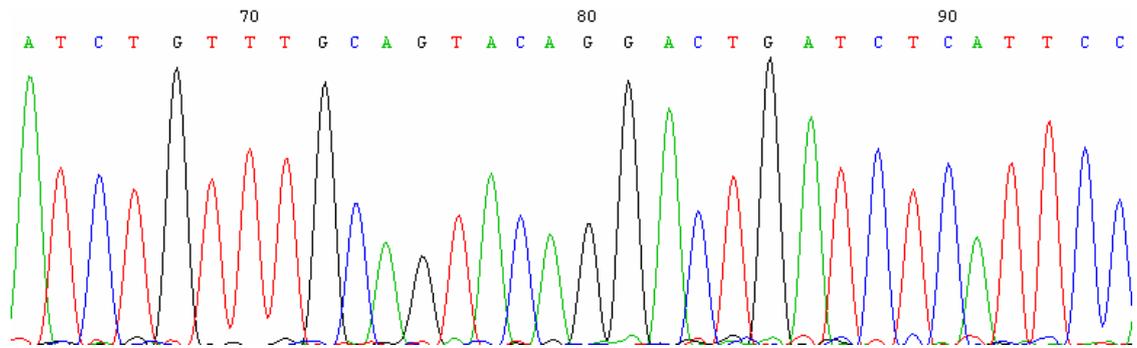


Fig. 35. Esempio di elettroferogramma

3.9 Metodica della PCR-RFLP al promotore

L'indagine è stata condotta sul DNA di 117 bufale di razza Mediterranea Italiana allevate nella provincia di Salerno.

Mediante l'endonucleasi *TaqI* (T!CGA) è stata tipizzata la transversione A→C in posizione -461 della regione promotrice, prendendo come riferimento numerico (+1) il primo nucleotide del primo esone.

La reazione è stata effettuata in 50 µl di mix comprendenti: 100 ng di DNA genomico, 10 pmoli di ciascun primer, 1,25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10 mM di Tris HCl (pH 9,0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 µM).

Le sequenze dei due primer corrispondono rispettivamente ai nucleotidi -596/-580 (prendendo come riferimento numerico +1 il primo nucleotide del primo esone della sequenza bovina) e 144/159 del primo esone :

- 5'SCD (forward): 5'-GAAACTTCCCCAGTGCC-3'
- SCD1R (reverse): 5'-CAAGTGGGCCCGGCATC-3'

Il programma di amplificazione adottato è rappresentato dai seguenti 32 cicli (tabella 9):

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1 ciclo	95°C x 5'		
30 cicli	95°C x 45''	65°C x 45''	72°C x 1'
1 ciclo			72°C x 10'

Tab. 9. Programma di amplificazione per la PCR-RFLP al promotore

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *TaqI* [T!CGA] (Promega, Madison, WI, USA) e incubando a 65°C over night.

La sequenza ottenuta è stata sottoposta all'analisi dei siti di legame per fattori di regolazione mediante il programma Transfac - Alibaba.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Analisi dei trascritti

Dalle cellule somatiche del latte è stato estratto l' mRNA di una bufala di razza Mediterranea Italiana allevata nella provincia di Salerno.

L'RT-PCR è stata realizzata con la coppia di primer *forward* 5'-CAGCGGAAGGTCCCGA-3' e *reverse* 5'-TGGGTAAACGTCATCTTTAGCA-3', corrispondenti rispettivamente ai nucleotidi 3-18 del primo esone e 290-311 del sesto esone del gene SCD bovino disponibile in banca dati (EMBL acc. no. AY241932).

L'analisi elettroforetica dei prodotti di RT-PCR ha evidenziato un pattern caratterizzato da cinque diverse bande le cui grandezze sono: ~1300 bp, ~1200 bp, ~900 bp, ~700 bp e ~450 bp (figura 36).

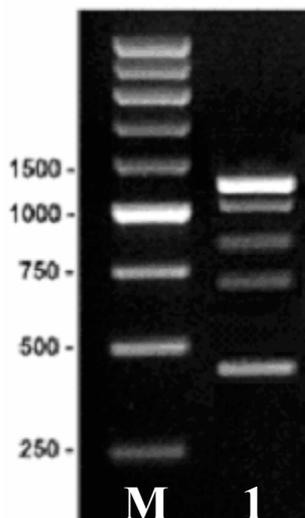


Fig. 36. RT-PCR (esone 1-6) dell'mRNA trascritto dal gene codificante la SCD bufalina. M:Marker 1000 bp (Promega); linea 1:prodotto dell' RT-PCR

Di queste, sono state isolate e sequenziate la popolazione corrispondente alla banda più pesante (~1300 bp), la popolazione di ~1200 bp e quella relativa alla banda più leggera (~450 bp).

Il primo dei tre trascritti è risultato essere lungo 1250 bp (EMBL acc. no. AM600640) e mostra un'omologia pari al 97.8% con la corrispondente sequenza del cDNA bovino.

Il confronto con la sequenza bovina ha consentito di stabilire che il frammento in esame corrisponde ad un trascritto correttamente assemblato, che si estende dal 53° nucleotide del primo esone al 278° nucleotide del sesto esone ed include l'intero ORF (Open Reading Frame) il quale è compreso tra il 145° nucleotide del primo esone ed il 200° nucleotide del sesto esone per un totale di 1080 nucleotidi codificanti per 359 residui aminoacidici.

Il codone di terminazione TGA si realizza tra il 198° ed il 200° nucleotide del sesto esone.

Dal confronto con la sequenza genomica bufalina riportata in banca dati relativa al quarto (EMBL acc. no. DQ088625), quinto (EMBL acc. no. DQ646700) e parte del sesto esone (EMBL acc. no. DQ646701), è stato possibile evidenziare 3 siti polimorfici :

- (TCC^{Ser} → TCA) al 220° nucleotide del 5° esone
- (GCG^{Ala} → GTG^{Val}) al 231° nucleotide del 5° esone
- (GCA^{Ala} → GCC) al 107° nucleotide del 6° esone

La mutazione al 231° nucleotide del quinto esone non è conservativa, in quanto responsabile del cambiamento aminoacidico $GCG^{Ala} \rightarrow GTG^{Val}$. Tale polimorfismo è stato già osservato nella specie bovina nella quale è stato associato a differenti contenuti di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) nelle carcasse (Taniguchi *et al.*, 2004) e nel latte (Mele *et al.* 2007).

Le restanti 2 mutazioni, realizzatesi al 220° nucleotide del 5° esone ($TCC^{Ser} \rightarrow TCA$) ed al 107° nucleotide del 6° esone ($GCA^{Ala} \rightarrow GCC$) sono transversioni conservative e, quindi, non comportano alcun cambiamento aminoacidico.

Il secondo trascritto caratterizzato corrisponde ad un mRNA non correttamente assemblato, di dimensioni pari a 1152 bp, che si estende dal 53° nucleotide del primo esone al 278° nucleotide del sesto esone prendendo come riferimento la sequenza bovina (EMBL acc. no. AY241932).

Tale trascritto alternativo si contraddistingue per una delezione di 101 nucleotidi e, per l'esattezza, per l'out splicing di parte del 2° esone, a partire dal 182° nucleotide. Tale evento è responsabile della generazione per frame shift di un nuovo stop codon (tra i nucleotidi 3-5 del quarto esone) rispetto a quello canonico.

La delezione degli ultimi 101 nucleotidi del secondo esone e la presenza di un nuovo stop codon all'inizio del quarto esone potrebbero portare alla traduzione di una nuova forma proteica, costituita da 105 aminoacidi, anziché 359, di cui gli ultimi 45 di nuova costituzione (figura 37).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1 -----
1 -----
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
91 ccgctccgca gtctcagccc cgagaaagtg atcccagtggt cctagaggcc agATGCCGGC CCACTTGCTG CAAGAGGAGA TCTCTAGCTC
91 ccgctccgca gtctcagccc cgagaaagtg atcccagtggt cctagaggcc agATGCCGGC CCACTTGCTG CAAGAGGAGA TCTCTAGCTC
      190     200     210     220     230     240     250     260     270
      Y T T T T T I T A P P S R V L Q N G G G K L E K T P L Y L E
181 CTACACAACC ACCACCACCA TCACAGCACC TCCTTCCAGG GTCCTGCAGA ATGGAGGGGG CAAATTGGAA AAGACTCCCC TATACTTGGA
181 CTACACAACC ACCACCACCA TCACAGCACC TCCTTCCAGG GTCCTGCAGA ATGGAGGGGG CAAATTGGAA AAGACTCCCC TATACTTGGA
      280     290     300     310     320     330     340     350     360
      E D I R P E T R D D I Y D P T Y Q D K E G P K P K L E Y V W
271 AGAAGACATC CGCCCTGAAA CGAGAGATGA CATCTATGAC CCAACTTACC AGGATAAGGA GGGCCCAAAG CCCAAGCTTG AGTATGTTTG
271 AGAAGACATC CGCCCTGAAA CGAGAGATGA CATCTATGAC CCAACTTACC AGGATAAGGA GGGCCCAAAG CCCAAGCTTG A-----
      370     380     390     400     410     420     430     440     450
      R N I I L M F L L H L G A L Y G I T L I P T C K I Y T Y L W
361 GAGAAACATC ATCCTCATGT TTCTGTTACA CTGGGAGGCC CTATATGGGA TCACATTGAT CCCCACCTGC AAGATATACA CCTATCTCTG
361 -----
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
      V L F Y Y L M G A L G I T A G A H R L W S H R T Y K A R L P
451 GTGTTATTC TACTATCTGA TGGGTGCCCT GGGCATCACA GCAGGGGCC ATCGCCTGTG GAGTCACCGA ACCTACAAAG CTCGGCTGCC
451 --TGTATTC TACTATCTGA TGGGTGCCCT GGGCATCACA GCAGGGGCC ATCGCCTGTG GAGTCACCGA ACCTACAAAG CTCGGCTGCC
      D V I L L S D G C P G H H S R G P S P V E S P N L Q S S A A
      550     560     570     580     590     600     610     620     630
      L R V F L I I G N T M A F Q N D V F E W S R D H R A H H K
541 CCTGCGGGTC TTCCTGATCA TCGGCAACAC CATGGCGTTC CAGAAAGCAGG TTTTGAATG GTCCCGAGAT CACCGTGCCC ACCACAAGTT
541 CCTGCGGGTC TTCCTGATCA TCGGCAACAC CATGGCGTTC CAGAAAGCAGG tttttgaatg gtccccgagat caccgtgccc accacaagtt
      P A G L P D H R Q H H G V P E ***
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
      F S E T D A D P H N S R R G F F F S H V G W L L V R K H P A V
631 TTCAGAAACG GATGCTGATC CCCACAATTC CCGACGTGGC TTTTCTTCT CTCACGTGGG TTGGCTGCTT GTGCGCAAAC ACCCAGCTGT
631 ttcagaaaag gatgctgata cccacaatc ccgacgtggc tttttcttct ctcacgtggg ttggctgctt gtgcgcaaac acccagctgt
      730     740     750     760     770     780     790     800     810
      I E K G S T L N L S D L K A E K L V M F Q R R Y Y K P G V L
721 CATAGAAAAG GGTCTACGC TAAATTTATC CGACCTAAAA GCCGAGAAGC TGTAATGTT CCAGAGGAGG TACTACAAAC CTGGTGTCTC
721 catagaaaag ggttctacgc taaatztatc cgacctaaaa gccgagaagc tgtaatggtt ccagaggagg tactacaaac ctggtgtctc
      820     830     840     850     860     870     880     890     900
      L L C F I L P T L V P W Y L W G E T F Q N S L F F A T L F
771 GTTGTGTG-- -GCTTCATCC TGCCCACT CGTGCCGTGG TATCTGTGGG GTGAAACGTT TCAAAACAGC CTGTTTTTTG CCACCTTATT
771 gttgttgtg gcttcatcc tgcccact cgtgccgtgg tatctgtggg gtgaaacggt tcaaaacagc ctgttttttg ccaccttatt
      910     920     930     940     950     960     970     980     990
      R Y A L G L N I T W L V N S A A H M Y G T R P Y D K T I S
901 CCGTTATGCC CTTGGGCTCA ACATCACCTG GCTGGTGAAT AGTGTGCCCC ATATGTATGG ATATCGCCCT TATGACAAGA CCATCAGCCC
901 ccgttatgcc cttgggctca acatcacctg gctggtgaat agtgtgcccc atatgtatgg atatcgccct tatgacaaga ccatcagccc
      1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080

```

```

P R E N I L V S L G A V G E G F H N T H H T F P Y D Y S A S
991 CCGAGAGAAT ATTCGTGGTTT CACTGGGAGC TGTGGGTGAG GGCTTCCACA ACTACCACCA CACCTTTCCT TATGACTACT CAGCCAGTGA
991 ccgagagaaat attctggtttt cactgggagc tgtgggtgag ggcttccaca actaccacca cacctttcct tatgactact cagccagtga
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
E Y R W H I N F T T F F I D C M A A I G L A Y D R K K V S K A
1081 GTACCGCTGG CACATCAACT TTACCACGTT CTTCATTGAT TGCATGGCTG CCATCGGTCT GGCTTATGAC CGGAAGAAAAG TATCCAAGGC
1081 gtaccgctgg cacatcaact ttaccacgtt cttcattgat tgcattggctg ccatcggctct ggcttatgac cggaagaaaag tatccaaggc
1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
A I L A R M K R T G E E S Y K S G ***
1121 TGCCATCTTG GCCAGGATGA AAAGAAGTGG AGAGGAAAGC TACAAGAGTG GCTTGAatttg tgggcccttg ggttcctttt CCAAAGCCA
1121 tgccatcttg gccaggatga aaagaactgg agaggaaaagc tacaagagtg gctgaatttg tgggcccttg ggttcctttt ccaaagcca
1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
1261 TCTGGGCAGA GGTTTAATGT TCTGTTTATT AACTACTGAA TAA----- ----- ----- ----- .....
1261 tctgggcaga ggtttaatgt tctgtttatt aactactgaa taa----- ----- ----- ----- .....

```

Fig. 37. Omologia tra la sequenza del trascritto correttamente assemblato del cDNA della SCD bufalina (linea superiore) e la sequenza del trascritto non correttamente assemblato (linea inferiore). I trattini rappresentano i nucleotidi mancanti, mentre le lettere maiuscole e minuscole rappresentano gli esoni tradotti e non tradotti.

E' stata, infine, individuata e caratterizzata una terza popolazione di mRNA lunga 407 bp.

Dalla comparazione con la sequenza correttamente assemblata, ottenuta nel corso della presente ricerca, tale trascritto si caratterizza per una delezione di 843 bp, dal 228° nucleotide del secondo esone al 217° nucleotide del sesto esone, come conseguenza di uno splicing alternativo.

Quest'ultima popolazione di mRNA si contraddistingue, inoltre, per la perdita del sito canonico di stop codon (TGA) e per la realizzazione di una nuova tripletta di terminazione (TAA) tra il 275° ed il 277° nucleotide del sesto esone.

Tale evento potrebbe condurre alla traduzione di una nuova proteina, costituita non più da 359, bensì da 104 aminoacidi, di cui gli ultimi 19 frutto

della traduzione di 57 nucleotidi del sesto esone, di norma solo trascritti (figura 38).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
1 tcaggaacta gtctacactc agtttggact gccccgaact ccgctccgca gtctcagccc cgagaaagtg atccccagtg cctagaggcc
1 tcaggaacta gtctacactc agtttggact gccccgaact ccgctccgca gtctcagccc cgagaaagtg atccccagtg cctagaggcc
      100      110      120      130      140      150      160      170      180
      M P A H L L Q E E I S S S Y T T T T T I T A P P S R V L Q
91 agATGCCGGC CCAATTGCTG CAAGAGGAGA TCTCTAGCTC CTACACAACC ACCACCACCA TCACAGCACC TCCTTCCAGG GTCCTGCAGA
91 agATGCCGGC CCAATTGCTG CAAGAGGAGA TCTCTAGCTC CTACACAACC ACCACCACCA TCACAGCACC TCCTTCCAGG GTCCTGCAGA
      190      200      210      220      230      240      250      260      270
      N G G G K L E K T P L Y L E E D I R P E T R D D I Y D P T Y
141 ATGGAGGGGG CAAATTGGAA AAGACTCCCC TATACTTGA AGAAGACATC CGCCCTGAAA CGAGAGATGA CATCTATGAC CCAACTTACC
141 ATGGAGGGGG CAAATTGGAA AAGACTCCCC TATACTTGA AGAAGACATC CGCCCTGAAA CGAGAGATGA CATCTATGAC CCAACTTACC
      280      290      300      310      320      330      340      350      360
      Q D K E G P K P K L E Y V W R N I I L M F L L H L G A L Y G
271 AGGATAAGGA GGGCCCAAAG CCCAAGCTTG AGTATGTTTG GAGAAACATC ATCCTCATGT TTCTGTTACA CTGGGAGACC CTATATGGGA
271 AGGATAAGGA GGGCCCAAAG CCCAAGCTTG AGTATGTTTG GAGAAACATC ATCCTCATGT TTCTGTTACA CTGGGAGACC CTATATGGGA
      370      380      390      400      410      420      430      440      450
      I T L I P T C K I Y T Y L W V L F Y Y L M G A L G I T A G A
361 TCACATTGAT CCCACCTGC AAGATATACA CCTATCTCTG GGTGTTATTC TACTATCTGA TGGGTGCCCT GGGCATCACA GCAGGGGCC
361 -----
      460      470      480      490      500      510      520      530      540
      H R L W S H R T Y K A R L P L R V F L I I G N T M A F Q N D
451 ATCGCTGTG GAGTACCGA ACCTACAAAG CTCGGCTGCC CCTGCGGGTC TTCCTGATCA TCGGCAACAC CATGGCGTTC CAGAATGACG
451 -----
      550      560      570      580      590      600      610      620      630
      V F E W S R D H R A H H K F S E T D A D P H N S R R G F F F
541 TTTTGAATG GTCCCGAGAT CACCGTGCCC ACCACAAGTT TTCAGAAAAG GATGCTGATC CCCACAATTC CCGACGTGGC TTTTCTTCT
541 -----
      640      650      660      670      680      690      700      710      720
      S H V G W L L V R K H P A V I E K G S T L N L S D L K A E K
631 CTCACGTGGG TTGGCTGCTT GTGCGCAAAC ACCCAGCTGT CATAGAAAAG GGTCTACGC TAAATTTATC CGACCTAAAA GCCGAGAAGC
720 -----
631 -----
720 -----
      730      740      750      760      770      780      790      800      810
      L V M F Q R R Y Y K P G V L L L C F I L P T L V P W Y L W G
721 TGGTAATGTT CCAGAGGAGG TACTACAAAC CTGGTGTCTT GTTGTGTGTC TTCATCCTGC CCACACTCGT GCCGTGGTAT CTGTGGGGTG
721 -----
      820      830      840      850      860      870      880      890      900
      E T F Q N S L F F A T L F R Y A L G L N I T W L V N S A A H
771 AAACGTTTCA AAACAGCCTG TTTTGTGCCA CCTTATTCGG TTATGCCCTT GGGCTCAACA TCACCTGGCT GGTGAATAGT GCTGCCATA
771 -----
      910      920      930      940      950      960      970      980      990

```

```

      M Y G Y R P Y D K T I S P R E N I L V S L G A V G E G F H N
901 TGTATGGATA TCGCCCTTAT GACAAGACCA TCAGCCCCCG AGAGAATATT CTGGTTTCAC TGGGAGCTGT GGGTGAGGGC TTCCACAAC
901 -----
      1000      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080
      Y H H T F P Y D Y S A S E Y R W H I N F T T F F I D C M A A
991 ACCACCACAC CTTTCCTTAT GACTACTCAG CCAGTGAGTA CCGCTGGCAC ATCAACTTTA CCACGTTCTT CATTGATTGC ATGGCTGCCA
991 -----
      1090      1100      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170
      I G L A Y D R K K V S K A A I L A R M K R T G E E S Y K S G *
1081 TCGGTCTGGC TTATGACCGG AAGAAAGTAT CCAAGGCTGC CATCTTGCC AGGATGAAAA GAACTGGAGA GGAAAGCTAC AAGAGTGGCT
1081 -----
      1180      1190      1200      1210      1220      1230      1240      1250
      **
1121 GAatttggtg tccettgggt tccttttcca aaagccatct gggcagaggt ttaatgttct gtttattaac tactgaataa ....
1121 -----T TCCTTTTCCA AAAGCCATCT GGCAGAGGT TTAATGTTCT GTTATTAAC TACTGAATAA ....
      S F S K S H L G R G L M F C L L T T E ***

```

Fig. 38. Omologia tra la sequenza del trascritto correttamente assemblato del cDNA della SCD bufalina (linea superiore) e la sequenza del trascritto non correttamente assemblato (linea inferiore). I trattini rappresentano i nucleotidi mancanti, mentre le lettere maiuscole e minuscole rappresentano rispettivamente gli esoni tradotti e non tradotti.

4.2 Struttura del gene che codifica per la Stearoyl-CoA Desaturasi (SCD) nella specie bufalina

Mediante l'omologia tra la sequenza del gene SCD bovino, reperibile in banca dati (EMBL acc. no. AY241932), e la sequenza del cDNA bufalino ottenuta nel corso della presente ricerca (EMBL acc. no. AM600640), è stato possibile suddividere quest'ultima in esoni per, poi, costruire su di essi una serie di coppie di primer che, unitamente ai primer disegnati sulla sequenza bovina, hanno consentito di completare il sequenziamento del primo esone (primi 52 nucleotidi) e del sesto esone (ultimi 3781 nucleotidi) e di amplificare e sequenziare le regioni introniche ed il promotore del gene SCD bufalino.

Usando come template il DNA genomico estratto dai leucociti di due bufale, appartenenti alla razza Mediterranea Italiana, allevate in provincia di Salerno, è stato sequenziato il gene della Stearoyl-CoA Desaturasi (*SCD*).

Il gene si estende su di un tratto di DNA di circa 17 Kb, di cui sono state sequenziate 13746 bp comprendenti 5083 bp di regioni esoniche e 8079 bp di regioni introniche con un contenuto di A/T e G/C rispettivamente pari al 53% ed al 47% (figura 40).

Per ciascuno dei due soggetti esaminati, sono stati sequenziati per intero il primo (516 bp), il terzo (1456 bp), il quarto (1580 bp) ed il quinto introne (2690 bp) del gene ed una parte del secondo introne (1837 bp).

Il gene *SCD* (figura 39) è organizzato in 6 esoni di dimensioni variabili da 131 bp (esone 3) a 4059 bp (esone 6) e 5 introni di grandezza compresa tra 516 bp (introne 1) e circa 3870 bp (introne 2). Tutte le giunzioni di splice seguono la regola comune 5'GT/ 3'AG.

La regione codificante ha inizio al 145° nucleotide del primo esone, mentre lo stop codon (TGA) si realizza tra i nucleotidi 198-200 del sesto esone.

La regione 5'UT è rappresentata dai primi 144 nucleotidi del primo esone, la regione 3'UT corrisponde agli ultimi 3859 bp del sesto esone e l'ORF (Open Reading Frame) si estende per un tratto di 1080 nucleotidi che codificano per 359 residui aminoacidici.

Tale organizzazione è simile a quella descritta da Medrano *et al.* (2003) per il gene SCD nella specie bovina con il quale è stata calcolata un'omologia media pari al 97,7 %.

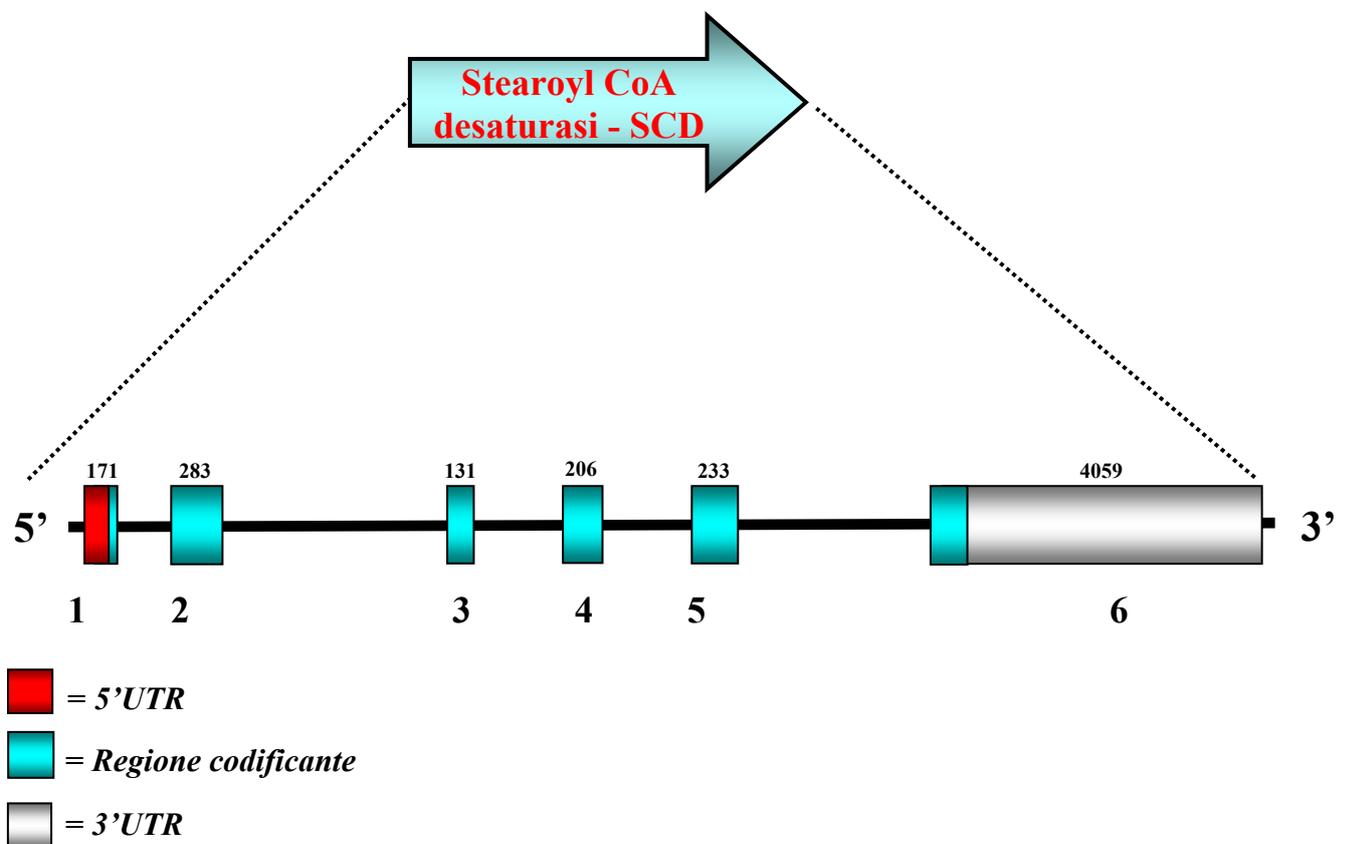


Fig. 39. Struttura del gene della Stearoyl-CoA Desaturasi bufalina

-584

ccagtgcccatccaatttgcaattgccggggccagttctgggctggcacgcatccccgcgccactccccgacag

-509

C/A

ggtcttctccctctccccgagcgcctccgaggcggcaggggtgccgggtNgaggccagcggccgggtgtaagagaa

-434

gccgaggagaaagggaggggagggggagtgaggagctcgcggcagagggaaacagcagattgcgccgagccaatgg

-359

caacggcaggacgaggtggcaccaaaattcccttcggccaatgacgcgccagagtctacagaagccattagcatt

-284

tccccaggggcaggggcagaggcaggggctgcggcggctaagccgcgggtgtgtctgcagcatccagttcttgctt

-209

cttcggccccagcagcctcggcgctctgtctcctcccctctcccgccatgcggatctcccacggtgagccaa

-134

ctctgcgcactttgcccttgttggcaacgaataaaaggggtctgaggaaatacgggacacagtcaccccctgcc

-59

+1 esone 1

agcgctattaaatccccagcacagcaggtcgggtccggacaccggtccagcgcgcaccgtgcagcgggaaggtccc

+17

gagcgcagcgcgccggatcgccacgcaaaagcaggctcaggaactagtctacactcagtttgactgccccgaac

+92

Metionina

tccgctccgcagttcagccccgagaaaagtgatccagtgctcctagaggccagatgcccggcccacttgctgcaag

+167 introne 1

aggaggtgagagcttccgagtaatggccccagaccccggttcgcgggtgctggtggggcttctgggtgactca

+242

ctggagaagagttgagatcaccgcgggagaacatagccgtcttttgcgagttgtactgccttcagtttggtgga

+317

atggggattgtaatttgcaaaacttaggtctccaactttcgtttcttaagctttaagagaaacctggtcctgccg

+392

gtagccttctgtagtaggtatgccggcttccggtgtgtgctcgttggggtgcgagtgttcactcctctttct

+467

tatttccccttcaccttgaggtttcacctcctctccgcagtcctctgcatagttcctgggcacttccctgtcttcc

+542

gccttccctcaggtaacctgggtattgggaccaggtctatgcctatccccgccttccccagctttactaagg

+617

esone 2

agtgaagtggccctactgcctccacgtgcctctcctctctcttgaccctccacttctctccttccagatct

+692

ctagctcctacacaaccaccaccaccaatcacagcacctccttccagggctcctgcagaatggagggggcaaatgg

+767

aaaagactcccctatacttgggaagaagacatccgccctgaaacgagagatgacatctatgaccaacttaccagg

+842

ataaggagggcccaaagcccaagcttgagtagtgggagaaacatcatcctcatgtttctgttacacttgggag

+917

introne 2

ccctatatgggatcacattgatccccacctgcaagatacacctatctctgggtaagaagttcccatgtcctc

+992

ccgaccagttaccccagggttctctccactcttttagttaagtaagatcttacatagagtacaaacaccagcccct

+1067

ccaggctgaagttttcccagccatttctctttgggtgtcctgagaggctgggtggcctgggaacaaagcctagggg

+1142

ggttgggatgcaggagcgtccactctgggggatcttttaattttgggtgtggggctggagccctgagaccatggg

+1217

cctcaggttttgaaatgagcagaactatgtcagagagtcagctttttctgaaagaggttttctgttttaattctt

+1292

ttgcttgactgcttatctcagccctgccagccaagaagaatcaaggtccctacctgggaggcatggggacattg

+1367

gactagatgagtgacttttagagggcttaagctgagtctagtcatggggtaataagaacaacggctcaggaggaga

+1442

gttagtagtaggggaacagagtggtggtcatgcacaaacttattttgccctgacccttgcccctttccagctcct

+1517

tggttacataaacagggtgaagaaggctcctgtgtaacctagtttacacagattgatctgtgactccatgttaggtc

+1592

togactgtacatgccactcgacaaaaatgttcttagaatgaaataaggttcaagatgtgttccatgtcccattcca

+1667

cacccatcccgtccagccgttctctcccaggccccgggcaaccctggtcttcaggctgctgcagtgagggggaca

+1742

gtccccagtgatccctgacctgctgcccttagctcagctctttcaggaatccatgggcttgggctgatatagcag

+1817

ggccctgccgctgcacacacacatgcaactctgcgggcattcctacctctgccactatgagtctggcttgggaag

+1892

C/T

gggaaaacagagaaccctaaagaccagggatcggaggggtggggcacatcagcactctctgagaggggNaggccag

+1967

aactccccctccagaaagcaactgttaggtcttccagagcagctcttgggtgtggggcttgcagacagctgcaact

+2042

cttggaggggaattacatagaaaaggctggcaggccaagtttcagccaagtcctccagaacctctttg.....

+2117

cagataaacacttaactttgctgagcatttgttttttcagccgcaaaagcgagggatttaaacccctttcaagat

+2192

atctagtggatcagaaaacataaaatccttagcgaagcttaagacactgcagctatgactgatgtgcagggtgaa

+2267

atttccccctcctgtggccacattgtctgctaaaaggtttttggaccacttggtaaatagttatagttctgagccc

+2342

ccttaatgtcccctagaaccaggaaccctcaaaagggtcagtgcccagactatactgtctgttaaatattttaa

+2417

taccacccttgagcatgggtcttaagcactgctgtagtggctgtggtccttaaccggtgaagaaggtagcag
+2492
aaggtcagaggggatgggacttgggagaataatccctcatgactgagaatgccaaagtggccgggggtaagagccc
+2567
tcttctctctcttgcctttctgaagttccctgggactcctaagcttattccagctcctagggttagatgatgagag
+2642
gggatgatacttttcaagtgattaaaatcaaaggagcctaagagatcaagctatccctggagttcaggggaagc
+2717
agatcctcaccgggagcctacacacactctggcctgaggaacaatcatgcaaacgctttccaggttagtgact
+2792
esone 3
gcctgcctgttattatcctggcagtggtatttctactatctgatgggtgccttgggcatcacagcaggggccatc
+2867
gcctgtggagtcaccgaacctacaagctcggctgcccctgcggtcttctctgatcatcggcaacaccatggcgt
+2942 introne 3
tccaggtaagaagccagctgtgctcagctcttttctcctcactcttgatcgatgagccggtggcggaaatggagg
+3017
cgatcagtgctggagagggacagcacctagacagccacttcactttctctctctctctcttctgtggttaagttcaggtt
+3092
cagtcccgaagtccataaaaacataaggatacttctgagtactggcagaggcaagtaggagataaagaagaaata
+3167
ctgtcagtggttagggatcttttgaacctctgttatcaccagctctggctgttctgtggtctttcataagtgcata
+3242
aggcaagagctgagcctggctccaatgggcagacattggacaaaacattcacaactctgggtggatgtcttaggcc
+3317
tctatcacaatgggggtgaagttaatgtttcacagattcttgttttaactgttgttttcaggttaagacgatcaa
+3392
atacttttatagtgctatctataatgtctggcactattctaagcacttgacatagattgcctcattaaaccctcat
+3467
gatagtcttaggaggtaggatatttggtatccccattcacagatggggaaattgtgtcactgaggggttaggt
+3542
agaccaacattatggctccttttaatgggttaccaggctgcctaagtcaagtgttgaggtttgttgaagcagaaaag
+3617
tttttagcagagatagaatgaaggggactggagaaagagaactcatagttattaagcagtagcaaagggcaaaag
+3692
atagcatgtagtaagggcctagcttgaacaagaggaaaacacaaggaagcccagttagtctccttctccatgg
+3767
caatatcccacggttgcataatcatctctgccatagccttaatgcctcaagggtcctgatattgtccccgcgg
+3842
ggcaaaaacaaggaagcgagattggcactgtatgggatagaaagagtcccagaggccatttgggaatgtggtcata
+3917
tcgtgatttatctgtctagcttttcaagttgtagaggtatctcttgctaaggcatcagaatggaactgccac

+3992
agcttcatccattgaccaggatgctaagacacaagggttgctgcctcctgttatccacgctcagggattaggcac
+4067 G/A C/T
cccacacccattttcttgccttgaagaattgcagtgctccctcctaattgNaactctgagccNtgtacaatcttctc
+4142
gcactccaactcaccacataaccctcgagaagcagccagccctgttcatgtggtcctgagacttgaagttgctttt
+4217
ccacttatgcttcagcagcaagtttaaggagaggaggcaactccatgacttctcctttggagaccaactcctag
+4292
gtatthttgtgaggttgggctgagagctgtgggctctggaagacacctggcaattggaattcccctgagaggggtg
+4367 esone 4
ctttccacaggtcttcaattcttctctgttcctctagaatgacgtttttgaatggtcccgagatcaccgtgccac
+4442
cacaagttttcagaaacggatgctgatccccacaattcccgaactggctttttcttctctcacgtgggttgctg
+4517
cttgctgcgcaaacaccagctgtcatagaaaagggttctacgctaaatttatccgacctaaagccgagaagctg
+4592 *introne 4*
gtaatgttccagaggaggtgagtgacatgatgatggagctggggacctggcattaggggacccccttttttctcc
+4667
taggacttgtcaacatgagctgagaaaattacttggttctataatctcaaattacaatttaaaccctaattttt
+4742
aatagcccatgggcccagagccatagactgttgtttctttttctctgagctacctaagccaattaaattcaaca
+4817
atgtttgttgacctaggacggtcatggatacaaagccaaatgtgtcatagtccttaccttcaaggagttcatagc
+4892
ttactggggagtggaaggataagccaagtgtccaaatcctatgatatacggcaaaaatattttccatagcgagga
+4967
gaggcacaaggaggaggagactgtagagtggggaacatcaggggaagggttatagaagaagtagctttggaatc
+5042
cactgatggatggcacagggcaggtgggtggggggacagtgcaaacagaaagaagagctgaagcatgttcctgc
+5117
aacagagtccttttgcttgaaatacaggggtgtggtaggaaaaagacttagcagcagagactgatgccattgttat
+5192
ggagtcttccaagcagacaaggtgtaattcaacccaagcaataggaaccaatagaaggtttttgagccagaagg
+5267
tggtatgggttgagggtgtgctttagaacggtacctctggggtggaatgagagaaggcattgaactaaagaggtggg
+5342
gaagtcttgggtttccgtgcagggaaagtgtggttaggaaatggagaggagttaaaggcagcagggcttactaatga
+5417
tacaagagtaacagacttaactgctgaaggtgtctagaaaatcagttccctggtaatgtttgatgcttgctgtacc
+5492

ttggggaggaggaagaatggaacagggcctccagaggacagatctgctggcatctaggacatttgggggcctc
+5567
tctgagggcaaagaagaggaaggaatgagaaagattcctggctagcaggagatgaaggcaacataactaaacaagaa
+5642
tcctggggacttctctggtggcccagtggttaagactccacacatgcacggggcacaggttcgatctctggtcca
+5717
ggaactaacatcccctcgtgccacctggtgtggccaaaaaaaaaaaaataaaagattgacttaacatagattctgc
+5792
gaagagcactgctaaaaagggaaaggaagcccaaaggcagaacagaaaaaccgggaaggagaactcagtctgtaa
+5867
tttgaccctgtctatctccctgaagtagtaaaagagagcaatggatttagagtcaggagatgaaacattccagt
+5942
ccttgctccaccacttctggtagtgtagccctagaaaagtcatttaaccctcattacctcatctcagaagtat
+6017
gataataacactgtattctcagaaaaatgtccttgccattcctctgttctgttgctgccacactgtgctttc
+6092
agtgtagaaagggacagcccagccctgtgagagtggaatacaggtaggtctcagcgtcccctctccactcactg
+6167 esone 5
agcgtgtgatctctcaatgcaggtactacaaacctggtgtcctgttgttgtgcttcatcctgccacactcgtgc
+6242
cgtggtatctgtggggtgaaacgtttcaaaacagcctgttttttgccaccttattccgttatgcccttgggctca
+6317
acatcacctggctggtgaatagtgctgcccatatgtatggatatacgcccttatgacaagaccatcagccccgag
+6392 C/A C/T introne 5
agaatattctggtttcNctgggagctgNgggtaagtcagcagtcacagcaagaccacgtctagtggtctgctgc
+6467
ttaggtattaggttacgtgccagaaaaactagatttacctgttttatgaccctctccatagtctattccacta
+6542
taaaactaaggacagcattagaaaaccctgaaagttaagcaacaagtcctatgtaaagagaaaaggtgaaat
+6617
ataacaatgcctttaattctaggtttaagagcaagccacaaatactatgtatgatgaaccctttgggctgttct
+6692
cttcccagtcattctctgatctgggtggtagctcttgcttggggcagggaaatgcataaatagaagagtagggctc
+6767
tgggtggccagaaagcctagatattttatatttagtagtgataacagaacaaatactgtcttttaactcactaa
+6842
gcttctcttttatcaccttctgtattcagaggggcaatatttgaagtgattacatgccttactacctggtaat
+6917
gccagtatgaaggacatcaaagcaactggtggtggtcctttatcaccacctaccctctcttctcttatacctta
+6992
ttttctctctctgtttctctgctgtgctgggaacactccctccccacagtgctgacttaggaaactaccataaa

+7067
gcaattactcactgacctaatagctgactattcaggaatttatttctaccattcctgttccaatagccagacaata
+7142
gggttctgccatctgtctccattttctttttcttttttttggctctgtcactcttttcagctaaatatagaccttg
+7217
actaaggcctggaattaggtttccttaggcagaccccaaggcctctccagtgatcagggcctctggatccag
+7292
cacagataggtaacctccctgctccacacatacatgtgccatggcctagctgtcactcggttctctttaa
+7367
cttcctttatactctcaaccctgaccatctttttcttttttattactctctgtactaaagacatctttttcattc
+7442
tcttttaattttcatgcatctttccctcctccagacaccgtgtactgttcacatgttcttactctgaacctgt
+7517
ttgaaatcaatcacattataggctattttcatagaaaaccagtgaatgtcatggaaggtttctggaatgagatca
+7592
gtcctgtactgcaaacagatctgttgtgagcttcccctattcagagtggctgtcaatagtacattatcattcgt
+7667
tccttcacccctgttgtctcccatttatcacctcacccttgttctctggctgcctgtttcccctgcttgctgc
+7742
cattotaatcttgttcttcttgaattacctccccacccccagtcacatgctcatcttcNctctgccagagctaac
+7817
ctccctgcttgagcctctcttggctatacttctgtgttccagttacagagtctcatccttcttttgcccactaac
+7892
cttctccgctttctttctctcttggcaccgtgtgtgtgtctgattgttttaaactgataagtgtggcctag
+7967
ctagtgttagacagagcctagttgcaaagtcatttatggaaattagcgtcttccatcagtaccttttagccttg
+8042
gggttatcctaccctcctactcagttctcattgaataaaactgatgagccacactgtgaacaaaccttgagatggt
+8117
gccctggatgggtgttattcccgtcacaggacttccctccttgttggttattaatgtcNtattactgtactgggg
+8192
ctctttcatcttcaaagggctcagcacactcttttattagctattctttacccagcctcataagggattgtta
+8267
ttgaatgtggttcacaaagaagagcctgcctaggactggagaactctgtctatggagttccacagcttgactca
+8342
ttacagaaattattctgaatctagaatttctttgaNtttctctgtccagcaaagtgaactgctcgtttcagaat
+8417
tttagaggctggaaNgaatacctaagctttttgattcttattccctcagagagcttctgttttatcagcatcacc
+8492
cccagggtgaaagctcaaagaattaggagccaaaacagtcactctgaaccagttagaggcaaggaaacttaggcc
+8567

C/T

A/C

T/G

A/G

+10142
aggaagatttcttattctagataacaagaaatcttgaggttggttatttccagaattgctgattccagcagctca
+10217
ggaaattgtcaaaaattctttcatctttctactctgccatcggtgggatattggtcagctcccctcatagtaagaa
+10292
ggtggctacagcatttgagacttcaaaaagagatacattgggtggtaggtggtagcagtagttgcctcccaaaa
+10367
aagaagaattttaggagctggaggtgggtcaaacataaagctatatatacatgggtactttgggtggaatatta
+10442 G/A
aaNtaattctcttagagtagttccctctgaaagagagggggcttgaagaagaggaagaattagccaggttgctc
+10517
cttctctctcgctgctggacaggagatggagaggttgagggcaggatctgtaggcagttcctaagagatagggt
+10592
tacaaaagaaaggctctgagatcacattgctgggggattcagaaggttactgagtaagttggtgggtgctctgat
+10667
atggaagctggttatacaaaacaagttagatggtgggttcatttcattaattccactttctccttgactgagaaa
+10742
gcattagaaggcttctccccacagtgttgaacccttccactcattccttctattaacttctagctgaaaatag
+10817
gactggctgggggatgggtaggaaatctcttaactaccctatcaattcttggttgccctctctgtccactttc
+10892
tctgctggttttatctccttgatgtttcttctctctggacaggcaagcctctctgtgtgtattcagaggc
+10967
agtgatggctactgcggtcccagtcggtccctctcttagcaacagaaatggtcagggtcactgaaccactgtttct
+11042
ctttacaaagttgagcaagctgccactttcacttggcctccagagtctccatctataatccttgctccttacca
+11117
cactgatgactccagacaaggctggcaaacctgctagaacaatcctgggcacaagcatttgactcatgaggca
+11192
tggccaagccgaatgctcatggttgccagagccagccatggagcaaaagaggattggttttagtctcctctgt
+11267
ctgggtcagaaccagagagcatgctggatgccccggcttctgggtaagctgcctagcctgagtcagtgctccc
+11342
agcggacagtgcgaggcttgcaagaagcagggggagcctagccttactgggaagcacaagaagcaaggcaggtt
+11417
ccaaagtacctcactcagaaggtggccccagccccctggagggagccaggtgtaccgtaagaccttgactgagg
+11492
cttaggatgtgagatgccatgaaactttgcggaacagtggtccgctcagcaactaaccagcattccccacaaca
+11567
caatctagggcagacaatagtatagaggaggttggagaaccttgggtccctttgtccctgtaacctcagttgt
+11642

ctaggcagaaacctggcctttattctattttaagggtgaaaaataacaatacaaatgctctgctactattgagctc
+11717
caaggatggaaaagaggagagcatttcttctgtattaattggatagatggaggctacagagcttaggctaaact
+11792
aaaggcatccttgtcttttgagttcctctcagtagagaaaaaaaaaagtctaattggaagatcactgtagattag
+11867
atcctctgaccgaagcacctacccttggaaatgcctgtgggtagttttaattccacgggtcatcagatgcatg
+11942 C/T
ctttacaactgatgatcaaaaaacaacttatctttctattctaatgtgttccatggatNtgatctataccatgac
+12017 G/A
cctacacaaggctggatgNtgctccttgggccagggtacttgtacttgtgtaggtgggggtgtctactgagtaa
+12092 C/T
ggaatactgtttttaagggttctaaagctaaattcaaatgatgctgtaataatgaccagaaactcagatctgaNgggtg
+12167 C/T
tctgaatttctaacagtccttgccttgtgggtatgctgacaacttatctggatgccttacatcttttcNaaacag
+12242
tgttgccctctctgctccctccctgctccctctgtgaagtcctttgcaccccagagcctgcagaagtggctggta
+12317
taaaagggggcctggctagagaaatgatcagtgtagctgtttgcaggattcctttctgggcttcattttgaaact
+12392
ttgcttagggctatttttcttaattgccgcatttgatggagggtagaaggaattttgaaatgtatttgattatt
+12467
attattattatttttttagattaaaagatgggtgtagcatttaaaatggaaatttttctcctggttagctag
+12542
tatcctgagtgattctctgtaagtgtagctcaaatgggtcatcatgaaaagttcaagaaagcttgatgtcaaag
+12617
ttatatgggtggtaaggccagggcctgtcctaccactgtgccactgacttgcctgtgtgaccctgggcaagtc
+12692
ttaactataatgtgcctcagttttccttctgttaaaatgggataaataactgacctacctcaagggcagttt
+12767
gaggcatgactaatgctttttataaagcatcttggaaattttcttaagttctgagtattttatagtagcagatc
+12842
caccatgaagtgtgtccaccatgaaccacgtgtcctggatgcaatcaggaatctatatggttctctctgagagat
+12917
tgaataaatgcatcagataaggggtggataactagccagacaaaatctgagaatgcataaactcattgccatgga
+12992
aacatacacaggataccttttcttctgattgggtgggatttttccctttttatgtgggatagtagttattttgtgac
+13067
ctaagaataattttggaataatttctattaatatcaactccaaagctagttgtactgatctgagattgtgtttgt
+13142
tcataataaaagtgaatctgattgccctg

Fig. 40. Sequenza nucleotidica del gene SCD bufalino. La numerazione è relativa al primo nucleotide (+1) del primo esone. I puntini rappresentano la parte mancante del secondo introne. Le "N" in grassetto rappresentano le posizioni della sequenza in cui si verificano gli SNP riscontrati. Le lettere in verde rappresentano la sequenza del promotore, quelle in viola le regioni esoniche e quelle in blu le regioni introniche.

4.2.1 Analisi del sesto esone

Usando come template il DNA genomico delle due bufale, è stato sequenziato l'intero sesto esone del gene che codifica per la Stearoyl-CoA Desaturasi bufalina, di dimensioni pari a 4059 bp.

Il confronto tra le sequenze ottenute nella presente ricerca ha messo in evidenza 6 eventi mutazionali.

- Transversione A^{Ala} → C al 107° nucleotide del sesto esone (figura 41), riscontrata anche da Napolitano *et al.* (EMBL acc. no. DQ646701). Tale mutazione ricade nell'ORF, ma non altera il senso della tripletta (mutazione silente).

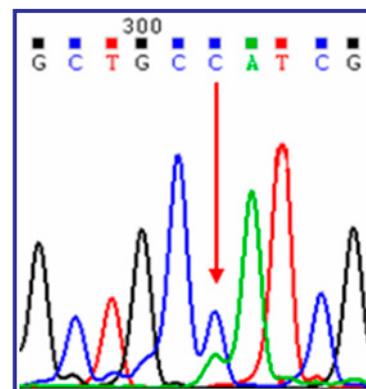


Fig. 41. A^{Ala} → C al 107° nucleotide del sesto esone

- Transizione G → A al 1333° nucleotide (figura 42)

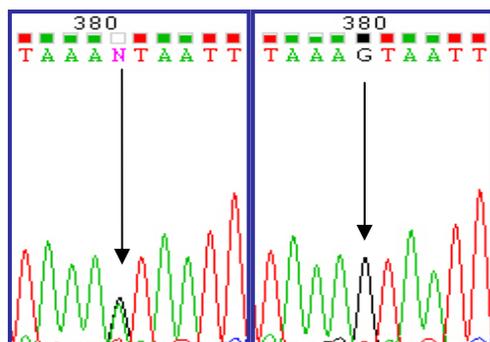


Fig. 42. G → A al 1333° nucleotide

- Transizione C→T al 2889°nucleotide (figura 43)

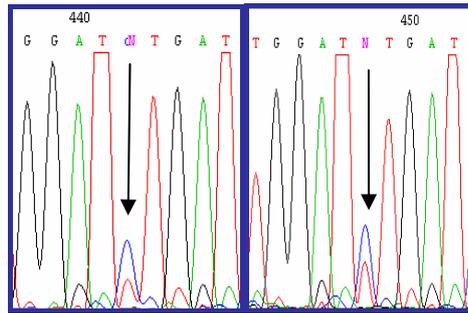


Fig. 43. C→T al 2889°nucleotide

- Transizione G→A al 2924°nucleotide (figura 44)

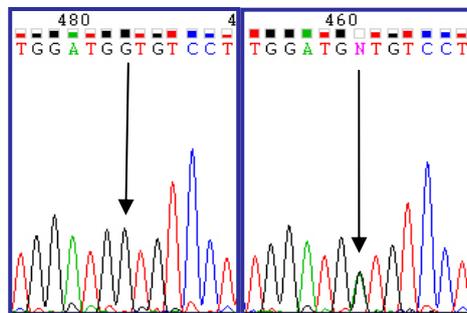


Fig. 44. G→A al 2924°nucleotide

- Transizione C→T al 3051°nucleotide (figura 45)

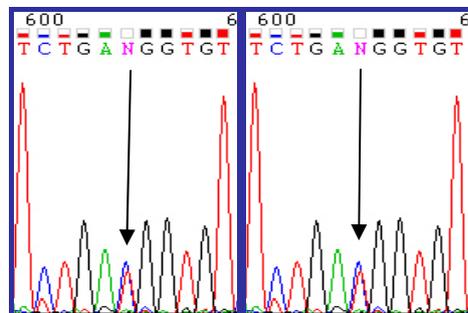


Fig. 45. C→T al 3051°nucleotide

- Transizione C→T al 3124°nucleotide (figura 46)

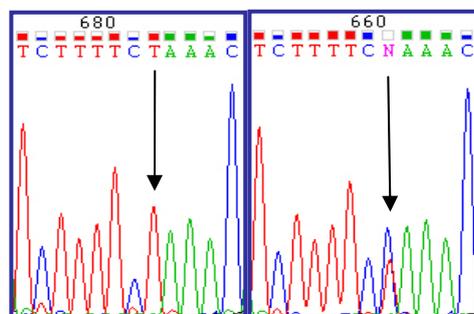


Fig. 46. C→T al 3124°nucleotide

Il confronto con la sequenza riguardante il sesto esone nella specie bovina (Medrano *et al.*, 2003) evidenzia una similarità del 97,4% ed in particolare, nel bufalo si riscontra la delezione di una sequenza di 9 bp localizzate tra i nucleotidi 16162 e 16171 dell'omologa sequenza bovina (EMBL acc. no. AY241932).

4.2.2 Analisi delle regioni introniche

Dall'analisi e dal confronto delle sequenze introniche relative al gene SCD dei due soggetti in esame è emerso un totale di 7 siti polimorfici (tabella 10), di cui cinque transizioni e due transversioni con un rapporto transizione/transversione di 2,5.

<i>Introne</i>	<i>Mutazione</i>	<i>Posizione*</i>
2	C→T	989° nucleotide
3	G→A	1169° nucleotide
3	C→T	1181° nucleotide
5	C→T	1379° nucleotide
5	A→C	1753° nucleotide

5	T→G	1956° nucleotide
5	A→G	2010° nucleotide

Tab. 10: Polimorfismi intronici

**La posizione è riportata contando a partire dal primo nucleotide dell'introne considerato*

Nessuna delle mutazioni evidenziate sembrerebbe responsabile di differenze nell'espressione del gene della Stearoyl-CoA Desaturasi poiché nessuna di esse, apparentemente, va ad alterare siti canonici di splice.

4.3 Analisi del promotore

Al fine di individuare marcatori responsabili di differenze nell'espressione del gene della Stearoyl-CoA Desaturasi in *Bubalus bubalis* sono state sequenziate 584 bp della regione fiancheggiante il 5' del gene di due bufale.

L'analisi strutturale della sequenza nucleotidica della regione del promotore (mediante il programma Transfac - Alibaba) ha evidenziato la presenza di diversi potenziali sequenze consenso per elementi regolatori.

Nella bufala il gene SCD mostra due GATA factor ed una TATA box localizzati (prendendo come riferimento numerico +1 il primo nucleotide dell'esone 1) rispettivamente ai nucleotidi -442/-433, -184/-175 e -52/-47.

La regione regolatrice, inoltre, presenta almeno 8 siti di legame per C/EBP (CCAAT/enhancer binding factor) ai nucleotidi -572/-563, -379/-370, -340/-331, -287/-278, -272/-263, -261/-252, 219/-210 e -92/-83. Di questi, 7 sono C/EBP alpha, che sono essenziali nella differenziazione di epatociti ed adipociti.

Le CCAAT sono elementi “*cis*” che mostrano una moderata sinergia nelle funzioni regolatorie del promotore e che sono implicati nella trascrizione di diversi geni lipogenici, tra cui l’SCD I (topo). Ad esse si lega il fattore NF(nuclear factor)-Y, richiesto per la trascrizione dell’SCD I e dell’SCD II nel topo (Zhang *et al.*, 2001).

Lo studio del 2001 condotto da Zhang *et al.* sulla caratterizzazione del promotore dell’SCD umano ha evidenziato che una mutazione del CCAAT box (-501) determina la completa inattivazione del promotore stesso suggerendo che si tratti di un elemento “*cis*” critico per l’attività della regione regolatrice dell’SCD umano, analogamente a quanto osservato per la trascrizione dell’SCD I murino.

Altri due fattori di trascrizione legati al metabolismo lipidico per i quali sono stati individuati i corrispondenti siti di legame sono PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor) e SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) in posizione rispettivamente -97/-100 e -68/-71 (un’ulteriore sito consenso per PPAR è situato tra il 44° ed il 47° nucleotide del esone 1). Il PPAR è un membro della superfamiglia dei recettori nucleari steroidei ritrovato

soprattutto nelle cellule adipose dove svolge un ruolo centrale nel processo di differenziazione della linea adipocitaria (Looze *et al.* 2008). L'SREBP appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione che regolano l'omeostasi lipidica controllando l'espressione di una serie di enzimi richiesti per la sintesi del colesterolo, degli acidi grassi, dei trigliceridi e dei fosfolipidi. Ne sono state identificate tre isoforme, SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2, cui corrispondono ruoli differenti: studi condotti in vivo sui topi hanno evidenziato che la SREBP-1c è coinvolta nella sintesi degli acidi grassi, la SREBP-2 è principalmente correlata alla sintesi del colesterolo, mentre la SREBP-1a sembra essere implicata in entrambi i processi (Eberlè *et al.*, 2004)

Nel lavoro di Zhang *et al.*, inoltre, analizzando la regione fiancheggiante il 5' dell'SCD umano, viene riconosciuta una similarità tra tale gene e l'SCD I murino, per la trascrizione del quale, durante l'adipogenesi, sono richiesti gli elementi NF-1 e AP-2. Il promotore dell'SCD bufalino presenta 3 potenziali siti di legame per NF-1 ai nucleotidi -540/-531, -277/-268 e -116/-107 e 2 possibili sequenze consenso per AP-2 in posizione -259/-250 e -457/-448.

Infine, è ipotizzabile la presenza di 2 siti consenso per CTF (CCAAT transcription factor), 2 per YYI (Yin and Yang Factor1) ed uno per ATF (activating transcription factor) rispettivamente ai nucleotidi -367/-358, -143/-135, 524/-514, 501/-491 e -323/-314.

La ricerca di potenziali sequenze consenso per fattori di trascrizione ha messo in evidenza che la regione promotrice sequenziata si caratterizzerebbe per 24 potenziali siti di legame per il fattore Sp (stimulatory protein)1 ai nucleotidi -561/-551; -546/-537; 531/-519; -490/-481; -481/-470; -475/-466; -459/-448 (Sp1A), -464/-450 (Sp1B); -453/-444; -411/-399; -394/-384; -375/-364; -356/-347; -283/-269; -266/-255; -260/-248; -208/-198; -202/-189; -194/-185; -182/-168; -173/-159; -99/-85; -70/-58; -32/-23 e -18/-5 .

L'Sp1 è un elemento ubiquitario che va a legarsi alle regioni di DNA ricche di guanina e citosina. E' un fattore "upstream" che agisce aumentando l'efficienza della trascrizione di geni contenenti il GC box nella struttura del loro promotore. L'elevato contenuto in GC (64,8%) è una caratteristica tipica delle regioni regolatrici di geni housekeeping e l'esistenza di questi siti potrebbe contribuire all'espressione costitutiva del gene nei vari tessuti.

Dal confronto delle sequenze ottenute dai due soggetti esaminati è emerso un polimorfismo C→A al nucleotide -461 (figura 47). Tale mutazione si localizza a breve distanza dalla sequenza di un sito di consenso per quest'ultimo fattore di regolazione dell'espressione genica (Sp1A, -459/-448) e, in particolare, la presenza della Citosina sembrerebbe determinare un'estensione di tale sito (da -464 a -450) ed un suo allungamento (15 bp vs 12 bp) (figura 48).

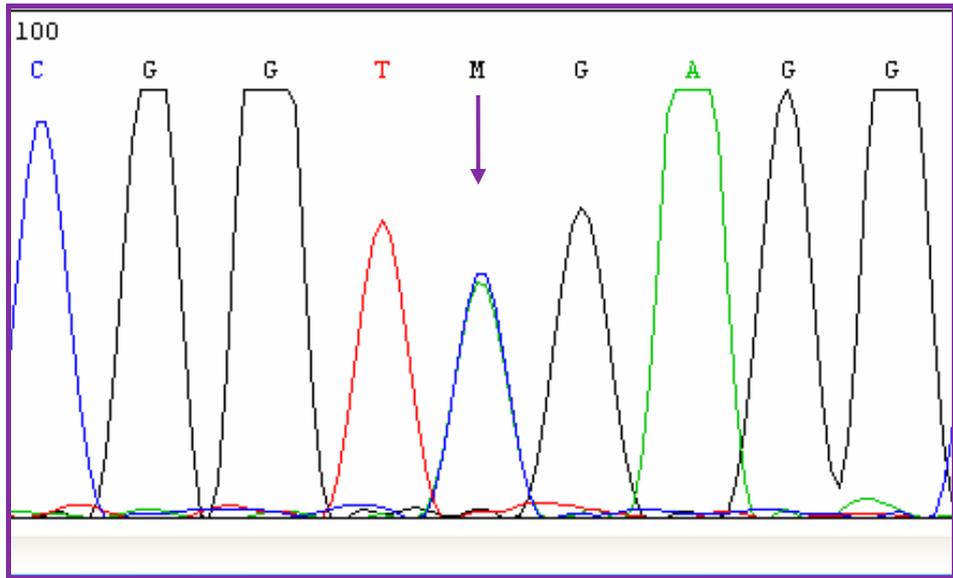


Fig. 47. Polimorfismo C→A al nucleotide -461del promotore

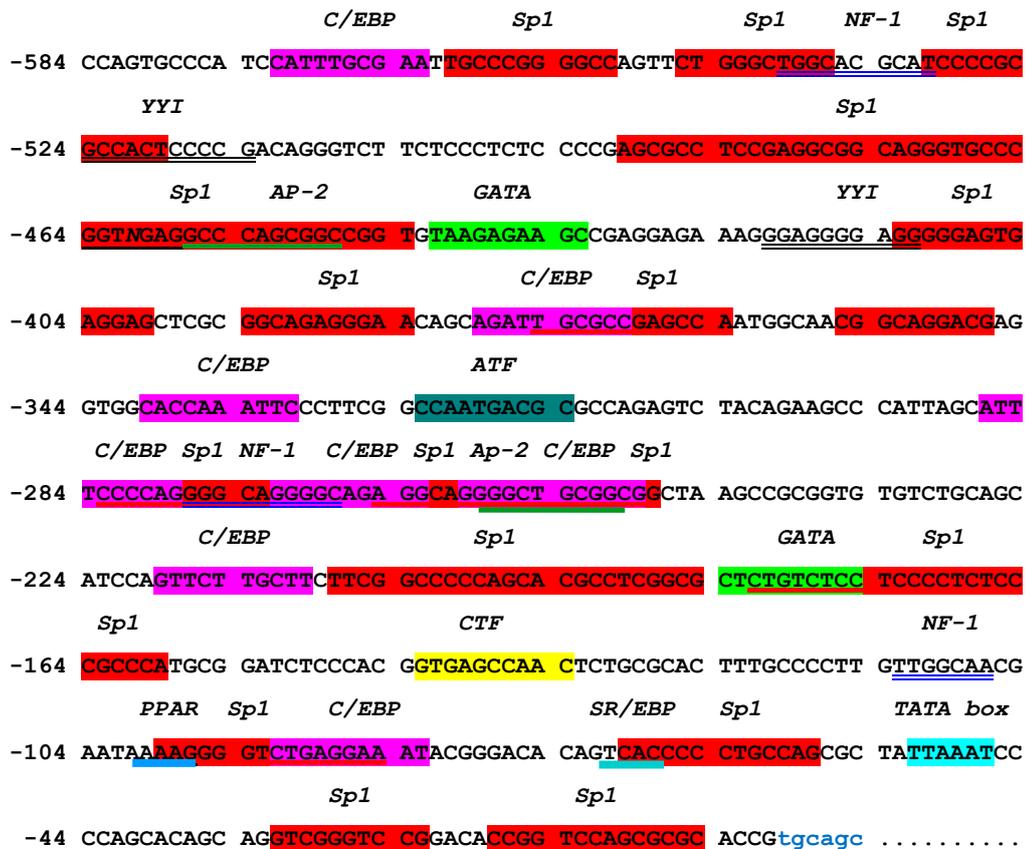


Fig. 48. Sequenza nucleotidica della regione promotrice del gene della Stearoyl CoA Desaturasi di bufala. I siti putativi riconosciuti da fattori di trascrizione sono evidenziati con colori diversi. Il sito di inizio trascrizione è in carattere blu.

4.3.1 PCR-RFLP al promotore

Al fine di individuare in modo rapido ed economico i portatori della transversione A→C in posizione -461 è stata messa a punto una metodica basata sulla PCR-RFLP. A tal fine è stato amplificato il tratto di DNA che va dal nucleotide in posizione -593 (prendendo come riferimento numerico +1 il primo nucleotide dell'esone 1) al 159° nucleotide del primo esone per un totale di 752 bp.

La transversione A→C in posizione -461 del promotore è responsabile della comparsa di un sito di restrizione dell'enzima *TaqI* (T!CGA) all'interno del tratto amplificato.

La digestione con tale endonucleasi ha prodotto nei campioni analizzati 3 differenti pattern elettroforetici, di cui uno caratterizzato da un'unica banda le cui dimensioni corrispondono a 752 bp (omozigote A/A), il secondo contraddistinto da due frammenti di restrizione lunghi 620 bp e 132 bp (omozigote C/C) ed il terzo rappresentato da tre bande di grandezza pari a 752, 620 e 132 bp (eterozigote A/C) (figura 49).

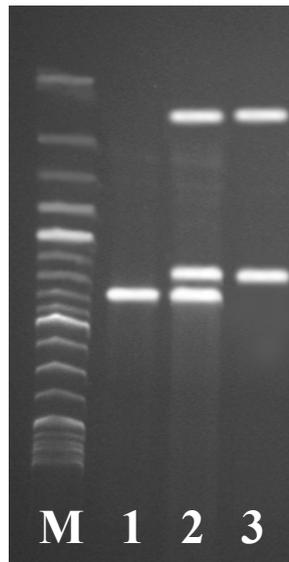


Fig. 49. Tracciato elettroforetico di prodotti di TaqI RFLP-PCR. Linea 1: omozigote A/A; linea 2: eterozigote A/C; linea 3: omozigote C/C.

L'indagine preliminare di popolazione, condotta su 117 bufale allevate nella provincia di Salerno, ha evidenziato che 84 soggetti risultano omozigoti per la presenza dell'Adenina al -461° nucleotide del promotore. Gli individui eterozigoti sono, invece, 27. Solo 3 soggetti sono, infine, risultati omozigoti per la presenza della Citosina.

5. CONCLUSIONI

Il bufalo viene allevato in Italia essenzialmente per la produzione di latte, interamente destinato alla trasformazione (prodotti a pasta filata come formaggi freschi e sottoprodotti quali ricotta e burro), mentre in altre parti del mondo, dopo una parziale scrematura, viene utilizzato anche per il consumo diretto.

La produzione di latte delle bufale in Italia ha subito negli ultimi anni un incremento dovuto essenzialmente alle migliorate condizioni ambientali e, solo in minima parte, al miglioramento genetico. Infatti, nonostante l'importanza economica che l'allevamento bufalino riveste nell'ambito delle produzioni animali, solo negli ultimi anni, contrariamente a quanto realizzato in passato per altre specie di ruminanti di interesse zootecnico, si stanno conducendo seri studi sull'analisi della variabilità genetica di tale specie al fine di acquisire utili informazioni per migliorarne le prestazioni produttive e riproduttive.

In Banca Dati sono disponibili le sequenze complete dei geni che codificano per le principali proteine del latte bovino, ovino e caprino e di quelli che regolano la secrezione di grasso nella specie bovina. Sono, inoltre, noti gli eventi molecolari responsabili di gran parte degli alleli ai diversi *loci* e, pertanto, è possibile identificare, fin dalla nascita, il genotipo degli animali superando il vincolo dell'espressione fenotipica. Di contro, pochissime informazioni sono disponibili per la specie bufalina.

La conoscenza della struttura del gene SCD ha fornito gli strumenti per l'individuazione di una naturale variabilità a tale *locus* in *Bubalus bubalis*.

Utilizzando l'mRNA estratto dalle cellule somatiche del latte di una bufala di razza Mediterranea Italiana allevata nella provincia di Salerno, sono stati isolati e sequenziati tre diversi trascritti di dimensioni pari a circa 1250, 1150 e 410 bp.

Di questi, il primo trascritto è correttamente assemblato, mentre gli altri due sono la risultante di splicing alternativi.

La successiva applicazione delle tecniche della proteomica consentirà, in futuro, di poter verificare se i trascritti alternativi osservati siano effettivamente tradotti e quale ruolo possano assumere le diverse isoforme proteiche nella regolazione del rapporto acidi grassi saturi/acidi grassi monoinsaturi nel latte di bufala.

Il sequenziamento dei trascritti e del genómico ha permesso di determinare la struttura del gene per un totale di 13746 bp comprendenti 5083 bp di regioni esoniche, 8079 bp di regioni introniche e 584 bp di regione promotrice.

Il confronto delle sequenze ottenute e tra queste e quelle depositate in banca dati, ha evidenziato un totale di 16 SNP: 11 transizioni e 5 trasversioni con un rapporto transizioni/trasversioni (*ti/ts*) pari a 2,2. La valutazione del rapporto *ti/ts* è importante non solo per comprendere l'evoluzione dei pattern di

DNA, ma anche per rendere più attendibile la stima della distanza genetica e della ricostruzione filogenetica della specie (Yang e Yoder, 1999).

In particolare, a livello intronico sono stati evidenziati 7 SNP: cinque transizioni e due transversioni con un rapporto transizione/transversione di 2,5.

A livello esonico sono stati osservati 8 cambiamenti nucleotidici: 2 al quinto esone e 6 al 6° esone. Riguardo ai primi due, evidenziati mediante il confronto con la sequenza disponibile in banca dati (EMBL acc. no. DQ646700), il più interessante è quello realizzatosi al 231° nucleotide del 5° esone ($GCG^{Ala} \rightarrow GTG^{Val}$) in quanto tale transizione è stata associata nella specie bovina a differenti contenuti di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) nelle carcasse (Taniguchi *et al.*, 2004) e nel latte (Mele *et al.* 2007). Indagata ulteriormente in *Bubalus bubalis*, tale mutazione potrebbe essere associata a differenti contenuti di MUFA anche nel latte di tale specie.

Dei sei SNP riscontrati a livello del sesto esone, il primo (transversione $A^{Ala} \rightarrow C$) è stato riportato anche da Napolitano *et al.* (EMBL acc. no. DQ646701) ed è l'unico che ricade nella regione codificante (al 107° nucleotide del sesto esone). I restanti 5 SNP (transizioni) ricadono nella regione 3'UT.

E' stata, infine, individuata una transversione $A \rightarrow C$ al nucleotide -461 della regione del promotore. Tale mutazione risulta di particolare rilievo in quanto sembrerebbe determinare l'estensione di un preesistente sito consenso

del fattore di regolazione dell'espressione genica Sp1 (15 bp vs 12, da -459/-448 a -464/-450).

E' stato dimostrato che le mutazioni che riguardano i siti di legame di fattori trascrizionali influenzano drasticamente la possibilità di legare tali fattori in vitro. Tale mutazione potrebbe, pertanto, influenzare i meccanismi di regolazione genica che controllano la sintesi di mRNA e potrebbe essere responsabile di un differente livello di espressione del gene in esame.

Un'analisi più approfondita della regione fiancheggiante il 5' del gene SCD di bufala potrebbe fornire un'importante contributo per stimare il ruolo e l'importanza dei fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione di tale gene.

Infine, l'individuazione di marcatori a livello di DNA risulta estremamente utile per interpretare le affinità o diversità tra gli individui così come interessanti sono i possibili sviluppi ed applicazioni derivanti dall'individuazione di una sequenza genica.

6. BIBLIOGRAFIA

- **ALBONICO F.** (1970): *Rivista di Sci. Tec. Latt. Cas.*: 21, 181.
- **ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W, LIPMAN D. J.** (1997): *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* *Nucleic Acids Res.*; 25(17): 3389–3402.
- **AVRAMOGLU R.K., BASCIANO H., ADELI K.** (2006): *Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states.* *Clinica Chimica Acta*, 368 pp. 1-19.
- **BALASINI D.** (1999): *Zootecnica Speciale.* Ed. Agricole.
- **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.

- **BANNI S., ANGIONI E., CARTA G., MURRU E., SPADA S., MELIS M.P.** (2001): Proceeding of 1st International Conference on Conjugated Linoleic Acid. June 10-13, Alesund-Norway. 22.
- **BAUMAN D.E., GRIINARI 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.
- **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.
- **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.

- **BINDAL M.P., VADHWA B.K., JAIN M.K.** (1981): *Rivista Indian Journal of dairy science*: 34, 320.
- **CANNELLA C., GIUSTI A.M.** (2000): *Conjugated linoleic acid - A natural anticarcinogenic substance from animal food*. *Italian J. Food Sci.* 12:123–127.
- **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.
- **CHOMCZYNSKY P., SACCHI N.** (1987): *Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- **CHUNG M., HA S., JEONG S., BOK J., CHO K., BAIK M., CHOI Y.** (2000): *Cloning and characterization of bovine stearoyl CoA desaturase cDNA from adipose tissues*. *Biosci. Biotechnol Biochem.*, 64(7):1526-30.

- **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.
- **CORREALE E., CITRO A.** (1995): *Allevamento del Bufalo*. Ed. Agricole.
- **DANIEL Z.C.T.R., RICHARDS S.E., SALTER A.M., BUTTERY P.J.** (2003): *Insulin and dexamethasone regulate stearoyl-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.

- **DE FRANCISCIS G. & DI PALO R.** (1995): *Buffalo milk production*.
IV World Buffalo Congress San Paulo, 27-30 Giugno. Rivista Sc. Tecn.
Latt. Cas., pp. 193-200.
- **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 STEFANO F.** (1999). *L'informatore agrario*, 51, 59-62.
- **EBERLE' D., HEGARTY B., BOSSARD P., FERRE' P.,
FOUFELLE F.** (2004): *SREBP transcription factors: master regulators
of lipid homeostasis*. Biochimie. 86 (11): 839-48.
- **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.

- **GOSSENS M. and KAN Y. W.** (1981): *DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders*. Method Enzymol. 76, 805-817.
- **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 $\Delta 9$ -desaturase*. J. Nutr., 130 pp. 2285-2291.
- **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.
- **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.
- **KHANAL R.C., DHIMAN T.R.** (2004): *Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review*. Pakistan Journal of Nutrition, 3 (2) pp. 72-81.

- **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.
- **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.
- **LOEB L.A., PRESTON B.D.** (1986): *Mutagenesis by apurinic/apymiridic sites.* Annual reviews of genetics, 20 pp. 201-230.
- **LOCK A.L., GARNSWORTHY P.C.** (2003): *Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows.* Livestock Production Science, 79 pp. 47-59.
- **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

- **LOOZE C., YUI D., LEUNG L., IINGHAM M., KALER M., YAO X., WU W.W., SHEN R.F., DANIELS M.P., LEVINE S.J. (2008):** *Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein.* Unpublished.

- **MALACARNE M., SUMMER A., FORMAGGIONI P., FRANCESCHI P., MARIANI P. (2001):** *Composizione in acidi grassi del grasso del latte di quattro razze bovine allevate nella zona di produzione del parmigiano-reggiano.* Annali facoltà di veterinaria dell'Università degli studi di Parma, 249-259.

- **MARTIN P., OLLIVIER-BOUSQUET M., GROSCLAUDE F. (1999):** *Genetic polymorphism of casein: a tool to investigate casein micelle organization.* International Dairy J. 9, 163-171.

- **MCGUIRE M.A., MCGUIRE M.K. (1999):** Proceedings of the American Society of Animal Science, 118.

- **MEDRANO, J.F.** (2002). *Modification of the composition of milk fat in dairy cows utilizing genetic selection*. California Dairy Research Foundation, Nutrition and Health.
- **MEDRANO, J.F., ISLSS-TREJO A.D., JHONSON A.M.** (2003): *Genomic sequence of the bovine stearoyl-CoA desaturase*. Unpublished.
- **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. 45-69
- **MELE M., CONTE G., CASTIGIONI B., CHESSA S., MACCIOTTA N.P., SERRA A., BUCCIONI A., PAGNACCO G., SECCHIARI P.** (2007): *Stearoyl-coenzyme A desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins*, *J. Dairy Sci.* 90 (9): 4458-65
- **MILANESI E., NICOLOSO,L., CREPALDI,P.** (2008): *Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds*, *JOURNAL J. Anim. Breed. Genet.* 125 (1), 63-67

- **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.
- **NEIMANN-SORENSEN A., TRIBE D.E.** (1992): *Buffalo Production*. World Animal Science, pp.394-397.
- **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., MIYAZAKI M.** (2004): *Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism*. Progress in Lipid Research, 43 pp. 91-104.
- **NTAMBI J.M., BENÈ H.** (2001): *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*. J. Molecular Neuroscience, 16 pp. 273-278.

- **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.
- **PARIA M. K., PARK Y., COOK M.E.** (2001): Progress in Lipid Research, 40:283
- **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.
- **PROTO V.** (1995): *Guida all'alimentazione dei ruminanti da latte*. Istituto Nazionale di Economia Agraria (I.N.E.A.), Roma.
- **REN J., KNORR C., HUANG L., BRENIG B.** (2004): *Isolation and molecular characterization of the porcine stearoyl-CoA desaturase gene*. Gene, 340 pp. 19-30.
- **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.

- **RAMAMURTHY M.K., NARAYANAN K.M. (1971):** *Milchwissenschaft, 29, 151*
- **SANGER, F., NICHLEN, S., COULSON, AR. (1977):** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology. 24:104-8.*
- **SCIANCELEPORE V. (1999).** *Industrie Agrarie.*
- **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., 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.*
- **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.

- **VENTER C. ET AL.** (2001): *The sequenze of human genome. Science, 291 pp.1304-1351.*
- **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 Biophydica Acta, 1391 pp.145-156.*
- **YANG Z., YOLDER A. D.** (1999): *Estimation of the transition/transversion rate bias and species sampling. J. Mol. Evol. 48, 274-283.*