

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

**Dottorato di ricerca in
Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
XVIII ciclo – 2002/2005**

Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli
Alimenti

TESI DI DOTTORATO

*Analisi preliminare al locus della lattoferrina
(LTF) nella specie caprina: struttura del gene e
analisi delle regioni regolatrici*

Dott. Alfredo Pauciullo

Relatore:
Prof. Luigi Ramunno

Coordinatore:
Prof.^{ssa} MariaLuisa Cortesi

“Il dolore può bastare a se stessi, ma per vivere a fondo una gioia bisogna dividerla con gli altri”. Questo traguardo e questa immensa gioia la condivido con i miei genitori, a cui va la mia più profonda ammirazione e gratitudine per avermi sempre seguito nell’intricato cammino della vita. “Non importa che tu sia un grande albero che svetta in cima a una montagna o un filo d’erba sepolto nel fondo di una valle. Ciò che importa è che qualunque cosa tu sia, tu riesca ad essere il meglio di ciò che sei”.

Grazie per avermi insegnato a crescere.

Alfredo



Abstract

This study reports a characterization, at DNA level, of the goat *LTF* gene. Three goats belonging to different genetic type (Saanen, Maltese and autocton goat reared in south of Italy) were investigated. The nucleotide sequence of lactoferrin encoding gene (*LTF*) plus 1671 nucleotides at the 5' flanking region and 50 nucleotides at the 3' flanking region was determined and aligned to its bovine counterpart. *LTF* gene spreads over 34.0 kb and consists of 17 exons varying in length from 48 bp (exon 11) to 226 bp (exon 17) and 16 introns with a exon/intron ratio of 1:8,57. Comparison of intronic sequences of the 3 goats showed a total of 138 polymorphic sites (53 transversions, 54 transitions, 33 single o multiple deletions/insertions e 2 nucleotide inversions) with a transition/trasversion ratio of 1,02. Five interspersed repeated elements (8 in the bovine *LTF* gene) were also identified at four different locations of the sequenced region: introns 4, 9, 12 and 13. Intron 13 also contains a polymorphic microsatellite (CTG)₆ / (CTG)₉.

The comparison of the exonic region with the cDNA available in EMBL showed a new mutation (transition T→G) at 12th nucleotide of exon 9. It is responsible of an aminoacid change Leu→Val in position 357. Other exonic differences characterize our sequences. Some of them are typical of French goats (Le Provost *et al.*, 1994) and some other are typical of the Korean one (Lee *et al.*, 1997). On the basis of the information so far available, it seems



reasonable to assume that our goats represent a new allelic combination, may be originated by interallelic recombination events. Furthermore, promoter analysis showed that highly conserved consensus sequences were found in this gene. In particular a not canonic TATA box and SP1 motif in position -28 and -69 respectively, represent the most preserved sequences, suggesting a main role in regulation of gene expression. Finally, the lactoferrin gene was mapped in q arm of goat chromosome 22, in 24 region, by using fluorescence in situ hybridization.

Sommario

L'analisi strutturale del gene della lattoferrina di capra e la sua caratterizzazione molecolare ha rappresentato l'oggetto di questo studio. L'indagine si è focalizzata su tre animali appartenenti a differenti gruppi genetici (una capra Saanen, una Maltese e un'autoctona allevata nell'Italia meridionale). La quasi totalità del gene della lattoferrina caprina, più 1671 nucleotidi appartenenti alla regione 5' e 50 nucleotidi alla regione 3' sono stati sequenziati per le 3 capre esaminate, e confrontate con la controparte bovina. Il gene *LTF* si estende su un tratto di DNA di circa 34.0 kb, è organizzato in 17 esoni e 16 introni, in particolare la grandezza degli esoni va da un minimo di 48 bp (esone 11) ad un massimo di 226 bp (esone 17) con un rapporto esoni/introni di 1:8,57. Il confronto tra le sequenze introniche relative al gene *LTF* delle tre



capre esaminate ha evidenziato la presenza di 138 siti polimorfici (54 transizioni, 53 trasversioni, 2 inversioni e 33 singole o multiple delezioni/insertioni nucleotidiche) con un rapporto transizione/trasversione (*ti/ts*) di 1,02. Cinque elementi di origine retroposonica (8 nella controparte bovina) sono stati identificati e localizzati rispettivamente negli introni 4, 9, 12 e 13. Nell'introne 13 è stato inoltre individuata una caratteristica sequenza microsatellite risultata polimorfa (CTG)₆ / (CTG)₉.

L'analisi delle sequenze esoniche ed il loro confronto con le sequenze disponibili in banca dati ha permesso di evidenziare una nuova mutazione puntiforme: transizione T→G al 12° nucleotide del 9° esone, responsabile del cambiamento aminoacidico Leu³⁵⁷/Val. Il confronto delle restanti regioni esoniche evidenzia la presenza di altre differenze, alcune tipiche della capra di razza Saanen, sequenziata da Le Provost *et al.* (1994), altre della capra nativa della Corea (Lee *et al.* (1997). Ne risulta, pertanto, che la sequenza del gene della lattoferrina che caratterizza le tre capre prese in esame possa rappresentare una nuova e particolare combinazione allelica probabilmente generata da eventi di ricombinazione. Inoltre l'analisi della regione promoter ha evidenziato la presenza di sequenze consenso altamente conservate. In particolare una TATA box non canonica e un motivo SP1, in posizione -28 e -69 rispettivamente, rappresentano le sequenze più preservate, suggerendo che questi due elementi possano giocare un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione del gene. In fine, il gene della lattoferrina (*LTF*) caprina è stato citogeneticamente



localizzato sul braccio lungo (q) del cromosoma 22, nella regione 24, mediante ibridazione in situ fluorescente.



INDICE

1. INTRODUZIONE	9
1.1. La lattoferrina: dal gene alla proteina.....	15
1.2. Concentrazione della lattoferrina nelle diverse specie	23
1.3. Proprietà della lattoferrina.....	24
1.3.1. Attività antimicrobica della lattoferrina e dei peptidi derivati	26
1.3.2. Attività antifungina, antiparassitaria e antivirale della lattoferrina	30
1.3.3. Attività antiossidante, antinfiammatoria e regolazione della omeostasi intestinale del ferro	32
1.3.4. Attività trascrizionale della lattoferrina.....	35
1.4. Attività antibatterica della lattoferrina e polimorfismo al <i>locus LTF</i>	36
2. OBIETTIVO	40
3. MATERIALI E METODI	41
3.1. Preparazione dei campioni di DNA	41
3.2. Disegno dei primer	42
3.3. Amplificazione del DNA mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).....	44
3.4. Purificazione e concentrazione dei prodotti di PCR	45
3.5. Sequenziamento dei frammenti amplificati	46
3.6. Metodica della PCR-RFLP	46
3.6.1. PCR-RFLP al 3° esone	47
3.6.2. PCR-RFLP all'8° esone.....	48
3.6.3. PCR-RFLP al 9° esone	49
3.7. Mappaggio del gene LTF	50
3.7.1. Allestimento delle colture.....	50
3.7.2. Preparazione delle sonde	52



3.7.3. Fluorescent in situ Hybridization (FISH)	53
3.7.3.1. Denaturazione dei preparati metafasici	54
3.7.3.2. Denaturazione della sonda.....	54
3.7.3.3. Ibridazione	55
3.7.4. Immunodetection e amplificazione del segnale.....	56
3.7.5. Colorazione con DAPI, analisi microscopica e criteri di osservazione.....	56
4. RISULTATI E DISCUSSIONI	58
4.1. Struttura del gene della lattoferrina di capra	58
4.2. Analisi delle regioni introniche.....	60
4.3. Analisi dei retroposoni	65
4.4. Analisi del promotore.....	69
4.5. Analisi delle regioni esoniche.....	74
4.6. Caratterizzazione degli aplotipi	79
4.6.1. PCR-RFLP al 3° esone	79
4.6.2. PCR-RFLP all' 8° esone.....	80
4.6.3. PCR-RFLP al 9° esone	81
4.7. Localizzazione fisica del gene LTF	83
5. CONCLUSIONI	88
6. BIBLIOGRAFIA	92



1. INTRODUZIONE

Il latte è una soluzione liquida dal sapore dolce e con un pH prossimo alla neutralità, secreto dalle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi dopo la nascita del piccolo.

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 non possono essere usati altri alimenti sostitutivi.

La notevole complessità della composizione del latte risponde a questa funzione.

I componenti principali del latte sono:

✚ **lipidi**, formati essenzialmente da grassi ordinari (trigliceridi, nella misura del 95-98%), presenti sotto forma di globuli con diametro medio di 2-5 μm e racchiusi da una membrana di natura in parte lipidica e in parte proteica;

✚ **proteine**, quattro caseine (α_1 , α_2 , β , κ) e due sieroproteine (α -lattoalbumina e β -lattoglobulina); la frazione sieroproteica comprende inoltre la sieralbumina, la lattoferrina, le immunoglobuline (più concentrate nel colostro), i proteosopeptoni (PP, derivati dall'idrolisi parziale della β -caseina) e gli enzimi (ossidasi, catalasi, lipasi, lisozima, proteasi, fosfatasi, ecc.).

✚ **glucidi**, essenzialmente il 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 (mancanza dell'enzima idrolizzante il lattosio);

✚ *sali minerali*, e altri componenti (in tracce) come lecitine, vitamine, enzimi, ecc., alcuni dei quali hanno una grande importanza biologica.

Inoltre, il latte riveste un ruolo di fondamentale importanza nell'alimentazione del piccolo, non solo per la particolare composizione nutrizionale, ma anche per la funzione protettiva contro le malattie infettive svolta da diverse sostanze ad accertata attività antibatterica (Agamy *et al.*, 1992) quali la lattoferrina, il lisozima e la lattoperossidasi.

Sin dai tempi più remoti si è ricorso al latte di altre specie animali (latte bovino, caprino, equino o prodotti variamente composti) per l'alimentazione dei bambini, in modo particolare in quei casi in cui i neonati non potevano essere alimentati con il latte materno.

Tuttavia, non sempre si riusciva a garantire un alimento idoneo alla sopravvivenza o ad un corretto sviluppo del neonato.

La struttura del latte nelle differenti specie è più o meno simile, ma può presentare delle differenze rilevanti nella composizione centesimale, determinando, di conseguenza, l'esistenza di proprietà a volte molto diverse.

Per esempio, il latte dei ruminanti contiene molta più caseina che sieroproteina (albumina) ed è per questo detto "caseinoso". Quello di altre specie, soprattutto carnivori, al contrario, è detto "albuminoso".



Il latte di donna, in generale, se comparato a quello dei ruminanti, risulta essere un latte ipoproteico con più alti livelli di lattosio. In particolar modo il latte di donna possiede peculiari caratteristiche proteiche che possono essere così sintetizzate:

- a) **assenza di β -lattoglobulina**, normalmente riportata come principale allergene che determina fenomeni di intolleranza verso altri tipi di latte nei neonati;
- b) **più del doppio del contenuto di α -lattoalbumina** rispetto alla caseina (in generale nel latte bovino è il contenuto in caseina ad essere circa 4,5 volte più abbondante rispetto al totale delle sieroproteine);
- c) **basso contenuto caseinico**, in particolar modo assenza della caseina α s2 e tracce di caseina α s1.

È chiaro, pertanto, che neonati e lattanti alimentati con latte di ruminanti ricevono un sovraccarico proteico, che può determinare da un lato una maggiore produzione di ammoniaca derivante dalla desaminazione degli aminoacidi, cui consegue un aumento dell'attività epatica e renale per il catabolismo dell'urea; dall'altro una iperproduzione di acido solforico derivante dal catabolismo degli aminoacidi solforati, con conseguente aumento del carico idrogenionico per la sua trasformazione in solfato con l'aumento del rischio di acidosi metabolica (De Curtis, 1999).



Inoltre, dal momento che si è in presenza di proteine eterologhe, è necessario che nell'individuo si crei una condizione di tolleranza immunologica all'atto della loro ingestione.

L'assenza di tale risposta, chiaramente, renderebbe l'alimentazione impossibile. Sembra accertato, tuttavia, che in taluni soggetti la precoce ed inadeguata esposizione ad alimenti con proprietà antigeniche aumenti l'incidenza e la precocità di manifestazioni allergiche (Ponzone *et al.*, 1994).

In generale, il latte di capra si presterebbe meglio, rispetto a quello bovino, per la produzione di un latte con caratteristiche biochimiche più rispondenti a quelle umane, essendo naturalmente dotato di una maggiore digeribilità, soprattutto grazie alle seguenti caratteristiche:

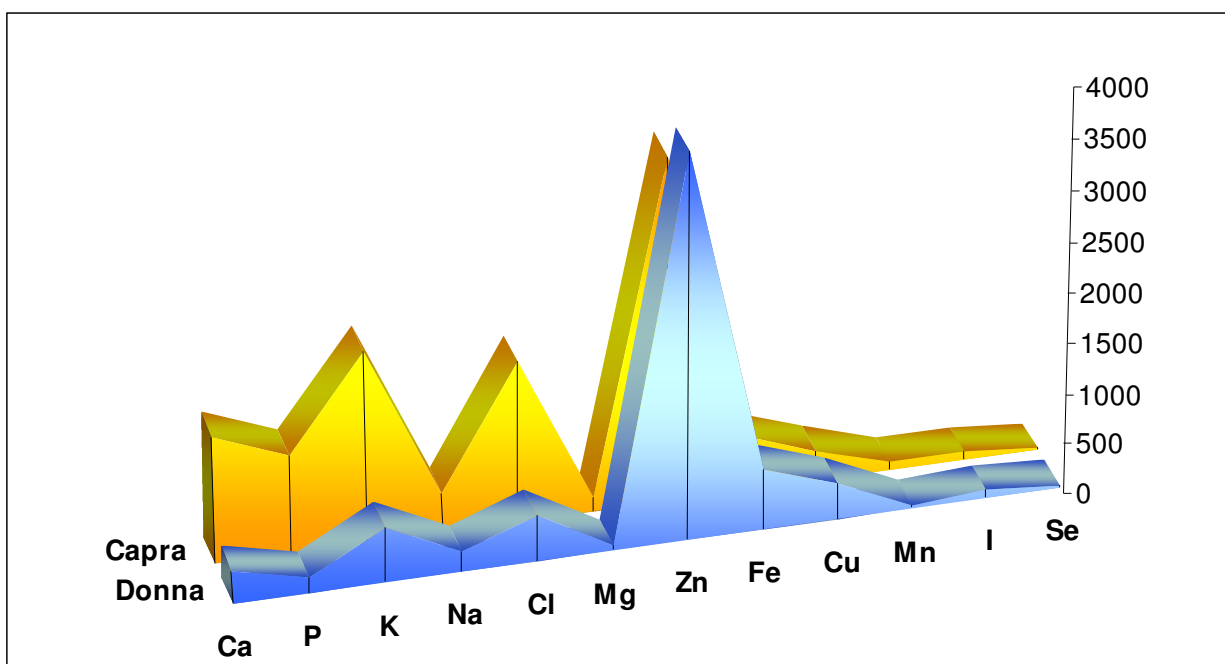
- 1) maggiore presenza di acidi grassi a catena corta laterale (Desjeux, 1993);
- 2) minore dimensione media dei globuli di grasso (Chandan *et al.*, 1992);
- 3) maggiore percentuale di taurina, utile per l'accrescimento e lo sviluppo (Mehaia *et al.*, 1992);
- 4) contenuto di selenio simile a quello del latte umano (Debski *et al.*, 1987).

Il latte di capra contiene tutti gli elementi indispensabili per la salute dell'uomo e, in particolare, risulta ricco in calcio, fosforo, potassio, cloro e magnesio. Nel latte di capra il ferro, lo zinco e il rame sono chimicamente coniugati con le caseine (60-80%) e con le immunoglobuline.



Inversamente, nel latte umano gli oligoelementi sono scarsamente legati alle caseine (2-10%) e principalmente coniugati con le proteine solubili, quali la lattoferrina (ferro e manganese), la sieralbumina (zinco e rame), altre proteine del latte (iodio e selenio) e, per una parte importante, con i globuli di grasso (Hambraeus, 1990).

Per questo motivo il ferro, contenuto in quantità molto simili nel latte di capra e donna (Tabella 1) risulta più biodisponibile nel latte materno.



<i>Latte</i>	Ca	P	K	Na	Cl	Mg	Zn	Fe	Cu	Mn	I	Se
<i>Donna</i>	320	150	550	200	450	40	3800	600	360	30	80	20
<i>Capra</i>	1260	970	1900	380	1600	130	3400	550	300	80	80	20

Tabella 1- Composizione minerale dei latti di donna e capra (mg/l) (Alasis, 2000).

Inoltre, negli ultimi anni sono state osservate differenze individuali di natura genetica nel contenuto in caseine calcio-sensibili ($\alpha s1$, β e $\alpha s2$).

Sono state osservate differenze individuali per il contenuto di β -caseina determinate dalla presenza di almeno 5 alleli: gli alleli *CSN2* A, B e C associati ad un contenuto normale della caseina (~5 g/l per allele) e gli alleli *CSN2* 0 e 01 associati ad un contenuto non determinabile di tale frazione caseinica nel latte (Ramunno *et al.*, 1995; Persuy *et al.*, 1999; Neveu *et al.*, 2002).

Un più marcato polimorfismo quali-quantitativo è stato osservato al *locus* della caseina $\alpha s1$ (*CSN1S1*). In particolare modo sono stati evidenziati almeno 16 alleli, corrispondenti a 4 diversi livelli di sintesi di tale proteina nel latte.

Gli alleli *CSN1S1*A, B1, B2, B3, B4, C, H, L e M sono associati ad un elevato contenuto di caseina $\alpha s1$ (~3,5 g/l per allele), gli alleli I ed E sono associati ad un contenuto intermedio (~1,1 g/l) e gli alleli D, F e G sono associati ad un basso livello di caseina $\alpha s1$ nel latte (~0,45 g/l). Gli alleli 01 e 02 sono alleli nulli e sono associati all'assenza di caseina $\alpha s1$ nel latte (Boulangier *et al.*, 1984; Grosclaude *et al.*, 1987; Bevilacqua *et al.*, 2002).

Più recentemente, nel corso di una indagine di popolazione, condotta su campioni individuali di latte e DNA prelevati da capre appartenenti ad una popolazione locale allevata in provincia di Napoli, è stato identificato un nuovo allele a tale *locus* (denominato N) associato anch'esso all'apparente assenza di sintesi (~0,0 g/l) di tale frazione caseinica (Ramunno *et al.*, 2002).



Per quanto riguarda il *locus* della caseina α_2 (*CSNIS2*), a tutt'oggi sono noti almeno 7 alleli responsabili di tre livelli di espressione del gene: gli alleli *CSNIS2* A, B, C, E e F (Bouniol *et al.*, 1994; Veltri *et al.*, 2000; Ramunno *et al.*, 2001) associati ad un contenuto normale di proteina (~2,5 g/l per allele), l'allele *CSNIS2* D associato ad un contenuto ridotto e l'allele 0 associato all'assenza di sintesi proteica (Ramunno *et al.*, 2001).

Pertanto in natura esistono capre che producono latte caratterizzato da un contenuto in caseina calcio-sensibile che varia tra 0,0 e 7,0 g/l, 0,0 e 10,0 g/l e 0,0 e 5,0 g/l rispettivamente per le frazioni α_1 , β e α_2 .

Tutta questa serie di caratteristiche rendono il latte di capra più idoneo, rispetto al latte bovino, per una alimentazione alternativa al latte di donna, sia dal punto di vista allergologico che dietetico.

Il latte di capra è un alimento molto apprezzato dai consumatori; tuttavia attualmente non trova larga diffusione per il consumo diretto, ma viene prevalentemente impiegato nella caseificazione per la produzione di formaggi tipici molto gustosi e di particolare pregio.

1.1. La lattoferrina: dal gene alla proteina

La lattoferrina, conosciuta anche come lattotransferrina (*LTF*), è una glicoproteina monometrica del peso di circa 80 KDa, indicata come proteina



rossa per il suo caratteristico colore dovuto alla capacità di legare il ferro nella forma ionica (Fe^{3+}).

Il punto isoelettrico (P.I.) della lattoferrina è stato individuato nell'intervallo 8.4-9.0, un valore più alto rispetto a quello osservato per le altre transferrine (P.I. 5.4-5.9) (Moguilevsky *et al.*, 1985; Sanchez *et al.*, 1992; Hovanessian e Awdeh, 1976).

La lattoferrina appartiene ad una importante classe di proteine chelanti il ferro chiamate transferrine (*TFs*) che includono, inoltre, l'ovotransferrina (*OTF*) e la sierotransferrina (*STF*) (Aisen e Listowsky, 1980).

Esperimenti di mappaggio cromosomico hanno permesso di individuare la localizzazione dei geni della lattoferrina umana e murina sui cromosomi 3 e 9 rispettivamente (Yang *et al.*, 1984; Teng *et al.*, 1987; Baranov *et al.*, 1987) e del gene della lattoferrina caprina e bovina sul cromosoma 22 (Le Provost *et al.*, 1994; Schwerin *et al.*, 1994).

Il gene della lattoferrina (*LTF*) bovina si estende su un tratto di DNA di circa 34,5 kb ed è organizzato in 17 esoni e 16 introni (Seyfert *et al.*, 1994).

La sequenza del cDNA della lattoferrina caprina ha una lunghezza di 2333 bp (Le Provost *et al.*, 1994) e comprende 75 bp della regione al 5'UT (UnTranslated), l'ORF (Open Reading Frame) che codifica per 690 residui aminoacidici della proteina matura e l'intera regione 3'UT (ultimi 131 bp del 17° esone).



Il peptide leader è costituito da 19 residui aminoacidici codificati dagli ultimi 14 codoni del primo esone e dai primi 5 del secondo esone.

La struttura tridimensionale della lattoferrina umana, costituita da una singola catena polipeptidica di 692 aminoacidi (Metz-Boutigue, *et al.*, 1994), è organizzata in due lobi globulari, corrispondenti rispettivamente ai residui aminoacidici 1-333 (lobo N-terminale) e 345-692 (lobo C-terminale), uniti da una struttura ad α -elica comprendente i residui aminoacidici 334-344 (Fig.1).

Ciascuno dei due lobi della proteina è costituito da due domini (α e β , noti anche come: N1 e N2 per il lobo N-terminale; C1 e C2 per il lobo C-terminale) codificati da specifici esoni, in particolare: per il lobo N-terminale gli esoni 2-4 codificano per il primo dominio e gli esoni 4-7 per il secondo dominio; analogamente, per il lobo C-terminale della proteina gli esoni 9-12 codificano per il primo dominio e gli esoni 12-15 per il secondo dominio globulare (per una review vedi Farnaud e Evans, 2003).

La proteina è strutturata in modo tale da disporre di un singolo sito di legame per il ferro per ogni lobo, situato in ciascuna delle facce interne dello spazio intra-dominiale (Grossmann *et al.*, 1992).

Tali siti risultano essere molto simili alla struttura classica bi-dominiale condivisa da una notevole quantità di proteine periplasmatiche batteriche che trasportano ioni e piccole molecole, ciò farebbe presupporre una origine evolutiva comune (Bruns *et al.*, 1997).





Fig. 1- Struttura tridimensionale della lattoferrina umana. I due ioni Fe^{3+} sono indicati in rosso. In giallo è indicata la porzione proteica da cui deriva la lattoferricina.

Le proprietà leganti della lattoferrina si sviluppano attraverso l'azione combinata di 4 residui aminoacidici identici per ciascun lobo (Asp58, Tyr93, Tyr193 e His254 nel lobo N-terminale, Asp396, Tyr434, Tyr527 e His596 nel lobo C-terminale) ed includono, oltre allo ione ferrico, un controione (normalmente un CO_3^{2-}), sinergico per ogni Fe^{3+} e con la stessa attitudine ad accettare una gran varietà di cationi, in particolare Zn^{2+} e Cu^{2+} in luogo del ferro (Kawakamy *et al.*, 1993).

Questo set di ligandi è chimicamente e geometricamente ideale per un alta affinità di legame reversibile con il ferro (Baker, 1994), e la presenza di un elemento non proteico (CO_3^{2-}) sembra essere una condizione necessaria sia ai fini del legame, che del rilascio del ferro. Infatti, attraverso la neutralizzazione della carica positiva di un residuo di arginina (Arg121 nel lobo N) e della α -elica associata, l'anione CO_3^{2-} facilita l'aggancio del ferro ai quattro ligandi raggruppati insieme sulla superficie laterale del dominio N2 (Baker & Baker,

2004). Inoltre, la protonazione dello stesso anione CO_3^{2-} , probabilmente rappresenta il primo step nel rilascio del ferro a bassi valori di pH. Una successiva protonazione della His in posizione 253, indebolisce ulteriormente il legame con lo ione ferrico, cui segue una dissociazione dei ligandi e una separazione dei domini, che realizzano il completo rilascio del ferro (MacGillivray *et al.*, 1998).

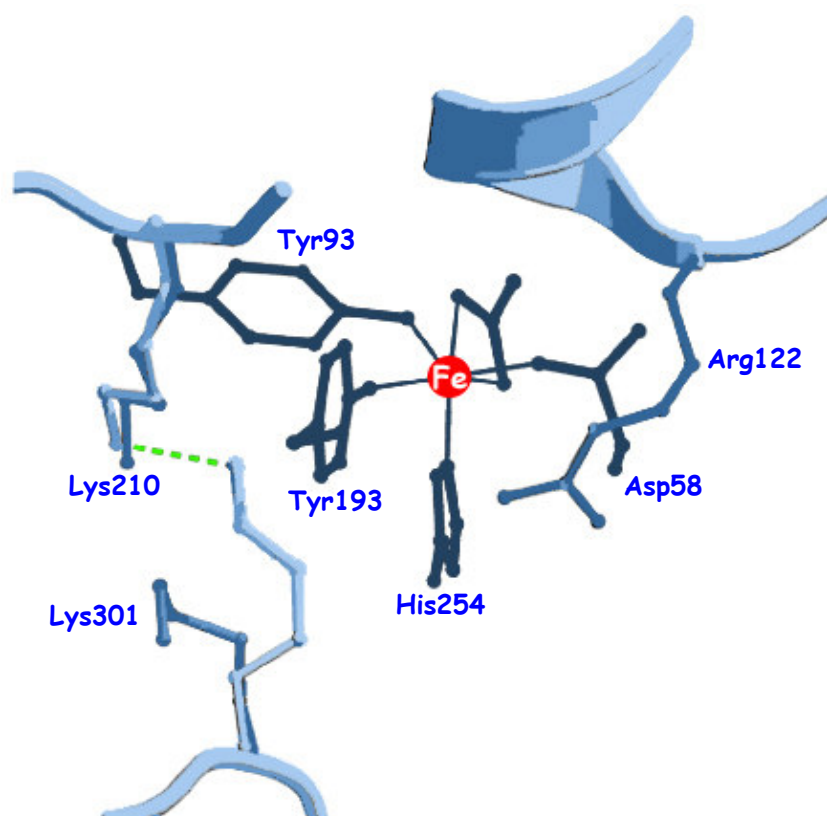


Fig. 2- Sito canonico di legame per il Fe^{3+} osservato nella lattoferrina. La numerazione degli aminoacidi è relativa al lobo N della lattoferrina caprina. La linea tratteggiata in verde rappresenta un legame idrogeno tra i residui di lisina.

Inoltre, le interazioni tra i domini della lattoferrina sembrano essere eventi critici nel modulare il legame e il rilascio del ferro (Day *et al.*, 1992), anche

perché associati a cambi conformazionali della proteina, dimostrati per la prima volta per l'apo-lattoferrina umana (apo-Lf) da Anderson *et al.* (1990).

In effetti, i due lobi della proteina nativa (non legata al ferro) possono assumere conformazione aperta o chiusa, e passare da una forma all'altra per effetto dei comparabili livelli energetici che caratterizzano i due stati (Fig. 3).

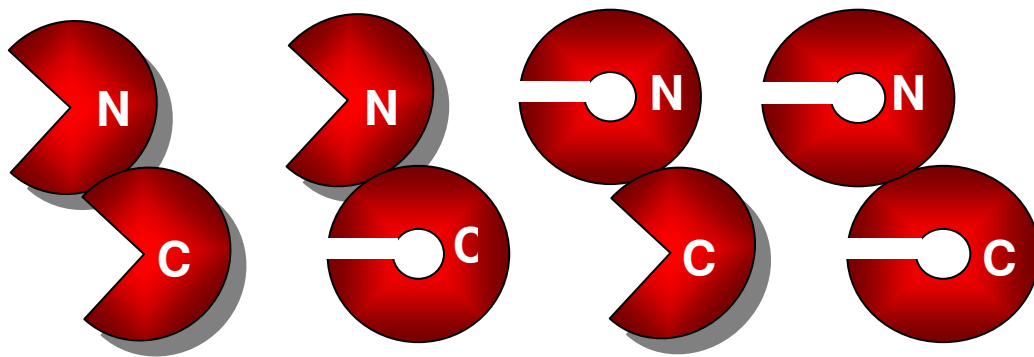


Fig. 3- Rappresentazione schematica delle possibili apo-forme della lattoferrina in soluzione: entrambi i lobi aperti, uno aperto e uno chiuso, entrambi chiusi.

Generalmente le differenze nella struttura terziaria della proteina riguardano il lobo N-terminale, che nella apo-lattoferrina assume una conformazione aperta, mentre il lobo C-terminale resta chiuso (Anderson *et al.*, 1990) (Fig. 4). Probabilmente, il legame con il ferro si realizza quindi proprio nella forma aperta dell'apo-proteina, poiché essa consente un più agevole accesso agli ioni Fe^{3+} liberi o complessati (Baker & Baker, 2004). La lattoferrina coniugata al ferro si caratterizza invece per una conformazione chiusa dei due lobi (Anderson *et al.*, 1990).

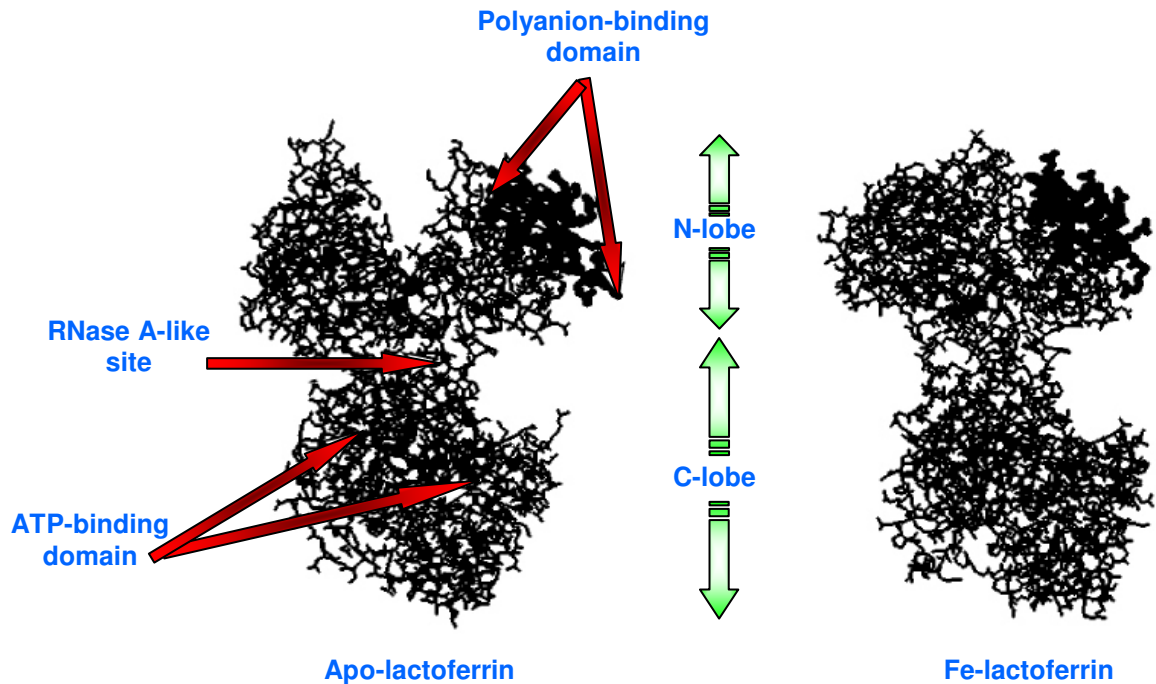


Fig. 4- Organizzazione spaziale della Apo- e Fe- lattoferrina (analisi strutturale ai raggi X). Le frecce indicano le posizioni dei siti di legame per vari ligandi.

La sequenza aminoacidica della lattoferrina umana dimostra di avere un'elevata omologia (~60%) con la transferrina del siero (sTf), inoltre i due lobi globulari si caratterizzano per avere 125 residui aminoacidici in comune (omologia di ~40%), e hanno una struttura terziaria molto simile, probabilmente come risultato della duplicazione di un gene ancestrale (Williams, 1982; Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

Attualmente si conoscono le sequenze aminoacidiche, determinate sia a livello proteico sia deducendole dalla sequenza nucleotidica, della lattoferrina umana, costituita da 692 aminoacidi (Anderson *et al.*, 1989), murina, 688 aminoacidi (Pentecost e Teng, 1987); bovina, costituita da 687 aminoacidi (Mead e Tweedie, 1990); suina, costituita da 685 aminoacidi (Alexander *et al.*,

1992); caprina, costituita da 690 aminoacidi (Le Provost *et al.*, 1994); e bufalina, costituita da 689 residui aminoacidici (Karthikeyan *et al.*, 2000).

Il grado di omologia tra le diverse specie è molto elevato. La lattoferrina caprina e bovina presentano una omologia del 94,9% (Mead e Tweedie, 1990), invece il grado di omologia della lattoferrina caprina con altre specie è del 76,1% con l'umano (Alexander *et al.*, 1992), 78,2% con il suino (Alexander *et al.*, 1992), 69,5% con il topo (Pentecost & Teng, 1987) e 91,1% con il bufalo (Karthikeyan *et al.*, 2000).

La lattoferrina umana possiede due potenziali siti di glicosilazione (Asn-X-Ser/Thr), uno in ciascuno lobo, tuttavia il grado di glicosilazione della proteina può variare tra le specie (3 siti nell'equino e nel suino, 5 nella specie bovina e caprina, 4 nel bufalo e nel cammello), con conseguente alterazione della massa molecolare, che normalmente va da 76 a 80KD (Karthikeyan *et al.*, 2000).

I residui glicosidici che contraddistinguono la proteina sono rappresentati essenzialmente da esosammine (fino all'1%) e zuccheri esosi (fino al 3%), in particolare mannosio comunemente legato ad un residuo terminale di fruttosio (Legrand *et al.*, 1995).

L'elevato grado di glicosilazione proteica sembrerebbe attribuire alla lattoferrina una elevata resistenza all'attacco delle proteasi e all'abbassamento del pH, e sebbene possa significativamente influenzare l'interazione con



molecole ligandi, la glicosilazione sembrerebbe non interferire con molte proprietà funzionali della lattoferrina (Van Berkel *et al.*, 1995).

1.2. Concentrazione della lattoferrina nelle diverse specie

La lattoferrina fu inizialmente individuata nel latte umano e bovino (Johanson B. *et al.*, 1960; Montreuil *et al.*, 1960) e, successivamente, in quello di altri mammiferi, compreso i caprini, i suini, gli equini e i murini (Masson e Heremans, 1971).

Oggi sappiamo che è presente in piccole quantità anche nei fluidi esocrini come la saliva, le lacrime, la bile, il liquido seminale e il succo pancreatico (Masson *et al.*, 1966; Lonnerdal & Iyer, 1995).

La concentrazione della lattoferrina varia ampiamente nelle diverse specie (Tabella 2), ad esempio è più elevata nel latte umano e in quello degli altri primati.

La specie suina e murina presentano un contenuto relativamente elevato di tale proteina nel latte, rispetto alla specie bovina e ad altri ruminanti come la capra (Schanbacher *et al.*, 1993) e la pecora (Zu-Yuan *et al.*, 1995).

In tutte le specie, comunque, tale concentrazione è più elevata nel colostro e può aumentare notevolmente durante una infezione intramammaria (Masson e Heremans, 1971).



<i>Specie</i>	Lattoferrina (<i>latte</i>) mg/ml	Lattoferrina (<i>colostro</i>) mg/ml
Umana	1	7
Bovina	0,02-0,2	1-2
Murina	0,2-2	*
Equina	0,1	1,5/5
Caprina	0,02-0,2	1-2
Suina	0,02-0,2	*
Ovina	0,135	1-2

Tabella 2- Concentrazione della lattoferrina nelle diverse specie. Confronto tra latte e colostro (Masson e Heremans, 1971).

Anche il plasma contiene la lattoferrina a concentrazione bassa (Scott, 1989); tuttavia, nel corso di reazioni infiammatorie, alcuni tipi di cellule (come i neutrofili, i linfociti, le piastrine ed alcuni batteri) accumulano, su recettori specifici, la lattoferrina proveniente, probabilmente, dal pool plasmatico, aumentando la concentrazione da 0,01 a 0,2 mg/ml (Leffel e Spitznagel, 1975; Slater e Fletcher, 1987).

1.3. Proprietà della lattoferrina

La lattoferrina è una proteina estremamente polifunzionale e presenta un ampio spettro di attività biologiche (Fig. 5).



Innanzitutto, tale proteina riveste un ruolo prioritario nell'alimentazione neonatale poiché è resistente alla proteolisi e, essendo attiva a pH neutro oltre che in presenza di bicarbonati, potrebbe idealmente espletare la propria funzione all'interno del lume intestinale a partire dall'area duodenale, permettendo l'assorbimento del ferro (Brock *et al.*, 1976); inoltre regola la granulopoiesi (Broxmeyer *et al.*, 1983), svolge un'azione immunostimolante (Shau *et al.*, 1992; De Sousa *et al.*, 1988; Gahr *et al.*, 1991) ed inibisce il rilascio di istamina dalle mastcellule, sia in vivo che in vitro (Lonnerdal & Iyer, 1995), regola l'omeostasi del ferro (Ward *et al.*, 2004), svolge attività anti-infiammatoria (Legrand *et al.*, 2004) e anti-ossidante (Kanyshkova *et al.*, 2001). È stato visto che la lattoferrina riduce lo sviluppo di cellule tumorali in pazienti affetti da leucemia e inibisce la formazione di metastasi nel cancro al seno (Bezault *et al.*, 1994, Yoo *et al.*, 1997). Questi risultati potrebbero suggerire un importante coinvolgimento di tale proteina nella protezione dallo sviluppo di tumori, fornendo nuovi approcci alle terapie antitumorali.



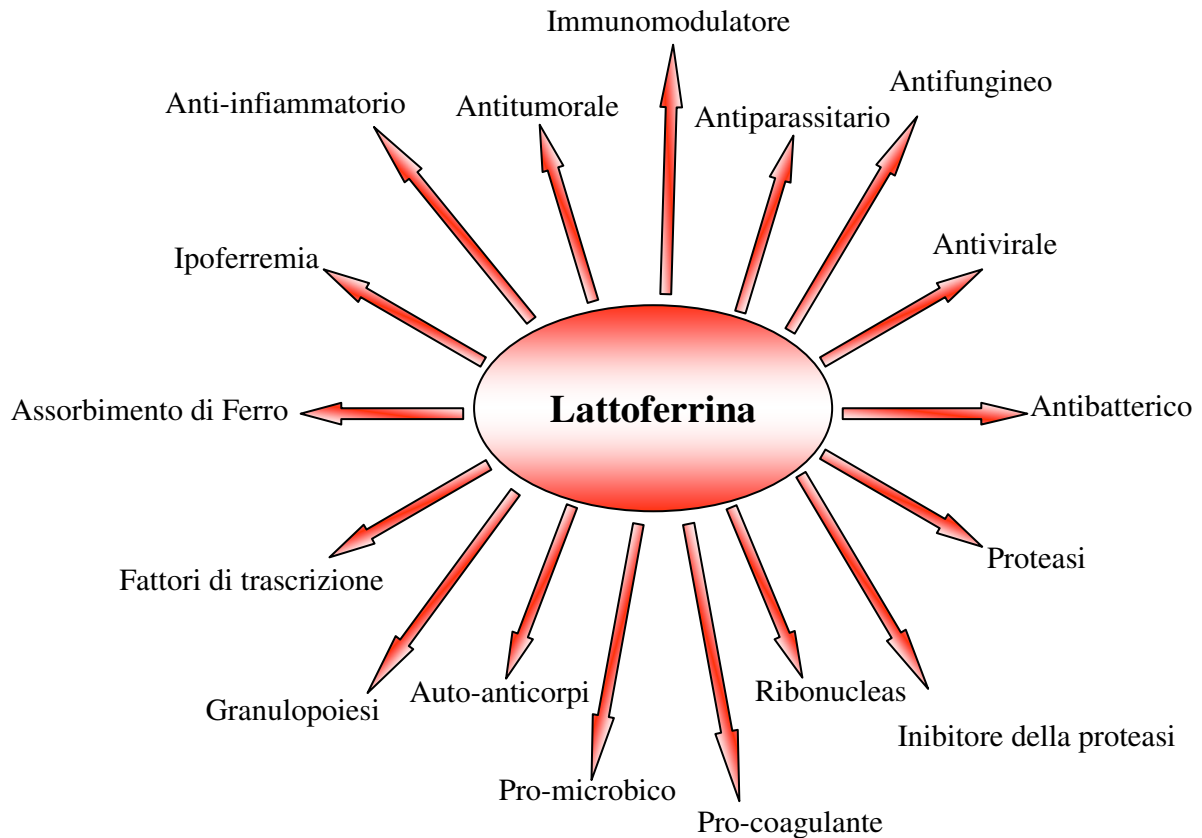


Fig. 5- Ruoli della lattoferrina proposti da Brock (2002).

1.3.1. Attività antimicrobica della lattoferrina e dei peptidi derivati

La funzione meglio conosciuta della lattoferrina è la sua marcata attività antimicrobica contro molte specie patogene (Naidu *et al.*, 1990; Nonneck e Smith, 1984).

L'effetto antimicrobico della lattoferrina è attribuito sia all'abilità della proteina di legare il ferro, in comune con le altre transferrine, sia a meccanismi più diretti, indipendenti dall'attività chelante il ferro (Farnaud e Evans, 2003).

La lattoferrina è capace di ritardare la crescita di alcune specie batteriche in vitro, privando del ferro i potenziali patogeni, essendo tale elemento

essenziale per la loro crescita. In particolare è stata dimostrata l'attività battericida contro *Streptococcus mutans* e *Vibrio cholerae* (Arnold *et al.*, 1977). Recentemente è stato suggerito che il sequestro del ferro ad opera della lattoferrina ha un effetto di protezione contro le infezioni da *Mycobacterium tuberculosis* (Schaible *et al.*, 2002), inoltre gioca un ruolo cruciale nella prevenzione di infezioni polmonari croniche da *Pseudomonas aeruginosa*, inducendo nel patogeno movimenti random che impediscono una adeguata divisione cellulare in forma di microcolonie. Ciò rende impossibile la produzione di biofilm da parte del patogeno (Singh *et al.*, 2002).

In alcuni casi, tali attività sono tuttavia solo temporanee. Infatti, i batteri tendono ad adattarsi alquanto rapidamente all'assenza di ferro attraverso la produzione di molecole siderofore, capaci cioè di complessarsi con il ferro e di competere con la lattoferrina per questo ione (Crosa, 1989). In aggiunta, alcune specie batteriche appartenenti alla famiglia delle *Neisseriaceae* si sono adattate alle restrittive condizioni imposte dalla assenza di ferro, sintetizzando specifici recettori in grado di legarsi alla lattoferrina ed estrarre tale elemento direttamente dalla proteina (Schryvers *et al.*, 1998).

In ogni caso, il sequestro del ferro ad opera della lattoferrina, oltre a ritardare la crescita di alcune specie batteriche, favorisce la duplicazione di microrganismi a ridotta richiesta di ferro, come i batteri acido-lattici, la cui crescita è supportata in modo diretto da tale proteina (Petschow *et al.*, 1999) e la



cui presenza è generalmente considerata antagonista ai patogeni e quindi benefica per l'ospite.

Attraverso un meccanismo di azione più diretto (Fig. 6), la lattoferrina è invece in grado di danneggiare la parete cellulare dei batteri Gram-negativi, legandosi al lipopolisaccaride A (LPS), alle porine e altre molecole di superficie proprie della parete cellulare di *Salmonella typhimurium* ed *Escherichia coli* (Appelmeek *et al.*, 1994).

La sottrazione di LPS causa un aumento della permeabilità membranale e/o lisi e, inoltre, rende la cellula batterica sensibile all'azione degli antibiotici (Ellison *et al.*, 1990).

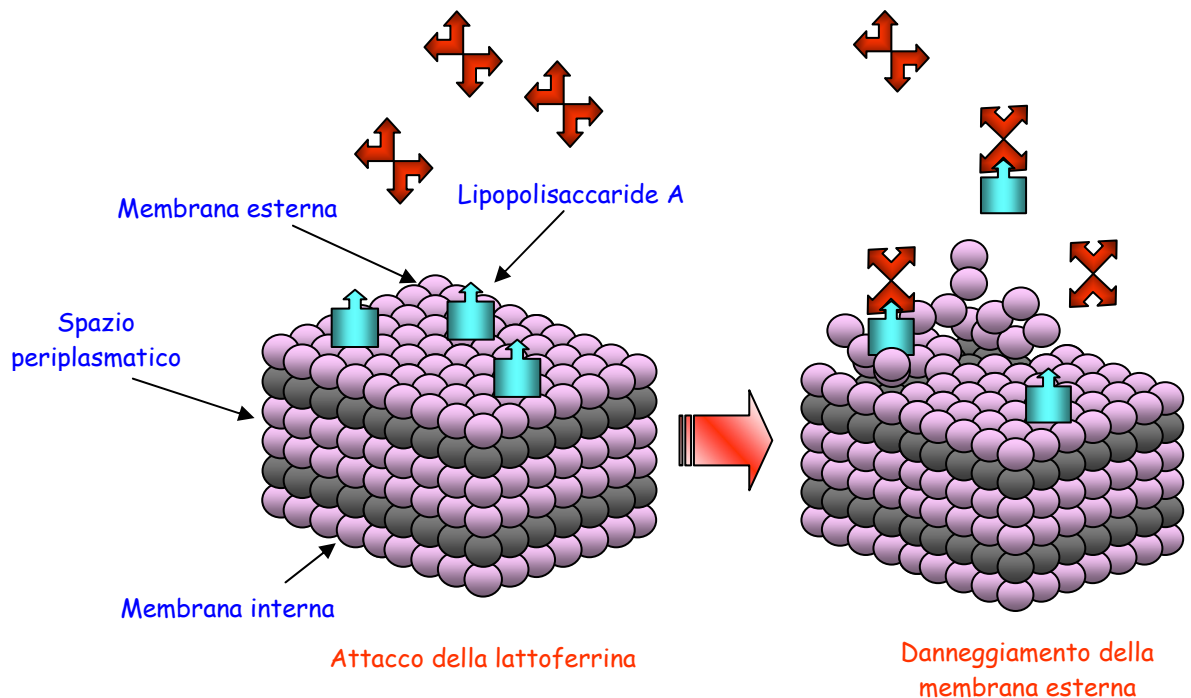


Fig. 6- Attività antibatterica svolta dalla lattoferrina attraverso un meccanismo di azione diretto. Il lipopolisaccaride A della parete cellulare dei batteri Gram- è rimosso dalla lattoferrina, ciò causa un aumento della permeabilità membranale e una maggiore sensibilità all'azione degli antibiotici (Ellison *et al.*, 1990).

Tuttavia, è stato dimostrato, per *Escherichia coli*, che la presenza di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} inibisce il rilascio del lipopolisaccaride A, moderando, così, l'abilità della lattoferrina nel rendere sensibile il batterio agli antibiotici (Ellison *et al.*, 1990).

Analogamente, composti come cloruro di calcio, nitrato di magnesio e cloruro di magnesio sono inibitori della lattoferrina per *Legionella pneumophila*; il cloruro di sodio, invece, non ha effetto sulla lattoferrina (Bortner *et al.*, 1989).

L'attività legante della lattoferrina è suscettibile alla temperatura; si è visto che la proteina è inattiva al di sotto dei 4°C ; inoltre valori di pH inferiori a 5 rendono più sensibili i microrganismi all'azione lesiva della lattoferrina (Bortner *et al.*, 1989).

L'attività antimicrobica della lattoferrina è da considerarsi sinergica al lisozima e agli antibiotici (Ellison *et al.*, 1988); tale sinergia si verifica anche tra la lattoferrina e le immunoglobuline A (IgA), il cui complesso è efficace sia contro i batteri Gram + che Gram - (Ellison *et al.*, 1990).

La digestione con pepsina della lattoferrina bovina (Saito *et al.*, 1991) e umana (Bellamy *et al.*, 1992) produce una serie di peptidi, detti "lattoferricine" a spiccata attività antimicrobica; tali peptidi non esibiscono, però, proprietà leganti il ferro (Bellamy *et al.*, 1992).

Entrambe le sequenze aminoacidiche della lattoferricina H, derivanti dalla proteolisi della lattoferrina nella specie umana, e della lattoferricina B, derivante dalla proteolisi della lattoferrina bovina, corrispondono alla regione N-terminale



del lobo N della proteina, per cui è da ritenere che proprio in questa regione siano localizzati i domini antimicrobici della lattoferrina (Kimura *et al.*, 2000).

La lattoferrina bovina (LfB) attacca le membrane cellulari di *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (Hoek *et al.*, 1997).

Studi effettuati su colonie di *E. coli*, in un intervallo di pH di 5,5-7,5, hanno messo in evidenza che i peptidi mostrano una più efficace attività antimicrobica in ambiente alcalino e in presenza di ioni Na⁺, K⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺.

La concentrazione di lattoferrina B necessaria per una completa inibizione della crescita microbica è di circa 0,3-150 mg/ml, ma ha un valore variabile nell'ambito delle varie specie microbiche (Odell *et al.*, 1996).

1.3.2. Attività antifungina, antiparassitaria e antivirale della lattoferrina

È ormai accertato che la lattoferrina esplica una azione coadiuvante ad antifungini nel trattamento terapeutico contro diverse infezioni da *Candida spp.* che hanno sviluppato resistenza farmacologica al fluconazolo in pazienti affetti dal virus dell'HIV (Knipers *et al.*, 1999).

La lattoferrina derivante dalla proteolisi della lattoferrina ha un effetto antifungino da 10 a 100 volte più forte rispetto alla proteina non digerita contro *Candida albicans* (Kimura *et al.*, 2000) e contro *Giardia lamblia* (Fleet, 1995).



Il ruolo antiparassitario della lattoferrina segue diversi meccanismi. Ad esempio, la crescita di *Pneumomonas carnii* è ostacolata a causa della sottrazione del ferro da parte della lattoferrina (Cirioni *et al.*, 2000).

I peptidi derivanti dalla lattoferrina bovina riducono la crescita parassitaria di *Toxoplasma gondii* e *Elimeria stiedai* agendo direttamente sui tessuti infetti e/o sulle membrane parassitarie (Omata *et al.*, 2001).

D'altra parte, in alcuni casi, la lattoferrina sembrerebbe esplicare una attività "promicrobica" per alcuni parassiti capaci di sfruttare a loro favore la capacità legante della lattoferrina e della transferrina; ne sono esempi *Tritrichomonas foetus* e l'agente patogeno della meningite *Neisseria meningitis* (Tachezy *et al.*, 1996).

Recenti studi hanno messo in evidenza la capacità preventiva della lattoferrina contro alcune specie virali, come il virus dell'epatite C (HCV), inibendone la sua duplicazione (Ikeda *et al.*, 1998).

Sia la lattoferrina umana che quella bovina risultano tossiche per il virus dell'epatite C (HCV), polio e rotavirus, *Herpes simplex virus* (HSV), *Citomegalovirus* e, probabilmente, contro il virus da immunodeficienza acquisita nell'uomo (HIV) (Ikeda *et al.*, 1998).

L'attività antivirale della lattoferrina è da attribuirsi probabilmente ad un duplice effetto: la sua capacità di legare i glucosamminoglicani localizzati sulle membrane delle cellule eucariotiche, impedendo la penetrazione delle particelle virali e bloccando quindi l'infezione sul nascere; e la sua proprietà di sottrarre il



ferro agli enzimi virali, che necessitano di tale metallo come cofattore per ottimizzare la loro funzione.

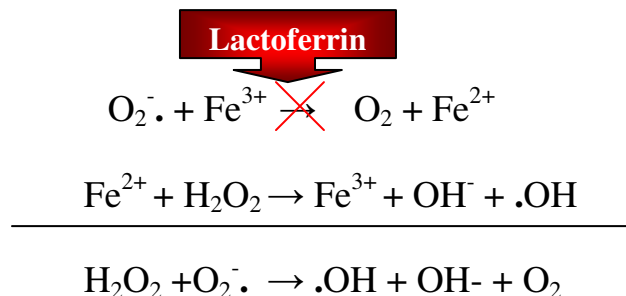
1.3.3. Attività antiossidante, antinfiammatoria e regolazione della omeostasi intestinale del ferro

La lattoferrina svolge una spiccata attività antinfiammatoria, inoltre è considerata un antiossidante naturale, riducendo i danni prodotti dall'azione dei radicali liberi (Paul-Eugene *et al.*, 1993).

Nel meccanismo di difesa antiossidante, la lattoferrina sequestra il ferro catalitico generato dai processi di distruzione cellulare, minimizzando in tal modo le lesioni tessutali prodotte dagli idrossidi radicalici che, durante i processi infiammatori, sono anche associati alla produzione di neutrofili ossidanti (Ye *et al.*, 2000).

L'abilità della lattoferrina di inibire il primo step della reazione di Haber-

Weiss:



è alla base del meccanismo di azione antiossidante che previene la formazione di radicali liberi (Ye *et al.*, 2000).



In aggiunta agli effetti antiossidanti, la lattoferrina gioca un rilevante ruolo anche nella risposta immunitaria, modulando i processi antinfiammatori attraverso la regolazione dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare del sistema immunitario (Kijlstra, 1990). Alcune di queste funzioni possono essere attribuite alla capacità di catturare i lipopolisaccaridi (LPS) della parete cellulare batterica, stimolando la produzione di interleuchine (IL-1 β e IL-6), prostacicline (PGI₂) e regolando i livelli di TNF- α (Tumor Necrosis Factor), che riducono la bioattività e la conseguente tossicità indotta dagli stessi LPS (Paul-Eugene *et al.*, 1993; Penco *et al.*, 1995; Choe *et al.*, 1999).

La notevole affinità della lattoferrina per il ferro, l'abbondante concentrazione di tale proteina nel latte materno e la grande biodisponibilità di tale elemento, ha inoltre suggerito un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi enterica e nell'assorbimento intestinale del ferro nei neonati (Iyer *et al.*, 1993). Recettori specifici per la lattoferrina sono stati infatti individuati sulla superficie della mucosa intestinale di molte specie, inclusi l'uomo, il maiale, il topo e la scimmia (Iyer *et al.*, 1993). Tali recettori costituiscono, assieme a molecole trasportatrici, il complesso pathway che regola l'assorbimento duodenale del ferro non-eme (Ward *et al.*, 2004).

Sotto lo stimolo dei recettori, la lattoferrina rilascia il ferro a livello del lume intestinale (Fig. 7).



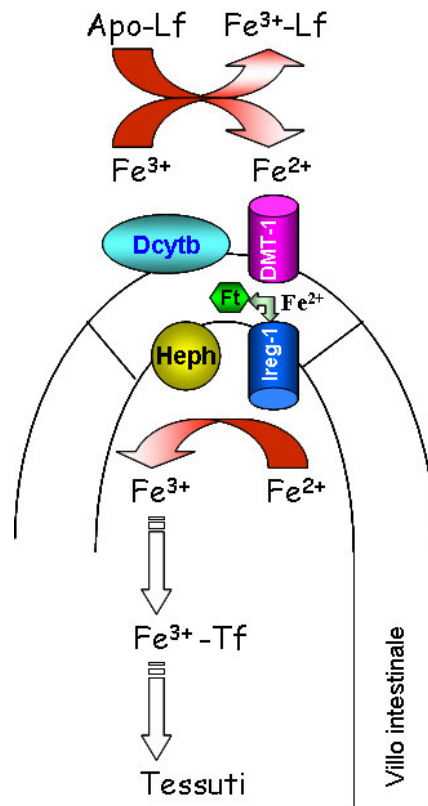


Fig. 7- La lattoferrina può agire a livello del lume intestinale per limitare l'ammontare di ferro disponibile per l'assorbimento mediato dal pathway DMT-1.

Lo ione ferrico è prima ridotto dal citocromo B duodenale (DcytB), quindi trasportato all'interno degli enterociti da una molecola trasportatrice (DMT-1). A questo livello, il ferro può essere accumulato sottoforma di ferritina, o uscire dagli enterociti attraverso una ferroporina (Ireg1) ed essere riossidato dalla efaestina (Heph). Attraversata la barriera intestinale, lo ione ferrico è quindi disponibile per il legame con l'apo-trasferrina, che provvederà al trasporto nei vari tessuti (Frazer *et al.*, 2003).

1.3.4. Attività trascrizionale della lattoferrina

Oltre alle proprietà strettamente correlate all'abilità di chelare il ferro, la lattoferrina svolge molte altre funzioni, tra le quali si annovera la capacità di interagire con molecole poli-anioniche, come l'eparina e gli acidi nucleici. Sebbene queste capacità siano note da più di venti anni, il possibile ruolo biologico di tali interazioni non è ancora del tutto chiaro (Kanyshkova *et al.*, 2001).

He & Furmanski (1995) hanno dimostrato che la lattoferrina esibisce una elevata affinità di legame con tre specifiche sequenze consenso di DNA: GGC~~A~~CTT(G/A)C , TAGA(A/G)GATCAAA, ACTACAGTCTACA, note rispettivamente come sequenze ON 1, ON 2 e ON 3.

In particolare, tali sequenze sono riconosciute da due specifici siti proteici (Fig. 4), localizzati nella porzione N-terminale della molecola (Kanyshkova *et al.*, 2001), e per i quali si è ipotizzato un possibile ruolo come fattore di trascrizione (Baeuerle, 1995). He & Furmanski (1995) hanno infatti dimostrato che, inserendo in una linea di leucociti umani (K562) un gene reporter (CAT: cloramfenicolo acil transferase) il cui promotore conteneva diverse copie di sequenze ON 1/ON 2/ON 3, l'espressione di tale gene nelle cellule trasformate e trattate con lattoferrina era numerose volte più elevato dell'espressione delle stesse cellule non trattate.



In questo contesto, la lattoferrina rappresenta un nuovo tipo di fattore di trascrizione, poichè secreto da un tipo di cellula e accettato da altri tipi di cellula; funzione questa, che solo poche altre proteine riescono a svolgere (Baeuerle, 1995).

1.4. Attività antibatterica della lattoferrina e polimorfismo al *locus LTF*

Fino a non molti anni fa, non era nota alcuna differenza nell'espressione quali-quantitativa della lattoferrina nella specie caprina.

Recentemente è stato osservato che alcune capre originarie della Corea producono un latte contenente una lattoferrina caratterizzata da una maggiore attività antibatterica (Lee *et al.*, 1997) rispetto a quello di capre di razza Saanen studiate precedentemente (Shimazaki *et al.*, 1991).

Il gene della lattoferrina che caratterizza le capre di origine coreana differisce da quello delle capre di razza Saanen (Le Provost *et al.*, 1994) per 15 mutazioni puntiformi (transizioni/transversioni), 8 delle quali determinano la sostituzione di 6 residui aminoacidici (5 localizzati nel lobo N-terminale) nella catena polipeptidica (Tabella 3).

Allo scopo di individuare una correlazione tra l'attività antibatterica della lattoferrina e le differenze nucleotidiche che caratterizzano la capra di razza



Saanen e la capra nativa della Corea, è stato effettuato un saggio dell'attività antibatterica utilizzando il metodo descritto da Tomita *et al.* (1991).

Sono state incubate a 37°C o.n. 2×10^5 cellule di *Escherichia coli* O111 in tubi di coltura contenenti diverse concentrazioni di lattoferrina (1-7,5 mg/ml), isolata dal colostro prodotto dalla capra Saanen e Coreana.

Nucleotide	Amminoacido	Capra Saanen	Capra Coreana
174; 176	56	ATA (Ile)	GTG (Val)
271	88	CTG (Leu)	CGG (Arg)
378	124	CAG (Gln)	AAG (Lys)
398	130	GGC (Gly)	GGT (Gly)
468; 469	154	TTC (Phe)	CCC (Pro)
918	304	AGC (Ser)	CGC (Arg)
1249	414	GAT (Asp)	GGT (Gly)
1721	571	ACG (Thr)	ACA (Thr)
1919	637	TTC (Phe)	TTT (Phe)
2304		A	G
2312		A	G
2313		C	A
2395		A	T

Tabella 3- Polimorfismo evidenziato a livello del cDNA codificante la lattoferrina di capra Coreana e capra Saanen (Lee, Shimazaki, Yu *et al.*, 1997).



È emerso (Tabella 4) che la lattoferrina prodotta dalla capra Saanen non espleta attività antibatterica contro *E. coli* O111 anche ad una concentrazione di 7,5 mg/ml a differenza della capra nativa Coreana che è già attiva ad una concentrazione di 5 mg/ml (Lee *et al.*, 1997).

LATTOFERRINA (mg/ml)					
	3,5	4	4,5	5	7,5
Saanen	-	-	-	-	-
Coreana	-	-	-	+	+

Tabella 4- Il segno (+) indica presenza di attività antibatterica; il segno (-) indica assenza di attività antibatterica.

È ipotizzabile che una diversa attività antibatterica della lattoferrina possa essere il risultato di una differente conformazione della proteina come diretta conseguenza del polimorfismo a livello del gene.

A sostegno di tale ipotesi, nella specie umana sono state individuate e caratterizzate due varianti della lattoferrina che differiscono per una sostituzione aminoacidica Lys→Arg in posizione 29 della regione N-terminale della proteina, in conseguenza di una transizione A→G al 1° esone del gene. È stato osservato che la variante caratterizzata dalla presenza della lisina in posizione 29 mostra una maggiore attività battericida contro diverse specie Gram-positive (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*) coinvolte in diverse patologie periodontali. Pertanto, il polimorfismo in posizione 29 viene efficientemente



impiegato quale utile marker per valutare la predisposizione alla periodontite giovanile localizzata (Velliyagounder *et al.*, 2003).

L'industria internazionale, forte del supporto della ricerca degli ultimi anni, ha impiegato ingenti risorse tecniche e finanziarie al fine di produrre o sintetizzare sostanze derivate dal latte che presentino un'azione farmacologica e "antimicrobica" naturale da utilizzarsi sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria.

Gli attuali sviluppi internazionali sembrano focalizzarsi sul clonaggio della lattoferrina umana e la relativa espressione in animali transgenici dove, però, il livello di espressione della lattoferrina rimane comunque basso.

Dalla osservazione dei polimorfismi al *locus* della lattoferrina è emerso, quindi, come possa essere utile disporre, ad esempio, di un latte naturalmente contenente una lattoferrina ad elevata attività antibatterica.



2. OBIETTIVO

Analizzare la struttura del gene della lattoferrina di capra allo scopo di individuare marcatori genetici utili per la caratterizzazione delle popolazioni/razze caprine dell'Italia meridionale.



3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei campioni di DNA

La ricerca è stata condotta sul DNA estratto dai leucociti recuperati da campioni individuali di sangue (40 ml) di capre appartenenti rispettivamente alla razza Saanen, Maltese ed a una popolazione locale allevata in provincia di Catanzaro, 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 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 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).

3.2. Disegno dei primer

I primer utilizzati per l'amplificazione del gene della lattoferrina caprina sono stati disegnati avvalendosi del software DNASIS-Pro (Hitachi), come



stampo sono state utilizzate le sequenze parziali relative al cDNA caprino depositato in Banca Dati (EMBL n° di accesso X78902).

Successivamente, sono stati disegnati altri primer utilizzando come stampo le regioni sequenziate nel corso della ricerca (Tabella 5).

<i>Nome del primer</i>	<i>Sequenza</i>
5'LactoF (forward)	5'-AGATACAAAGATGCTTCA-3'
5'LactoR (reverse)	5'-TGGCAGAGGCAATAT-3'
5'LTF-Prom (forward)	5'-TCCTTTTCATTGGCAAATGAG-3'
Lacto1eR (reverse)	5'-GGCGGGGACGAAGAG-3'
Lacto5'NF(forward)	5'-CCCTCTAGGAACTAGCAG-3'
Lacto5'F (forward)	5'-GGGTGGAGAGAGGGT-3'
Lacto1eF (forward)	5'-CGGAGTCGCCCCAGG-3'
Lacto1inF (forward)	5'-ACTCACCTGTGCTGGACATT-3'
Lacto2eR (reverse)	5'-GCGATGGCCCGGATACA-3'
Lacto2eF (forward)	5'-GCCCCGAGGAAAAACGT-3'
Lacto3eR (reverse)	5'-TGTCCCATAGATCTCTGC-3'
Lacto2inF (forward)	5'-CCTGGGTTGGGAAGATC-3'
Lacto3F (forward)	5'-AAATGCGGATGCTGTGA-3'
Lacto5R (reverse)	5'-TTGAAGGCACCAGAATAAC-3'
Lacto5F (forward)	5'-TGTGGCTAGATTCTTCTC-3'
Lacto6R (reverse)	5'-CAAACACTGTCGTCTCC-3'
Lactoin6F (forward)	5'-GTGCTTGTCTGGTTC-3'
Lactoin6R (reverse)	5'-GCTCTGGGATTGTTG-3'
LactoR6in (reverse)	5'-TGGATCTCACAATCATG-3'
Lacto6inF (forward)	5'-TGCTTTCTCATCCCACA-3'
Lacto7eR (reverse)	5'-AACAGCATGAGAAGGGA-3'
Lacto7F (forward)	5'-TTGCCAGAGAAGGCTG-3'
Lacto9R (reverse)	5'-AGCACCAGGGCGAT-3'
Lactoin9F (forward)	5'-CAGTTCATCTCAGTTTAGCC-3'
Lacto10eR (reverse)	5'-CGGTTCTCTGCCATGAC-3'
Lacto9eF (forward)	5'-CGAGGAGCAGAGTAAGTG-3'
Lacto10inF (forward)	5'-CCAGCAAGGGTTAATGA-3'
Lacto10inR (reverse)	5'-GGCAAAGTGACTCAGTTA-3'
Lacto11inR (reverse)	5'-CCTCCAGGGACAAGA-3'
LactoF10in (forward)	5'-AAAGCCATGCCAATATGCG-3'
Lacto10eF (forward)	5'-AGAAAGGGGAAGCGGAC-3'
Lacto11eR (reverse)	5'-ACCTTCCGTTGGTCTCA-3'



Lacto11eF (forward)	5'-CCTCCAAATACAGTAGCCTA-3'
Lacto12eR (reverse)	5'-CCTGTCTGGTTGGCGAT-3'
Lactoin12F (forward)	5'-TTCATACATCCTGCC-3'
Lacto12inR (reverse)	5'-TGCGCATTCTCTCCTA-3'
Lactoin12R (reverse)	5'-GATGTGACATGAGCCG-3'
Lacto13eR (reverse)	5'-CCCGGTGTAGCCATAGT-3'
Lacto12eF (forward)	5'-TTGCCGTGGCAGTTGTC-3'
Lacto13eF (forward)	5'-TTAGTCAGAGCTGTGC-3'
Lacto14eR (reverse)	5'-CTCCCAGACTGTGTC-3'
Lacto13inF (forward)	5'-CTCTCAGTTCGCCA-3'
Lactoin13F (forward)	5'-CTCTCAGTTCGTCCC-3'
Lacto14inF (forward)	5'-CGCCATCTGCCTGTTT-3'
Lacto14inR (reverse)	5'-TACTCAGCAACAAGAAGGA-3'
Lacto14eF (forward)	5'-CTGGCTGAGGACGTTG-3'
Lacto15eR (reverse)	5'-TGGAGCAGCACCTGTT-3'
Lacto15eF (forward)	5'-GACTGGGCTAAGAACTT-3'
Lacto16eR (reverse)	5'-TTCAGGTTGGCAATGG-3'
Lacto16eF (forward)	5'-CAATGACAACACTGAGTG-3'
Lactoin16R(reverse)	5'-ACAAGTCTCTGCTAAAG-3'
Lacto17eR (reverse)	5'-GGAATGAAAATCAACAGCA-3'
Lacto17eF (forward)	5'-TCCTGACGAGGTAAAG-3'
Lacto3'R (reverse)	5'-GACACGATTTTCAGTATACAT-3'

Tabella 5- Primer utilizzati per sequenziare il gene *LTF* di capra.

3.3. 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 comprende i seguenti 32 cicli:

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	97 °C x 2'	56 - 65.5 °C x 45''	72 °C x 2'30''
30	94 °C x 45''	56 - 65.5 °C x 45''	72 °C x 2'30''
1	94 °C x 45''	56 - 65.5 °C x 45''	72 °C x 10'

3.4. 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 dal gel.

Il protocollo si basa sull'impiego di speciali buffer che in presenza di un'alta concentrazione di "chaotropic-salt", consente 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 (corsa di 30 minuti a 100 Volt), usando come tracciante bromuro di etidio, per accertare l'assenza di RNA e DNA contaminanti.

3.5. 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 mediante il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988).

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

3.6. Metodica della PCR-RFLP

L'indagine è stata condotta su 185 capre appartenenti a diverse razze/popolazioni appartenenti all'Italia meridionale: 20 capre di razza Saanen,



25 capre di razza Maltese, 30 di razza Argentata, 30 di razza Girgentana, 30 di razza Siriana e 50 capre autoctone della provincia di Catanzaro.

Sono state tipizzate le transizioni G→T al 56° nucleotide del 3° esone, utilizzando l'endonucleasi *MspI*, A→C al 28° nucleotide dell'8° esone con l'enzima di restrizione *Hae II* e, infine, la transizione T→G al 12° nucleotide del 9° con l'endonucleasi *HphI*.

3.6.1. PCR-RFLP al 3° esone

Per il marcatore localizzato al nucleotide 56 del 3° esone, la reazione è stata effettuata in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (Lacto3F e Lacto5R), 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 comprende i seguenti 32 cicli:

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	97 °C x 2'	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'
30	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'
1	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 10'



Le sequenze dei due primer corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 6-22 del 3° esone (Lacto3F) e ai nucleotidi 130-146 del 5° esone (Lacto5R):

✚ Lacto3F (forward): 5'-AAATGCGGATGCTGTGA-3'

✚ Lacto5R (reverse): 5'-TTGAAGGCACCAGAATAAC-3'

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *MspI* [C!CGG] (MBI Fermentas, Hanover, MD) e incubando a 37°C per 5 ore.

3.6.2. PCR-RFLP all'8° esone

Relativamente al marcatore localizzato al nucleotide 28 dell'8° esone, la reazione è stata effettuata in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (Lacto7F e Lacto9R), 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 comprende i seguenti 32 cicli:

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	97 °C x 2'	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'
30	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'*
1	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 10'

* Con un incremento di 4'' per ogni ciclo.



Le sequenze dei due primer corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 6-21 del 7° esone (Lacto7F) e ai nucleotidi 141-154 del 9° esone (Lacto9R):

✚ Lacto7F (forward): 5'-TTGCCAGAGAAGGCTG-3'

✚ Lacto9R (reverse): 5'-AGCACCCAGGGCGAT-3'

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *Hae* II [A/GGCGC!T/C] (MBI Fermentas, Hanover, MD) e incubando a 37°C per 5 ore.

3.6.3. PCR-RFLP al 9° esone

Per il marcatore localizzato al nucleotide 12 del 9° esone, la reazione è stata effettuata in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (LactoIN8F e Lacto9R), 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 comprende i seguenti 32 cicli:

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	97 °C x 2'	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'
30	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 2.5'*
1	94 °C x 45''	57 °C x 45''	72 °C x 10'

* Con un incremento di 4'' per ogni ciclo.



Le sequenze dei due primers corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 175-159 dell'8° introne (LactoIN8F) e ai nucleotidi 141-154 del 9° esone (Lacto9R):

✚ LactoIN8F (forward): 5'-CGCCTCCCGCTAATACT-3'

✚ Lacto9R (reverse): 5'-AGCACCAGGGCGAT-3'.

La digestione di 40 µl di ciascun prodotto di PCR è stata effettuata aggiungendo 10 U dell'enzima di restrizione *HphI* [GGTGA(N)₈!] (MBI Fermentas, Hanover, MD) e incubando a 37°C per 5 ore.

3.7. Mappaggio del gene LTF

Al fine di mappare il gene della lattoferrina nella specie caprina è stato necessario allestire colture cellulari, bandeggiare, preparare sonde da impiegare nella *FISH* (*Fluorescence In Situ Hybridization*).

3.7.1. Allestimento delle colture

Tecniche citogenetiche standard sono state impiegate per ottenere piastre metafasiche di linfociti di capra su cui testare le sonde.

In fiaschi sterili monouso, 1 ml di sangue intero eparinizzato è stato trattato con:

✚ 7 ml di RPMI (Dutch modification), (GIBCO)



- ✚ 2 ml di Foetal Bovine Serum (FBS), (GIBCO)
- ✚ 100 µl di L-Glutamine, (GIBCO)
- ✚ 40 µl di Antibiotic/Antimicotic solution, (GIBCO)
- ✚ 150 µl di Concavalin A, (SIGMA)
- ✚ 10 µl di Eparina sodica

I fiaschi sono stati messi in incubatore termostatico a 37,5°C per 72 ore. 40 minuti prima dello scadere delle 72 ore è stato aggiunto COLCEMID (SIGMA) ad una concentrazione finale di 1µg/ml, per bloccare la divisione mitotica in metafase,. Al termine della coltura si è poi proceduto al trattamento ipotonico, alla fissazione e all'allestimento dei vetrini.

Brevemente, il contenuto dei fiaschi è stato versato in provette FALCON e centrifugato per 10 minuti a 1.400 giri al minuto; il surnatante è stato poi allontanato per aspirazione. Dopo l'aggiunta di 12 ml di soluzione ipotonica (KCl 0,075 M), le colture sono state messe in incubatore a 37°C per 20 minuti; dopodichè è stato aggiunto 1 ml di fissativo di Carnoy (3 parti di metanolo : 1 parte di acido acetico) per bloccare l'azione dell'ipotonico, ed infine si è proceduto ad una nuova centrifugazione con le stesse modalità. Le fasi successive hanno previsto la fissazione e i lavaggi delle colture, operati attraverso l'aggiunta ripetuta di fissativo, seguita da centrifugazione e aspirazione.

Gocce di materiale cellulare così ottenuto sono state versate su vetrini microscopici puliti.



3.7.2. Preparazione delle sonde

Un frammento di 1347 bp comprendenti il 7° esone e gran parte del 9° esone del gene della lattoferrina è stato amplificato mediante PCR al fine di produrre sonde per il mappaggio dello stesso gene.

La reazione è stata effettuata in 50 µl di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer (Lacto7F e Lacto9R), 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 comprende i seguenti 32 cicli:

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1 ciclo	94 °C x 4'	57 °C x 45''	72 °C x 1.5'
30 cicli	94 °C x 1'	57 °C x 45''	72 °C x 1.5'
1 ciclo	94 °C x 1'	57 °C x 45''	72 °C x 10'

Le sequenze dei primers corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 6-22 dell'esone 7 (lacto7F) e ai nucleotidi 141-154 del 9° esone:

✚ Lacto7F (forward): 5'-TTGCCAGAGAAGGCTG-3'

✚ Lacto9R (reverse): 5'- AGCACCAGGGCGAT-3'.

Il prodotto di amplificazione è stato quantificato allo spettrofotometro e controllato su gel di agarosio all'1.5% in TBE 1X. Si è quindi proceduto al labelling con Biotina-14-dATP attraverso Nick-Translation.



La reazione, condotta su ghiaccio, è stata effettuata in 45µl di mix così composta: 1 µg di template DNA, 5 µl di 10x dNTP Mix (0.2 mM di dCTP, dGTP e dTTP, 0.1 mM dATP, 0.1 mM biotin-14-dATP, 500 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM MgCl₂, 100 mM β-mercaptoetanol, 100 µg/ml nuclease-free BSA), 5 µl di 10x Enzyme Mix (0.5 U/µl DNA Polymerase I, 0.007 U/µl DNase I, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50% (v/v) glycerol, 100 µg /ml nuclease-free BSA) (Invitrogen).

La mix è stata brevemente centrifugata e immediatamente incubata a 15°C per 2 ore. La successiva aggiunta di 5µl di Stop Buffer (0.5 M EDTA pH 8.0) ha infine interrotto la reazione di labeling.

La sonda così preparata è stata quindi impiegata per la ibridazione *in situ* (Trask, 1991).

3.7.3. Fluorescent in situ Hybridization (*FISH*)

Questa tecnica consente la mappatura fisica di frammenti di DNA, marcati in modo non radioattivo, usati come sonde da ibridare su metafasi e nuclei.

Prevede 3 step:

- ✚ Denaturazione dei preparati mitofasici
- ✚ Denaturazione della sonda
- ✚ Ibridazione in situ



3.7.3.1. Denaturazione dei preparati metafasici

I vetrini coprioggetto sono preparati facendo cadere 2-3 gocce della sospensione cellulare su un vetrino pulito e bagnato di fissativo. Una volta asciugati, si procede ad un pretrattamento che prevede un prelavaggio di 5 minuti in una soluzione 2x SSC, seguita da un trattamento postfissazione per 1 ora con soluzione di RNAsi (200µg /ml) in 2x SSC (in camera umida), seguito da un successivo lavaggio per 5 minuti in 1x PBS. I vetrini sono successivamente deidratati attraverso una sosta di 2 minuti in soluzioni al 70%, 90%, 100% di etanolo a temperatura ambiente, quindi si lasciano asciugare all'aria.

A questo punto si passa alla denaturazione vera e propria, che si realizza attraverso una sosta di 2-4 minuti in una soluzione denaturante di formammide al 70% in 2x SSC preriscaldata a 72 °C. La denaturazione è quindi terminata dalla successiva disidratazione dei vetrini per 2 minuti in soluzioni al 70%, 90%, 100% di etanolo ghiacciato (-20°C). Poi si lasciano asciugare i vetrini all'aria.

3.7.3.2. Denaturazione della sonda

Prima della ibridazione è necessario che la sonda sia sottoposta a denaturazione. Una mix di ibridazione va aggiunta alla eppendorf che contiene la sonda (in concentrazione di circa 4ng/µl).

La mix di ibridazione (10µl) per un singolo vetrino è composta da:



- ✚ 5 μ l formamide deionizzata (50%);
- ✚ 4 μ l dextran-solfato 25% in H₂O (autoclavato);
- ✚ 1 μ l 20x SSC.

La soluzione viene ben miscelata e quindi denaturata a 72-74 °C per 10 minuti in termociclizzatore. Segue quindi una pre-ibridazione a 37C per 80 minuti prima della ibridazione sul vetrino.

3.7.3.3. Ibridazione

Il mix di ibridazione contenente le sonde denaturate è quindi applicato sui vetrini preriscaldati su un termoblock a 37°C. Successivamente si copre con coprioggetto 24x24, si allontanano le possibili bolle d'aria e si sigilla con Rubber Cement. Il tutto è incubato over night a 37°C in vassoi umidificati ad H₂O.

Il giorno seguente si procede al lavaggio dei vetrini per eliminare la sonda in eccesso. I lavaggi condotti a 42°C per 5 minuti, comprendevano i seguenti passaggi:

- ✚ due passaggi in 2x SSC (pH 7.0) per 5 minuti
- ✚ due passaggi in 50% formammide in 2x SSC (pH 7.0) per 5 minuti
- ✚ due passaggi in 0.1x SSC (pH 7.0) per 5 minuti
- ✚ un passaggio in TNT a 42°C per 5 minuti
- ✚ un passaggio in TNT a temperatura ambiente per 5 minuti.



Al termine delle fasi di lavaggio il vetrino è trattato con una soluzione di bloccaggio (TNB: 1% Blocking reagent for nucleic acid hybridization and detection ROCHE, in 1x TN), quindi si incuba a 37°C per 30 minuti. Segue un trattamento con 100 µl di detection solution.

3.7.4. Immunodetection e amplificazione del segnale

Si pongono sul vetrino 100 µl di una soluzione di detection (TNB) in cui è stata diluita avidina-FITC DCS (VECTOR) in rapporto 1:400. Si incuba a 37°C per 45 minuti, dopodiché si effettuano 3 lavaggi per 5 minuti a 42°C in 10x TNT. A questo punto si applicano 100 µl di TNB e dopo incubazione per 10 minuti a 37°C, si tratta con 100 µl di una soluzione antiavidina-biotina (SIGMA) 1:400 in TNB. Si reincuba per 45 minuti a 37°C e si risciacqua con 3 passaggi per 5 minuti a 42°C in 10x TNT. In fine, si ripete il passaggio con avidina-FITC per completare l'amplificazione del segnale.

3.7.5. Colorazione con DAPI, analisi microscopica e criteri di osservazione

I vetrini sono stati colorati con 8 µl di DAPI in antifade (concentrazione DAPI 0.24 µg/ml), montati con coprioggetto 24x24 mm e conservati al buio.

ANTIFADE (x 10 ml): 0.233 g DABCO, 800 µl H₂O, 200 µl 1M Tris-HCl, 9 ml glicerolo.



I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento 100x con un microscopio a fluorescenza Leica DM RA equipaggiato con specifici filtri per DAPI, FITC, TEXAS RED.



4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1. Struttura del gene della lattoferrina di capra

Usando come template il DNA genomico estratto dai leucociti ottenuti da campioni individuali di sangue di capra, sono state sequenziate le regioni esoniche del gene della lattoferrina (*LTF*) e le rispettive regioni introniche comprese o fiancheggianti per un totale di circa 22000 bp, più 1600 bp della regione 5'UT (UnTranslated) e 50 bp della regione 3'UT di 3 capre appartenenti rispettivamente alla razza Saanen, Maltese ed a una popolazione locale allevata in provincia di Catanzaro.

La principale caratteristica del gene *LTF* nella specie caprina è la sua struttura particolarmente frazionata, analogamente a quanto già osservato per i geni *CSNIS1* e *CSNIS2* che codificano rispettivamente per le caseine α s1 (Koczan *et al.*, 1991; Ramunno *et al.*, 2004) e α s2 (Groenen *et al.*, 1993; Bouniol *et al.*, 1994). Tale gene è organizzato in 17 esoni e 16 introni, in particolare la grandezza degli esoni va da un minimo di 48 bp (esone 11) ad un massimo di 226 bp (esone 17) (Figura 8). Tutte le giunzioni di splice seguono la regola comune 5'GT/ 3'AG.

La sequenza del cDNA ottenuto dall'analisi delle sequenze esoniche è risultata di 2333 bp comprendenti la regione 5'UT (primi 75 bp dell'esone 1), una regione 3'UT (ultimi 131 bp del 17° esone) e l'ORF (Open Reading Frame,



2127 bp), che codifica per il peptide leader (costituito da 19 residui aminoacidici codificati dagli ultimi 14 codoni del primo esone e dai primi 5 del secondo esone) e per 690 residui aminoacidici della proteina matura.

Lo stop codon (TAA) si realizza tra il 32° ed il 35° nucleotide del 17° esone.

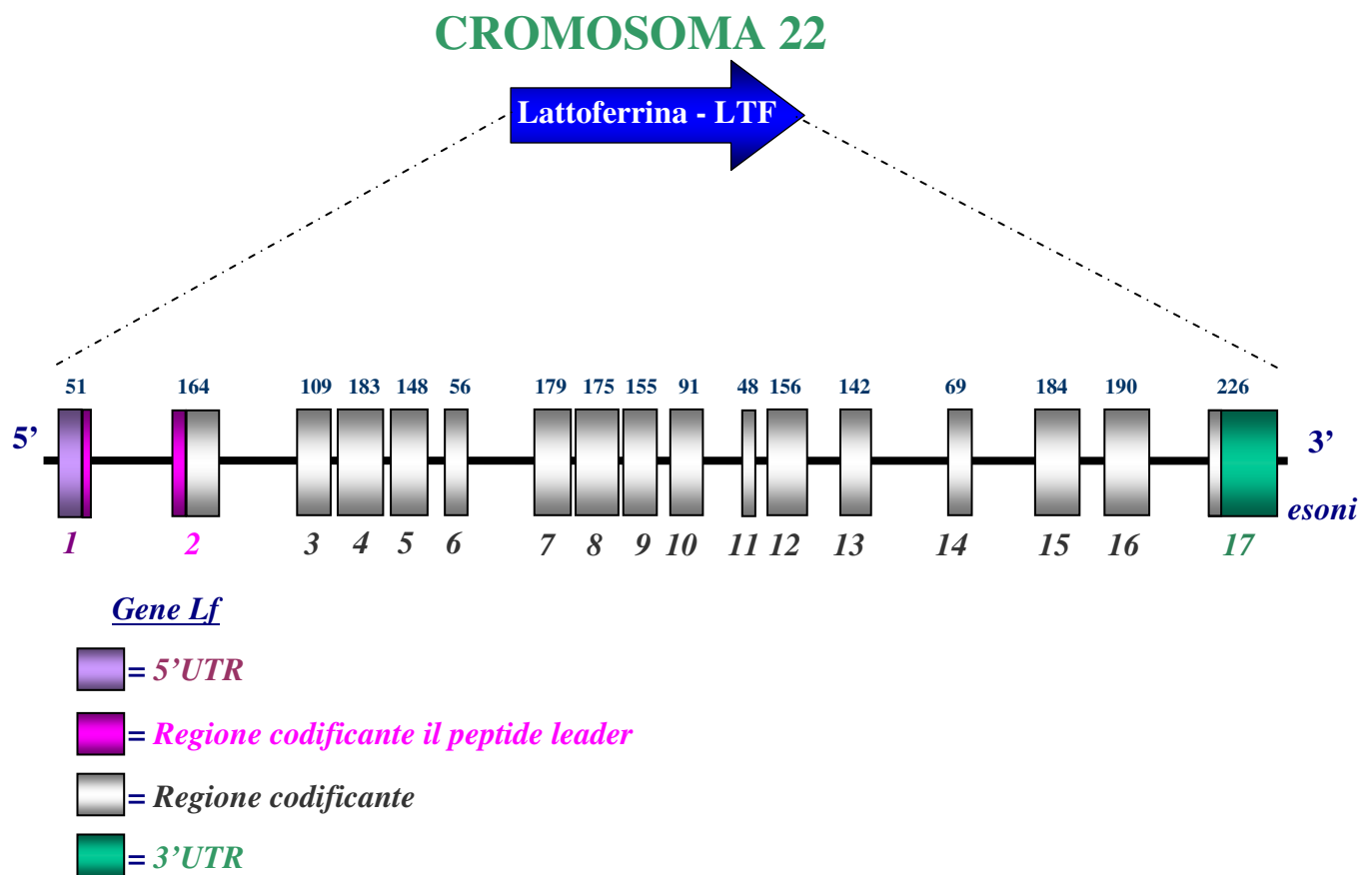


Fig. 8- Struttura del gene della lattoferrina di capra.

4.2. Analisi delle regioni introniche

Sono stati sequenziati circa 18000 nucleotidi del gene della lattoferrina per ciascuna delle tre capre esaminate.

In particolare, 11 dei 16 introni del gene sono stati completamente sequenziati (introni 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15 e 16), mentre dei restanti si è riusciti a disporre delle sequenze fiancheggianti i corrispettivi esoni (introni 1, 2, 6, 10 e 13).

Il confronto tra le sequenze introniche relative alle tre capre esaminate ha messo in evidenza una omologia del 97,6% tra la capra Maltese e la capra Saanen e di circa il 96,8% tra queste e la capra autoctona calabrese; il confronto con la relativa sequenza bovina ha mostrato, invece, una similarità media del 67,5% (Fig. 9).

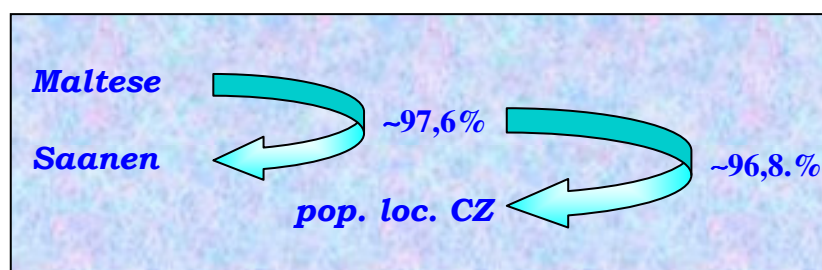


Fig. 9- Percentuale di omologia relativa alle regioni introniche delle tre capre esaminate.

L'analisi delle parziali sequenze introniche relative al gene *LTF* dei tre soggetti in esame ha messo in evidenza un totale di 138 siti polimorfici (53 transversioni, 54 transizioni, 33 singole o multiple delezioni/inserzioni e 2

inversioni nucleotidiche con un rapporto transizione/trasversione di 1,02)

(Tabella 6).

INTRONE	MUTAZIONI OSSERVATE			
	POSIZIONE	LOCALE	MALTESE	SAANEN
1	+982	N	-	G
	+1305	C	-	A
	-729	A	A	T
	-715	A	A	G
	-651	T	T	A
	-649/-648	--	--	TG
	-444	C	C	-
	-443	T	-	T
	-355	C	T	C
	-343	T	-	T
	-314	A	-	A
2	+141	A	C	A
	+252	C	G	G
	+507	G	C	G
	+833	N	T	T
	+908	-	-	C
	+1038	G	A	G
	+1119	G	G	C
	+1182	G	T	T
	+1185	T	T	A
	-421	-	C	G
	-396	-	C	T
	-393	-	C	N
	-314	-	C	T
	-260	-	C	G
	-249	-	G	T
	-161	N	C	C
	-134	C	C	A
	-119	C	C	T
	-111	-	-	C
-83	G	T	T	
-74/-73	N-	C-	CA	
3	+188	G	G	N
	+195	G	N	C
	+223	C	C	N
	+260	G	G	N
	+296	G	G	N
5	+55	G	N	G
	+224	G	C	N
	+240/+241	GG	CC	CC
	+243	C	T	C
	+300	G	C	G
	+463	T	C	C
+467	C	T	C	
7	+16	G	G	A
	+90	-	-	C
	+182	T	T	A
9	+12	C	T	C
	+617/+618	TC	CT	TC
	+666	T	N	A
	+772	T	A	T
+1063	T	T	C	
10	+54	C	C	G
	+89	C	G	C
	+125	C	A	A



	+130 +394 +436 +455 +457 +466 +471 +498 +537 -220 -196 -155 -136 -121 -74 -39	G T C C C C A A C A T T A A G A	G - T G - G - G A A C T N N N -	N - T G - G - A N - C A G G C -
11	+14 +139 +159 +167 +178 +184 +202 +237 +241 +363	C G A A G G G - C G	G T - C C A C G T A	G T - A G G A G T G
12	+245 +447 +567 +901 +1103 +1188 +1308 +1325 +1879	G C T T C - C - N	N C G T G A - G A	G T T C G - C G A
14	+119 +232 +347 +353 +480 +500 +507 +513 +568 +580 +1342 +1356 +1578 +1700	G G G G T C G C T - T A A	T G G C G C - T T T - C A T	G C C G T C - G T G T C G T
15	+507 +530 +532 +544 +773	G A A A G	T G - - G	T G - - A
16	+612 +626 +629 +640 -223 -221 -196/-195 -191 -174	- T C G C C CT T C	C C A - C C TT T C	C C A G T T TG G T



	-171	C	C	T
	-169	C	T	T
	-165	G	G	C
	-160	A	A	G
	-144	T	T	A
	-129	C	C	T
	-109	G	G	A
	-102/-101	AG	AG	GA
	-92	C	T	T
	-85	A	A	G
	-82	G	G	T
	-80	C	T	C
	-77	C	C	T
	-70	T	T	G

Tabella 6- Confronto delle differenze introniche. La posizione del nucleotide è riportata contando rispettivamente a partire dall'esone a monte (+) o a valle (-).

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

Tra i nucleotidi +242 e +253 del 3° introne è stata evidenziata una caratteristica sequenza microsatellite (*CTCTCTCTCTCT*) risultata monomorfa.

Una ulteriore sequenza microsatellite è stata individuata tra i nucleotidi +3543 e +3560 del 13° introne (numerazione rispetto alla sequenza bovina, Seyfert *et al.*, 1994). Trattasi di una ripetizione (*CTGCTGCTGCTGCTGCTG*) risultata polimorfa nei 3 campioni sequenziati. La capra autoctona calabrese e la capra di razza maltese si caratterizzano per 6 ripetizioni della tripletta (*CTG*), mentre la capra di razza saanen si caratterizza per 9 ripetizioni della stessa tripletta (Fig. 10).

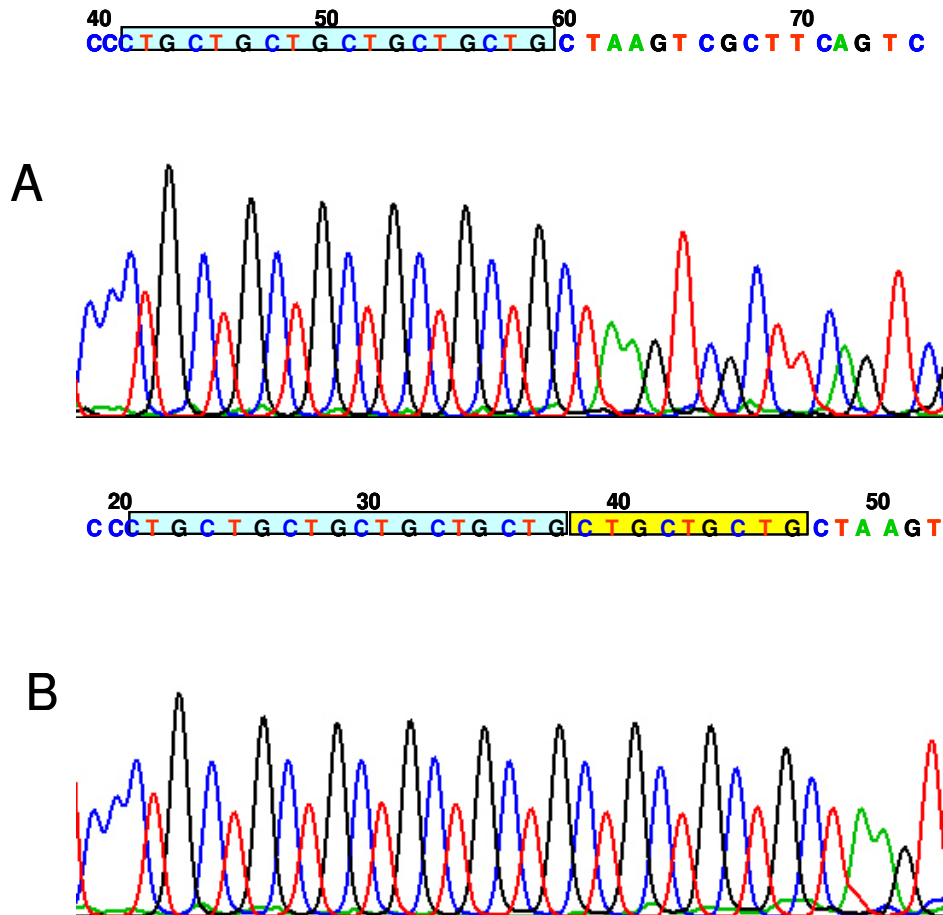


Fig. 10- Elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento dell'introne 13 caprino. A) Microsatellite osservato per la capra locale e per la capra maltese; B) Microsatellite polimorfo osservato per il campione di razza saanen.

Il 10° introne (dal nt +629 al nt +732) ed l'11° introne (dal nt +8 al nt +111) si caratterizzano per la presenza di una perfetta duplicazione di 103 nucleotidi. Tale sequenza è presente nella specie bovina solo nel 10° introne (dal nt +629 al nt +732).

Inoltre, il successivo confronto con la specie bovina ha reso possibile evidenziare all'interno del 4° introne due diversi fenomeni di riarrangiamento del DNA, la cui peculiarità sta nel fatto di avere origine nello stesso punto di sequenza. Prendendo come riferimento la sequenza caprina, tra i nucleotidi

+366/+367 vi è l'inserzione dell'eptadecamero *CTCCTTCCAGGGCGCTC* e la delezione di un tratto di DNA di 126 bp.

4.3. Analisi dei retroposoni

Negli eucarioti la trasposizione è la forma più comune di trasferimento di materiale genetico ed è determinata dalla capacità dei retrovirus di inserire nei cromosomi di una cellula ospite copie di DNA per mezzo di trascrizione inversa del proprio genoma virale.

Gli elementi inseriti sono denominati retroposoni e possono generare brevi ripetizioni nel sito di inserzione del DNA bersaglio.

L'inserzione di elementi di origine retroposonica può verificarsi in direzione 3' → 5' oppure 5' → 3'.

In accordo con la nomenclatura proposta da Lenstra *et al.* (1993), per il genoma bovino sono state individuate tre differenti tipologie di retroposoni denominati: Bov-B, Bov-A2 e Bov-tA, che incidono rispettivamente per lo 0,5%, 1,8%, and 1,6% sull'intero genoma bovino; ad esempio il Bov-tA è contenuto in 285.000 copie (Lenstra *et al.*, 1993).

Il Bov-B, che è stato originariamente descritto come un SINE (Short Interspersed Nuclear Element) o Art2 o *PstI* si caratterizza oltre che per ripetizioni *PstI*, di circa 560 bp, anche per un segmento di 78 bp, all'estremità



3', omologo alla sequenza monomerica di 115bp del Bov-A (Lenstra *et al.*, 1993).

Quest'ultimo elemento non è mai stato trovato in singola copia, probabilmente perché generato dalla delezione della porzione centrale di un Bov-B e dal successivo riassetto delle due estremità (Okada *et al.*, 1997).

Il Bov-tA (eterodimero di un frammento di 73 bp di uno pseudogene di un t-RNA^{Gly} più un Bov-A) e il Bov-A2 (dato dalla duplicazione di un Bov-A) sono i più frequenti SINE riscontrabili nel genoma bovino (Lenstra *et al.*, 1993). In particolare, essi hanno in comune la presenza di un elemento Bov-A.

L'analisi preliminare della sequenza del gene della lattoferrina di capra ha messo in evidenza la presenza di almeno 5 brevi sequenze di DNA che mostrano una elevata similarità con elementi di tipo retrosonico (Fig. 11).

Il primo retrosonone (226 bp) è localizzato al 2° introne (dal nt +237 al nt + 463), mostra un'omologia del 92,1% con l'elemento Bov-tA proposto da Lenstra *et al.* (1993) e termina con la sequenza tandem: A (AC) CC G CC (AC) TA (AC)₃ A (ATG)₂ T (CA)₂.

Due retrosoni sono localizzati al 9° introne: il primo, 203 bp (dal nt +279 al nt +482), mostra un'omologia dell'82,7% con la sequenza complementare di un Bov-tA (Lenstra *et al.*, 1993), ed è fiancheggiato all'estremità 5' dalla sequenza ripetuta (CCA)₂ CA GTT CA (GT)₃ GTT. Il secondo elemento retrosonico, 206 bp (dal nt +437 al nt +643), analogamente



al precedente, mostra un omologia del 83,7% con il Bov-tA riportato da Lenstra *et al.* (1993), e termina con la sequenza ripetuta A AAC (AGC)₂ AAC G A(CTG) G G(CTG) C(CTG).

Il quarto retroposone (200 bp) è localizzato al 12° introne (dal nt +882 al nt +1082), presenta una elevata similarità (87,7%) con la sequenza complementare di un Bov-tA (Lenstra *et al.*, 1993) e si caratterizza al 5' per la sequenza ripetuta CTT (GTT)₃ T.

Il quinto ed ultimo retroposone (277 bp) è localizzato al 13° introne (dal nt -1231 al nt -954 rispetto all'esone 14), mostra un omologia del 83,9% con un elemento Bov-A2 complementare, in accordo con Lenstra *et al.* (1993). Tale retroposone si caratterizza all'estremità 5' per una caratteristica sequenza microsatellite (CTGCTGCTGCTGCTGCTG) risultata polimorfa nei 3 campioni sequenziati. I due elementi Bov-A sono inoltre intervallati dalla sequenza tandem: AATGCAGG AAA (GTG) AAAA (GTG) AAA (GTG).

Tra i nucleotidi +145 e +212 del 16° introne è stata inoltre individuata una caratteristica sequenza complementare ad un ART-A troncato con una omologia dell'89,2%.

L'analisi ed il confronto con le sequenze omologhe del gene *LTF* bovino ha evidenziato in quest'ultima specie la presenza di almeno altri 2 elementi retroposonici. In particolare, al 4° introne il bovino si caratterizza per la presenza di un Bov-A complementare e fiancheggiato a monte e a valle dalla sequenza ripetuta GGTAGCTGACTC, presente in singola copia nella capra,



mentre al 9° introne per l'inserzione di un tratto di DNA di 616 bp recante al suo interno un Bov-A2 di 331 bp (Seyfert *et al.*, 1994).

Inoltre la sequenza relativa al 13° introne bovino (Seyfert *et al.*, 1994), sequenziata solo parzialmente per la specie caprina, ha messo in evidenza altri 2 elementi di origine retroposonica: un Bov-tA e un Bov-A2 (Fig. 11).

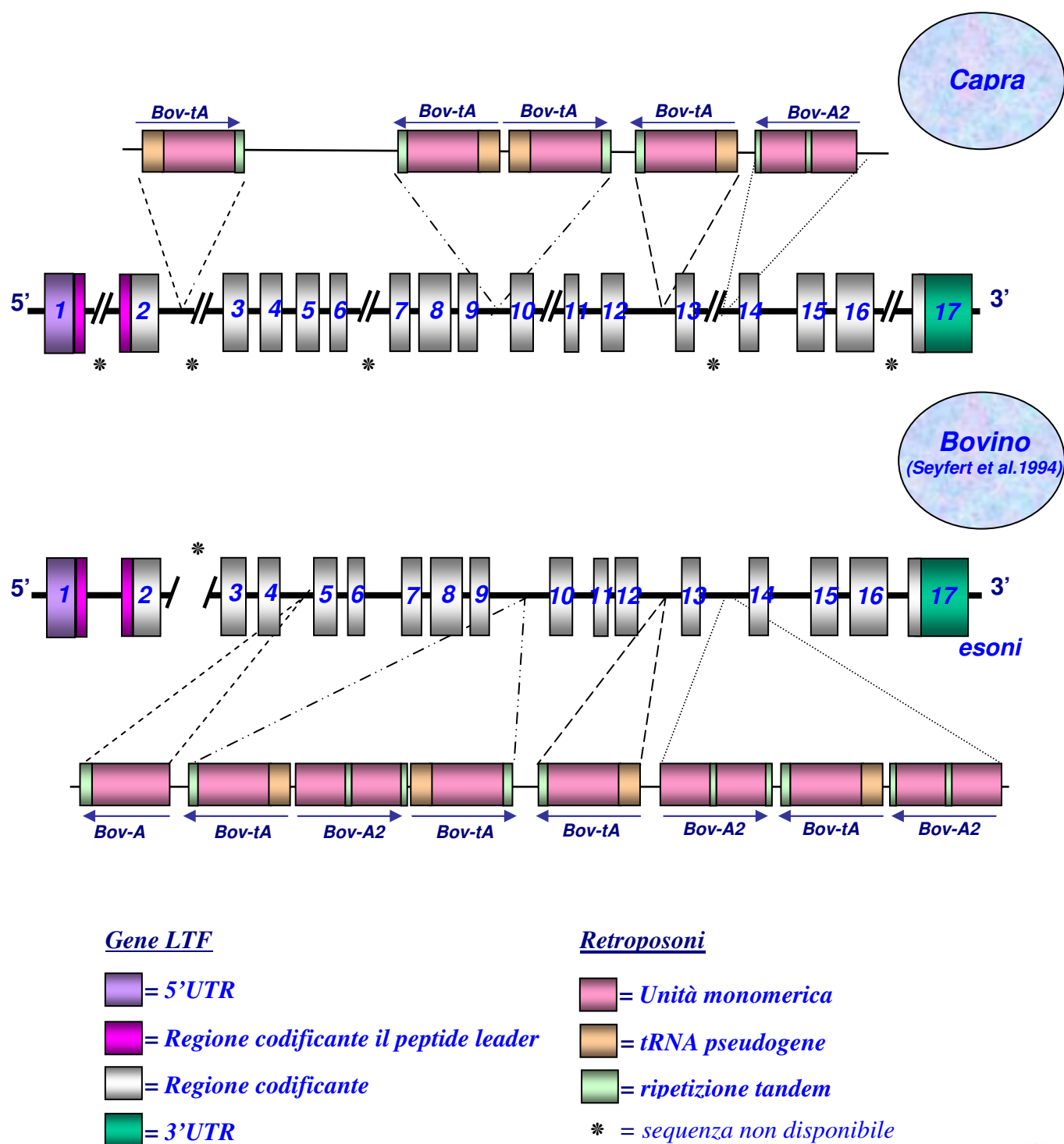


Fig. 11- Rappresentazione grafica degli elementi retroposonici. Confronto tra



4.4. Analisi del promotore

Al fine di individuare marcatori responsabili di differenze nell'espressione del gene della lattoferrina nella specie caprina, sono state sequenziate oltre 1600 bp della regione 5'UT a monte del primo esone (Fig. 12). La sequenza è stata depositata in EMBL ed è disponibile con numero di accesso: [AJ784283](#).

L'analisi strutturale ha evidenziato la presenza di diversi elementi regolatori. Analogamente a quanto osservato nel bovino (Seyfert *et al.*,1994), nella capra il gene *LTF* mostra due GATA factor e una TATA box non canonica localizzati rispettivamente ai nucleotidi -1250/-1245, -902/-897 e -28/-24, prendendo quale riferimento numerico (+1) il 1° nucleotide dell'esone 1 della sequenza relativa alla capra autoctona della provincia di Catanzaro. Inoltre, la regione 5'UT comprende almeno 3 GC box (-1369/-1364, -948/-934, -164/-159) e 2 siti SP1 (-200/-187, -69/-55). L'elevato contenuto in GC (64,9%) è una caratteristica tipica delle regioni regolatrici dei geni housekeeping e l'esistenza di questi siti potrebbe contribuire alla espressione costitutiva del gene nei vari tessuti (Teng, 1994). In particolare, la TATA box non canonica (ATAAA) in



posizione -28 e il sito SP1 in posizione -69 sono motivi quasi perfettamente conservati per 8 ben specie (bovino, uomo, suino, topo, ratto, cammello, capra e bufalo), suggerendo che questi due elementi possano giocare un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione del gene *in vivo* (Zheng *et al.*, 2005).

Il promotore si caratterizza inoltre per la presenza di 2 CCAAT/enhancer localizzati rispettivamente ai nucleotidi -914/-910 e -718/-714. Le CCAAT e GC box sono elementi “*cis*” che mostrano una moderata sinergia nelle funzioni regolatorie del promotore; inoltre, sono state identificati i corrispondenti fattori di trascrizione: alla CCAAT box si lega il fattore NF-Y, mentre le GC box sono riconosciute prevalentemente dal fattore Sp3 (Sugiura e Takishima, 2000).

È presente anche una CACCC box localizzata tra i nucleotidi -1557/-1552. La CACCC box caratterizza i promotori e gli enhancer di un gran numero di geni virali e di mammiferi ed è riconosciuto dal fattore Sp/KLF (Sp/Krüppel-like Factor) (van Vliet *et al.*, 2000).

La ricerca di potenziali siti di legame per fattori di trascrizione ha inoltre messo in evidenza che la regione compresa tra i nucleotidi -1009/-841 contiene tre potenziali LPS-responsive elements, in particolare, un sito STAT3 (-1009/-991), e due siti NF- κ B (-960/-949, -852/-838). Mentre STAT3 è noto come fattore di risposta a fasi acute, promuovendo la crescita e la guarigione cellulare, NF- κ B gioca un ruolo centrale nella risposta immunitaria e nei processi infiammatori, attraverso la sua abilità di incrementare l'espressione dei geni pro-



infiammatori (Caamano & Hunter, 2002); inoltre, NF- κ B può essere attivato dai LPS attraverso recettori Toll-like (Muzio *et al.*, 2000). Tali siti putativi di legame sembrano essere coinvolti nella espressione del gene indotta dai LPS.

Un recettore estrogeno è inoltre stato individuato tra i nucleotidi -46/-29. Probabilmente tale elemento è responsabile dell'espressione del gene estrogeno-indotta. E' infatti noto che la produzione di lattoferrina a livello dell'utero umano e murino, è stimolata da estrogeni (Teng *et al.*, 2002).

Un potenziale sito C/EBP (-675/-670) ed almeno un elemento YY1 (Yin and Yang factor 1) tra i nucleotidi -420/-415 sono presenti nella regione al 5' del gene della lattoferrina. Il fattore C/EBP è coinvolto nella attivazione trascrizionale del promoter della lattoferrina (Verbeek *et al.*, 1999), mentre è ancora da investigare la possibile influenza dell'elemento YY1 (Seto *et al.*, 1991) sulla espressione del gene.

E' stato inoltre individuato un segnale di poliadenilazione (AATAAA), localizzato ai nucleotidi +156/+162 dal segnale di terminazione della traduzione, caratteristico sito di inserzione per un acido poliadenilico all'estremo 3' di un RNA eucariotico dopo la sua trascrizione.

Il confronto delle sequenze relative alle tre le capre esaminate ha evidenziato 2 siti polimorfici: una transizione G→A (nt -333) e l'inserzione di una C realizzatasi tra i nucleotidi -87/-86.

Mentre la prima, apparentemente, non sembrerebbe interessare siti noti di regolazione genica, l'inserzione della citosina nella sequenza relativa alla capra



autoctona calabrese, sembrerebbe creare un sito di legame extra per un recettore estrogeno AP-2 (Transcription Factor Activator Protein-2) (Williams *et al.*, 1988) la cui sequenza è GCCTGGGG.

Locale	-1671	AGTCAATGTT	GTGTTACTTC	ATTATTTTTG	TAATGGCTTA	TTGCAGTTAT
Maltese	-1671	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1671	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1621	TGATGAAAGC	AACTTTTAAT	GTTGCAACAC	TGTGTTTCCA	AACCATGAGA
Maltese	-1621	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1621	-----	-----	-----	-----	-----
			CACCC box			
Locale	-1571	GACCCTGGAT	CTGT CACCCC	AAAACCTGAC	TGGTGATCCT	CCCACTGAAC
Maltese	-1571	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1571	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1521	CTTGGATCCC	ACTCCTGTGC	CCAGCAAGCG	GGATCCCTAG	TCAGACTCCA
Maltese	-1521	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1521	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1471	CTCATGTGCC	TTGGCAGGAT	CCATGCCCAG	GATAGAGGGG	CCCCACAGTC
Maltese	-1471	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1471	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1421	TCCTCGAGGG	CCTCCAAAAC	GGGCTGGCTC	TGCTTCGCCA	TGGTGCCAAG
Maltese	-1421	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1421	-----	-----	-----	-----	-----
			GC signal			
Locale	-1371	TG CCGCCC AC	TGCATATCCA	CCCCAACAG	GGCCGTCTCC	CGAGGTATTG
Maltese	-1371	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1371	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1321	CCCCTCTGCC	CCTGGAAACC	CTTTGTGTAC	TCAGTAGTCT	AAGCAAAGAA
Maltese	-1321	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1321	-----	-----	-----	-----	-----
				GATA		
Locale	-1271	TCAAGGCCAG	CTTTTCAGGA	CAGATAG AATT	TCAGAATAAC	ATACTGTCCA
Maltese	-1271	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1271	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1221	GACTAACCCA	CGTAGGGAAT	TTCTCTCACT	CTTAGGACCT	GACTTCTTCA
Maltese	-1221	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1221	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1171	CTTAGTATCT	CCTGGAGCTA	AGTGCTCATC	GGTACTTGCA	TGGTGGCCCT
Maltese	-1171	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1171	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1121	TTCTCTCTGG	GCCCCCAGT	GTGTTTCAGA	GCATCATGCT	CTATGTGACA
Maltese	-1121	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1121	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-1071	CCCCCTGTT	TTTTGTTTTT	TTTTTTTTTT	AAATTTTGGC	CACACCTCAC
Maltese	-1071	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1071	-----	-----	-----	-----	-----
				STAT3		
Locale	-1021	AGCATATGGG	AT CTTAGTTC	CCCCAAGTGG	GTTTGAACCT	GCACATGCTG
Maltese	-1021	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-1021	-----	-----	-----	-----	-----



				NF-κB		GC signal		
Locale	-971	CATCGGAAGC	G	CCCCGGGAAG	TCC	TGCCCC	ACCCCTTGAT	GGACATTTAG
Maltese	-971	-----		-----		-----	-----	-----
Saenen	-971	-----		-----		-----	-----	-----
				CAAT		GATA		
Locale	-921	TTTGTTT	GCA	ATCAGTGAA	T	GATAA	GCAGG	GCTGCACTGG
Maltese	-921	-----		-----		-----	-----	-----
Saenen	-921	-----		-----		-----	-----	-----
						NF-κB		
Locale	-871	GTGGGAGTCA	TTGTGCTTCA	AGGGAGTGTA	TTTC	GAGGAT	GCAGAGCAGA	
Maltese	-871	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Saenen	-871	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Locale	-821	CTAGCTTTAG	AATTGAAAAC	CAGCTTCCTG	AAACAGGGTC	AGCCTGTGTA		
Maltese	-821	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-821	-----	-----	-----	-----	-----		
Locale	-771	CTGAGGACAA	AATAGGACAT	TTATCAAAAT	GAGGTTCTTA	TCTCCACCT		
Maltese	-771	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-771	-----	-----	-----	-----	-----		
				CAAT				C/EBP
Locale	-721	CAT	ATTGCA	CAAAACAAAA	CAAGTGGTAG	GATATCCTTT	TCATTG	GCAA
Maltese	-721	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-721	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-671	AT	GAGGGACC	AGGAGAGCCT	TTGGGCACTT	AGGCCTCTGG	TTCTGTTTTC	
Maltese	-671	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Saenen	-671	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Locale	-621	TGGGAGCTGT	ATTAGTCTC	AGGAGGGCCC	CAGAGGCAGT	CTGGGTCAGA		
Maltese	-621	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-621	-----	-----	-----	-N-	-----		
Locale	-571	CTCTGGGCAG	CATATTGCCT	CTGCCAGTTG	GACCAAGCTG	CTGTGGACCC		
Maltese	-571	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-571	-----	-----	-----	-----	-----		
Locale	-521	CGGGCCAGGC	AGCGGGTCTT	CTTTCAAAAC	TCCAGGCTGG	CTGCTGCGTG		
Maltese	-521	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-521	-----	-----	-----	-----	-----		
Locale	-471	CAGACGCAAG	GATCTCCGTC	TGCCTCAACT	GTTTCCAAG	CACTTTAGAT		
Maltese	-471	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-471	-----	-----	-----	-----	-----		
				YY1				
Locale	-421	A	CCATCT	GTA	CAGTCAAGCT	GATCCGCAAA	GATTCACCTT	AGGACCCCTG
Maltese	-421	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Saenen	-421	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Locale	-371	CTCTAGGTGC	CGATCTCCAG	AAGGCACTGA	GACCAGAGGG	GGGACAAAAC		
Maltese	-371	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-371	-----	-----	-----	-----	-----		
						G-		
						A-		
Locale	-321	TCAGGGACTG	CCACTCCCGA	GGGGTGC	GGG	ACAAGTGGGA	AGGAAAGAGC	
Maltese	-321	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Saenen	-321	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Locale	-271	ATCCCCAAC	TAGGCAGCGC	TGGGGGGACT	TGAGAGGTGG	GTGTGGGTTG		
Maltese	-271	-----	-----	-----	-----	-----		
Saenen	-271	-----	-----	-----	-----	-----		
						SP1		
Locale	-221	GGTATCCTCT	CCCCGAGCGC	CAAGCCCGCC	CGGG	ACCTT	TCCTGCTCCC	
Maltese	-221	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Saenen	-221	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
						GC signal		
Locale	-171	TCGTTCT	CCG	CCC	CCACCTC	CCCCCTTCCC	CCAGTTCTTC	CCCTCTAGGA
Maltese	-171	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



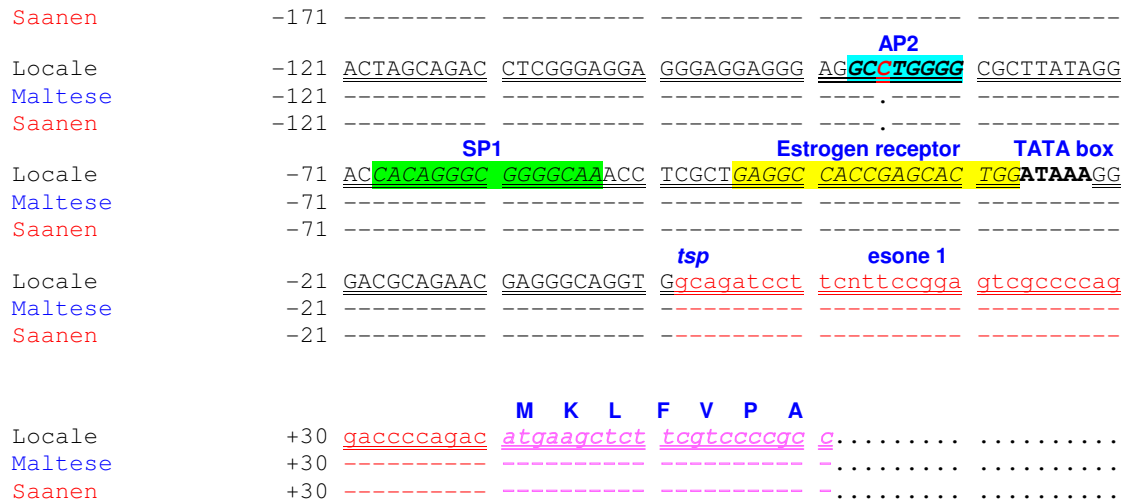


Fig. 12- Sequenza nucleotidica della regione promotrice del gene della lattoferrina caprina, depositata in EMBL con Accession No. [AJ784283](#). I siti putativi riconosciuti da fattori di trascrizione sono evidenziati con diversi colori. Il sito di inizio trascrizione (*tsp*) è in carattere rosso. La regione GC rich è sottolineata. In violetto è indicato l'inizio della traduzione.

4.5. Analisi delle regioni esoniche

Sono stati sequenziati tutti i 17 esoni per un totale di 2333 nucleotidi del gene che codifica per la lattoferrina nelle tre capre esaminate. Il confronto delle sequenze ottenute non ha evidenziato alcuna differenza nucleotidica.

Sono stati identificati 5 potenziali siti di glicosilazione (Asn-X-Ser/Thr), rispettivamente localizzati tra i nt +51/+59 del 7° esone, nt +16/+24 del 8° esone, nt +102/+110 dell'esone 9, nt +133/+141 del 12° esone e nt +41/+49 dell'esone 14. Solo uno di questi si realizza nel lobo N-terminale della molecola, gli altri 4 si collocano nel lobo C-terminale in accordo con Le Provost *et al.* (1994).

Il confronto delle sequenze esoniche con le sequenze relative ai cDNA caprini depositati in banca dati (EMBL accession numbers: [X78902](#), [U53587](#)) ha messo in evidenza la presenza di una nuova mutazione: transizione T→G al



nucleotide 12 dell'esone 9 (Fig. 17), responsabile del cambiamento aminoacidico Leu³⁵⁷→Val della proteina matura (Tabella 7).

Tale mutazione individuerebbe un nuovo allele al *locus LTF* nella specie caprina.

La presenza della guanina al 12° nucleotide dell'esone 9 **GTG**^{Val} caratterizza anche la sequenza relativa al cDNA della specie umana (Rey *et al.*, 1990), bovina (Mead *et al.*, 1990), murina (Pentecost *et al.*, 1987), suina (Alexander *et al.*, 1992), bufalina (Karthikeyan *et al.*, 2000) e, pertanto, rappresenterebbe la condizione ancestrale del gene (Fig. 13).

		<i>Esoni 9</i>				
		10	20	30	40	50
gLTF	1	CCGCGGAGGA	G GTG AAGGCG	CGGTGCACGC	GGGTCGTGTG	GTGCGCGGTG
gpLTF (X78902)	1	-----	-TTG-----	-----	-----	-----
gyLTF (U53857)	1	-----	-TTG-----	-----	-----	-----
bLTF (NM180998)	1	-T-----	- GTG -----	----A---CA	-----	---T--C---
buLTF (AJ005203)	1	-T-----	- GTG C-----	---C--G--A	-----	-----
hLTF (NM002343)	1	GT-A-----	A GTG GCT--C	---C-TG---	-----	---T-----
mLTF (NM008522)	1	AGCA-C----	T GTG -TA--C	TCAAAGG-C-	----ACA--	---T--C---
pLTF (L77887)	1	-G--A-C---	- GTG G-----	---CAGG--A	A-----	-----C---

Fig. 13 - Confronto dei primi 50 nucleotidi della sequenza relativa all'esone 9 del gene LTF caprino con le sequenze caprine già depositate (gp e gy) e con la controparte bovina (b), bufalina (bu), umana (h), murina (m) e suina (p). In rosso, la guanina al 12 nt che rappresenterebbe la condizione ancestrale del gene. I trattini (-) corrispondono a identici nucleotidi.

Il confronto delle restanti regioni esoniche evidenzia la presenza di altre 8 differenze con la capra di razza Saanen, sequenziata da Le Provost *et al.* (1994) (EMBL n° di accesso [X78902](#)) delle quali 5 sono responsabili di 4 cambiamenti aminoacidici.

Analogamente, il confronto di sequenza con il cDNA disponibile per la capra nativa della Corea, sequenziata da Lee *et al.* (1997) (EMBL n° di accesso



[U53587](#)) ha messo in evidenza altre 7 differenze nucleotidiche, 3 delle quali sono responsabili di 2 cambiamenti aminoacidici (Tabella 7).

Fatta eccezione per la transversione al 9° esone, le restanti 15 differenze nucleotidiche erano già note e rappresentano le mutazioni che differenziano la capra “Francese” dalla capra “Coreana” (Lee *et al.*, 1997) (Tabella 3).

Ne risulta, pertanto, che la sequenza del gene della lattoferrina che caratterizza le tre capre prese in esame possa rappresentare una nuova e particolare combinazione allelica (aplotipo C) rispetto a quella che caratterizza la capra di razza Saanen riportata Le Provost *et al.* (1994) (aplotipo A) e la capra nativa della Corea riportata da Lee *et al.*, (1997) (aplotipo B) (Fig. 14).

La differente composizione aminoacidica stimata sulla base delle sequenze esoniche si traduce anche in un differente peso molecolare della proteina matura attesa: ~77327 Da (aplotipo C) vs ~75432 Da (aplotipo A) e vs ~75442 (aplotipo B).



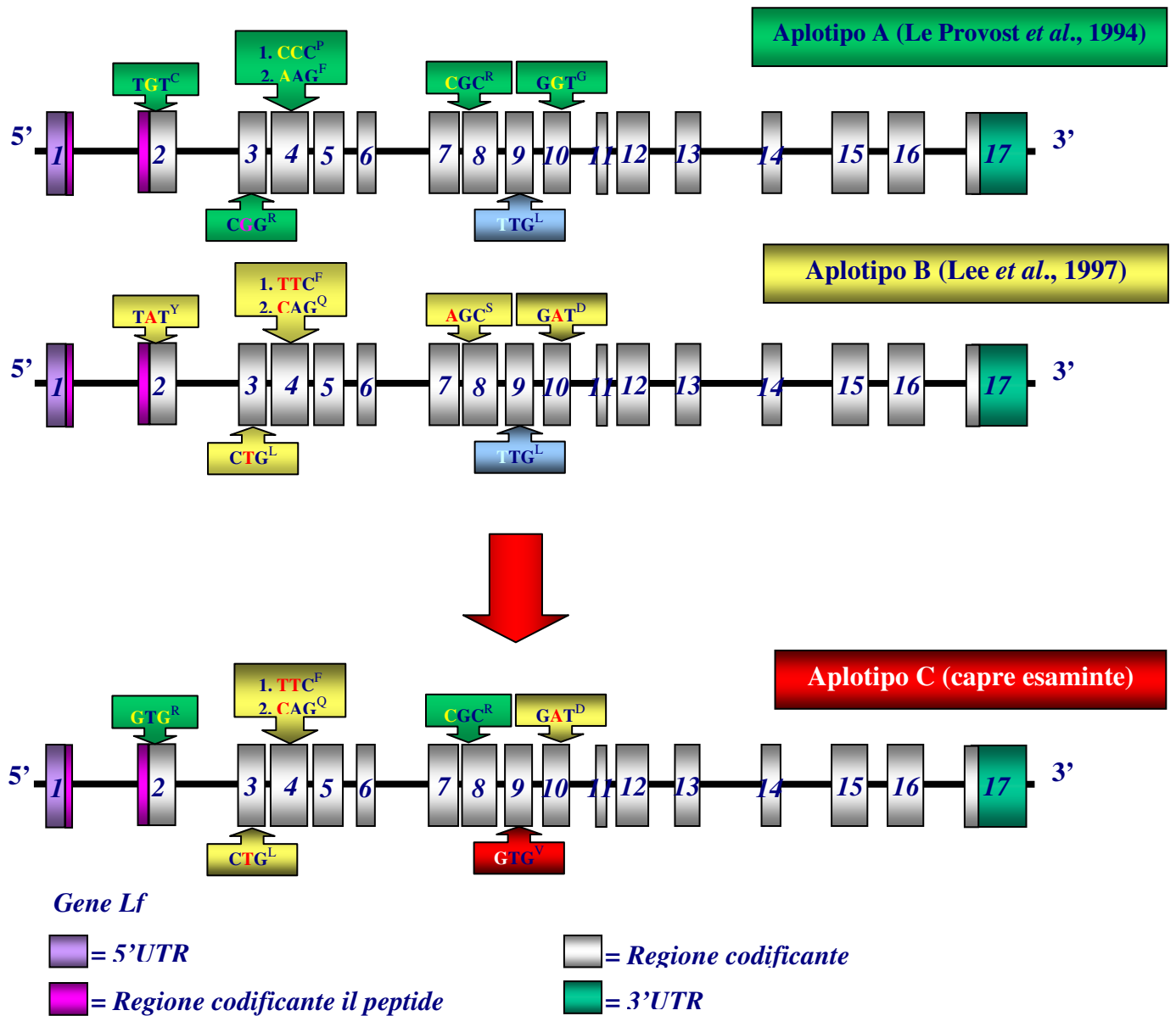


Fig. 14- Rappresentazione grafica degli aplotipi A, B e C. L'aplotipo C sembrerebbe essere una combinazione dei primi due.

ESONE	Capre oggetto di studio			Saanen Le Provost <i>et al.</i> , 1994			Corana Lee <i>et al.</i> , 1997		
	Posizione	Mutazione	aa	Posizione	Mutazione	aa	Posizione	Mutazione	aa
2	121	TGT	Cys	121	TGT	Cys	121	TAT	Tyr
2	123	GTG	Val	123	GTG	Val	123	ATG	Met
3	56	CTG	Leu	56	CGG	Arg	56	CTG	Leu
4	54	CAG	Gln	54	AAG	Lys	54	CAG	Gln
4	74	GGC	Gln	74	GGT	Gln	74	GGC	Gln
4	144-145	TTC	Phe	144-145	CCC	Pro	144-145	TTC	Phe
8	28	CGC	Arg	28	CGC	Arg	28	AGC	Ser
9	12	GTG	Val	12	TTG	Leu	12	TTG	Leu
10	29	GAT	Asp	29	GGT	Gly	29	GAT	Asp
14	64	ACA	Thr	64	ACA	Thr	64	ACG	Thr
16	9	TTC	Phe	9	TTT	Phe	9	TTC	Phe
17	104	G	-	104	G	-	104	A	-
17	122	G	-	122	G	-	122	A	-
17	123	A	-	123	A	-	123	C	-
17	205	A	-	205	T	-	205	A	-

Tabella 7- Confronto delle differenze esoniche.



4.6. Caratterizzazione degli aplotipi

Allo scopo di stimare la distribuzione degli aplotipi osservati e, eventualmente, di identificarne nuovi, sono state tipizzate 185 capre appartenenti a diverse razze/popolazioni locali allevate nell'Italia meridionale.

L'indagine è stata condotta utilizzando la metodica della PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) per le transizioni G→T al 56° nucleotide del 3° esone, A→C al 28° nucleotide dell'8° esone e T→G al 12° nucleotide del 9°.

4.6.1. PCR-RFLP al 3° esone

E' stato amplificato per mezzo di PCR il tratto di DNA che va dal 3° al 5° esone per un totale di 1059 bp.

La transizione G→T al 56° nucleotide del 3° esone è responsabile, oltre che del cambiamento aa Arg→Leu, della scomparsa di uno dei due siti di restrizione dell'endonucleasi *MspI* [C!CGG] all'interno del tratto amplificato.

La digestione con tale endonucleasi dei prodotti di amplificazione ha prodotto in tutti i campioni analizzati un unico pattern elettroforetico caratterizzato da due frammenti di restrizione, rispettivamente di 247bp e 812 bp (Figura 15). Pertanto tutti gli individui analizzati risultano omozigoti per la presenza della Timina al 56° nucleotide del 3° esone.



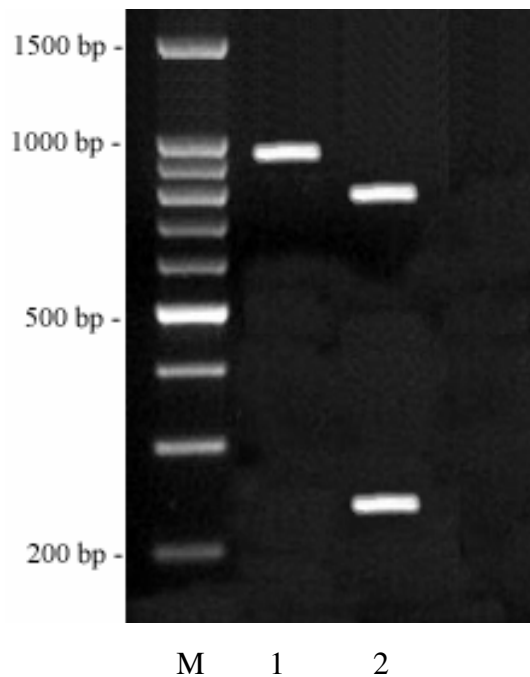


Fig. 15- Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra il 3° ed il 5° esone del gene *LTF* di capra (line 1) e successiva digestione con l'endonucleasi *MspI* (line 2). M = Marker 100 bp

4.6.2. PCR-RFLP all' 8° esone

L'amplificazione per mezzo di PCR della regione di DNA che va dal 7° esone al 9° esone ha prodotto un frammento di circa 1348 bp.

La transizione A→C al 28° nucleotide dell'8° esone è responsabile a livello aminoacidico della sostituzione Ser→Arg e a livello nucleotidico della creazione di un 4° sito di restrizione dell'endonucleasi *HaeII* [A/GGC**GC**!T/C] all'interno del tratto amplificato. La digestione con tale endonucleasi dei prodotti di amplificazione ha prodotto, in tutti i campioni analizzati, un unico pattern elettroforetico caratterizzato da 5 frammenti di restrizione

rispettivamente di 61bp, 97 bp, 187 bp, 432 bp, 571 bp (Figura 16). Pertanto tutti gli individui analizzati risultano omozigoti per la presenza della Citosina al 28° nucleotide dell'8° esone.

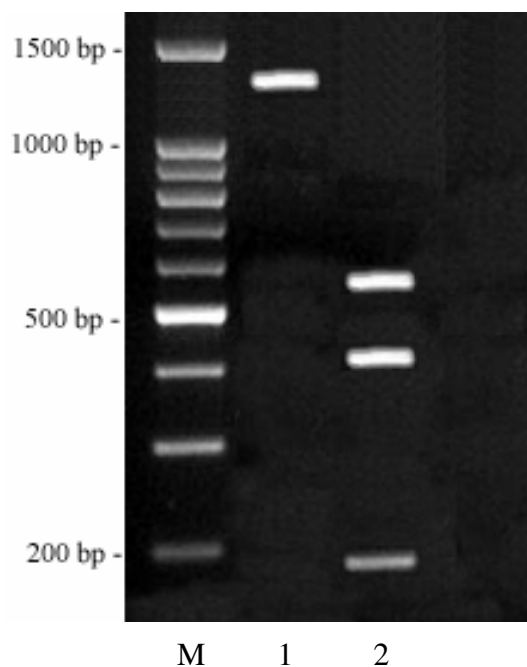


Fig. 16- Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra il 7° ed il 9° esone del gene *LTF* di capra (line 1) e successiva digestione con l'endonucleasi *HaeII* (line 2). M = Marker 100 bp

4.6.3. PCR-RFLP al 9° esone

E' stato amplificato per mezzo di PCR il tratto di DNA di 328 bp comprendente parte dell'8° introne e tutto il 9° esone.

La transizione T→G al 12° nucleotide del 9° esone è responsabile della sostituzione aa Leu→Val e della creazione di un unico sito di restrizione dell'endonucleasi *HphI* [G**G**TGA(N)₈!] all'interno del tratto amplificato.

La digestione con tale endonucleasi dei prodotti di amplificazione ha prodotto, in tutti i campioni analizzati, un unico pattern elettroforetico caratterizzato da due frammenti di restrizione rispettivamente di 186 bp e 142 bp (Figura 17).

Pertanto tutti gli individui analizzati risultano omozigoti per la presenza della Guanina al 12° nucleotide del 9° esone.

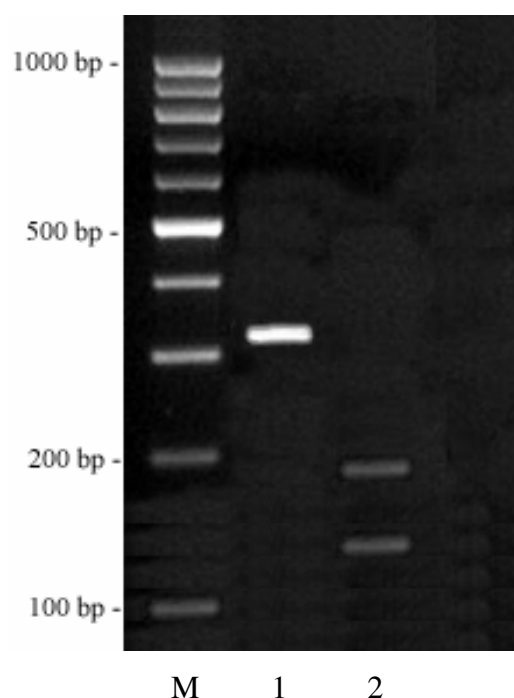


Fig. 17- Tracciato elettroforetico del prodotto di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA compreso tra l'8° introne ed il 9° esone del gene *LTF* di capra (line 1) e successiva digestione con l'endonucleasi *HphI* (line 2). M = Marker 100 bp

L'indagine di popolazione dunque ha messo in evidenza che le capre appartenenti a diverse razze/popolazioni allevate nell'Italia meridionale si potrebbe caratterizzare per la sola presenza dell'aplotipo C.

4.7. Localizzazione fisica del gene LTF

Un metodo FISH è stato sviluppato allo scopo di mappare il gene della lattoferrina nella specie caprina. Un frammento di 1347 bp comprendenti il 7° esone e gran parte del 9° esone del gene della lattoferrina è stato amplificato mediante PCR e marcato con biotina. Il successivo trattamento con avidina-FITC e antiavidina-biotina ha consentito una amplificazione notevole del segnale di ibridazione secondo lo schema riportato in figura 18.

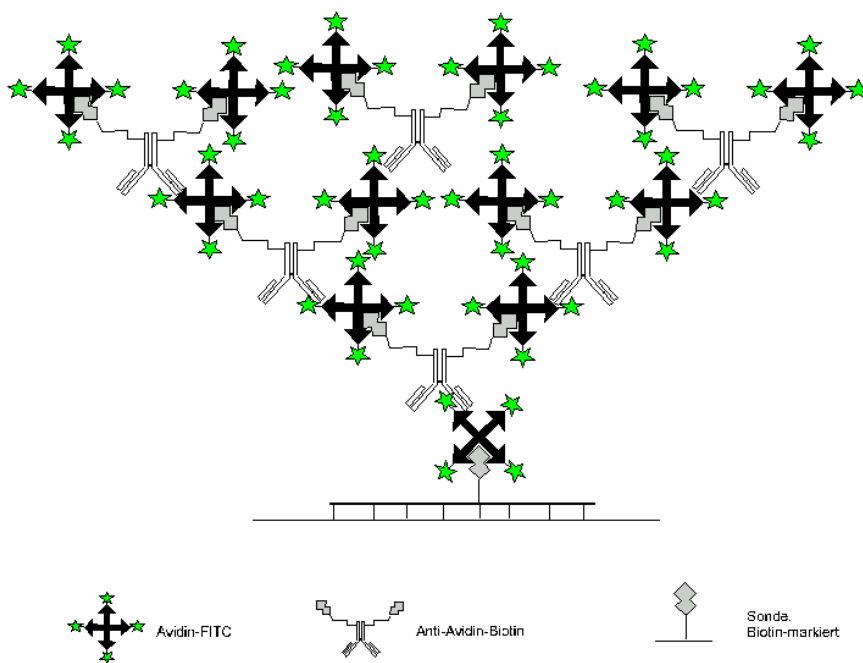


Fig. 18- Sonda marcata con biotina. Schema di amplificazione del segnale di ibridazione per mezzo di avidina-FITC e antiavidina-biotina.

I cromosomi con segnale di ibridazione sono stati identificati in accordo con lo standard internazionale (Di Berardino *et al.*, 2001). Delle 15 metafasi bandeggiate G, il 100% ha esibito uno specifico segnale fluorescente indicando una precisa posizione cromosomica: la regione telomerica. Il segnale di

ibridazione si presenta con due spot simmetrici, risultato del riconoscimento del gene sul cromosoma (figura 19).

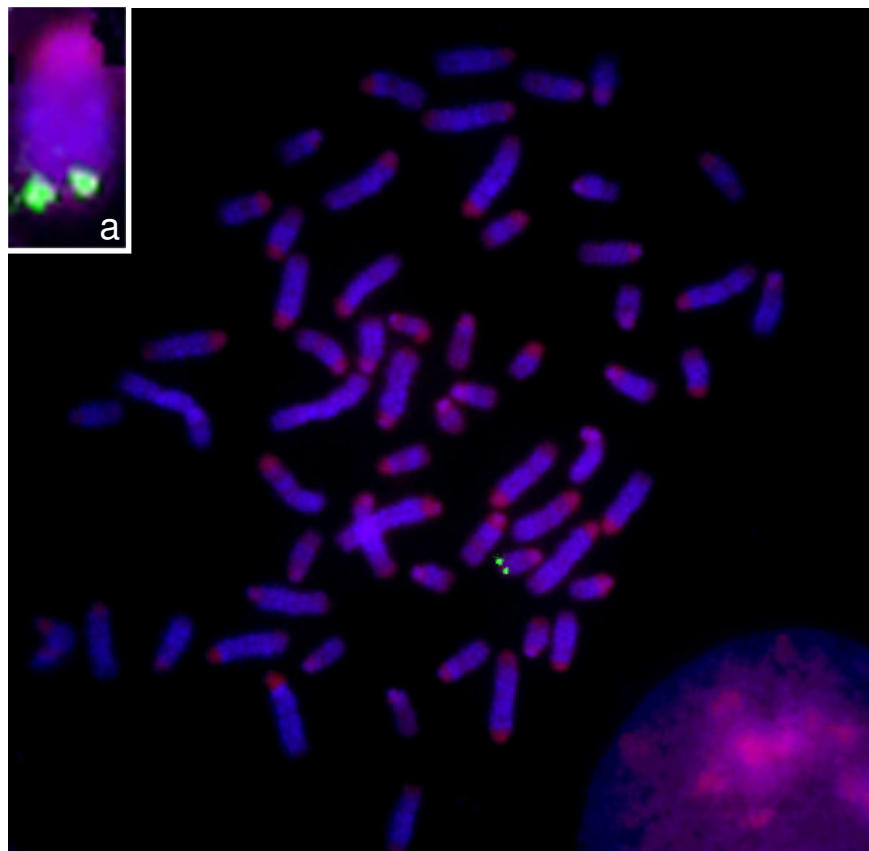


Fig. 19- Ibridazione in situ fluorescente con sonda biotinilata specifica per il gene della lattoferrina caprina. Segnale FITC nella regione telomerica del cromosoma 22.

Nessun segnale di ibridazione è stato riscontrato su altre regioni cromosomiche. Precedenti esperimenti basati sull'analisi di cellule somatiche ibride hanno consentito di assegnare il *locus LTF* al gruppo sintenico U12, corrispondente al cromosoma 22 bovino, con coefficiente di correlazione pari a 0.76 (Le Provost *et al.*, 1994). In accordo con Schibler *et al.* (1998), i dati sperimentali confermano che nella specie caprina il gene della lattoferrina è

citogeneticamente localizzato sul braccio lungo (q) del cromosoma 22, nella regione 24 (fig. 20).

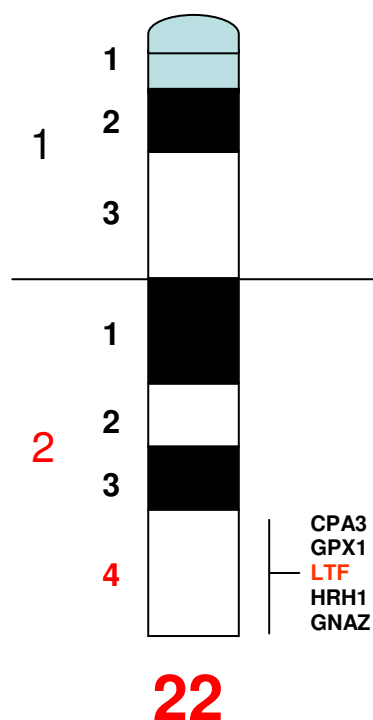


Fig. 20- Rappresentazione schematica del cromosoma 22 caprino con bandeggio G e localizzazione del gene LTF nella regione q24.

Analogamente a quanto evidenziato per la specie bovina, il *locus LTF* caprino, sebbene probabilmente generato dalla duplicazione di un gene ancestrale codificante per una transferrina (Williams, 1982), non è localizzato nella stessa regione cromosomica di quest'ultimo, come invece appare nell'uomo (Yang *et al.*, 1984) e nel topo (Teng *et al.*, 1987). La loro localizzazione su due differenti cromosomi (22 e 1 rispettivamente) indica che nel corso dell'evoluzione un breakage ha caratterizzato questi due loci, confermando il processo di divergenza genetica che ha separato le diverse specie.

Probabilmente nel processo evolutivo, un break si è realizzato a livello del centromero del cromosoma 3 umano, separando il braccio corto (p) da quello lungo (q). Un segmento del braccio p si è quindi riarrangiato andando a costituire parte del cromosoma 22, mentre una porzione del braccio q si è probabilmente inserito tra le regioni 21q22.1 e 21q22.3 del cromosoma 21 come conseguenza di un nuovo break (Le Provost *et al.*, 1994), andando a costituire parte del cromosoma 1 (Fig. 21).

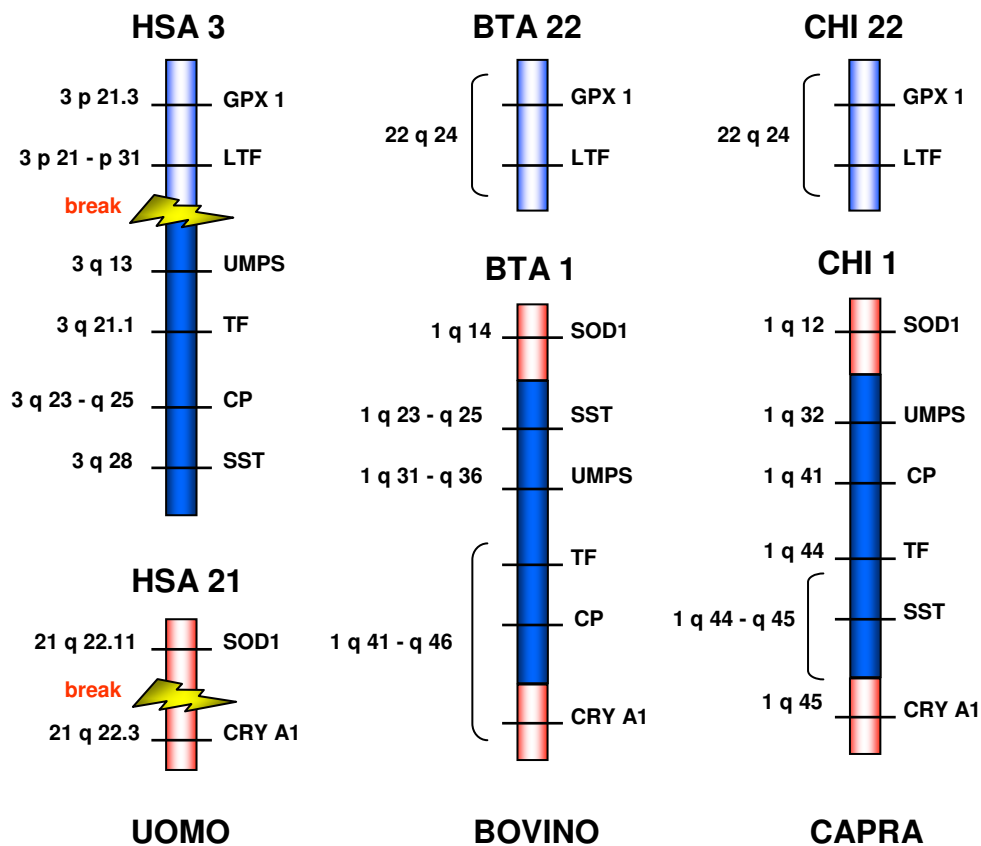


Fig. 21- Rappresentazione schematica del probabile riarrangiamento cromosomico realizzatosi nel processo evolutivo che differenzia la specie caprina e bovina da quella umana.

GPX 1: glutatione per ossidasi 1; LTF: lattoferrina; UMPS: uridina monofosfato sintetasi; TF: transferrina; CP: ceruloplasmina; SST: somatostatina; SOD 1: superossido dismutasi 1; CRY A1: α -1 cristallino.

Questa ipotesi è supportata dal fatto che, nella specie umana, i geni SOD 1 e CRY A1 sono separati da 67 cM nei maschi e 62 cM nelle femmine (Petersen *et al.*, 1991), mentre nella specie bovina e probabilmente nella specie caprina, questi loci sono separati da 146 cM (Barendse *et al.*, 1993).

Ulteriori fenomeni di riarrangiamento hanno poi differenziato la specie caprina da quella bovina. Infatti, la mappa genica delle due specie evidenzia un differente ordine lungo il segmento cromosomico in esame (INRA database).



5. CONCLUSIONI

Il gene della lattoferrina (*LTF*) caprina è citogeneticamente localizzato sul braccio lungo (q) del cromosoma 22, nella regione 24 (Fig. 19 e 20). Relativamente alle regioni sequenziate, esso mostra un'organizzazione molto simile a quella dell'omologo gene nella specie bovina, con alcune differenze sulla dimensione delle regioni introniche.

Infatti, l'analisi del gene *LTF*, effettuata sulla base delle sequenze sovrapponibili tra le due specie, ha evidenziato un rapporto introni/esoni più alto nel bovino (1: 10,02) rispetto alla capra (1: 8,57).

Tale differenza è dovuta principalmente alla presenza addizionale di altri due elementi retroposonici negli introni 4 e 9 della sequenza bovina (Fig. 11) i quali, presumibilmente, sono da ritenersi eventi mutazionali realizzatesi successivamente al fenomeno di divergenza genetica che ha differenziato le due specie. Pertanto, questi elementi rappresentano un utile strumento per una più attenta analisi filogenetica delle principali specie dei ruminanti.

Gli elementi di origine retroposonica possono posizionarsi indifferentemente in ogni porzione del genoma: negli esoni, negli introni oppure nelle regioni intergeniche. Essi possono costituire parte integrante dell'ORF (Open Reading Frame), essere coinvolti in diverse funzioni regolatorie, servire da "hot-spots" di ricombinazione o essere implicati in processi funzionali e strutturali di nuovi geni.



Più frequentemente, il fenomeno di espansione genomica ad opera di inserzioni retrosoniche interessa regioni intergeniche ed introniche e ciò potrebbe essere interpretato come una conveniente strategia evolutiva, adottata dalla maggior parte degli organismi, per rendere meno esposte alle mutazioni le regioni più vulnerabili: esoni, promoter o altre regioni regolatrici.

Il confronto tra le parziali sequenze introniche relative al gene *LTF* delle tre capre esaminate ha evidenziato la presenza di 138 siti polimorfici (54 transizioni, 53 transversioni, 2 inversioni e 33 singole o multiple delezioni/inserzioni nucleotidiche) con un rapporto transizione/trasversione (*ti/ts*) di 1,02. 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 delle specie (Yang and Yoder, 1999).

L'analisi delle sequenze esoniche relative alle tre capre oggetto d'indagine ed il loro confronto con le sequenze disponibili in banca dati ha permesso di evidenziare una nuova mutazione puntiforme: transizione T→G al 12° nucleotide del 9° esone, responsabile del cambiamento aminoacidico Leu³⁵⁷/Val. Tale mutazione consente, pertanto, di poter evidenziare un nuovo allele al *locus LTF* di capra, denominato *LTF*^C.

E' ipotizzabile che tale mutazione si sia realizzata su di un allele (*W*_?) con caratteristiche intermedie tra l'allele *LTF*^A e *LTF*^B per la presenza di 8 mutazioni in comune con il primo e 7 con il secondo.



L'indagine di popolazione condotta su diverse razze/popolazioni allevate nell'Italia meridionale ha rivelato che il nuovo aplotipo C è monomorfo in tutte le capre.

L'81,8% circa delle mutazioni osservate si è realizzata tra il 2° ed il 10° esone del gene, conferendo alla corrispondente regione codificata (lobo N-terminale e parte del primo dominio del lobo C-terminale) una maggiore suscettibilità a modificazioni strutturali.

Sulla base di tali osservazioni è possibile ipotizzare che il secondo dominio C-terminale della proteina matura (codificato dagli esoni 11-17) possa svolgere un ruolo di maggiore rilievo nella funzionalità propria della lattoferrina.

In generale, la differente composizione aminoacidica della lattoferrina codificata dall'aplotipo *LTF^C* potrebbe essere responsabile di una differente attività antibatterica rispetto a quella già riportata.

Tuttavia, le differenze nell'attività antimicrobica di tale gene potrebbero anche essere la diretta conseguenza di più elaborati sistemi di regolazione genica. La maggior parte delle analisi dei caratteri quantitativi di interesse zootecnico è finalizzato alla ricerca di associazioni tra il carattere in esame e mutazioni all'interno del gene candidato. Ad esempio, è noto che le sequenze regolatorie giocano un ruolo primario nel determinare il livello e la specificità dell'espressione genica.



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. Tali mutazioni potrebbero, pertanto, essere responsabili di differenze quali-quantitative nel livello di trascritti. Un'analisi più approfondita delle regioni fiancheggianti il 5' ed il 3' del gene *LTF* di capra potrebbe fornire un importante contributo per stimare il ruolo e l'importanza dei fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione dei geni delle proteine del latte. Ad esempio, l'identificazione di nuovi polimorfismi e l'ulteriore analisi delle 2 differenze osservate nella regione fiancheggiante il 5' del gene *LTF* di capra e, in particolar modo, della inserzione di una citosina tra i nucleotidi -87/-86, responsabile della creazione di un probabile sito di legame in direzione 3'→5' del fattore AP-2 (GCCTGGGG), potrebbe offrire delle indicazioni preziose circa i meccanismi di regolazione genica che controllano la sintesi di mRNA e che, potrebbero essere responsabili del differente livello di attività antibatterica della lattoferrina in tale specie.

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 e applicazioni in esperimenti transgenici derivanti dall'individuazione di una sequenza genica.



6. BIBLIOGRAFIA

Agamy E., I., Ruppaner R., Ismail A., Champagne C.P., Assaf R. (1992). Antibacterial and Antiviral Activity of Camel Milk Protective Proteins. *Journal of Dairy Research*, **59** (2): 169-175.

Aisen P., Listowsky I. (1980). Iron transport and storage proteins. *Annual Review of Biochemistry*, **49**: 357-393.

Alasis C. (2000). Scienza del latte . Principi di tecnologie del latte e dei derivati. Milano.

Alexander L.J., Levine W.B., Teng C.T., Beattle C.W. (1992). Cloning and sequencing of the porcine lactoferrin cDNA. *Animal Genetics*, **23**: 251-256.

Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rice D.W., Baker E.N. (1989). Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **209**: 711-734.

Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rumball S.V., Baker E.N. (1990). Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrin. *Nature*, **344**: 784-787.



Appelmelk B.J., An Y.Q., Geerts M., Thijs B.G., De Boer H.A., Mac Laren D.M., De Graaff J., Nuijens J.H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*, **62**: 2628-2632.

Arnold R.R., Russel J.E., Champion W.J., Gauthier J.J. (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical condition and metabolic state of the target microorganism. *Infection and Immunity*, **32**: 655-660.

Baeuerle P.A. (1995). Enter a polypeptide messenger. *Nature*, **373**: 661-662.

Baker H.M. & Baker E.N. (2004). Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*, **17**:209-216.

Baranov, V. S.; Schwartzman, A. L.; Gorbunova, V. N.; Gaitskhoki, V. S.; Rubtsov, N. B.; Timchenko, N. A.; Neifakh, S. A. (1987). Chromosomal localization of ceruloplasmin and transferrin genes in laboratory rats, mice and in man by hybridization with specific DNA probes. *Chromosoma*, **96**: 60-66.



Barendse W., Armitage S.M., Ryan A.M., Moore S.S., Clayton D., Georges M., Womack J.E., Hetzel J. (1994). A genetic map of DNA loci on bovine chromosome 1. *Genomics*, 18 (3): 602-608.

Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M., Yamauchi k. (1992a). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1121**: 130-136.

Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. (1992b). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**: 472-479.

Bevilacqua C., Ferranti P., Garro G., Veltri C., Lagonigro R., Leroux C., Pietrolà E., Addeo F., Chianese L., Martin P. (2002). Interalleli recombination is probably responsabile for the occurrence of a new alpha-s-1 casein variant found in the goat species. *European Journal of Biochemistry*, **269** (4): 1293-1303.

Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P. (1994). Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Research*, **54**: 2310-2312.



Bortner C.A., Arnold R.R., Miller R.D. (1989). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophyla*: effect of the physiological state of the organism. *Canadian Journal of Microbiology*, **35**: 1048-1051.

Boulanger A., Groskulade F., MaheM.F. (1984). Polymorphism of caprine (*Capra hircus*) alpha-s-1 and alpha-s-2 caseins. *Genetique Selection Evolution*, **16**: 157-175.

Bourniol C., Prinz C., Mercier J.C. (1993). Bovine α s2-casein D is generated by exon VIII skipping. *Gene*, **128**: 289-293.

Brock J.H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemical and Cell Biology*, **80**: 1-6.

Broxmeyer H.E., Gentile P., (1983). Suppression of mouse myelopoiesis by administration of human lactoferrin in vivo and the comparative action of human transferrin. *Blood*, **61**: 982-993.

Bruns C.M., Nowalk A.J., Arvai A.S., McTigue M.A., Vaughan K.G., Mietzner T.A., McRee D.E. (1997). Structure of *Haemophilus influenzae* Fe³⁺-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily. *Nature Structural Biology*, **4**: 919-924.



Caamano J., Hunter C.A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**: 414-429.

Chandan R., Attaie T., Shahani K.M. (1992). Nutritional aspects of goat milk and its products: recent advances in goat production. *V International conference of goats, New Delhi.*

Choe Y. and Lee S. (1999). Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *Journal of Cellular Biochemistry*, **76**: 30-36.

Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G. (2000). Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**: 577-582.

Crosa J.H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiological Review*, **53**: 517-530.

Day C.L., Stowell H.M., Baker E.N., Tweedie J.W. (1992). Studies of the N-terminal half of human lactoferrin produced from the cloned cDNA



demonstrate that interlobe interactions modulate iron release. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**: 13857-13862.

Debski B., Picciano M.F., Milner I.A., (1987). Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *Journal of Nutrition*, **117**: 1091-1097.

De Curtis M., (1999). Le proteine nel latte umano e nelle formule. *Bambini e Nutrizione*, **6**: 124-127.

Desjeux J.F.(1993). Valeur nutritionnelle du **lait** de chèvre. Nutritional value of goat's milk. *Le lait*, **73**: 573-580.

De Sousa M., Breedvelt F., Pynesius-Trentham R., Trentham P., Lum J. (1988). Iron, iron-binding proteins and immune system cells. *Annals of New York Academy of Sciences*, **526**: 310-322.

Di Bernardino D., Di Meo G.P., Gallagher P.S. Hayes H., Iannuzzi L. (2001). International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB). *Cytogenetic Cell Genetic*, **92**: 283-299.



Ellison R.T., LaForce, F.M., Giehl, T.J. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram- bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*, **56**: 2774-2781.

Ellison R.T., LaForce, F.M., Giehl, T.J., Boose D.S., Dunn B.E. (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the gram – outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of General Microbiology*, **136**: 1437-1446.

Evans R.W., Oakhill J.S. (2002). Transferrin-mediated iron acquisition by pathogenic Neisseria. *Biochememical Society Transaction*, **30**: 705-707.

Frazer D.M., Anderson G.J. (2003). The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **30**: 288-297.

Gahr M., Speer C.P., Damerau B., Sawatzki G. (1991). Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, **49**: 427-433.



Grosculade F., Mahè M.F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. (1987).
A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat α s1-casein. *Genetique Selection Evolution*, **19**: 399-412.

Grossmann J.G., Neu M., Pantos E., Shwab F.J., Evans R.W., Townes-Andrews E., Appel H., Thies W.G., Hasnain S.S. (1992). X-ray solution scattering reveals conformational changes upon iron uptake in lactoferrin, serum, ovo-transferrins. *Journal of Molecular Biology*, **225**: 811-819.

Havanessian A.G., Awdeh Z.L. (1976). Gel isoelectric focussing of human serum transferrin. *European Journal of Biochemistry*, **68**: 333-338.

He J., Furmanski P. (1995). Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, **373**: 721-724.

Hoek K.S., Milne J.M., Grieve P.A., Dionysius D.A., Smith R. (1997). Antibacterial activity in bovine lactoferrin derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 54- 59.

Ikeda M., Sugiyama K., Tanaka T., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Kato N. (1998). Lactoferrin markedly inhibits Hepatitis C



virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochememical and biophysical Research Communications*, **245**: 549-553.

INRA: Institute National de la Recherche Agronomique.
Biotechnology Laboratories. <http://locus.jouy.inra.fr/>

Iyer S., Lonnerdal B. (1993). Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition*, **47**: 232-241.

Jane van Vliet, Jeremy Turner and Merlin Crossley. (2000). Human Krüppel-like Factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic Acids Research*, 2 (9), 1955-1962

Johanson B. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, **14**: 510-512.

Kanyshkova T.G., Buneva V.N. and Nevinsky G.A. (2001). Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)*, **66 (1)**: 1-7.

Karthikeyan S., Yadav S., Paramasivam M., Srinivasan A., Singh T.P. (2000). Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å resolution at 277 K. *Biological Crystallography, Acta Crystallographica Section D*, **56**: 684-689.



Kimura M., Myoung-Soo N., Yoshifumi O., Haruto K., Shimazaki K., Dea-youl Yu, (2000). Antimicrobial peptide of Korean native goat lactoferrin and identification of the part essential for this activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **268**: 333-336.

Kijlstra A. (1990). The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface. *Regional Immunology*, **3**: 193-197.

Koczan D., Hobom G., Seyfert H.M. (1991). Genomic organization of the bovine α s1-casein gene. *Nucleic Acids Research*, **19**: 5591-5596.

Kuipers M.E., De Vries H.G., Eilkeboom M.C., Meijer D.K.F., Swart P.J. (1999). Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 2635-2641.

Lee T.H., Shimazaki K., Yu S.L., Nam M.S., Lee K.K., Yu D.Y. (1997). Polymorphic sequence of corean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. *Animal Genetics*, **28**: 367-369.



Leffel M.S., Spitznagel J.K. (1975). Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytosing human neutrophils: effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads. *Infection and Immunity*, **12**: 813-820.

Legrand D., Salmon V., Coddeville B., Benaissa M., Planke Y. and Spik G. (1995). Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells. *FEBS Letters*, **365**: 57-60.

Legrand D., Ellass E., Pierce A. & Mazurier J. (2004). Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *BioMetals*, **17**: 225-229.

Le Provost F., Nocart M., Guerin G., Martin P. (1994). Characterization of the goat lactoferrin cDNA: assignment of the relevant locus to bovine U12 synteny group. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **203**: 1324-1332.

Lonnerdal B., Iyer S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, **15**: 93-110.



MacGillivray R.T.A., Moore S.A., Chen J., Anderson B.F., Backer H., Luo Y., Bewley M., Smith C.A., Murphy M.E.P., Wang Y., Mason A.B., Woodworth R.C., Brayer G.D., Backer E.N. (1998). Two high resolution structures of recombinant N-lobe of human transferrin reveal a structural change implicated in iron release. *Biochemistry*, **37**: 7919-7928.

Masson P.L., Heremans J.F., Dive C. (1966). An iron-binding protein common to many external secretion. *Clinica Chimica Acta*, **14**: 735-739.

Masson P.L., Heremans J.F. (1971). Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **39 B**: 119-129.

Mead P.E., Tweedie J.W. (1990). C-DNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucleic Acids Research*, **18**: 7167.

Mehaia M.A., Al-Kenehal M.A. (1992). Taurine and other free amino acids in milk of camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, **47**: 351-353.

Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P. (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins *European Journal of Biochemistry*, **145**: 659-676.



Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S. (1960). Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, **45**: 413-421.

Mouguilevsky N., Retegui L.A., Masson P.L. (1985). Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and up-take by the liver. *The Biochemical Journal*, **229**: 353-359.

Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Manoj Kumar P.P., Mantovani A. (2000). Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochemical Society Transaction*, **28**: 563-566.

Naidu A.S., Miedzobrodzki J., Andersson M., Nilsson L.E., Forsgren A., Watts J.L. (1990). Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 2312.

Nonnecke B.J. Smith K.L. (1984).Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. *Journal of Dairy Science*, **67**: 606.



Odell E.W., Sarra R., Foxworthy M., Chapple D.S., Evans R.W. (1996). Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. *FEBS letters*, **382**: 175-178.

Omata Y., Satake M., Maeda R., Saito A., Shimazaki K., Yamauki K., Uzaka Y., Tanabe S., Sarashina T., Mikami T. (2001). Reduction of the infectivity of toxiplasma gondii and eimeria stedai sporozites by treatment with bovine lactoferricin. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **63**: 187-190.

Paul-Eugene N., Dugas B., Kolb J.P., Damais C., Braquet P., Paubert-Braquet M., Rialland J.P. (1993). Immunomodulatory and anti-oxidant effects of bovine lactoferrin in man. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III*, **316** (2): 113-119.

Penco S., Pastorino S., Bianchi-Scarra G., Garre C. (1995). Lactoferrin down-modulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in Interleukin-1b-stimulated cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 12263-12268.



Pentecost B.T., Teng C.T. (1987). Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**: 1034-1039.

Persuy M.A., Printz C., Medrano J.F., Mercier J.C. (1999). A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat beta-casein null allele. *Animal Genetics*, **30**: 444-451.

Petersen M.B., Slaugenhaupt S.A., Lewis J.G., Warren A.C., Chakravarti A., Antonarakis S.E. (1991). A genetic linkage map of 27 markers on human chromosome 21. *Genomics*, **9**: 407-419.

Petschow B.W., Talbott R.D. and Batema R.D. (1999). Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology*, **48**: 541-549.

Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Spik G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *European Journal of Biochemistry*, **196**: 177-184.



Ponzone A., Ferrero G.B., Spada M., Dompè C., Ferraris S., (1984).

Atti del Convegno su "Biotecnologie e Produzioni del latte". Torino, 83-93.

Ramunno L., Mariani P., Pappalardo M., Rando A., Capuano M., Di Gregorio P., Cosenza G. (1995). Un gene ad effetto maggiore sul contenuto di caseina β nel latte di capra. *Atti XI Congresso Nazionale A.S.P.A.*, Grado (Go): 185-186.

Ramunno L., Longobardi E., Pappalardo M., Rando A., Di Gregorio P., Cosenza G., Mariani P., Pastore N., Masina P. (2001). An allele associated with a non detectable amount of α s2 casein in goat milk. *Animal Genetics*, **32 (1)**: 19-26.

Ramunno L., Cosenza G., Gallo D., Illario R., Rando A., Masina P. (2002). Un nuovo allele al *locus* CSN1N1 di capra: CSN1N1 N. *XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.*, 221.

Sato E., Shi Y., Shenk T. (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature*, **Nov 21; 354**: 241-245.



Saito H., Miyakawa H., Tamura Y., Shimamura S., Tomita M. (1991). Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrosylate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Dairy Science*, **74**: 3724-3730.

Sanchez L., Calvo M., Brock J.H. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, **67**: 657-661.

Schaible U.E., Collins H.L., Priem F., Kaufmann S.H. (2002). Correlation of iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*, **196**: 1507-1513.

Schanbacher F.L., Goodman R.E., Talhouk R.S. (1993). Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *Journal of Dairy Science*, **76**: 3812-3831.

Schibler L., Vaiman D., Oustry A., Giraud-Delville C., Cribiu E.P. (1998). Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome Research*, **8**: 901-915.



Schryvers A.B., Bonnah R., Yu R.H., Wong H., Retzer M. (1998). Bacterial lactoferrin receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **443**: 123-133.

Schwerin M., Solinas Toldo S., Eggen A., Brunner R., Seyfert H.M., Fries R. (1994). The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and syntenic group U12. *Mammalian Genome*, **5**: 486-489.

Scott P.H. (1989). Plasma lactoferrin levels in newborn preterm infants: effect of infection. *Annals of Clinical Biochemistry*, **26**: 412-415.

Seyfert H.M., Tuckoricz A., Interthal H., Koczan D., Hobom G. (1994). Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Gene*, **143 (2)**: 265-269 .

Shau H., Kim A., Golub H. (1992). Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *Journal of Leukocyte Biology*, **51**: 343-349.

Shimazaki K., Nobuki K., Yoo Y.C. (1991). Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behaviour,



conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **98 B**: 417-422.

Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**: 552-555.

Slater K., Fletcher J. (1987). Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood*, **69**: 1328-1333.

Sugiura N., Takishima K. (2000). Regulation of the gene promoter for extracellular signal-regulated protein kinase 2 by transcription factors NF- κ B and Sp3. *The Biochemical Journal*, **347**: 155-161.

Tachezy J., Kulda J., Bahnikowa I., Suchan P., Razga J., Schrevel J. (1996). *Trichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology*, **83**: 216-228.

Teng C.T., Pentecost B.T., Marshall A., Solomon A., Bowman B.H., Lalley P.A., Naylor S.L. (1987). Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, **13**: 689-93



Teng C.T. (1994). Lactoferrin gene promoter in human and mouse. Analogous and dissimilar characteristics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **357**: 183-196.

Teng C.T., Gladwell W., Beard C., Walmer D., Teng C.S., Brenner R. (2002). Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium. *Molecular Human Reproduction*, **8**: 58-67.

Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamamuchi K., Wakabayashi H., Kamase K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, **74**: 4137-42.

Trask B.J. (1991). DNA sequence localization in metaphase and interphase cells by fluorescence in situ hybridization. *Methods in Cell Biology*, **35**: 3-35.

Van Berkel P.H., Geerts M.E., van Veen H.A., Kooiman P.M., Pieper F.R., de Boer H.A. and Nuijens J.H. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *The Biochemical Journal*, **312**: 107-114.



Vellyagounder K., Kaplan J.B., Furgang D., Legarda D., Diamond g., Parkin R.E., Fine D.H. (2003). One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infection and Immunity*, **71**: 6141-6147.

Verbeek W., Lekstrom-Himes J., Park D.J., Dang P.M., Vuong P.T., Kawano S., Babior B.M., Xanthopoulos K., Koeffler H.P. (1999). Myeloid transcription factor C/EBPepsilon is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood*, Nov1, **94(9)**: 3141-3150.

Ward P.P. & Conneely O.M. (2004). Lactoferrin: Role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *BioMetals*, **17**: 203-208.

Williams J. (1982). The evolution of transferrins. *Trends in Biochemical Sciences*, **7**: 394-397.

Williams T., Admon A., Luscher B., Tjian R. (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes & Development*, **2 (12A)**: 1557-1569.



Yang F., Lum J.B., McGill J.R., Moore C.M., Naylor S.L., Van Bragt P.H., Baldwin W.D., Bowman B.H. (1984). Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **81**: 2752-2756.

Ye X.Y., Wang H.X., Liu F., Ng T.B. (2000). Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**: 235-241.

Zheng J., Ather J.L., Sonstegard T.S., Kerr D.E. (2005). Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. *Gene*, **353**: 107-117.

Zu-Yan Qian, Jollès P., Migliore-Samour D., Fiat A.M. (1995). Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1243**: 25-32.

