



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

SCIENZE VETERINARIE

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVII CICLO)

Coordinatore: Prof. Vincenzo Carcangiu

II GENE SREBP-1 E LE CARATTERISTICHE DEL LATTE IN OVINI DI RAZZA SARDA

Docente Guida

Prof. Vincenzo Carcangiu

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dr. Giovanni Cosso

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

Introduzione	pag	1
• Lattazione	“	2
• Latte	“	3
• Classificazione acidi grassi	“	6
• Caratteri della dieta	“	7
• Metabolismo acidi grassi volatili	“	11
• Mammella: capacità captive	“	14
• Globulo di grasso: formazione, struttura e sue caratteristiche	“	23
• Isomeri CLA e loro importanza	“	29
• Variazioni nella dieta e MFD	“	32
• SREBPs: struttura, isoforme e splicing	“	37
• SREBPs: regolazione e interazioni	“	40
Scopo	“	51
Materiali e metodi	“	54
Risultati	“	67
Discussione	“	89
Conclusioni	“	94
Bibliografia	“	96

INTRODUZIONE

Lattazione

La lattazione è un evento fisiologico caratterizzato dalla sintesi e secrezione del latte da parte del tessuto mammario dei mammiferi dal momento del parto e per il periodo di allattamento della prole garantendone in tal modo la sopravvivenza.

Questo prodotto di secrezione è essenziale per il redo per via di un sistema digestivo inefficace allo svolgimento della normale attività rispetto ad un adulto. Il latte oltre che essere importante per la prole è utilizzato dall'uomo come tale in tutte le fasce di età o come derivato della lavorazione lattiero-casearia e per le importanti caratteristiche nutrizionali apportate. L'apparato mammario è caratteristico di ciascuna specie per forma, dimensione e numero di mammelle ed è caratterizzato da un periodo di mammogenesi con lo sviluppo dell'organo; da una successiva lattogenesi con l'avvio della secrezione lattea e da una galattopoiesi in cui si ha il mantenimento della secrezione fino all'involutione del tessuto ghiandolare che conduce alla diminuzione e arresto della produzione (Park and Jacobson, 2002).

La durata della lattazione viene individuata con una curva e suddivisa in 4 fasi: la prima, con breve durata, inizia nell'immediato post-partum ed è caratterizzata dall'inizio e dalla crescita della produzione lattea; la seconda, in cui viene raggiunto il picco produttivo; la terza fase in cui si ha una graduale riduzione della secrezione per poi passare nella quarta fase dove il decremento è ancora più accentuato. La curva di lattazione descrive come varia, in funzione del tempo trascorso dal parto, la produzione lattea

giornaliera in cui viene rappresentato il raggiungimento del picco produttivo e il seguente decremento (Naitana, 2009).

Nella bovina il picco produttivo è raggiunto verso il 60° giorno, periodo durante il quale si evidenzia una riduzione del peso corporeo, seguito da un suo incremento dai sessanta giorni fino alla fine della lattazione. Ciò corrisponde ad un bilancio energetico negativo durante la fase precoce della stessa che si protrae fino al picco per poi diventare positivo nella fase avanzata (Mesilati Stahy and Argov-Argaman, 2014).

Latte

Il latte è costituito da diversi componenti tra i quali l'acqua, i lipidi, le proteine, il lattosio e i sali minerali (Tabella 1); tra questi la frazione che presenta maggiore variabilità inter e intra specifica è quella lipidica.

Tabella 1. Composizione del latte in % (Park et al., 2007).

composizione	capra	pecora	bovina	donna
Grassi %	3,80	7,90	3,60	4,00
Solido non grasso %	8,90	12,00	9,00	8,90
Lattosio %	4,10	4,90	4,70	6,90
Proteine %	3,40	6,20	3,20	1,20
Caseine %	2,40	4,20	2,60	0,40
Albumina, Proteina %	0,60	1,00	0,60	0,70
Azoto non proteico %	0,40	0,80	0,20	0,50
Ceneri %	0,80	0,90	0,70	0,30
Calorie/100 ml	70,00	105,00	69,00	68,00

I lipidi sono una componente importante del latte dal punto di vista energetico, fisiologico, sensoriale e per i prodotti lattiero-caseari da esso derivati (McGuire and Bauman, 2002; Bauman et al., 2006).

La variabilità della concentrazione dei lipidi del latte dipende dalla specie, razza, genotipo, fase di lattazione, management alimentare, condizioni climatico ambientali nonché stagione, BCS, località di allevamento e dal livello di benessere animale (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Palmquist et al., 1993).

Tra tutti questi fattori l'alimentazione e la selezione genetica influenzano maggiormente la componente lipidica del latte sia dal lato quantitativo che qualitativo (Bauman et al., 2006; Palmquist et al., 1993).

Nel latte il contenuto in grassi è più elevato nell'immediato post-partum e decresce costantemente durante l'avanzare della lattazione fino al raggiungimento del picco produttivo. In questo ultimo periodo si avrà una riduzione della capacità di mobilizzare le riserve corporee, con conseguente minore disponibilità da parte della mammella per le proprie attività biosintetiche, di NEFA plasmatici ed in particolare di acido stearico (C18:0) e acido oleico (C18:1) (Chilliard et al., 1986).

Nella bovina e nella capra lo stadio di lattazione è strettamente correlato con il bilancio energetico il quale si riflette in una maggiore concentrazione di acidi grassi a lunga catena nel latte nei primi mesi rispetto alla fine della lattazione (Mesilati-Stahy and Argov-Argaman, 2014). È anche stabilito che nella bovina la lattazione è associata con variazioni nella concentrazione e composizione di acidi grassi, fosfolipidi e nel diametro medio dei globuli di grasso del latte; È attestato, infatti un contenuto di fosfolipidi maggiore nei globuli di grasso con una taglia minore (Mesilati Stahy et al., 2011).

Lipidi

La componente lipidica è rappresentata dai trigliceridi, nonché da piccole percentuali di 1,2 diacilglicerolo e monoacilglicerolo, da lipidi complessi (fosfolipidi), da componenti lipo-solubili (steroli, esteri del colesterolo), da vitamine liposolubili e β carotene (Creamer and MacGibbon, 1996; Ramos and Juarez, 2011; Bauman, McGuire and Harvatine, 2011a)

In questa categoria i trigliceridi sono rappresentati da una frazione pari al 95% e si ritiene che nei ruminanti si trovino più di 400 differenti acidi grassi esterificati, per la maggior parte rappresentati da catene costituite dai 4 ai 18 atomi di carbonio con un elevata proporzione di quelli tra C4 e C10 (Bauman, McGuire and Harvatine, 2011a). Inoltre solo 14 tipi di acidi grassi sono presenti con concentrazione superiore all'1% (Creamer and MacGibbon, 1996).

Gli acidi grassi presenti nel latte derivano dalla sintesi ex novo della ghiandola mammaria (catene corte e medie da 4 a 8, da 10 a 14 atomi di carbonio rispettivamente, più una parte delle catene a 16 carboni), la cui entità varia secondo lo stato fisiologico della stessa, oppure vengono trasportati dal circolo ematico e captati dalle cellule dell'epitelio mammario (tutte le catene lunghe oltre i 16 carboni e una parte di quelle a 16) (Bauman and Griinari, 2003).

La mammella con la capacità di sintetizzare acidi grassi di de novo sintesi contribuisce per circa il 40% nella formazione dei grassi nel latte mentre quelli preformati e captati dal sangue dallo stesso tessuto contribuiscono per il 60% (Chilliard et al., 2000).

Classificazione acidi grassi

Gli acidi grassi sono delle catene carboniose alifatiche classificate secondo diversi parametri quali il numero di atomi di carbonio che compongono la molecola, la presenza o assenza di doppi legami e la presenza o meno di acidi grassi essenziali.

In base al numero di atomi di carbonio possono essere suddivisi in:

- acidi grassi a catena corta (4-8 carboni)
- acidi grassi a catena media (10-14 carboni)
- acidi grassi a catena lunga (16 e più carboni)

In base alla presenza/assenza di doppi legami:

- acidi grassi saturi privi di doppi legami nella catena
- acidi grassi insaturi con 1 o più doppi legami tra cui i monoinsaturi (MUFA) ed i polinsaturi (PUFA).

In base al fatto che siano essenziali o meno:

- omega 9, C18:1, acido oleico con doppio legame in cis-C9
- omega 6, C18:2, acido linoleico con doppio legame in C9, C12
- omega 3, C18:3, acido linolenico con doppio legame in C9, C12, C15.

Caratteri della dieta

Con la dieta il ruminante introduce una varietà di sostanze rappresentate da monosaccaridi (fruttosio, glucosio, galattosio etc.), disaccaridi (maltosio, cellobiosio etc), polisaccaridi (amido), cellulose (polimeri del cellobiosio), sostanze peptiche, emicellulosa e lignina.

La cellulosa (polisaccaride strutturale delle piante) è costituita da unità di glucopiranosio legate con legame β 1,4 glicosidico.

L'amido (polisaccaride di riserva della piante) è presente sotto forma di granuli ed è costituito dall'amilosio e amilopectina. Il primo è costituito da catene lineari di glucosio legate con legame α 1,4 glicosidico mentre il secondo (struttura ramificata), presenta nei punti delle ramificazioni legami α 1,6 glicosidico.

L'emicellulosa è un polisaccaride formato da molecole di xilosio unite con legame β 1,4 glicosidico.

La pectina è anche essa un polisaccaride in cui sono presenti e unite con legame β 1,4 glicosidico molecole di galattosio e acidi uronici.

Popolazione prestomacale e sue funzioni

Gli animali superiori posseggono enzimi capaci di idrolizzare i legami α ma non β e proprio per questo, che i ruminanti a differenza degli erbivori monogastrici e ancor di più dei carnivori, possedendo un apparato prestomacale dove l'alimento può soffermarsi per diversi giorni subiscono processi fermentativi da parte della flora e della fauna microbica. Questa popolazione ruminale è in grado di idrolizzare i legami β arrivando a digerire la cellulosa in modo completo (Leek, 2002; Beghelli, 2002)

Le condizioni fisiologiche ottimali presenti all'interno del rumine per la crescita e sopravvivenza di una favorevole popolazione microbica, idonea alle attività fermentative, sono caratterizzate da una temperatura di 39-40°C e da un pH compreso tra 6 e 7.

Variazioni nella dieta possono apportare un mutamento ambientale tale da determinare modificazioni dell'equilibrio a favore di una particolare popolazione batterica o protozoaria. Questi cambiamenti agiscono sullo stato fisiologico dell'apparato digerente con effetti anche sulla produzione latte. Variazioni nel management alimentare come tipologia di dieta somministrata, presenza di sostanze capaci di alterare il pH ruminale, dimensione delle particelle alimentari, presenza di metaboliti intermedi ruminali implicano modificazioni nei rapporti della sensibile flora e fauna. (Piccione, 2009)

La componente batterica si ritiene sia dell'ordine di 5-40 milioni per grammo e quella protozoaria di 0,2-0,5 milioni per grammo.

I batteri di derivazione alimentare sono rappresentati da:

- **cellulosolitici** prevalenti nelle diete con un'elevata presenza di fibre e con spiccata capacità di degradare la cellulosa (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Clostridium longisporum* etc.);
- **emicellulosolitici** capaci di agire sulla emicellulosa con attività più rapida rispetto ai precedenti;
- **amilolitici** con capacità di intaccare gli alimenti in cui sono presenti amidi e che tendono a prevalere in diete in cui il rapporto foraggi/concentrati si sposta a favore di questi ultimi (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Bacteroides ruminicola* etc.);
- **lipolitici** che idrolizzano i legami esterei in acidi grassi e glicerolo oltre al fatto che alcune specie sono in grado di idrogenare gli acidi grassi insaturi;
- **utilizzatori della pectina** che agiscono di preferenza sulla pectina (*Bacillus polymyxa*);
- **utilizzatori di zuccheri semplici** che agiscono secondariamente in quanto utilizzano metaboliti derivati dalla degradazione della cellulosa, degli amidi o perché introdotti con l'alimento come tali (*Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus* etc.);
- **utilizzatori di acidi** capaci di utilizzare come fonte energetica l'acido lattico, succinico, malico etc (*Veilonella alcaliensis*, *Selenomonas ruminantium* etc.);

- **proteolitici** che utilizzano come fonte energetica le proteine
- **metanogeni** che utilizzando idrogeno e anidride carbonica e producono metano;
- **produttori di ammoniaca** attraverso il metabolismo dell'urea, amminoacidi etc.
- **produttori di vitamine** del gruppo B e K.

La componente protozoaria (Isotricha prostoma, Dasytricha ruminantium e genere Entodinium e Diplodinium) svolge una funzione molto importante nel coadiuvare le attività batteriche nel processo di degradazione della cellulosa e dell'amido per il 20-25% ed interviene nel rimescolare il contenuto del rumine. I protozoi si nutrono di granuli di amido, di batteri e di sostanze prontamente digeribili.

L'attività protozoaria e la successiva digestione intestinale rifornisce l'ospite oltre che di proteine di elevato potere biologico anche di acidi grassi polinsaturi e amido non fermentato altrimenti non disponibili per via dei processi fermentativi in ambiente ruminale.

I funghi (Neocallimastix, Piromonas, Sphaeromonas), presenti per il 5-10%, maggiormente rappresentati con diete ricche in concentrati, sembrano essere implicati nella degradazione delle pareti cellulari vegetali (Piccione, 2009; Beghelli, 2002)

La digestione ruminale è caratterizzata dalla demolizione degli zuccheri complessi a zuccheri più semplici da parte di enzimi che vengono riversati dalla componente microbica nel lume dell'organo. I polisaccaridi

sono idrolizzati ad oligosaccaridi e questi a monosaccaridi. I legami β sono idrolizzati soltanto dalla cellulasi (complesso enzimatico β 1,4 glucan 4 gluconoidrolasi) e cellobiasi in 2 molecole di glucosio. In particolare, la prima idrolizza il legame β 1,4 glicosidico della cellulosa e la seconda il cellobioso (unità disaccaridica ripetitiva della cellulosa).

Dalla degradazione dell'emicellulosa e dalla pectina deriva invece lo xilosio.

Metabolismo acidi grassi volatili

Il glucosio e lo xilosio formatosi dalla digestione della cellulosa vengono metabolizzati a fruttosio 1,6 difosfato nel lume ruminale il quale entra nella via Emben-Meyerhof nella cellula batterica con sintesi di metaboliti intermedi. Attraverso una serie di reazioni è convertito in piruvato e lattato e questi in acidi grassi volatili (ac. acetico, propionico e butirrico) in rapporto rispettivamente del 70:15:10 più altri metaboliti di minore importanza come CO₂, metano e altri acidi grassi.

Con una adeguata ingestione di foraggi si avrà una maggiore produzione di acido acetico per circa il 70%; mentre con una riduzione del rapporto foraggi/concentrati aumenta la formazione del propionato a discapito dell'acetato fino ad arrivare ad un rapporto tra i tre acidi grassi volatili di 55:25:15 per acetato, propionato e butirato rispettivamente (Leek, 2002).

Gli acidi grassi volatili prodotti dalle fermentazioni ruminali vengono assorbiti per il 75% dal rumine-reticolo, per il 20% dall'omaso – abomaso e il resto a livello enterico.

A valori di pH ruminale compreso tra 5,5 e 6,5 gli acidi grassi volatili presenti in forma indissociata sono assorbiti per diffusione passiva, mentre, il resto per diffusione facilitata tramite scambio ionico con il bicarbonato. La velocità di assorbimento varia in funzione del gradiente di concentrazione tra lume dei prestomaci, epitelio e circolo sanguigno.

Principalmente nell'ovino, il butirrato viene metabolizzato a β idrossibutirrato, acetone e ac. acetoacetico nelle cellule epiteliali della parete ruminale. Il butirrato che perviene come tale al fegato viene anche esso metabolizzato a β idrossibutirrato e come il precedente utilizzato dalla ghiandola mammaria per la produzione di catene carboniose da C4 a C14 nei soggetti in lattazione, oppure, entra nel ciclo di krebs.

Solo una piccola parte di acetato è metabolizzata nella parete del rumine e previa attivazione ad acetil-CoA può imboccare diverse vie metaboliche: entrare nel ciclo di krebs, essere utilizzato per la lipidogenesi nei tessuti lipogeni tra cui la stessa mammella che lo utilizza come precursore per la sintesi degli acidi grassi, essere usato per la biosintesi di colesterolo o essere convertito in corpi chetonici.

Anche una frazione del propionato è metabolizzata dalla parete dei prestomaci. Successivamente all'assorbimento, viene metabolizzato dal fegato a glucosio e per ciò nel circolo si riscontra a concentrazioni molto basse (Leek, 2002; Beghelli, 2002).

Metabolismo lipidico enterico

I grassi che riescono a pervenire nell'intestino sono introdotti con la dieta e nel duodeno grazie all'attività peristaltica intestinale ed emulsionante dei sali biliari vengono ridotti a gocce lipidiche sempre più piccole,

(micelle) sottoposte ad un continuo rimescolamento. L'azione dei sali biliari è molto importante perché fa in modo che aumenti il rapporto superficie-volume delle gocce lipidiche riducendo così il tempo di attività delle lipasi, compatibilmente con i tempi di transito intestinale degli stessi. Successivamente le gocce lipidiche sono attaccate dalle lipasi pancreatiche che idrolizzano il legame tra acidi grassi e glicerolo.

L'assorbimento avviene nel duodeno e nella prima parte del digiuno dove i prodotti emulsionati per il 50% sono ridotti a glicerolo e acidi grassi e per il resto a digliceridi e monogliceridi.

Il glicerolo e gli acidi grassi a corta catena diffondono per la loro solubilità attraverso la membrana plasmatica mentre i mono, di-gliceridi e gli acidi grassi a lunga catena formano con i sali biliari disposti sulla superficie micelle di 10 μm . Venendo in contatto con i villi intestinali il contenuto diffonde attraverso la parete. Il glicerolo e gli acidi grassi a corta catena vengono rilasciati nel circolo portale; il resto viene riesterificato a trigliceride nella cellula formando i chilomicroni costituiti da un core di trigliceride rivestito da fosfolipidi e proteine con dimensione di 0,5 μm e successivo trasferimento nei vasi chiliferi dei villi per esocitosi (Piccione, 2009; Argenzio, 2002).

Mammella: capacità captive

Oltre alla capacità biosintetica la mammella è in grado di assorbire acidi grassi preformati dal circolo ematico (Figura 1) i quali si trovano impacchettati sotto forma di trigliceridi all'interno dei chilomicroni, nelle VLDL (lipoproteine a bassissima densità) e sotto forma di NEFA legati alle albumine. Essi provengono, dall'assorbimento da parte del tratto digestivo, dal fegato o dalla mobilizzazione delle riserve grasse corporee. (Bauman and Griinari, 2003).

La mammella è in grado di captare e assorbire i trigliceridi e i NEFA dal plasma proporzionalmente alla loro concentrazione; essi comunque rappresentano solo il 3% dei lipidi plasmatici contribuendo, in peso, per il 55% alla formazione dei lipidi del latte. La concentrazione plasmatica dei NEFA varia a seconda dello stato fisiologico ed energetico dell'animale tant'è che nel primo periodo di lattazione in cui il bilancio energetico è negativo l'apporto dei NEFA è assicurato dalla mobilizzazione delle riserve corporee (Bauman, McGuire and Harvatine, 2011a; McGuire and Bauman, 2002). Invece, quando l'animale si trova in bilancio energetico positivo solo il 10% degli acidi grassi deriva dalla mobilizzazione dei tessuti di riserva (Bauman and Griinari., 2003).

La ghiandola mammaria grazie alla presenza nella parete dei suoi capillari dell'enzima LPL (lipoprotein lipasi) in concerto con i VLDLR (recettori per le VLDL e chilomicroni) è in grado di ancorare i trigliceridi tagliando i legami esterei liberando così i NEFA (Bionaz and Loo, 2008a); Il meccanismo di traslocazione è mediato da proteine trasportatrici legate alla membrana (FATPs) che captano gli acidi grassi; le stesse sono coinvolte

nell'omeostasi lipidica e l'assenza, di tali trasportatori in topi transgenici knock-out, causa processi patologici. In questa famiglia sono state individuate 6 componenti con differente espressione nei tessuti (Doege and Stahl, 2006). Le FATPs interagiscono con trasportatori cellulari, proteine leganti gli acidi grassi (FABPs) e proteine leganti acil-CoA (ACBPs). Gli acidi grassi trasportati nel citosol per poter essere utilizzati devono essere prima attivati ad acil-CoA e in questo processo intervengono le ACSs (acil-CoA sintetasi) di cui fin ora sono stati individuati 26 enzimi. (Watkins et al., 2007).

Capacità biosintetiche mammarie

Nei monogastrici la principale fonte di carbonio è il glucosio, nei ruminanti l'acetato e il beta idrossibutirrato (Figura 1). La sintesi degli acidi grassi avviene attraverso l'assorbimento dal circolo ematico da parte della ghiandola mammaria di queste unità carboniose (Bauman and Griinari, 2003). L'ACC (acetil-CoA carbossilasi) catalizza la carbossilazione ATP-dipendente di malonil-CoA a livello citoplasmatico, in presenza di acetil-CoA, HCO_3^- e ATP. (Bionaz and Loo, 2008a). L'Acetil-transacilasi e il Malonil-transacilasi catalizzano la reazione in cui si avrà il legame tra l'acetile e il malonile con ACP (proteina trasportatrice costituente il nucleo del complesso FAS) (Heskin and Goff, 2013).

Il β idrossibutirrato, anche esso attivato a butirril-COA è necessario, insieme all'acetato, per formare la nascente unità carboniosa a 4 atomi di carbonio; per cui in questa prima fase di sintesi essi contribuiscono equamente (Shingfield et al., 2010).

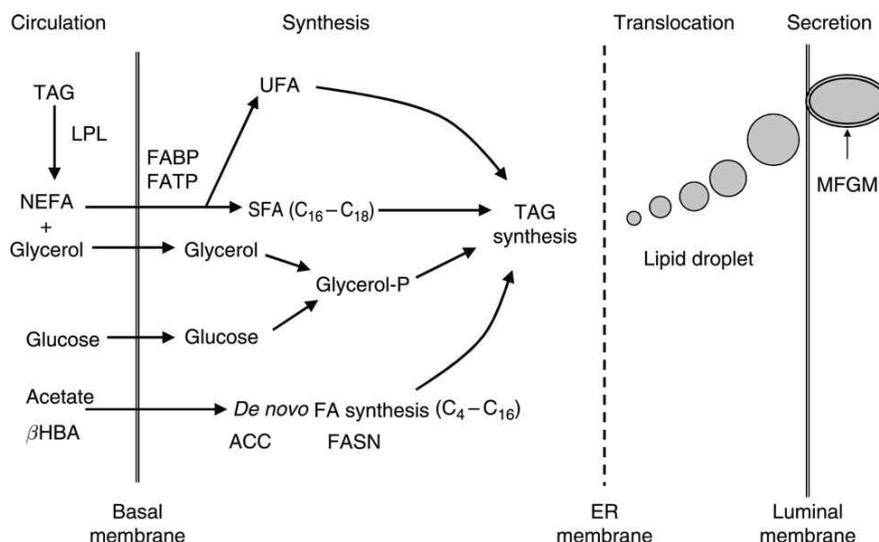


Figura 1. Captazione e sintesi degli acidi grassi da parte del tessuto mammario (Bauman, Mcguire and Harvatine, 2011a)

FAS (acido grasso sintasi) è un complesso multi enzimatico costituito da sette enzimi integrati la cui attività, in presenza di NADPH, è caratterizzata da un susseguirsi di reazioni che in primis implicano il trasferimento dell'acile saturo dalla tiolo-4-fosfopanteteina al sito B2 e il simultaneo trasferimento del gruppo malonico dal sito B1 al tiolo-4-fosfopanteteina. Le successive reazioni sono caratterizzate da una reazione di condensazione catalizzata dalla β ketoacil sintetasi tra acetil-ACP e malonil-ACP, dalla reazione di chetoriduzione da parte della β chetoacil reductasi, dalla reazione di deidratazione ad opera della β idrossiacil deidratasi e da una riduzione da parte della enoil reductasi per ottenere un residuo acilico saturo (Palmquist, 2006).

Il processo di allungamento prosegue fino a C14 e principalmente fino a C16. La terminazione a questo livello è dovuta all'intervento e

all'attività della tioesterasi I intrinseca al complesso FAS, la quale è presente in molti tessuti e numerose specie (Chilliard et al., 2000).

Si ritiene che FAS sia costituito da due subunità identiche e che l'utilizzo di tripsina sul complesso determini il taglio della tioesterasi I da FAS portando alla perdita della capacità di bloccare il processo di allungamento ma lasciando inalterata la capacità di sintetizzare lunghe catene. Per ciò il processo di allungamento prosegue da C16 a C18 e fino a C22 ma molto più lentamente. Questo fa supporre che il principale prodotto di sintesi sia proprio il C16 (Heskin and Goff, 2013). Il tessuto mammario a differenza di molti altri tessuti non è in grado di prolungare le catene carboniose oltre il C16 (Moore and Christie, 1981; Chilliard et al., 2000).

Il meccanismo attraverso il quale viene bloccato l'allungamento delle catene corte e medie in effetti non è stato ben chiarito ma studi hanno consentito di evidenziare l'esistenza di una tioesterasi II, (tessuto-specifica) presente nella ghiandola mammaria di ratti e conigli, non associata a FAS, presente nel citosol e responsabile dell'alterazione dell'attività della FAS. Essa è in grado di idrolizzare il legame tioestere agendo sul gruppo prostetico di FAS, interrompendo così l'allungamento delle catene e rilasciando gli acidi grassi a media catena (C8-C12) (Barber et al., 1997). Invece nel tessuto mammario dei ruminanti nel complesso enzimatico FAS vi è la presenza di una trans-acilasi che è in grado di determinare il rilascio delle catene in via di allungamento fino a 12 atomi di carbonio (Knudsen and Grunnet, 1982).

L'enzima Δ^9 -desaturasi codificato da SCD1 (Steroil-CoA denaturasi) presente nella ghiandola mammaria e in altri tessuti è capace di

introdurre un doppio legame cis⁹ nelle catene sature degli acidi grassi, in particolare nell'acido stearico con formazione dell'acido oleico. L'inserimento di questo doppio legame è condizione importante per abbassare il punto di melting così come l'acilazione dell'oleato in sn-3 del trigliceride per garantire la fluidità delle membrane e la secrezione del globulo di grasso dalla cellula dell'epitelio mammario (Gervais et al., 2009).

L'attività desaturasica tra il carbonio 9 e 10 nell'acil-CoA saturo avviene in presenza del su citato enzima, del coenzima ridotto NADPH, della citocromo b5 reduttasi, del citocromo b5 accettore di elettroni e di ossigeno molecolare. Esso agisce su numerosi substrati tra i quali il palmitoil-CoA, stearoil-CoA e miristil-CoA (16, 18 e 14 carboni rispettivamente) i quali vengono deidrogenati a palmitoleil-CoA, oleil-CoA e miristil-CoA (Ntambi, 1999). Con tale processo si ha la formazione di cis⁹ C16:1, cis⁹ C18:1 e di cis⁹ C14:1 rispettivamente per il 50%, 59% e 90%. Un'altra importante attività è quella di inserire un ulteriore doppio legame nell'acido vaccenico con formazione di un importante CLA ovvero dell'acido rumenico (cis⁹, trans¹¹ C18:2) (Mosley e McGuire, 2007). L'importanza del gene SCD1 e dell'espressione dell'enzima Δ^9 -desaturasi deriva dal fatto che l'acido oleico suo metabolita è uno dei maggiori componenti monoinsaturi delle membrane cellulari, e così anche previa metabolizzazione da parte di ACAT (acil-CoA:colesterolo acil-transferasi) e del DGAT (diacil-glicerol-acil-transferasi), degli esteri del colesterolo e dei trigliceridi rispettivamente. Il knock-out del gene determina deficienze nella sintesi di trigliceridi ed esteri del colesterolo con aumento delle componenti sature (C:16 e C:18) (Ntambi and Miyazaki, 2004).

Esterificazione e distribuzione spaziale degli acidi grassi

Una volta formate, le catene vengono condensate al glicerolo 3-fosfato grazie all'azione in sequenza di alcuni enzimi. Il primo ad agire è il GPAT (glicerol-3 fosfato acil-transferasi) seguito dal AGPAT (acil glicerol fosfato acil transferasi) e dal DGAT (diacil glicerol acil transferasi) che rispettivamente condensano gli acili in posizione sn-1, s-2, sn-3. Tra gli ultimi due enzimi agisce una fosfatidato fosfatasi (LIPIN1) che idrolizza il legame tra il 1,2 diacil-glicerolo e lo stesso fosfato (Bionaz and Loor, 2008a; Shingfield et al., 2010).

La distribuzione degli acidi grassi all'interno della molecola del trigliceride differisce lievemente tra pecora e bovino; per esempio la ripartizione all'interno della molecola degli acidi grassi a catena corta (C4:0, C6:0, C8:0) non è casuale e sono esterificati preferenzialmente sul carbonio sn-3 del glicerolo e tra questi solo uno tra C4 o C6 è presente mentre quelli a media e lunga catena evidenziano una specificità per sn-1 o sn-2 come l'acido palmitico (Ramos and Juarez, 2011). Nella bovina per esempio l'acido laurico è assegnato a random su uno dei tre legami a disposizione del glicerolo (McGuire, and Bauman, 2002), l'acido stearico è selettivamente posizionato in sn-1, l'acido oleico in posizione sn-1 e sn-3 (Mansson 2008; Macgibbon and Taylor, 2006; Jensen, 2002).

L'esterificazione degli acidi grassi a corta catena e dell'acido oleico in posizione sn-3 è molto importante in quanto riducono il punto di melting influenzando così le caratteristiche fisiologiche dei grassi nel latte (Palmquist et al., 1993).

La distribuzione spaziale del C18:0 e C18:1 varia secondo il peso molecolare del trigliceride. Essi preferenzialmente sono esterificati in sn-1 e sn-3 quando la molecola è di elevato peso molecolare mentre in sn-1 quando è di medio o basso peso (MacGibbon and Taylor, 2006).

Esiste una sostanziale differenza nella distribuzione percentuale in carboni nei trigliceridi a catena corta (C26-C36) più alto per la pecora e capra (24%) rispetto alla bovina (21%) così come in quelli a media catena, (C38-C44) a favore della capra rispetto all'ovino e bovino (49%, 42%, 36% rispettivamente); I trigliceridi a catena lunga (C46-C54) sono maggiormente rappresentati nel bovino rispetto alla pecora e capra, rispettivamente (43%, 34% e 27%) (Ramos and Juarez, 2011; Park et al., 2007).

Nella capra la distribuzione dei carboni all'interno della molecola presenta un massimo tra C40-C42 mentre nella bovina è compresa tra C36-C40 (35%) e C46-C52 (36%) (MacGibbon and Taylor, 2006).

Nel latte bovino in sperimentazioni condotte su frazioni di globuli di grasso di differenti dimensioni a 10, 100 e 150 giorni post-partum gli acidi grassi più rappresentati sono stati: miristico C14:0, palmitico C16:0, stearico C18:0, oleico C18:1n-9 e linoleico C18:2n-6 rispettivamente, con percentuali del 10, 30, 12, 20 e 4% sul totale degli acidi grassi (Mesilati Stahy and Argov-Argaman, 2014; Mansson, 2008).

Così come nel bovino, nel bufalo i trigliceridi nel latte sono composti in prevalenza da C14:0, C16:0 e C18:0 e cis9, C18:1. Nel bufalo comunque è stata riportata rispetto al bovino una più alta percentuale di acidi grassi saturi e minore di quelli insaturi anche se in entrambi la

componente satura supera il 70% (Ménard et al., 2010; Varrichio et al., 2007; Blasi et al., 2008).

Nella pecora e capra gli acidi grassi maggiormente rappresentati, oltre il 75%, sono il C16:0 (ac. palmitico), C18:1 (ac. oleico), C10:0 (ac. caprico), C14:0 (ac. miristico), C18:0 (ac. stearico) (Park et al., 2007; Alonso et al., 1999; Goudjil et al., 2004) (Tabella 2).

Peculiarità dei piccoli ruminanti rispetto al bovino è il più alto contenuto di acidi grassi a corta e media catena: C6:0 (ac. caproico), C8:0 (ac. caprilico), C10:0 (ac. caprico), C12:0 (ac. laurico) che conferiscono il caratteristico aroma ai prodotti lattiero caseari. (Park et al., 2007; Ramos and Juarez, 2011).

Tabella 2. Composizione in acidi grassi dei lipidi nel latte (%) in alcune specie di mammiferi; (pecora: Goudjil et al., 2004; capra: Alonso et al., 1999; bovina: MacGibbon and Taylor, 2006) modificato.

acidi grassi		bovino	pecora	capra
Butyric (C4:0)	(C4:0)	3,90	3,51	2,18
Caproic (C6:0)	(C6:0)	2,50	2,90	2,39
Caprylic (C8:0)	(C8:0)	1,50	2,64	2,73
Capric	(C10:0)	3,20	7,82	9,97
Decenoic	(C10:1)	0,15	0,26	0,24
Lauric	(C12:0)	3,60	4,38	4,99
Dodecenic	(C12:1)	0,06	0,04	0,19
Tridecanoic	(C13:0)	0,19	0,17	0,19
Myristic	(C14:0)	11,10	10,43	9,81
iso Pentadecanoic	(C15:0)	0,40	0,34	0,13
anteiso Pentadecanoic	(C15:0)	0,44	0,47	0,21
Myristoleic	(C14:1)	0,80	0,28	0,18
Pentadecanoic	(C15:0)	1,20	0,99	0,71
iso Palmitic	(C16:0)	0,40	0,21	0,24
Palmitic	(C16:0)	27,90	25,93	28,00
iso Heptadecanoic	(C17:0)	0,50	0,53	0,35
anteiso Heptadecanoic	(C17:0)	0,52	0,30	0,42
Palmitoleic	(C16:1)	1,50	1,03	1,59
Heptadecanoic	(C17:0)	0,60	0,63	0,72
Heptadecenoic	(C17:1)	0,36	0,20	0,39
Stearic	(C18:0)	12,20	9,57	8,88
Oleic ^a	(C18:1) cis	17,20	18,20	17,18
Octadecenoic	(C18:1) trans	3,90	2,90	2,12
Linoleic ^a	(C18:2)	1,40	3,21	3,19
Eicosanoic	(C20:0)	0,35	0,45	0,15
Linolenic ^a	(C18:3)	1,00	0,80	18,30
Linoleic conjugated ^a	(C18:2)	1,10	0,74	0,70

^a tutti gli isomeri

Globulo di grasso: formazione, struttura e sue caratteristiche

Il 99% dei lipidi nel latte bovino si presenta sotto forma di gocce lipidiche nelle quali il 97% è rappresentato da trigliceridi, da piccole quantità di mono-gliceridi e acidi grassi liberi (Mather and Keenan, 1998).

La membrana dei globuli del grasso del latte ovino, caprino e bovino presenta composizione e struttura molto simile nelle 3 specie e rappresenta approssimativamente l'1% del volume del grasso totale del latte (Scolozzi et al., 2003).

Il meccanismo di secrezione lipidico da parte delle cellule mammarie è unico e differisce da qualsiasi altro sistema secretivo cellulare. Infatti in altre linee cellulari come negli epatociti ed enterociti i lipidi vengono rilasciati per esocitosi. Durante la lattazione le cellule epiteliali mammarie secernono le gocce di trigliceridi una volta formatesi (Mather e Keenan, 1998).

Una particolare caratteristica dei piccoli ruminanti è la capacità della mammella di produrre una più elevata proporzione di globuli di grasso di taglia minore rispetto a quella bovina; proprietà che rende il grasso del latte di capra più facilmente digeribile rispetto a quello bovino (Raynal-Ljutovac et al., 2008).

La taglia media del globulo di grasso come riportato da El-Zeini, 2006 è nella capra 3,20 μ m, nel cammello 2,99 μ m, nella bovina 3,95 μ m e bufala 8,7 μ m. La digeribilità è inversamente proporzionale alla taglia del globulo ossia più piccola è la taglia e più veloce sarà la digestione dovuta all'aumento del rapporto superficie volume (Berton et al., 2012). Infatti si evidenzia che la taglia media del globulo di grasso decrementa nell'ordine

bufala, bovina, capra, cammello e la digeribilità incrementa nell'ordine cammello, capra, bovina, bufala (Meena et al., 2014). Il diametro medio dei globuli di grasso nella pecora è di $2,97\mu\text{m} \pm 0,495$; i globuli medi sono presenti con una percentuale del 48,36%, quelli piccoli del 36,36% e i grandi del 15,27% dimostrando che i globuli con un diametro medio tra 1 e 3 μm sono i più rappresentati (Martini et al., 2012). Una diversa concentrazione di lipidi polari risulta correlata ad una differente taglia dei globuli e nel bovino questo tipo di lipidi risulta del 28% superiore rispetto alla bufala (Menàrd et al., 2010).

La stessa composizione lipidica nonché gli acidi grassi del globulo di grasso del latte sono influenzati dalla fase di lattazione e dalla taglia dei globuli in quanto, nell'intero periodo di lattazione, si verificano cambiamenti metabolici e stagionali (Mesilati Stahy and Argov-Argaman, 2014).

Le gocce si formano nel reticolo endoplasmatico rugoso (Figura 2) e sono costituite da un nucleo di trigliceridi che si accumula tra la membrana esterna ed interna dello stesso reticolo. Esse vengono rilasciate nel citosol avvolte da un monostrato fosfolipidico derivante dalla parte più esterna o citoplasmatica della membrana (Heid and Keenan, 2005). Questi precursori delle dimensioni inferiori a 0,5 μm chiamate micro gocce lipidiche (MLDs) in cui il nucleo è avvolto da un mono strato di proteine e lipidi polari, possono essere secrete direttamente dalla cellula come piccoli globuli, fondersi con altre micro gocce per formare le gocce lipidiche citoplasmatiche (CLDs) o unirsi a queste ultime per formare globuli più

grandi; la fusione tra le CLDs non è stata però evidenziata (Valivullah et al., 1988; Mather and Keenan, 1998).

In sistemi acellulari derivati da ratto si è evidenziato che il processo di fusione è promosso dal calcio e da una proteina, non ben identificata ad elevato peso molecolare, frazione del citosol (Valivullah et al., 1988); in tal processo si ha anche il coinvolgimento dei glicosidi.

Il meccanismo di migrazione unidirezionale verso la parte apicale della cellula è tutt'ora sconosciuto ma sembra che sia coinvolto il citoscheletro; infatti microfilamenti contenenti actina sono presenti in elevata concentrazione in prossimità della regione apicale e la contemporanea presenza di filamenti intermedi (Franke et al., 1980) fa supporre che essi guidino la migrazione (Mather and Keenan, 1998; Heid and Keenan, 2005). Le gocce lipidiche citoplasmatiche possono ingrandirsi quando si trovano in prossimità della membrana plasmatica apicale e durante il processo di secrezione; esse vengono progressivamente avvolte dalla membrana plasmatica cellulare e rilasciate.

Il globulo di grasso del latte è circondato da una membrana (MFGM) che ha l'importante funzione di stabilizzare le gocce lipidiche nel latte. Essa è costituita da tre strati: quello più interno che deriva dal reticolo endoplasmatico, a sua volta circondato da un doppio strato derivato dalla membrana apicale della cellula mammaria. Le due componenti sono tra loro uniformemente separate da uno spessore di 10-20 μm in cui è presente materiale di derivazione citoplasmatica o di membrana (Mather e Keenan, 1998). L'involucro lipidico polare consiste di glicerofosfolipidi, sfingolipidi, colesterolo e proteine; questi elementi derivano dal reticolo

endoplasmatico e dalla porzione apicale delle cellule dell'epitelio mammario (Ronit Mesilati Stahy and Argov-Argaman, 2014)

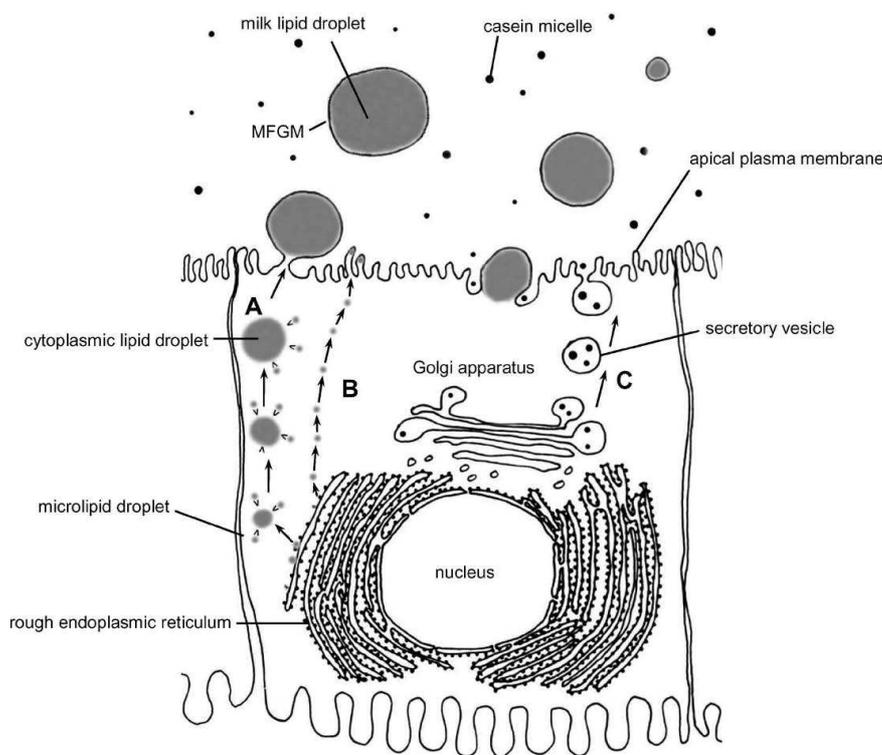


Figura 2. Formazione e secrezione delle gocce lipidiche (Bauman et al., 2006).

Le MFGMs rappresentano solo una piccola frazione se comparate al nucleo di trigliceridi ($\pm 98\%$) e il loro contenuto nel latte subisce delle importanti variazioni a seconda del tenore in grasso come pure in base alla dimensione degli stessi globuli (Mather, 2011). Nella bovina i trigliceridi associati alla MFGM presentano una maggiore percentuale di acidi grassi saturi a catena più lunga, rispetto ai trigliceridi del nucleo del globulo (Keenan and Mather, 2002); le MFGM sono ricche in proteine, glicoproteine, glicerofosfolipidi, sfingolipidi, colesterolo e altri componenti minori (Ménard et al., 2010); alcuni steroli presenti nella membrana

plasmatica si ritrovano nella MFGM e circa il 10% del totale sono esterificati. Anche il colesterolo entra a far parte delle MFGM dove rappresenta oltre il 90% del totale degli stessi steroli (Keenan and Mather, 2002). I fosfolipidi della membrana del globulo di grasso sono in concentrazione almeno del 30% dei lipidi totali delle MFGM (Spitsberg, 2005). I glicerofosfolipidi sono composti da una molecola di glicerolo con esterificati in posizione sn-1 e sn-2 un acilglicerolo e in sn-3 un fosfato residuo con differenti gruppi organici (colina, etanolamina, inositolo e serina); la sfingomieline è composta da uno sfingoside il cui amino gruppo è legato ad un acido grasso il quale è esterificato con un gruppo di fosfatidilcolina (Ménard et al., 2010).

I 5 maggiori rappresentanti dei lipidi polari che entrano nella costituzione delle MFGM sono le sfingomieline, le fosfatidilcoline, la fosfatidiletanolamina, il fosfatidilinositolo e la fosfatidilserina. I glicosfingolipidi sono i minori costituenti e insieme alle sfingomieline contengono principalmente catene di acidi grassi a lunga catena ossia C16:0, C18:0, C22:0, C23:0, C24:1 (Keenan and Mather, 2002).

I fosfolipidi sono delle molecole bioattive che possiedono una notevole importanza in quanto, nella forma di fosfatidil-inositolo, migliorano il profilo lipidico plasmatico (Burgess et al., 2005) e inoltre sono coinvolti anche nell'inibizione della patogenesi del cancro al colon nei soggetti la cui dieta è ricca in sfingomieline (Dillehay et al., 1994).

Le proteine maggiormente rappresentate nelle MFGM del latte bovino sono le glicoproteine butirofiline (40% del totale delle proteine del MFGM), gli enzimi redox xantino ossidasi/deidrogenasi (12-13% del totale)

(Spitsberg, 2005), le mucine MUC-1 e MUC-15, le proteine integrali di membrana CD-36, le adipofiline (ADRP o proteine correlate alla differenziazione degli adipociti), le MFG-E8 (glicoproteine adesive) e le FABP (proteine leganti gli acidi grassi) (Mather and Keenan., 1998; Bauman et al., 2006).

Queste proteine facenti parte delle MFGM sono importanti in quanto, come è stato evidenziato in numerose ricerche, possiedono un potenziale nutraceutico capace di apportare dei benefici risvolti sulla salute umana (Spitsberg et al., 2005).

Inoltre il knockout dei geni che codificano per la butirrofillina e la xantino ossidasi/deidrogenasi blocca la secrezione dei trigliceridi i quali si accumulano in elevate quantità nel citoplasma mentre l'inattività del gene DGAT1 (diacylglycerol acyl transferase 1) determina una mancata triaciglicerol-sintesi (Bauman et al., 2006).

Isomeri CLA e loro importanza

La presenza nel latte di isomeri CLA è molto importante perché come riportato da Parodi (1999) sono considerati anticarcinogeni, antiarterosclerotici e componenti antidiabetici e antiobesità. Tra questi quello maggiormente rappresentato nei lipidi dei latticini è l'isomero cis9, trans11 C18:2 (acido rumenico) (Griinari et al., 2000; Parodi, 1997) che può raggiungere il 75-90% dei CLA totali (Bauman et al., 2006). Ricerche svolte sui singoli acidi grassi valutando gli effetti biologici e nutrizionali hanno spostato l'interesse nel cercare di ridurre, nel grasso del latte, gli acidi grassi saturi come il palmitato, il miristico e il laurico per i loro effetti ipercolesterolemici e per via del fatto che si ritiene siano associati a malattie cardiache. Per contro, si sta cercando di aumentare la concentrazione degli acidi linoleici, del butirrato e delle sfingomieline per le loro proprietà anticarcinogeniche (Parodi, 1997; Bauman et al., 2006).

Metabolismo MUFA e PUFA nei prestomaci

Nei ruminanti le componenti lipidiche della dieta subiscono un processo alterativo dovuto al metabolismo batterico ruminale e gli acidi grassi maggiormente interessati sono i PUFA (acidi grassi polinsaturi) (Bauman and Griinari, 2003).

A questo livello percentuali superiori all'85% dei legami esterei presenti nell'alimento vengono idrolizzati (Bauman, Harvatine and Lock, 2011b) primariamente dalle lipasi microbiche; gli acidi grassi insaturi subiscono un processo di idrogenazione che porta al decremento sul totale

degli acidi grassi con doppi legami e ad un incremento di quelli saturi e inoltre alla formazione di isomeri cis e trans del C18:1 (Jensen, 2002).

Il primo processo è caratterizzato da una iniziale idrolisi dei legami esterei seguito dalla bioidrogenazione dei PUFA, attività che non è dovuta ad un unico microrganismo ma coinvolge un insieme di batteri (Bauman et al., 1999).

Infatti Kemp and Lander (1984) riuscirono ad isolare e successivamente a suddividere alcuni batteri in due gruppi in cui uno era capace di idrogenare l'acido linoleico e α linolenico a trans11, C18:1 e l'altro invece riusciva a ridurre molti acidi ottadecenoici come l'acido oleico, l'acido vaccenico e l'acido linoleico ad acido stearico. Uno tra i batteri maggiormente studiati implicati nella bioidrogenazione e nel processo di isomerizzazione dell'acido linoleico è il *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler et al., 1966).

La bioidrogenazione (Figura 3) dell'acido linoleico (cis9, cis12 CLA) è caratterizzata da una isomerizzazione con formazione dell'isomero cis9, trans11 C18:2 da parte della cis12, trans11 isomerasi (linoleato isomerasi) legata alla membrana batterica e da successive riduzioni prima a tran11 C18:1 (acido vaccenico) e poi a C18:0 (acido stearico) (Parodi 1997, 1999). L'acido linolenico è soggetto a questo processo di bioidrogenazione ruminale in cui l'isomero α (cis9, cis12, cis15 C18:3) inizialmente subisce una isomerizzazione a cis9, trans11, cis15 C18:3, cui seguono una serie di riduzioni a trans11, cis15 CLA e poi a trans11 C18:1 fino ad acido stearico.

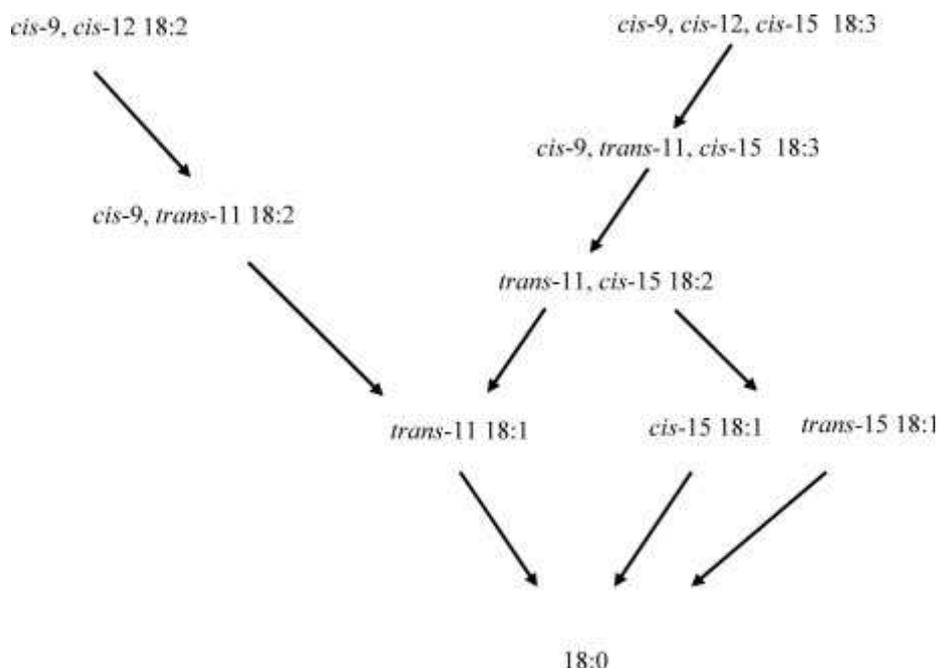


Figura 3. Bioidrogenazione ruminale dell'acido linoleico e dell'acido α linolenico (Shinfield and Griinari., 2007).

Anche l'isomero γ (cis6, cis9, cis12 C18:3) segue lo stesso destino (Bauman et al., 1999). In questo meccanismo la riduzione dell'intermedio transitorio cis9, trans11 C18:2 è veloce a differenza della reazione di riduzione del trans11 C18:1 che quindi tende ad accumularsi nel rumine (Piperova et al., 2002; Katz and Keeney, 1966); infatti, una piccola parte riesce a sfuggire al rumine per rendersi disponibile a livello mammario.

La presenza del cis9, trans11 C18:2 nei grassi dei tessuti e del latte è dovuta al fatto che lo stesso è riuscito a sottrarsi ad una completa bioidrogenazione nel rumine (Griinari et al., 2000); ossia un incremento nella concentrazione di cis9, trans11 C18:2 nel latte dimostra l'esistenza di una via endogena di sintesi da parte di $\Delta 9$ desaturasi tissutale che agisce sui derivati acidi grassi trans ruminanti (Griinari et al., 2000; Mosley et al., 2006). Tutto ciò evidenzia il fatto che la maggior fonte di acido rumenico

nel latte deriva dalla capacità della mammella, attraverso le proprie attività enzimatiche e desaturasiche di convertire l'acido vaccenico sfuggito al ruminante in acido rumenico.

Menàrd et al. (2010) hanno riscontrato nel latte di bufala rispetto al bovino una concentrazione più bassa di cis9 C18:1 e più alta dei trans C18:1 principalmente di ac.vaccenico (trans11 C18:1); nonché una più alta concentrazione di acido rumenico cis9, trans11 C18:2, principale CLA (ac.linolenico coniugato).

Infusioni duodenali di trans11 C18:1 nella bovina hanno evidenziato un incremento del cis9, trans11 C18:2 del 31% (Griinari et al., 2000). Piperova et al. (2002) hanno comparato le quantità di CLA individuali e gli isomeri degli acidi grassi trans nel fluido duodenale e nel latte di bovine lattanti evidenziando che il rapporto trans C18:1 e CLA era di circa 60:1 indicando una sovrapproduzione di acidi grassi trans nel ruminante; Pecore mature presentavano un flusso duodenale con maggiore quantità di trans11 C18:1 rispetto agli altri isomeri CLA (Kucuk et al., 2001).

Variazioni nella dieta e MFD

Cambiamenti nella dieta possono determinare una riduzione della componente lipidica nel latte e l'esempio tipico maggiormente studiato è la low-fat milk syndrome indicata come MFD (milk fat depression) (Peterson, Matitashvili and Bauman, 2004). Sono state avanzate numerose ipotesi per spiegare questa sindrome ma quella più completa riguarda la teoria della bioidrogenazione proposta da Bauman and Griinari (2001).

La MFD determina la riduzione dei grassi nel latte; interessa gli acidi grassi di tutte le lunghezze ma influenza maggiormente quelli di de novo sintesi (Hussein et al., 2013) ossia quelli a corta e media catena con meno di 16 carboni. Condizione essenziale per indurre la MFD secondo Bauman et al. (2006, 2011b) è che nella dieta siano presenti acidi grassi insaturi e che lo stesso alimento possa cambiare le condizioni ambientali ruminali in modo tale che si possa avere un'alterazione dei rapporti microbici e dei processi di bioidrogenazione (Figura 4).

Le MFD dieta-indotte sono evidenziate con somministrazione di alimenti altamente fermentescibili, con riduzione dei rapporti foraggi/concentrati e con supplementi di oli di pesce o vegetali che determinano una riduzione della componente grassa anche del 50% (Bauman et al., 2006, 2008) mentre la produzione latte e tutte le altre componenti rimangono invariate.

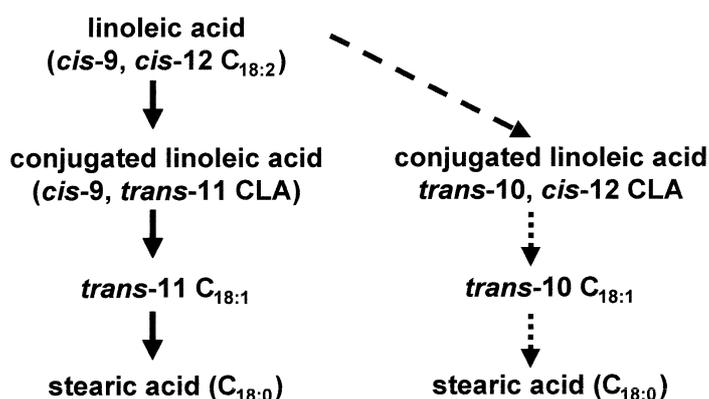


Figura 4. Variazione del normale processo di bioidrogenazione (Bauman and Griinari, 2001).

Prove effettuate da Harvatine et al. (2006) con somministrazione di una dieta con un ridotto rapporto foraggi/oli ed un'infusione di trans10,

cis12 C18:2 inducivano nella bovina un decremento nella produzione e presenza dei grassi nel latte rispettivamente del 38% e 24%. Infusioni di dosi anche di 2,5 g/d di trans10, cis12 CLA erano sufficienti per determinare nella stessa una minore sintesi di grassi del 25% (Bauman et al., 2006).

Inoltre in numerosi esperimenti sono stati messi in evidenza cambiamenti nella distribuzione di isomeri CLA nel latte ottenuti somministrando alle vacche nella dieta supplementi di olio di semi (Lerch et al., 2012).

Alcuni isomeri CLA hanno la capacità di inibire la sintesi di acidi grassi ed infatti la presenza nel latte bovino di alti livelli di alcuni isomeri trans C18 ed in particolare del trans10 C18:1 e del suo precursore trans10, cis12 C18:2 (Griinari et al., 2000; Bauman and Griinari, 2001) nonché trans9, cis11 C18:2 e cis10, trans12 C18:2 (Weerasinghe et al., 2012; Perfield et al., 2007) determinerebbe proporzionalmente una riduzione del contenuto di grassi nel latte a causa di un'alterazione della bioidrogenazione degli acidi grassi insaturi da parte della popolazione microbica nel rumine (Bauman et al, 2001; Griinari et al., 2000).Anche l'isomero trans7, cis9 CLA è ritenuto essere un inibitore (Bauman, Harvatine and Lock, 2011b).

Un meccanismo simile a quello bovino indotto da alcuni isomeri, in primis dal trans10, cis12 CLA (anche in questo caso, somministrato come supplemento, sotto forma di lipidi rumine protetti) è stato evidenziato nei piccoli ruminanti (Lock et al., 2006; Lock et al., 2008; Weerasinghe et al., 2012). Valutando gli effetti dose-risposta la mammella caprina risulta meno sensibile all'effetto anti-lipogeno rispetto alla mammella bovina ed ovina

(Lock et al., 2008; Shingfield et al., 2009). Altre sperimentazioni hanno dimostrato invece che la MFD nei piccoli ruminanti, non è così frequente anche quando essi vengono alimentati con diete ricche in amido e contenenti oli vegetali e di pesce. L'incremento nel latte bovino del trans10 CLA è tre volte superiore rispetto al latte ovino e caprino; Esso è accompagnato da una marcata riduzione in sintesi di acidi grassi nel latte bovino, situazione che invece non si verifica nei piccoli ruminanti. Si può capire quindi che probabilmente il processo di bioidrogenazione ruminale nei piccoli ruminanti è meno suscettibile di quello bovino alle modificazioni alimentari così come il tessuto mammario dei primi potrebbe presentare una sensibilità inferiore all'attività anti-lipogena di alcuni isomeri trans-CLA rispetto al secondo (Shingfield et al., 2010).

Il trans10, cis12 C18:2 sembra svolgere un effetto inibitorio sulla lipogenesi coinvolgendo la regolazione dei geni nelle cellule epiteliali mammarie attraverso meccanismi molecolari che determinano una riduzione coordinata degli enzimi implicati nella via biosintetica (Bauman et al., 2006).

Un ruolo centrale in questo senso è svolto da una famiglia di fattori di trascrizione (SREBF) (Hussein et al., 2013) la cui "down regulation" determina il decremento nell'espressione mammaria di enzimi coinvolti nella sintesi di acidi grassi (Harvatine et al., 2006), e nell'attività di desaturazione (Gervais et al., 2009).

Infatti in presenza di MFD nel tessuto mammario bovino la trascrizione di geni che codificano per enzimi lipogenici è sotto regolata e

SREBP-1 e Spot14 sono implicati nella regolazione trascrizionale (Harvatine and Bauman, 2006).

Nello specifico è SREBP-1c che a livello mammario è implicato nella regolazione dei geni chiave; infatti un suo knockout riduce del 41% la concentrazione di grassi nel latte dei topi facendo capire come alcuni isomeri trans CLA determinino una sua “down-regulation” inducendo la MFD. Anche Spot14 è coinvolto, infatti nonostante rimanga invariata l’attività degli enzimi mammari lipogenici il knockout di Spot14 (codificante per una proteina nucleare) determina una riduzione delle sintesi de novo degli acidi grassi (Bauman et al., 2008).

Hussein et al. (2013) somministrando a pecore lattanti lipidi incapsulati (trans11, cis9 CLA e trans10, cis12 CLA in uguale misura), cioè protetti dall’attività ruminale ed assorbibili a livello duodenale, hanno evidenziato un’alterazione delle proporzioni di acidi grassi nel latte.

In particolare decrescevano C6:0, C8:0, C10:0 e C12:0 mentre incrementavano proporzionalmente C18:0, tran11, cis9 CLA e tran10, cis12 CLA. Questo trattamento deprimeva l’espressione di alcuni geni tra cui SREBF-1, INSIG1 dal 30 al 55% mentre nessun effetto veniva osservato sulla quantità di mRNA di INSIG2 e SCAP.

SREBPs: struttura, isoforme e splicing

SREBPs (Sterol regulatory element binding proteins) è una famiglia di fattori di trascrizione strutturalmente correlati che svolge un ruolo importante nell'omeostasi lipidica regolando l'espressione di almeno 30 geni coinvolti nella sintesi ed assorbimento di colesterolo, acidi grassi, trigliceridi e fosfolipidi (Sato et al., 1994; Eberlè et al., 2004; Hua et al., 1995a) come pure del cofattore NADPH necessario per la sintesi di queste molecole nelle cellule di mammiferi. (Brown and Goldstein, 1997; Horton, Goldstein and Brown, 2002). I lipidi e il colesterolo sono molto importanti perché entrano nella costituzione di molecole segnale essenziali, nei sali biliari, nei precursori di ormoni steroidei e nelle stesse membrane cellulari.

Nell'uomo sono stati caratterizzati i geni SREBF-1 e SREBF-2 che risultano localizzati rispettivamente nel cromosoma 17 (17 p11.2) e 22 (22 q13) (Hua et al., 1995a); SREBP-1 nel bovino è localizzato nel cromosoma 19 (35.234.637-35.250.672 forward strand) e nell'ovino nel cromosoma 11.

SREBP-1 e SREBP-2 hanno una dimensione compresa tra i 1133 e 1147 aminoacidi. A differenza delle altre proteine con il dominio bHLH-zip sono sintetizzate come precursori inattivi (Horton et al., 2002), si localizzano sulla membrana del reticolo endoplasmatico e risultano costituite da tre segmenti. Il segmento NH₂-terminale comprende il dominio acido e il dominio bHLH-zip (basic helix-loop-helix zipper) di circa 500 aminoacidi, seguito da un residuo di circa 80 aa. e da il COOH-terminale di circa 550 aa. (Hua et al., 1995b).

Un modello in cui il residuo di 80 aa. è caratterizzato da 2 segmenti idrofobici transmembrana separati da uno idrofilo di circa 30 aa. è stato

proposto dagli stessi autori; Tale residuo si proietta nel lume dell'organello citoplasmatico mentre i due terminali NH₂ e COOH sono rivolti verso il citosol.

In sperimentazioni effettuate sull'hamster l'attaccamento alla membrana avviene nelle due regioni idrofobe nelle posizioni aminoacidiche comprese tra il 477-497 e 536-556 (Sato et al., 1994).

Il dominio acido presente sul segmento NH₂ ha la funzione di attivare la trascrizione mentre il bHLH-zip media la dimerizzazione e il legame con il DNA (Hua et al., 1993, 1995b).

Fino ad ora sono state identificate 3 isoforme di SREBPs ossia 1a, 1c e 2.

Il dominio bHLH-zip è caratterizzato da un segmento idrofobo di 22 aa. che attraversa la membrana del reticolo endoplasmatico, da un residuo idrofilo di circa 31 aa. proiettati nel lume dell'organello e da un ulteriore segmento idrofobo di 22 aa.

Il dominio acido del NH₂-terminale presenta 42 aa., 24 aa., 48 aa. di cui 12, 6, 14 acidi, rispettivamente nell'isoforma 1a, 1c e 2 (Brown and Goldstein, 1997).

L'isomero 1c per via del più corto dominio e della minor presenza di amminoacidi è una proteina di attivazione più debole rispetto ad 1a e 2 (Shimomura et al., 1997; Shimano et al., 1997; Eberlè et al., 2004)

SREBP-1c interagisce con altre proteine che partecipano alla trascrizione del complesso; infatti a livelli basali supporta la trascrizione dei geni per la sintesi basale di acidi grassi quando la domanda di colesterolo è ridotta ma quando la domanda di quest'ultimo cresce l'azione di SREBP-2

sostituisce quella di 1c facendo supporre che SREBP-2 sia un più forte attivatore del promotore SRE-1 (Shimano et al., 1997).

SREBP-1a e 1c sono trascritti dallo stesso gene ma sono caratterizzati da uno splicing differente a livello del primo esone con formazione dell'esone 1a e 1c (Figura 5). E' proprio qui che viene trascritto parte del dominio acido di attivazione (Shimano et al., 1997; Horton et al., 2002); infatti a livello della parte terminale in 5' del mRNA esistono 2 forme differenti dovute allo splicing che presentano un uguale esone 2 facendo presumere che vengano trascritti da differenti promotori (Shimomura et al., 1997). Nell'uomo anche nella posizione finale in 3', nell'estremità COOH-terminale, è presente uno splicing alternativo che da origine nell'esone 18 e 19 alle due classi a e c (Figura 5); 18a e 19a codificano un residuo amminoacidico di 113 aa., 18c e 19c di 37 aa. (Hua et al., 1995a).

Lo splicing presente nella regione finale in 3' implica nella classe c un clivaggio meno efficiente e non sterolo dipendente o comunque sterolo-resistente tanto da far avanzare un ipotesi sul fatto che SREBP-1c non sia regolato dagli steroli e che l'isoforma in "3'end" possa in qualche modo interferire con la regolazione (Hua et al., 1996b).

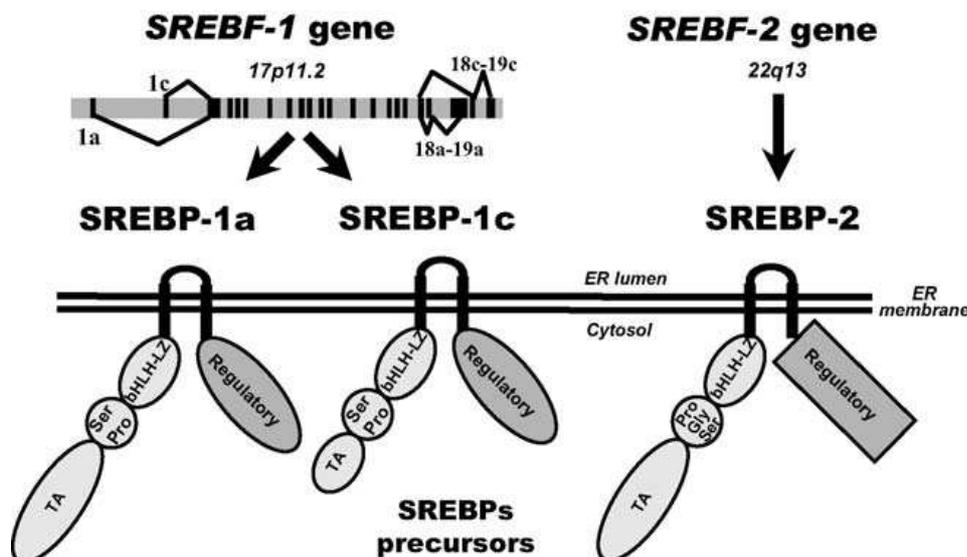


Figura 5. Famiglia di SREBPs e struttura (Eberlè et al., 2004).

SREBPs: regolazione e interazioni

I fattori di trascrizione SREBP vengono regolati a diversi livelli: a livello trascrizionale, a livello di clivaggio proteolitico dei precursori e a livello della forma matura nucleare (nSREBP), con modificazioni post-traslazionali. Infatti tra le tre isoforme esistono sostanziali differenze di regolazione per cui 1a e 2 sono regolate a livello di precursori mentre 1c principalmente a livello trascrizionale (Eberlè et al., 2004).

Azzout-Marniche et al. (2000) hanno evidenziato in colture di cellule epatiche di topo che i precursori dell'isoforma 1c aumentano sotto stimolazione dell'insulina, la quale agisce attraverso la via della fosfatidil chinasi e con la successiva attivazione di quei meccanismi implicati nell'induzione del precursore.

I precursori di SREBPs per poter essere attivati hanno bisogno di essere veicolati nell'apparato del Golgi dove avvengono due tagli enzimatici.

Hua et al. (1996a) hanno isolato il cDNA di SCAP che regola con la propria espressione il metabolismo dei lipidi, favorisce il rilascio dalla membrana dei fattori di trascrizione SREBPs e accompagna gli stessi all'apparato del Golgi

SCAP è una proteina legata alla membrana del reticolo endoplasmatico che presenta 2 domini: il dominio di membrana NH₂-terminale composto da 730 aa. caratterizzato da alternate sequenze idrofile e idrofobe e il dominio idrofilo COOH-terminale che si proietta nel citosol, costituito da 546 aa. organizzati in 4 sequenze ripetute di circa 40 aa. appartenenti alla famiglia WD, (dominio che media l'interazione proteina-proteina) la quale, è ugualmente ripetuta in molte proteine (Hua et al., 1996a; Brown and Goldstein, 1997; Nohturfft, Brown and Goldstein, 1998).

Il legame per la formazione del complesso avviene tra la regione ripetuta e citoplasmatica WD di SCAP e il dominio del versante citoplasmatico COOH-terminale di SREBP (Brown and Goldstein, 1997).

SCAP oltre ad essere una molecola trasportatrice è anche una molecola sensore di steroli (Horton et al., 2002) in quanto, quando la cellula si impoverisce di colesterolo accompagna SREBPs dalla membrana del reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi dove sono presenti 2 proteasi, S1P e S2P. (Figura 6) Mutazioni a livello di sequenza possono indurre una colesterolo-resistenza o una superattività (Brown and Goldstein, 1997).

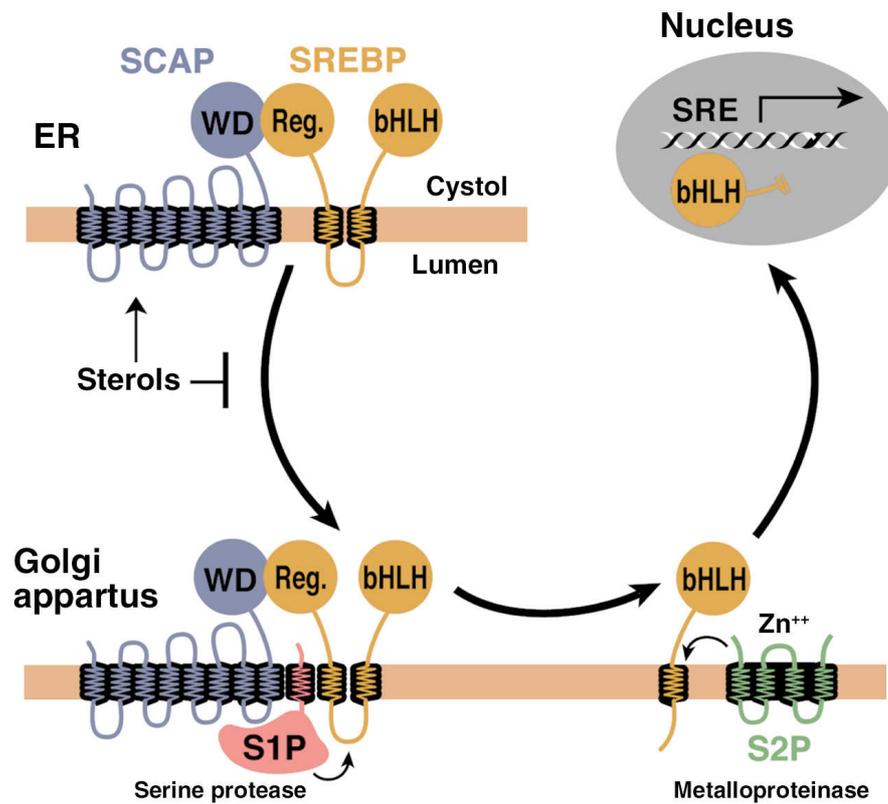


Figura 6. Rilascio e attivazione di SREBP. (Horton et al., 2002).

Eccessi di colesterolo invece bloccano il trasporto ed il processamento di SREBPs impedendo il movimento laterale nella membrana del reticolo endoplasmatico all'interno delle vescicole COPIII. L'inserimento di SREBPs all'interno delle vescicole è mediato dalla proteina SAR-1 capace di reclutare una proteina eterodimero di rivestimento Sec23/Sec24 che recluta un altro eterodimero Sec13/Sec31 con il quale costituisce la copertura delle vescicole (Sun et al., 2005).

In risposta all'incremento di colesterolo SCAP subisce un cambiamento conformazionale che impedisce che il complesso venga incorporato nelle vescicole di trasporto del reticolo endoplasmatico (Horton

et al., 2002). Il cambiamento conformazionale aumenta così l'affinità tra lo stesso e INSIG1 e INSIG2, proteine regolatrici di membrana, presenti nel reticolo endoplasmatico che associandosi con il complesso SCAP-SREBPs (Figura 7) lo bloccano in loco in risposta al cambio del contenuto di colesterolo sulla membrana (Yang et al., 2002; Irisawa et al., 2009).

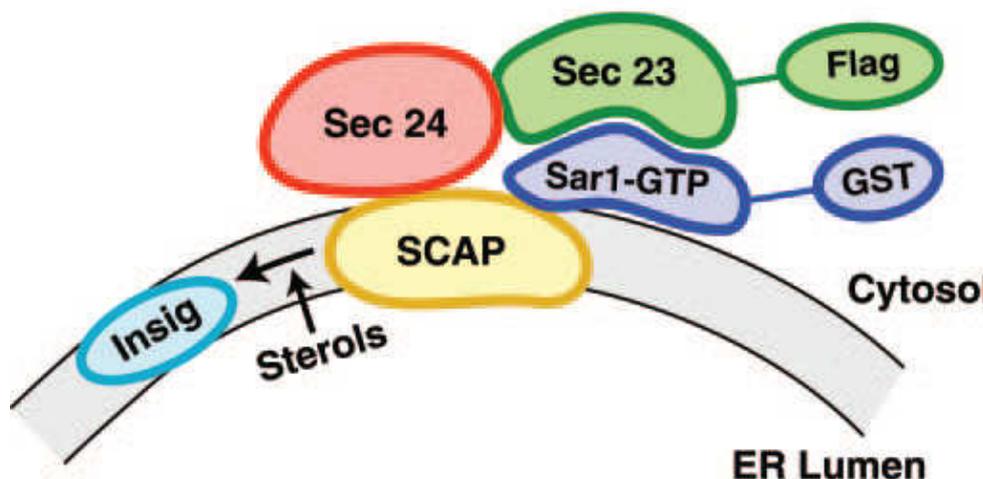


Figura 7. Regolazione sterolo mediata SCAP-COPIII. (Sun et al., 2005) modificata.

Nell'uomo le proteine INSIG1 e INSIG2 sono omologhe, con un'identità del 59%, entrambe idrofobe presentano sei eliche trans membrana.

INSIG2 è l'isoforma maggiormente conservata in molte specie e presenta il segmento NH₂-terminale più corto.

Tra le due forme inoltre esistono sostanziali differenze funzionali;

La produzione di INSIG1 in eccesso implica un aumento dell'inibizione del clivaggio sterolo-mediato di SREBPs determinando la ritenzione del complesso nel reticolo endoplasmatico. Così come SREBPs anche INSIG1 svolge un importante ruolo nell'omeostasi lipidica. Quando il

rapporto INSIG1 e SCAP è elevato il primo blocca il trasporto di SREBPs all'apparato del Golgi anche in mancanza di steroli esogeni (Yang et al., 2002;). Inoltre in colture cellulari mammarie, INSIG1 richiede per l'espressione la forma nucleare degli SREBPs. Per contro, INSIG2 ad elevati livelli di espressione, non ritiene il complesso SCAP-SREBP-1 nel reticolo endoplasmatico rugoso anche in assenza di steroli (Yabe, Brown and Goldstein, 2002). Il complesso INSIG1-SCAP-SREBPs rimane tale fino a quando non si riduce la concentrazione cellulare di colesterolo, infatti nel caso in cui le cellule siano impoverite di steroli e colesterolo o vi sia deficienza di SCAP, INSIG1 viene rapidamente ubiquitinata e degradata dai proteosomi. Quando invece si ha l'accumulo intracellulare di steroli la proteina INSIG1 viene stabilizzata. INSIG2 anche se funzionalmente è omologa ad INSIG1 viene degradata lentamente e la sua degradazione è sterolo indipendente (Xiao-Ying and Sheng-Qiu, 2010).

TCR8 (Trans location in renal cancer from chromosome 8) è un altro gene implicato nella regolazione dell'espressione del fattore di trascrizione SREBP-2 piuttosto che delle altre due isoforme. TCR8 codifica per una proteina presente nella membrana del reticolo endoplasmatico che presenta un dominio sterolo-sensibile e un'attività inibitoria sulla maturazione della proteina SREBP-2. La proteina codificata da TCR8 esplica la sua azione inibendo il legame tra Sec24 e il sito di legame MELADL di SCAP, mascherando lo stesso e impedendo così il trasporto del complesso SCAP-SREBPs al Golgi; MELADL è una sequenza esapeptidica, localizzata tra l'elica 6 e 7 del "loop" citoplasmatico (Sun et al., 2005).

Questa proteina inibitrice viene rapidamente degradata nella via proteosoma-ubiquitina. (Irisawa et al., 2009).

Irisawa et al. (2009) hanno constatato che una sovra espressione di TCR8 sopprime l'espressione dei geni target di SREBPs tra i quali HMG-Coa sintetasi e Squalene sintasi attraverso il controllo dell'attivazione di SREBPs;

S1P è una proteasi serino-lisina legata alla membrana mentre S2P è una proteasi idrofobica o una zinco metalloproteasi.

S1P agisce per prima e taglia SREBPs nel sito 1 a livello dell'anello che si affaccia sul lume del Golgi dividendolo in 2 metà; in questa fase il segmento NH₂-terminale rimane ancorato e rappresenta la forma molecolare immatura. Successivamente agisce S2P che taglia nel sito-2 del dominio trans-membrana e libera la forma matura bHLH-zip NH₂-terminale (Sakai et al., 1996, 1998; Brown and Goldstein, 1999; Horton et al., 2002).

La forma matura di SREBPs rilasciata nel citoplasma entra nel nucleo dove attiva la trascrizione di geni target imputati nella captazione e sintesi del colesterolo e degli acidi grassi insaturi (Lee et al., 2003). La proteina matura riconosce e si lega al promotore e precisamente a sequenze SRE-1 (sterol regulatory element 1) di circa 10 bp (Hua et al., 1993) con la stessa specificità, dimostrata in vitro, nelle diverse isoforme (tabella 3).

Tabella 3. Geni attivati da SREBPs (Shimano, 2001).

Gene	SRE promoter
<i>Cholesterol metabolism</i>	
LDL receptor	ATCACCCCAC
CoA synthase	CTCACCCCAC
	GCCACCCTAC
HMG CoA reductase	ACCGCACCAT
	CTCTCACCAC
Farnesyl diphosphate synthase	CTCACACGAG
Squalene synthase	ATCACGCCAG
	CTAGTGTGAG
SREBP-2	ATCACCCCAC
Lanosterol 14a-demethylase (Cyp51)	ATCACCTCAG
<i>Fatty acid metabolism</i>	
Acetyl CoA carboxylase	CCAT----TCAC
Fatty acid synthase	GCCACGCCAC
	GTCAGCCCAT
Stearoyl CoA desaturase-1 and 2	AGCAGATTGTG
AcylCoA binding protein (Diazepam)	CTCGCCCGAG
SREBP1	CTCACCCGAG
ATP citrate lyase	TCAGGCTAG
Malic enzyme	TCACCCGTCGGTG
PPAR gamma	ATCACTTGAG
Acetyl CoA synthase	ATTCATGTGACAT
	ATCACTCCAC
<i>Triglyceride synthesis</i>	
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	CTCAGCCTAG
	CTCACCCCAG
	GACACCCCAG
<i>Plasma lipoprotein metabolism</i>	
Lipoprotein lipase	CTCCCCCAA
HDL receptor (SRBI)	GCCACCTGCA

La regione bHLH-zip delle tre isoforme di SREBPs è altamente conservata (identità del 71%) e questo fa supporre la stessa tipologia di importazione nucleare (Nagoshi et al., 1999; Nagoshi and Yoneda, 2001). È stato dimostrato, in vitro e in vivo, che l'ingresso della forma matura di SREBP-2 (sotto forma di dimero) avviene grazie all'interazione e al legame

della β -importina con bHLH-zip il quale possiede un NSL (segnale di localizzazione nucleare).

Le tre isoforme all'interno del nucleo subiscono delle modificazioni covalenti per via dell'interazione con SUMO-1 (piccoli modificatori ubiquitina-correlati) (Hirano et al., 2003; Eberlè et al., 2004).

Il turn-over non è influenzato dalla concentrazione di steroli intracellulari, ma ritrovamenti di nSREBPs legati alla catena poliubiquitina fanno pensare che il sistema ubiquitina-proteosoma degradi SREBPs. Si ritiene che i substrati di degradazione del proteosoma 26S siano le forme attive che contengono il dominio bHLH-zip piuttosto che i precursori (Hirano et al., 2001).

Le tre isoforme SREBPs hanno diversi ruoli nella sintesi lipidica, i ruoli di 1c e 2 (Figura 8) sono più ristretti rispetto ad 1a (Horton et al., 2002); studi su topi transgenici evidenziano che mentre l'isoforma 1c è coinvolta nella sintesi di acidi grassi e nel metabolismo insulino-indotto, la 2 è specifica per la biosintesi del colesterolo mentre l'isoforma 1a è coinvolta in entrambe le vie (Shimano, 2001; Eberlè et al., 2004).

Nel topo la sovra espressione della isoforma 1a altera l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo tra i quali gli enzimi HMG CoA sintetasi, HMG CoA reduttasi, Squalene sintasi, nonché FAS, ACC, SCD1, i recettori LDL (Shimano et al., 1996; Shimomura et al., 1997) e ne determina livelli elevati, mentre la sovra espressione di 1c determina un' induzione di trascrizione di geni lipogenici (tra i quali FAS, ACC e LPL) senza coinvolgimento di quelli implicati nella colesterolo genesi (Shimano et al., 1997).

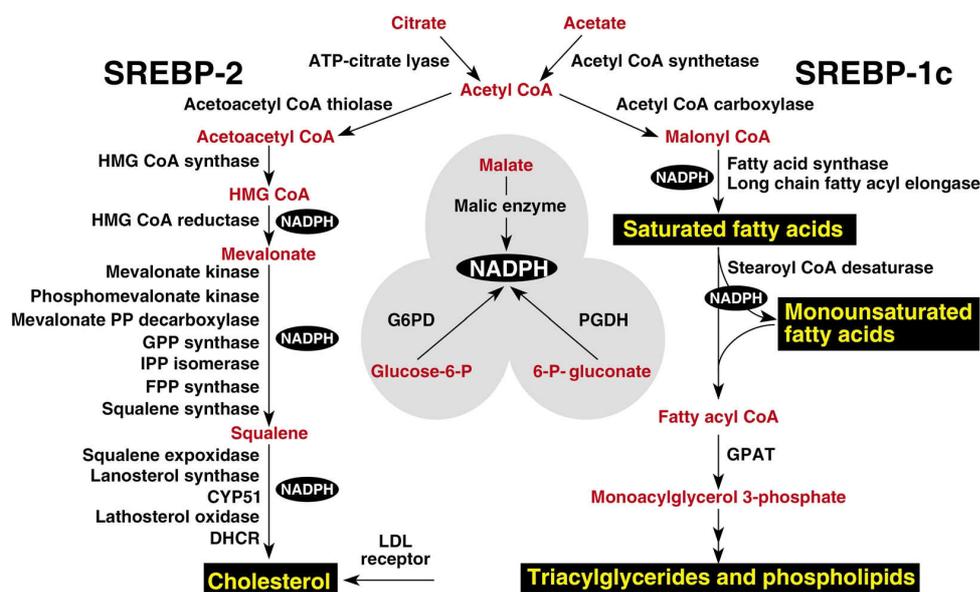


Figura 8. Geni regolati da SREBPs. (Horton et al., 2002).

Le tre isoforme attivano inoltre i geni coinvolti nella produzione di NADPH (Figura 8) che è consumato nelle fasi del metabolismo lipidico (Shimomura et al., 1998); infatti nel fegato di topi trans genici sono presenti elevati livelli di mRNA codificante per tutti gli enzimi implicati nelle vie biosintetiche di NADPH.

Nell'uomo e nel topo SREBP-1a è maggiormente espressa in linee cellulari e tessuti ad elevata capacità proliferativa come intestino e milza; il rapporto tra le due isoforme 1a: 1c può arrivare in questo caso anche a 10:1.

SREBP-1c è espressa nella maggior parte dei tessuti dove si evidenziano dei rapporti tra le due isoforme 1c e 1a elevati come nel tessuto adiposo, muscolo scheletrico, cervello, surrene e fegato ed in quest'ultimo il rapporto è di 9:1 (Eberlè et al., 2004; Shimano et al., 1997; Shimomura et al., 1997).

Numerosi geni, coinvolti nel metabolismo lipidico tra i quali anche SREBP-1, nello sviluppo e crescita cellulare e tissutale, nella risposta infiammatoria hanno un' espressione controllata dai PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) appartenenti alla superfamiglia di recettori-ormonali nucleari. La loro attivazione si ritiene sia dovuta all'interazione con gli acidi grassi a lunga catena (Bionaz et al., 2012; Bionaz et al., 2013a).

I PPARs formano con RXR (Retinod-X-Receptor) un eterodimero e grazie al dominio LBD sono capaci di legare i ligandi. Questa interazione implica la modificazione covalente di PPARs con attivazione dei recettori nucleari. PPAR-RXR si lega al PPARE (PPAR response element) nella regione del promotore di un gene bersaglio inducendone o deprimendone l'espressione.

Nei monogastrici PPAR α è maggiormente espresso nel fegato, nei reni, nell'intestino e nel cuore; PPAR γ nelle cellule adipose mentre PPAR β/δ sembra essere ubiquitario. Gli isotipi α e β/δ legano sia gli acidi grassi a lunga catena saturi e insaturi mentre γ è più incline a legare i polinsaturi (Bionaz et al., 2013b).

I più potenti ligandi sono l'acido linoleico, l'acido linoleico, l'acido arachidonico e suoi derivati.

Nei ruminanti per contro gli acidi grassi a lunga catena saturi hanno maggior effetto sull'espressione di quei geni bersaglio di PPAR α e γ rispetto a gli insaturi. I maggiori agonisti evidenziati sono C16:0 e C18:0.

Il PPAR γ nei poligastrici controlla i geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi nel latte ed è altamente espresso durante la gestazione e lattazione.

Il fatto che anche SREBF-1 sia un gene target deriva dal fatto che l'attivazione di PPAR α con agonisti determina l'incremento dell'espressione di SREBF-1. Inoltre l'attivazione di PPAR γ in cellule MAC-T ha evidenziato che esso controlla l'espressione di diversi geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi nel latte. (Bionaz et al., 2013b; Bionaz et al., 2012)

SCOPO

In Sardegna il comparto dell'allevamento ovino e principalmente della razza Sarda e dell'indotto lattiero-caseario che ne deriva ha degli importanti risvolti economici. Già da molti decenni si cerca di migliorare la razza e le sue performance produttive perfezionando le metodiche manageriali, alimentari e di allevamento.

Come ormai evidenziato da autori in numerosi lavori un ulteriore importante e non trascurabile tecnica è quella della selezione genetica ormai applicata su altre specie animali in primis su quella bovina. La capacità di programmare accoppiamenti tra i migliori riproduttori dei quali si conoscono il patrimonio genetico e le performance produttive può riflettersi nella selezione di una discendenza con migliori caratteri genetico-fenotipici in grado di migliorare i caratteri razziali.

Di per se la pecora di razza Sarda è una buona produttrice di latte con contenuto di grasso e proteine rispettivamente di 6,70 g/100 ml e di 6,3 g/100 ml rispettivamente (Pulina et al., 2006)

La possibilità di studiare il patrimonio genetico e quindi anche i geni implicati nella regolazione dei caratteri produttivi, potrebbe insieme alle tecniche di allevamento all'avanguardia ed alla somministrazione di buoni regimi alimentari avere dei risvolti importanti sia di tipo qualitativo che di tipo quantitativo sulla produzione latte.

Da diverso tempo la quantità e qualità del grasso presente nel latte costituisce uno degli argomenti oggetto di studio. È risaputo che alcune componenti presenti nel latte dei ruminanti, come gli acidi grassi saturi, hanno risvolti negativi nell'alimentazione umana inducendo ipercolesterolemia etc. Gli acidi grassi insaturi, gli isomeri CLA e le

sfingomieline, invece, posseggono importanti proprietà nutrizionali e terapeutiche inducendo degli effetti positivi sulla salute umana. Infatti oltre alla riduzione delle malattie cardiovascolari questi acidi grassi hanno proprietà anticarcinogene e antiarterosclerotiche.

Uno dei geni implicati nella regolazione della secrezione mammaria dei grassi nel latte è SREBP-1 ampiamente studiato nella specie bovina ma la cui attività ed influenza nell'ovino non è stata ancora valutata.

SREBP-1 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione SREBPs, la cui importante attività è quella di regolare l'espressione di un ampio range di enzimi deputati al processo di biosintesi degli acidi grassi e del colesterolo.

Nel bovino l'individuazione e lo studio di polimorfismi all'interno della sequenza del gene SREBP-1 ha fatto sì che gli stessi venissero correlati con le performance produttive. Individuare e studiare polimorfismi anche nell'ovino di razza Sarda potrebbe aprire scenari importanti nella selezione genetica dei riproduttori sia per migliorare i caratteri produttivi della razza ma anche per poter capire come sia possibile migliorare la qualità del latte.

Lo scopo della presente ricerca è caratterizzare l'intera sequenza codificante del gene SREBP-1 in pecore di razza Sarda e valutare la presenza di polimorfismi (SNPs) e l'eventuale esistenza di associazione tra gli SNPs ed i caratteri produttivi.

Materiali e metodi

La ricerca è stata effettuata utilizzando 80 pecore di razza Sarda scelte da 2 allevamenti presenti nel nord Sardegna e soggette alle stesse condizioni alimentari e di management. Le pecore sono state alimentate su pascolo di leguminose e graminacee con supplemento di 200g/d di alimento concentrato commerciale, somministrato durante la mungitura mattutina e serale, contenente 20,4% di proteine grezze e con un apporto energetico di 12,5 MJ ME/Kg DM . Con il ricovero serale è stato garantito agli animali il libero accesso ad acqua e fieno (11,1% di protidi grezzi e 7,2 MJ ME/Kg DM).

Da ogni soggetto è stato prelevato un campione di 10 ml di sangue dalla vena giugulare con vacumm tube (BD Vacuntainer System, Belliver Industrial Estate, Plymouth,UK) contenente come anticoagulante EDTA, dal quale successivamente sono state realizzate diverse aliquote da 300 µl che venivano conservate a -20°C fino al successivo utilizzo.

Di ogni soggetto è stata misurata la quantità di latte prodotta nelle due mungiture giornaliere e una quantità di 50 ml è stata raccolta per essere sottoposta da parte dei laboratori ARA (associazione regionale allevatori) alla determinazione della concentrazione in proteine, grasso, lattosio ed alla conta della carica microbica e delle cellule somatiche.

Nell'immediato post prelievo, il latte è stato refrigerato a 4°C per essere trasportato presso il nostro laboratorio.

Il DNA genomico è stato estratto dall'aliquota di 300 µl di sangue intero con un Kit di estrazione (Genomic DNA from blood, Macherey–Nagel, Germany) e dopo la valutazione della concentrazione e della purezza mediante lettura spettrofotometrica è stato conservato a -20°C.

Sono stati utilizzati i campioni con rapporto 260/280 compreso tra 1,60-1,90 e rapporto 260/230, intorno a 2,20 e con concentrazione maggiore di 50 ng/μl. Per l'amplificazione degli interi tratti codificati sono state costruite e messe a punto 19 coppie di primers cercando di includere nell'amplicone l'intera sequenza codificante e la parti adiacenti degli introni

L'unica eccezione è rappresentata dall'amplicone 19 per l'amplificazione del quale è stato necessario utilizzare esclusivamente i tratti codificanti.

Per la costruzione dei primers è stato utilizzato il software Primer3 Plus (2007 35) e la sequenza bovina ENSEMBL (ENSBTAG00000007884).

Di seguito vengono descritte le sequenze nucleotidiche di ciascun primer.

Frammento 1

Parte regione 5'UTR, esone 1, parte introne 1

1 FW 5'CCCAGTTTCCGAGGAACTTTTC 3'
1 RW 5'GGCCCTGACGCACCTTCTAT 3'

Frammento 2

Parte introne 1, esone 2, parte introne 2

2 FW 5'ACGGCTGCTCACGGCTTT 3'
2 RW 5'AGCCTGCAAACCTCCTTACCA 3'

Frammento 3

Parte introne 2, esone 3, parte introne 3

3 FW 5'AGCCCCAGCCTTCATCTCT 3'
3 RW 5'TCCCTGATGCCAGCCAGAC 3'

Frammento 4

Parte esone 3, introne 3, esone 4, parte introne 4

4 FW 5'CCTCCCAGATACAGCAGGTC 3'
4 RW 5'GGCAGAGTTAGCAGGTGGAC 3'

Frammento 5

Parte introne 4, esone 5, parte introne 5

5 FW 5'CCTGACGACCATGAAAACAG 3'
 5 RW 5'TATTAGGGCCTCAGCCCACA 3'

Frammento 6

Parte introne 5, esone 6, parte introne 6

6 FW 5'CTCTGCCCTCTTGCTTCAGT 3'
 6 RW 5'AACTTCCAGGGACACCAG 3'

Frammento 7

Parte introne 6, esone 7, parte introne 7

7 FW 5'CCTGGTGTCCCTGGAAGTT 3'
 7 RW 5'CCCTCAGCCTTGTCTTTCTTC 3'

Frammento 8

Parte introne 7, esone 8, parte introne 8

8 FW 5'GCTGAAGGGTTCCCACAGTA 3'
 8 RW 5'CACAGGACGGGATCCACATA 3'

Frammento 9

Parte introne 8, esone 9, parte introne 9

9 FW 5'GATCTTGTCTGTGGGCTTG 3'
 9 RW 5'AGCACCTTCCCAGGCACT 3'

Frammento 10

Parte introne 9, esone 10, parte introne 10

10 FW 5'CCCAAGATGGAGGAGTAGCA 3'
 10 RW 5'TGGAAGATAAGAGGGCGTGA 3'

Frammento 11

Parte introne 10, esone 11, parte introne 11

11 FW 5'ATGGGTATGCCGGTGAGG 3'
 11 RW 5'GCTGTTGAGGAGGGAATGG 3'

Frammento 12

Parte introne 11, esone 12, parte introne 12

12 FW 5'GTGAGGGCTGCACAGAAAG 3'
 12 RW 5'AGGCAAGGGACAAGACTG 3'

Frammento 13

Parte introne 12, esone 13, parte introne 13

13 FW 5'GGTGCGTGTGCAAAGGAG 3'
 13 RW 5'CCCAGAGAGGAACCGAAATG 3'

Frammento 14

Parte introne 13, esone 14, parte introne 14

14 FW 5'AGCCATGTTGACCGCCTGT 3'
 14 RW 5'GCAGAAACTCAGCCACTG 3'

Frammento 15

Parte introne 14, esone 15, parte introne 15

15 FW 5' GCTGAGTTTCTGCCTCCTGT 3'
 15 RW 5' CTCTGCCCTGGTTCTGGAT 3'

Frammento 16

Parte introne 15, esone 16, parte introne 16

16 FW 5' ATCCAGAACCAGGGCAGAG 3'
 16 RW 5' CATCCAGGGAGTGGAAAGG 3'

Frammento 17

Parte introne 16, esone 17, parte introne 17

17 FW 5' TTGTGAGGCAGGTGCAGTG 3'
 17 RW 5' AGTCGGGCAGTGGCTTCAT 3'

Frammento 18

Parte introne 17, esone 18, parte introne 18

18 FW 5' GGGACAGGCATGAGGTGT 3'
 18 RW 5' CATCTTACGGTCTCCCTCTG 3'

Frammento 19

Parte esone 18, introne 18, parte codificante esone 19

19 FW 5' CTTCTGGACCGTAGCCTGAG 3'
 19 RW 5' AGCTGGAGGTCACAGTGGTC 3'

Per tutti i frammenti la reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 µl e sono stati utilizzati ~ 100 ng di DNA genomico.

I volumi finali dei diversi reagenti utilizzati per i 19 frammenti sono indicati nella Tabella 4

Tabella 4. Condizioni di pcr.

MIX PCR							
Fram.	Buffer	MgCl₂	Dntps	P.for	P.rev	Taq	DNA
		mM	mM	μM	μM	UI	ng
1	1X	1,5	0,2	0,4	0,4	1	100
2	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
3	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
4	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
5	1X	1,5	0,2	0,4	0,4	1	100
6	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
7	1X	1,5	0,2	0,2	0,2	1	100
8	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
9	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
10	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
11	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
12	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
13	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
14	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
15	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
16	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
17	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
18	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100
19	1X	1,5	0,2	0,32	0,32	1	100

Le condizioni di amplificazione (Tabella 5) presentano per tutti i 19 frammenti una denaturazione iniziale a 95°C per 2,30 min, 35 cicli caratterizzati da una denaturazione ciclica a 95°C per 20 secondi e una estensione finale a 72°C per 10 minuti; le condizioni di annealing e di denaturazione ciclica invece variano in base alle temperature ottimali per ciascuna coppia di primers e alla diversa lunghezza presunta del frammento amplificato, rispettivamente.

Tabella 5. Condizioni di amplificazione dei frammenti.

Programmi di PCR						
Fram	Den. Iniz.	Den.cicl.	Annealing	Est.cicl.	Est.finale	cicli
1	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	60,5° c 30 sec	72° c 14 sec	72° c 10 min	35
2	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	64,3° c 30 sec	72° c 34 sec	72° c 10 min	35
3	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	62° c 30 sec	72° c 16 sec	72° c 10 min	35
4	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	64° c 30 sec	72° c 20sec	72° c 10 min	35
5	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	61° c 30 sec	72° c 29 sec	72° c 10 min	35
6	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	54,7° c 30 sec	72° c 14 sec	72° c 10 min	35
7	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	59° c 30 sec	72° c 33 sec	72° c 10 min	35
8	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	63,1° c 30 sec	72° c 22 sec	72° c 10 min	35
9	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	67° c 30 sec	72° c 20 sec	72° c 10 min	35
10	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	62° c 30 sec	72° c 27 sec	72° c 10 min	35
11	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	61° c 30 sec	72° c 23 sec	72° c 10 min	35
12	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	65° c 30 sec	72° c 25 sec	72° c 10 min	35
13	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	56° c 30 sec	72° c 17 sec	72° c 10 min	35
14	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	61° c 30 sec	72° c 16 sec	72° c 10 min	35
15	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	60,1° c 30 sec	72° c 17 sec	72° c 10 min	35
16	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	64° c 30 sec	72° c 19 sec	72° c 10 min	35
17	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	64° c 30 sec	72° c 29 sec	72° c 10 min	35
18	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	62,1° c 30 sec	72° c 20 sec	72° c 10 min	35
19	95° c 2,30 min.	95° c 20 sec	57° c 30 sec	72° c 36 sec	72° c 10 min	35

Per le amplificazioni è stato utilizzato il Mastercycle ep gradient S, Eppendorf AG, Hamburg, Germany.

Una volta ultimata la reazione di PCR gli ampliconi sono stati risolti su gel di agarosio al 1-1,5% ((w/v) Gelly, Euroclone, UK) facendoli correre in parallelo con un marker da 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizzando il Buffer TAE 1% ad un voltaggio costante di 100 V per 30 minuti.

Ultimata la corsa elettroforetica, i prodotti di PCR, colorati con una soluzione di bromuro di etidio al 1‰ sono stati visualizzati utilizzando il trans illuminatore (UVItec, Cambridge, UK).

10 campioni di ogni frammento amplificato sono stati purificati mediante l'utilizzo del kit Charge Switch-PCR Clean-Up (life technologies, Carlsbad, CA, USA) e sequenziati in direzione forward e reverse da un servizio commerciale di sequenziamento (Bio-Fab Research srl, Rome, Italy).

Le sequenze sono state confrontate con quelle depositate in banca dati attraverso il programma BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e analizzate con il software FinchTV (Geospiza, Seattle, USA).

L'allineamento delle sequenze è stato eseguito con il software BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

Una volta constatata l'esatta amplificazione, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad una migrazione elettroforetica in gel di acrilamide utilizzando la tecnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorfism),

metodica impiegata per la ricerca ed individuazione di sequenze di DNA mutate.

In base alle diverse prove di laboratorio (Tabella 6) effettuate, sono state individuate concentrazioni del gel e condizioni di corsa differenti per i tutti i frammenti.

Di seguito sono elencati i reagenti utilizzati per la preparazione dei gel di SSCP e del tampone di corsa: soluzione di acrilammide al 40% (w/v) (acrylamide:bis-acrylamide 37,5:1), Tris-borate-EDTA ((TBE) 0,44 M di tris base, 0,44 M di acido borico 0,01 M di EDTA a pH 8.0), ammonio persolfato (APS) al 10%, tetrametiletilene-diamina (TEMED) e glicerolo.

2,5 µl di prodotto di PCR è stato denaturato per 10 minuti a 95°C in 7,5 µl di una soluzione denaturante costituita da 1 mg/ml di xilene cianolo- (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA), 1 mg/ml di blu bromofenolo- (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 10 mM EDTA (pH 8), 8 ml di formammide deionizzata (Sigma- Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) e successivamente mantenuto in ghiaccio per evitare la rinaturazione dell'amplificato fino al caricamento sul gel di acrilamide.

Di seguito sono riportate le condizioni di corsa e della mix del gel di acrilammide per ciascun frammento:

Tabella 6. Concentrazione del gel di acrilamide e condizioni di corsa.

Protocollo gel SSCP						Condizioni corsa		
Fram.	TBE	Glicerolo	APS	Temed	Acril.	°C	T	Progr
1	0,5X	-	0,05%	0,10%	10%	12	6 h	p1
2	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
3	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	12%	12	16 h	p2
4	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	10%	12	16 h	p2
5	0,5X	1 ml	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p1
6	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	12%	12	16 h	p2
7	0,5X	-	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
8	0,5X	-	0,05%	0,10%	10%	12	16 h	p2
9	0,5X	1 ml	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
10	0,5X	-	0,05%	0,10%	10%	15	16 h	p1
11	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
12	0,5X	-	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
13	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	10%	12	16 h	p2
14	1,0X	2 ml	0,05%	0,10%	15%	15	24 h	p1
15	0,5X	1 ml	0,05%	0,10%	10%	12	6 h	p1
16	0,5X	1 ml	0,05%	0,10%	8%	12	16 h	p2
17	0,5X	2 ml	0,05%	0,10%	6%	12	17 h	p2
18	1,0X	2 ml	0,05%	0,10%	15%	15	24 h	p1
19	-	-	-	-	-	-	-	-

p1→ 1200 V; 25 W

p2→ 1100 V; 15 W

Tutti i campioni dei frammenti da 1 a 18 sono stati risolti in elettroforesi verticale con l'utilizzo del vertical electrophoresis DCode TM Universal mutation system per SSCP (Bio-Rad laboratories, Segrate, MI, Italy).

Il gel è stato colorato per 30 minuti con Sybr Gold (Life technologies Europe BV, Monza, MB, Italy) e dopo di che visualizzato e fotografato al trans illuminatore UV (UVItac, Cambridge, UK).

Alcuni campioni rappresentativi di ciascun frammento sono stati purificati e sequenziati in direzione Forward e Reverse e le rispettive sequenze nucleotidiche sono state allineate e confrontate come precedentemente descritto.

Analisi statistica

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il programma R Project (R Core Team, 2013).

La frequenza allelica, genotipica e l'equilibrio di Hardy e Weinberg sono stati ottenuti e analizzati con l'utilizzo del software GENEPOP (4.1—<http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>) (Raymond M. and Rousset F., 1995; Rousset F., 2008) applicando il test del Chi-quadro.

Per lo studio delle frequenze aplotipiche è stato usato il pacchetto di R-Project "Haplo.stats" (Sinnwell and Schaid, 2013).

Per le analisi delle associazioni tra gli SNPs presenti nella sequenza di SREBP1, la produzione latte e il contenuto in grassi e proteine è stato utilizzato il modello generale lineare (GLM).

Il modello utilizzato è:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + G_j + E_{ijk}$$

Dove Y è la variabile dipendente, F_i è l'effetto dell'allevamento, G_j è l'effetto fisso del genotipo/aplotipo ed E_{ijk} è l'effetto dell'errore.

Il valore $P < 0,05$ è considerato statisticamente significativo.

Risultati

Con la PCR sono stati ottenuti 19 ampliconi (Figura 9 e 10) delle dimensioni indicate in tabella 7 e 8.

Ciascun frammento è rappresentato dall'intera sequenza esonica e da una piccola parte intronica adiacente. Soltanto il frammento 19 contiene una parte dell'esone 18, l'introne 18 e la sola regione codificante dell'esone 19.

La risoluzione degli amplificati con la metodica SSCP (Figure 11, 15, 19, 23 e 26) ha permesso di individuare differenti pattern in alcuni frammenti e l'analisi degli elettroferogrammi (Figure da 12 a 14, da 16 a 18, da 20 a 22, 24, 25, da 27 a 31) ottenuti mediante il sequenziamento ha evidenziato due mutazioni nel frammento 3 (G980A e G981A) localizzate entrambi nell'esone 3; una mutazione nel frammento 5 (C1686T), una nel frammento 11 (C4294T) e una nel frammento 15 (C5448T) situate nell'esone 5, nell'introne 11 e nell'esone 15 rispettivamente. Inoltre due SNPs sono stati individuati a livello esonico nel frammento 16 (G5657A e G5688A) (Tabella 9).

La presenza di sostituzioni nucleotidiche nella regione intronica del bovino rispetto all'ovino non ci ha permesso di disegnare i primers nella regione intronica adiacente all'esone 19.

La coppia di primer utilizzata ci ha permesso di amplificare un frammento di 600 paia di basi comprendente l'intero tratto codificante .

L'eccessiva lunghezza del frammento non ha permesso però di effettuare una corsa elettroforetica in gel di acrilamide e quindi di individuare la presenza di eventuali polimorfismi.

Diversi campioni sequenziati hanno mostrato la presenza di uno SNP nella regione codificante dell'esone 19 (C6872T) (Figura 32 e 33). La mancanza di endonucleasi di restrizione che possano riconoscere il sito specifico di interesse ci preclude, per ora, la possibilità di considerare tale polimorfismo.

Le sequenze e i relativi SNPs sono stati depositati in banca dati (GenBank) con numero di accesso KF360085.2

Tabella 7. Dimensione in bp dei frammenti amplificati da 1 a 10.

Frammento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lunghezza bp	221	523	238	333	436	228	495	365	327	398

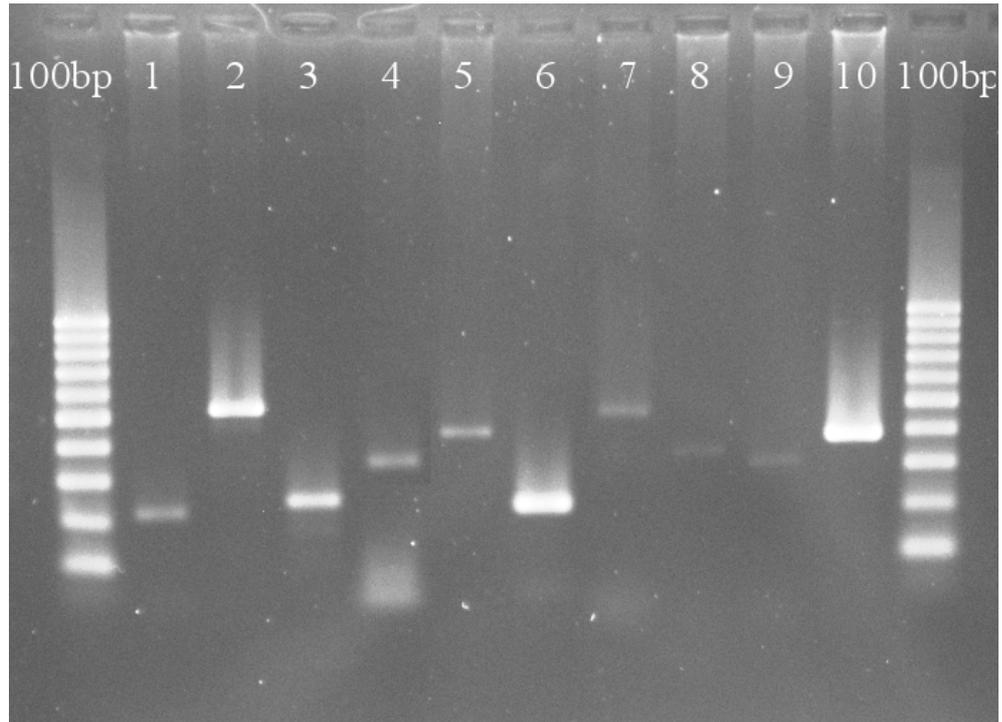
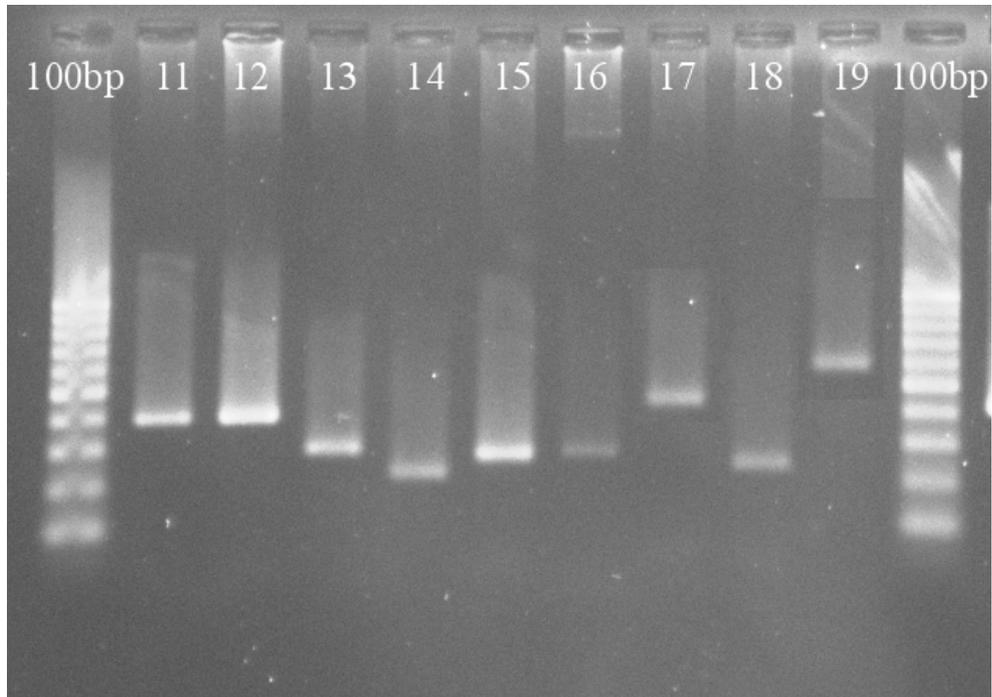
**Figura 9.** Corsa elettroforetica in agarosio gel al 1,5% dei frammenti amplificati da 1 a 10

Tabella 8. Dimensione in bp dei frammenti amplificati da 11 a 19.

Frammento	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Lunghezza bp	387	388	284	222	276	287	455	246	600

**Figura 10.** Corsa elettroforetica in agarosio gel al 1,5% dei frammenti amplificati da 11 a 19.**Tabella 9.** Polimorfismi e loro localizzazione.

posizione SNPs (bp)	980	981	1686	4294	5448	5657	5688	6872
Esone/introne	E3	E3	E5	I11	E15	E16	E16	E19
Sost. nucleotidica	G/T	G/T	C/T	C/T	C/T	G/A	G/A	C/T
Sost. amminoacidica		Gly/Val					Gly/Ser	

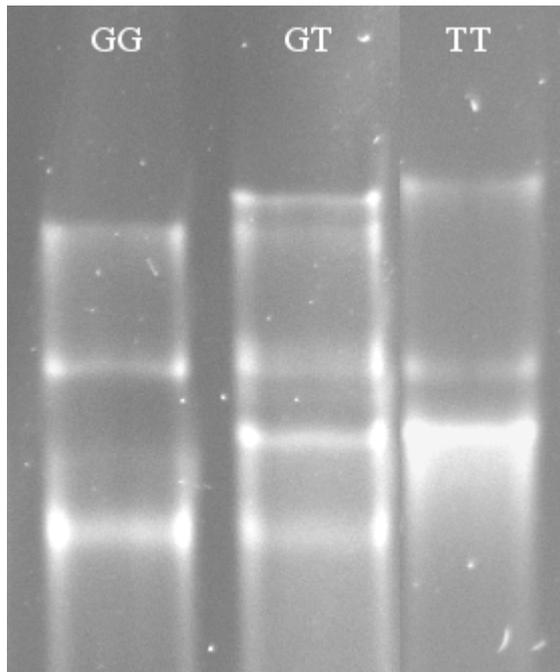


Figura 11. SSCP del 3° frammento con i 3 diversi profili individuati.

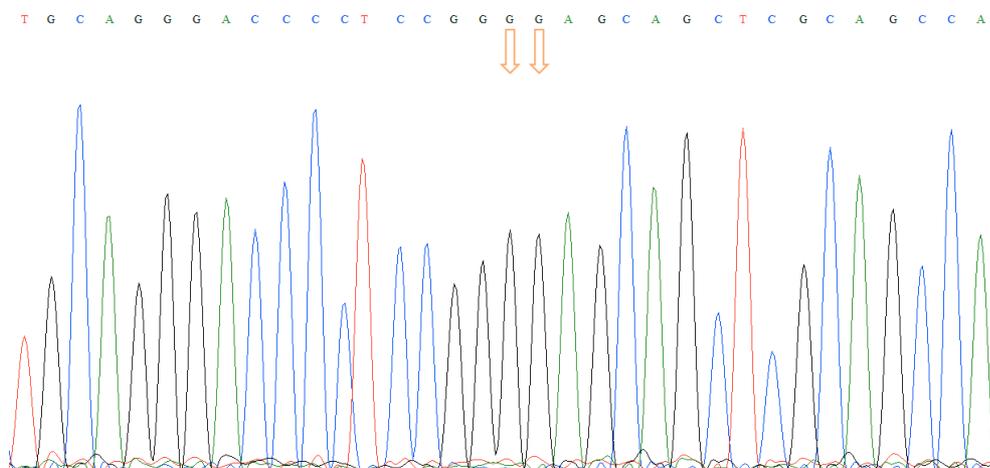


Figura 12. Elettroferogramma di porzione del 3° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 980 e 981 (omozigoti GG) nei diversi soggetti esaminati

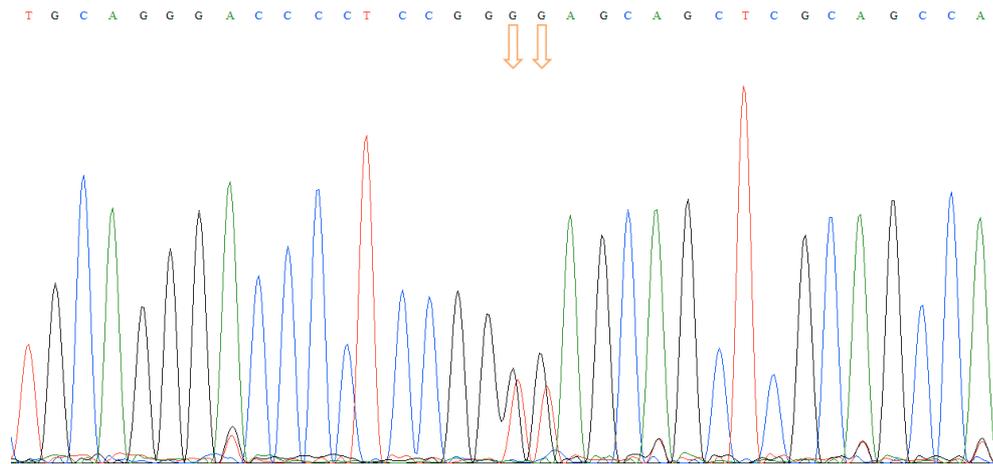


Figura 13. Elettroferogramma di porzione del 3° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 980 e 981 (eterozigote G/T) nei diversi soggetti esaminati.

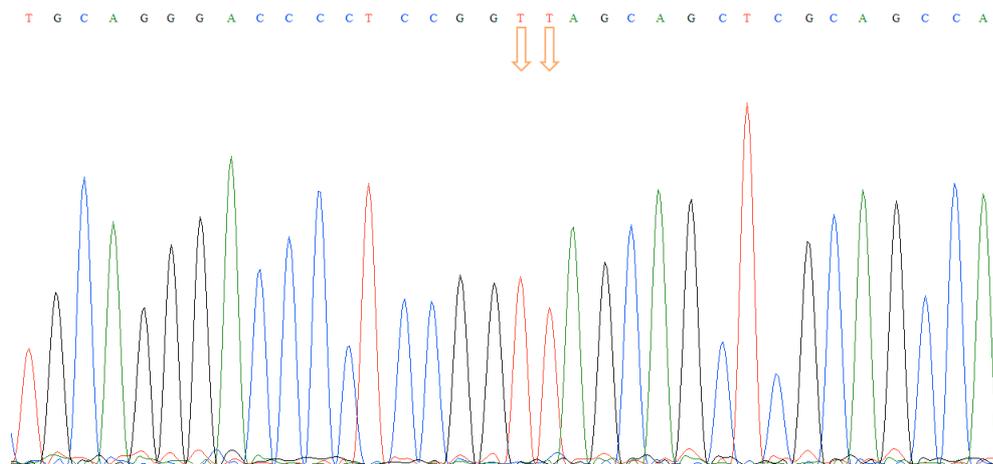


Figura 14. Elettroferogramma di porzione del 3° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 980 e 981 (omozigote T/T) nei diversi soggetti esaminati.

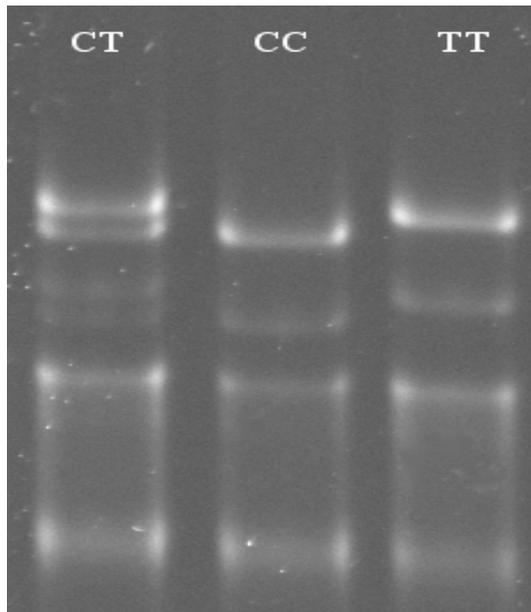


Figura 15. SSCP del 5° frammento con i 3 diversi profili individuati.

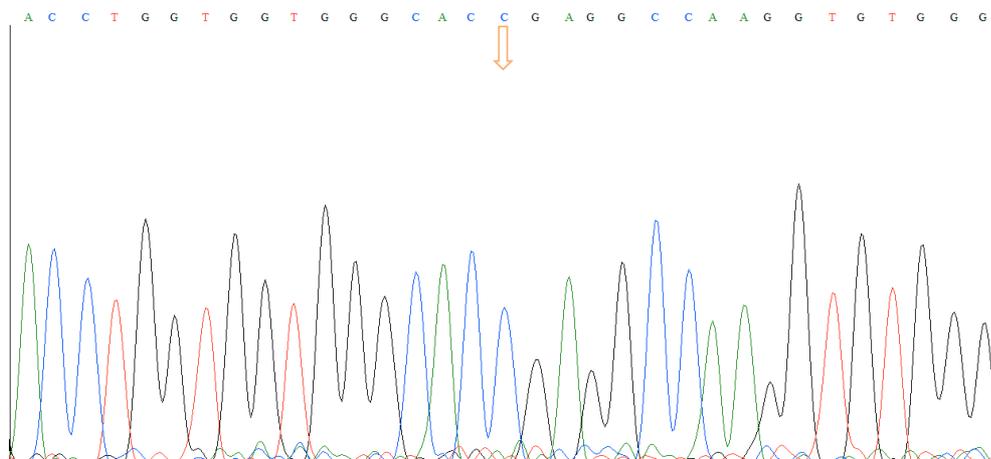


Figura 16. Elettroferogramma di porzione del 5° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 1686 (omozigote C/C) nei diversi soggetti esaminati.

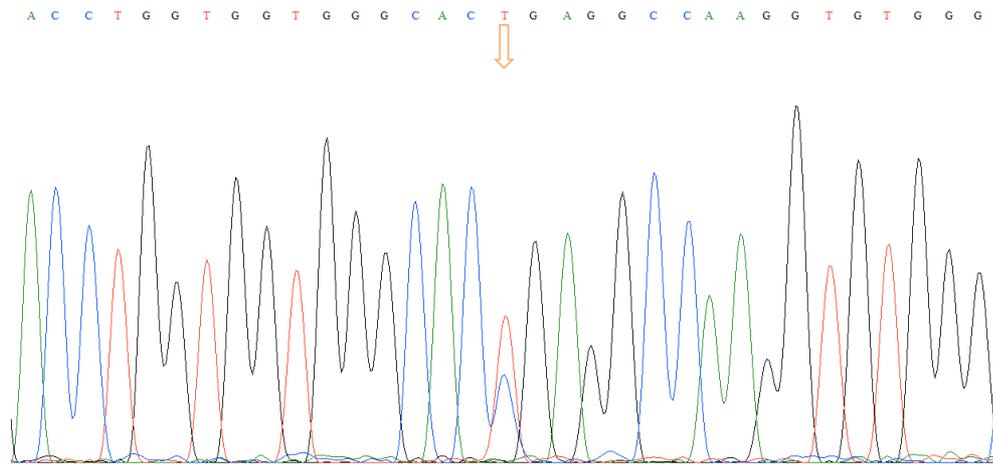


Figura 17. Elettroferogramma di porzione del 5° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 1686 (eterozigote C/T) nei diversi soggetti esaminati.

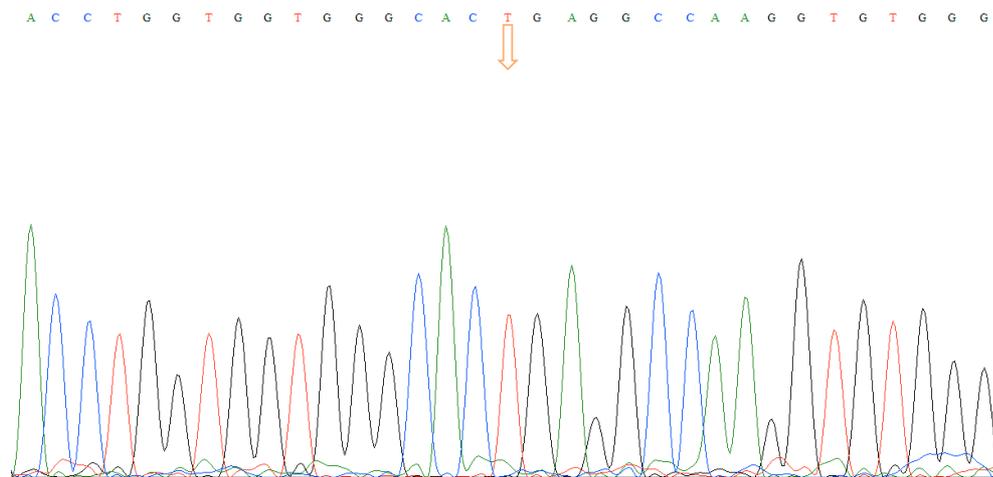


Figura 18. Elettroferogramma di porzione del 5° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 1686 (omozigote T/T) nei diversi soggetti esaminati.

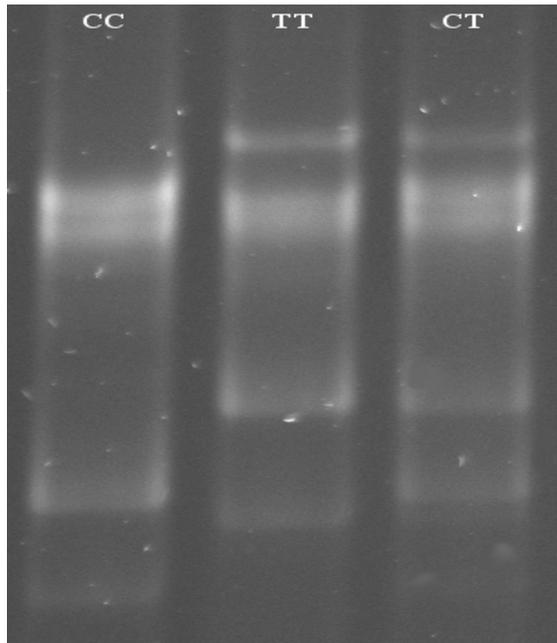


Figura 19. SSCP del 11° frammento con i 3 diversi profili individuati.

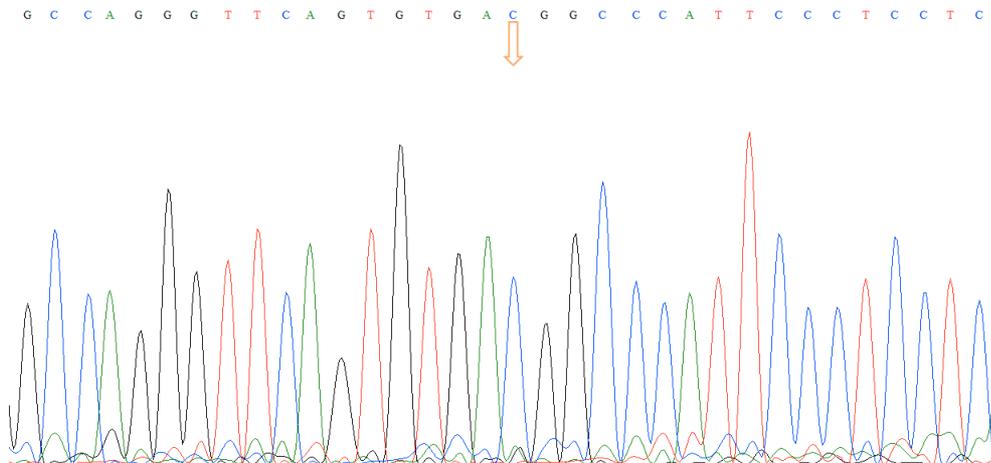


Figura 20. Elettroferogramma di porzione del 11° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 4294 (omozigote C/C) nei diversi soggetti esaminati.

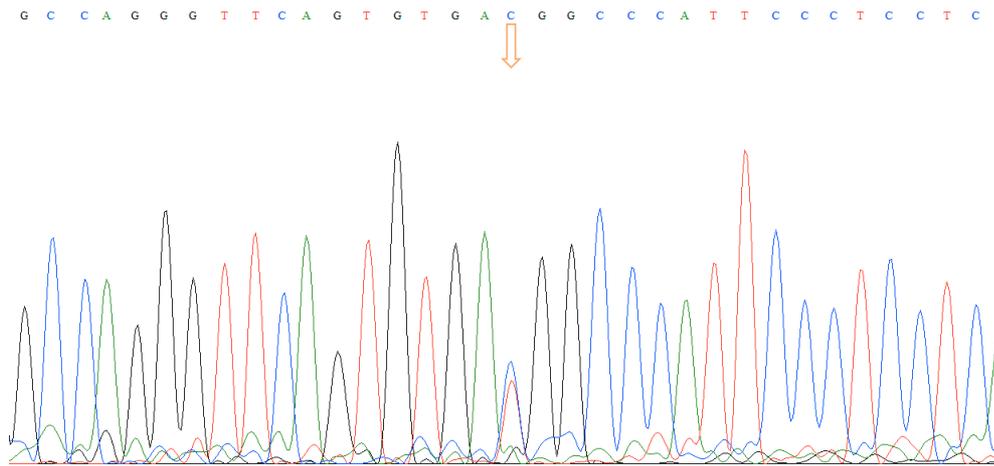


Figura 21. Elettroferogramma di porzione del 11° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 4294 (eterozigote C/T) nei diversi soggetti esaminati.

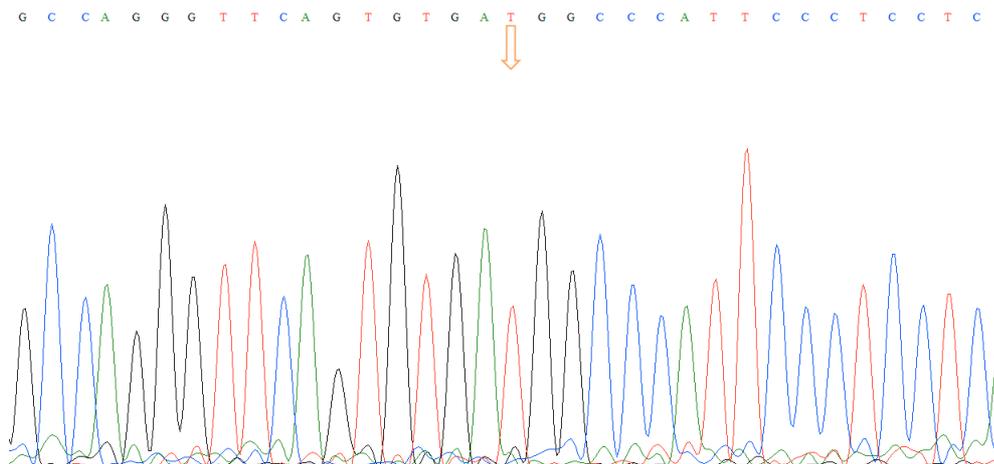


Figura 22. Elettroferogramma di porzione del 11° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 4294 (omozigote T/T) nei diversi soggetti esaminati.

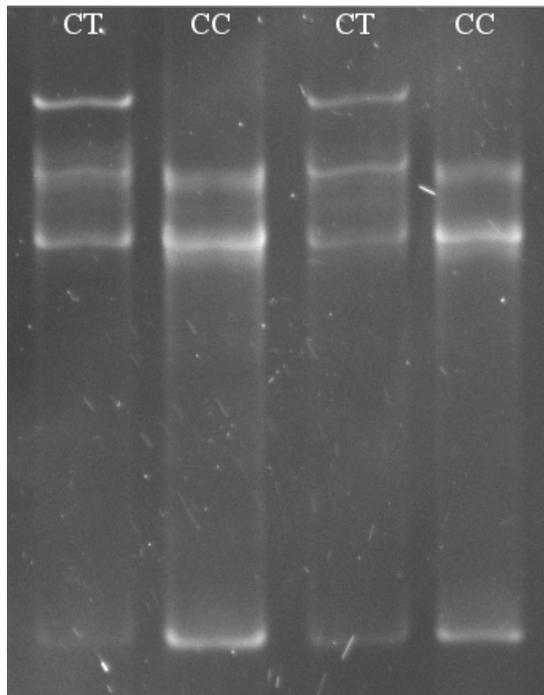


Figura 23. SSCP del 15° frammento con i 2 diversi profili individuati.

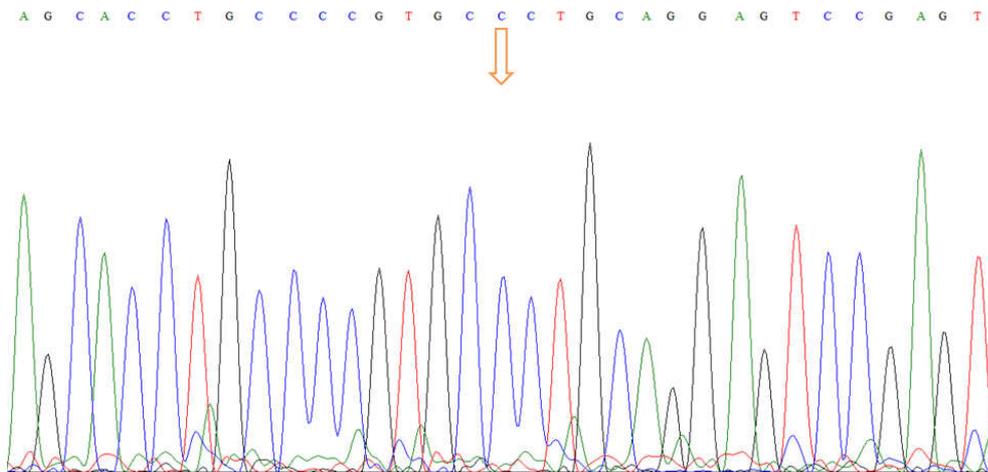


Figura 24. Elettroferogramma di porzione del 15° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 5448 (omozigote C/C) nei diversi soggetti esaminati

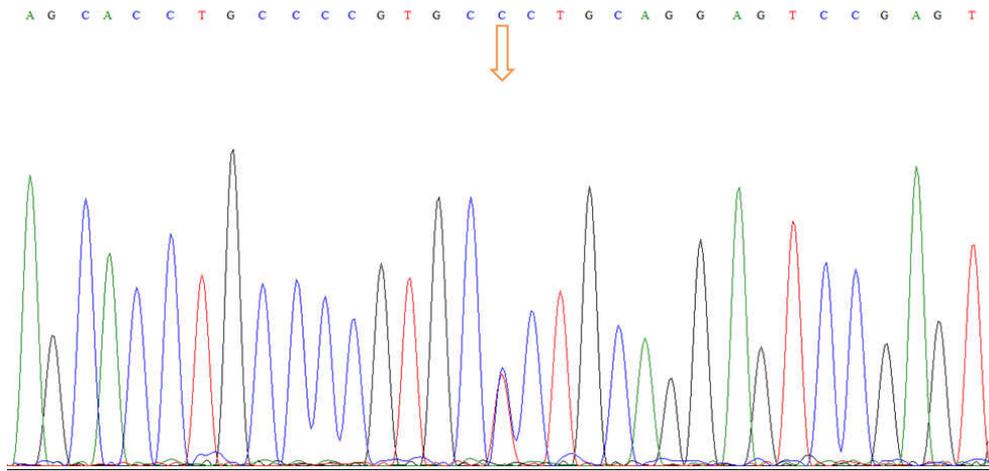


Figura 25. Elettroferogramma di porzione del 15° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 5448 (eterozigote C/T) nei diversi soggetti esaminati.

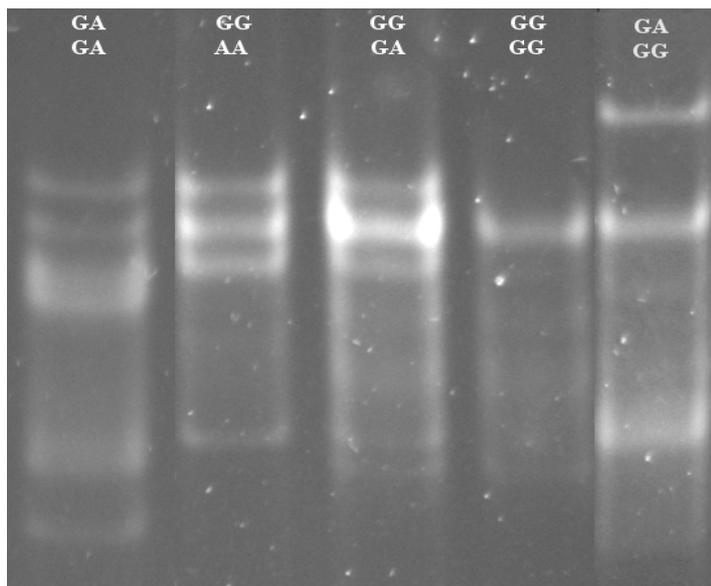


Figura 26. SSCP del 16° frammento con i 5 diversi profili individuati.

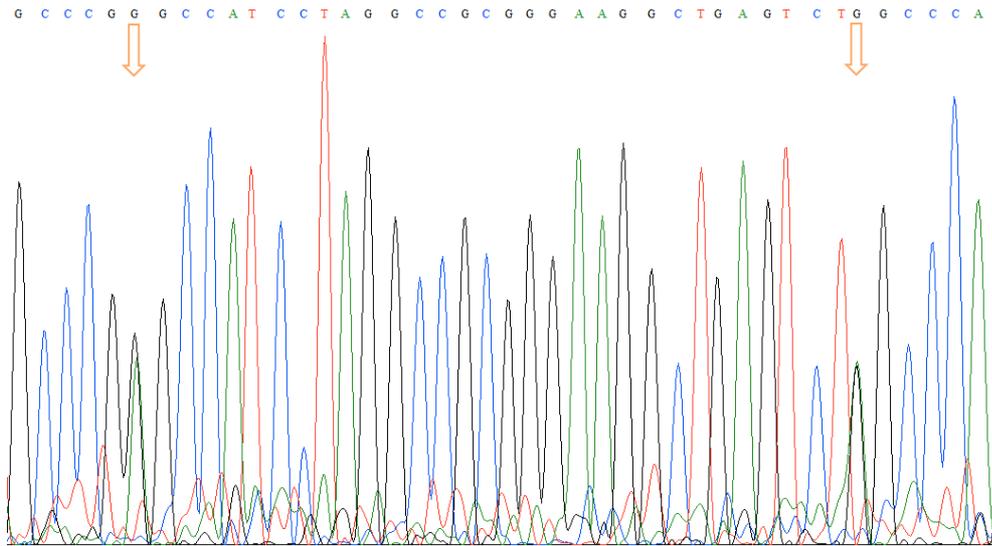


Figura 27. Elettroferogramma di porzione del 16° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 5657 e 5688 (eterozigoti G/A e G/A rispettivamente) nei diversi soggetti esaminati.

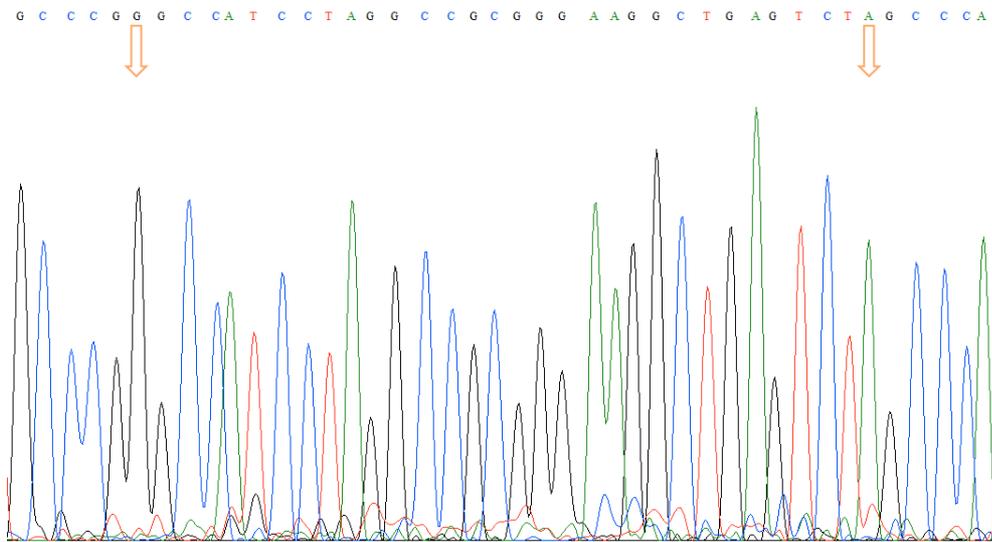


Figura 28. Elettroferogramma di porzione del 16° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 5657 e 5688 (omozigote G/G e A/A rispettivamente) nei diversi soggetti esaminati.

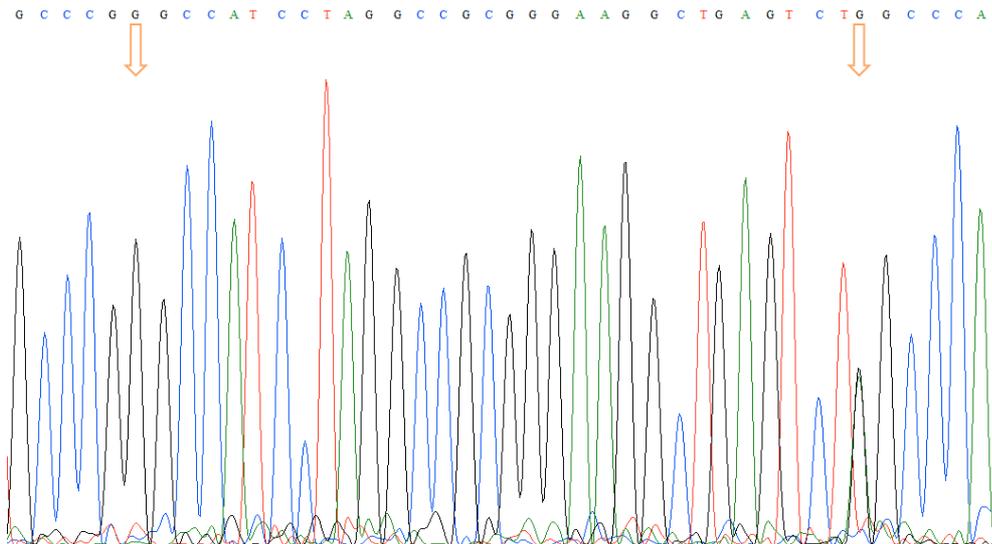


Figura 29. Elettroferogramma di porzione del 16° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 5657 e 5688 (omozigote G/G ed eterozigote G/A rispettivamente) nei diversi soggetti esaminati.

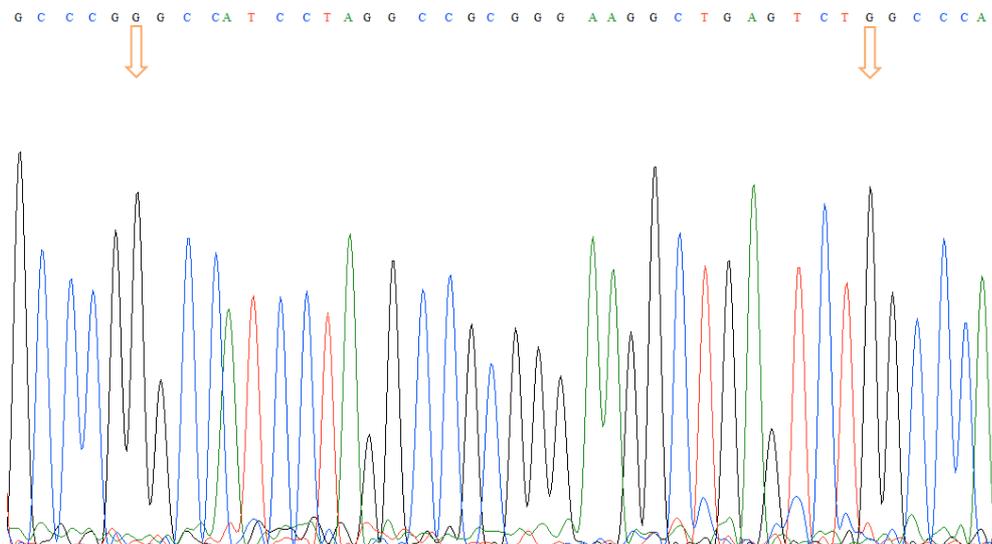


Figura 30. Elettroferogramma di porzione del 16° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 5657 e 5688 (omozigoti G/G) nei diversi soggetti esaminati

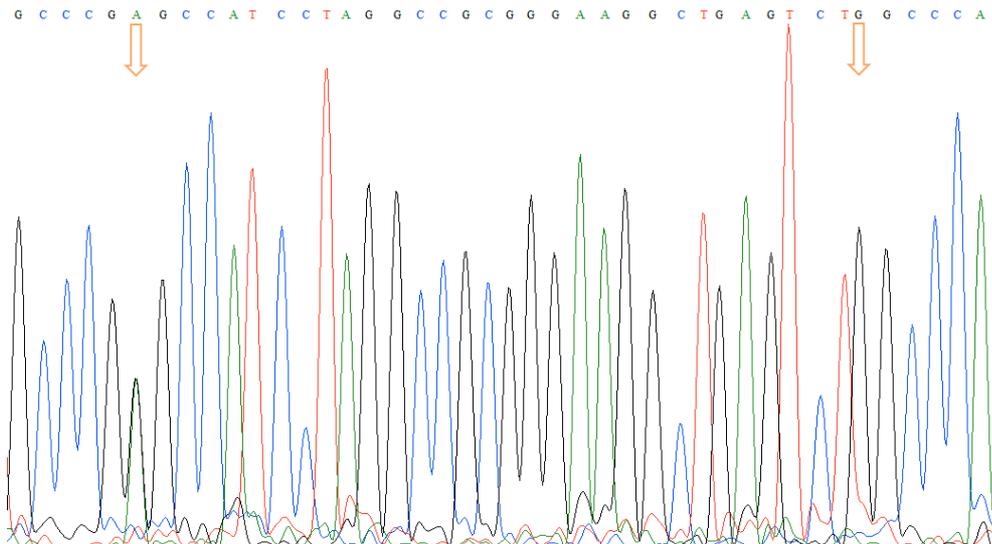


Figura 31. Elettroferogramma di porzione del 16° frammento ottenuto con sequenziamento. Con le frecce sono indicati i nucleotidi mutati in posizione 5657 e 5688 (eterozigote G/A ed omozigote G/G rispettivamente) nei diversi soggetti esaminati.

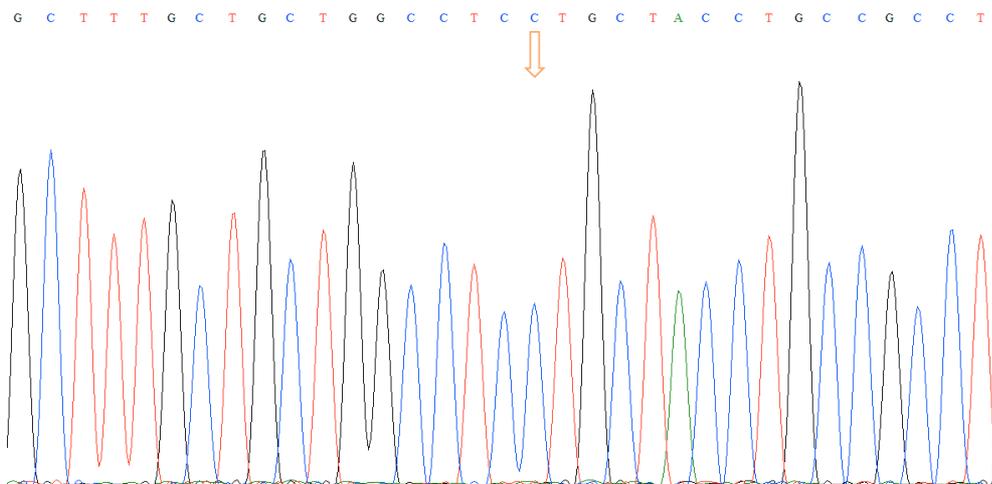


Figura 32. Elettroferogramma di porzione del 19° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 6872 (omozigote C/C) nei diversi soggetti esaminati.

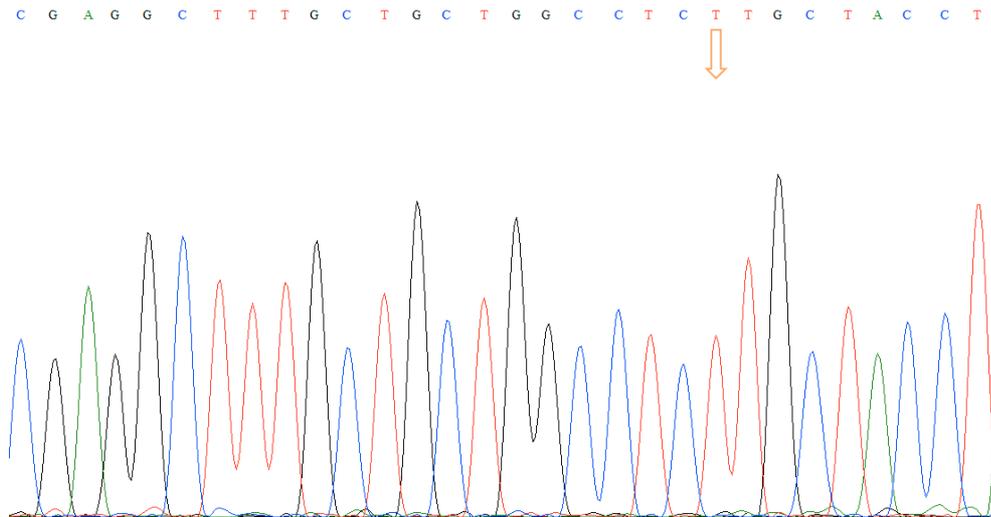


Figura 33. Elettroferogramma di porzione del 19° frammento ottenuto con sequenziamento. Con la freccia è indicato il nucleotide mutato in posizione 6872 (omozigote T/T) nei diversi soggetti esaminati.

Le sostituzioni nucleotidiche nelle regioni esoniche in posizione 980 (G>T), 1686 (C>T), 5448 (C>T), 5657 (G>A) e 6872 (C>T) non determinano sostituzioni amminoacidiche mentre quelle localizzate in posizione 981 (G>T) e in posizione 5688 (G>A) implicano una mutazione non silente con la valina al posto della glicina e la serina al posto della glicina nella proteina matura di 1146 aa..

Di seguito è riportato l'allineamento tra la sequenza proteica ovina e quella bovina (Figura 34)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Ovis aries MDEPFNEAALELALAEPCELDAALLTDIEDMLQLINNQSDPFGFLDPPYAGGGAGTTDPASPDASSPGSLSPPPSTMS
Bos taurus .....E.....

      90      100     110     120     130     140     150     160
Ovis aries SSLEGLGATKATPPPLSPQPAPTPLRMYPVPAFSPGPGIKEEPALTILOQTPPQPLPGALLPQSVAAATPPQFSSA
Bos taurus .....V.....I.....V.....V....T.....

      170     180     190     200     210     220     230     240
Ovis aries PIVGYSPPGGFSTGTTPPGSSQPLAGPPLASLPGVFPVLSHSQVQSAAPQQLLTAIATPTVAPGATAVTSQIQQVPLL
Bos taurus .....-.....S..L.....T.....

      250     260     270     280     290     300     310     320
Ovis aries QPHFIKADSLLLTMTKTDVGGAPLKAAGIRSLGPGTAMQAAPLQTLVSGGAILATVPLVVDTKLPIINRLAGGKAPGSAQS
Bos taurus .....V.....V.....S.....

      330     340     350     360     370     380     390     400
Ovis aries RGEKRTAHNAIEKRYRSSLINDKIVELKDLVVGTEAKLNKSAVLRKADYIRFLQHSNQKLRQENLSLRTAVHRSKSLKDL
Bos taurus .....

      410     420     430     440     450     460     470     480
Ovis aries VSACGGSTDVPMEGMKPEVVDTLSPPPSDAGSPSQSSPLSLGSRGSSGGSGSDSEPDSPVPEFQVNPPELLPAPHSQ
Bos taurus .....P.....

      490     500     510     520     530     540     550     560
Ovis aries GMLDRSLALCALVFLCLSCNPLASLLGSRGPAGPSDTTSSINHRPGRSMLGAEGRDGGWAPWLLPPLVWLMLNGLLVLFS
Bos taurus .....G.R.....

      570     580     590     600     610     620     630     640
Ovis aries LALLFVYGEPVTRPHSPAVHFWRHRKQADLDLARGDFQAQQQLWALRALGRPLPTSHLDLACSLLWSLIRHLLQRLW
Bos taurus .....C.....

      650     660     670     680     690     700     710     720
Ovis aries VGRWLAGWAGLRDRALQADARTSARDAALVYHKLHQHTMGKYSGGHLAAANLALSALNLAEACAGDAVSATLAETV
Bos taurus .....

      730     740     750     760     770     780     790     800
Ovis aries AAALRVKASLPRALHFLTRFFLSSARQAQLAQSGSVFLAMQWLCHPVGHRFFVDGNWALCSAPRDSLYSVAGNPFVDPLAQ
Bos taurus .....

      810     820     830     840     850     860     870     880
Ovis aries VTQLFREHLLERALNCVAQPSPPSGSABGDKFESDALGYLQLLNSCSMDMAGAPACFSISSSMAATPGTDPVAKWASLT
Bos taurus .....V...LT.....

      890     900     910     920     930     940     950     960
Ovis aries AVVTHWLRDEEAERLYPLVEHLPRALQSEKPLPRAALHSFKAARAILGRGKAESGPASLVMCEKASGYLQDSLATTP
Bos taurus .....T.....A.....

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
Ovis aries ADSSIDKAMQLLLCDLLVARTSLWQQKLPAPTQASQGGGGAQASALELRGFQRDLSGLRRLAQNVRPAMRRVFLHEA
Bos taurus .....L.....R.....

      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
Ovis aries TARLMAGASPARTHQLLDRSLRRRVGPKGG-AAVELESRPTRREQAEALLASCYLPFGFLSAPGQVGMLEAEARTLE
Bos taurus .....AV.A.....

      1130    1140
Ovis aries KIGDRRLLEDCCQMLMRLGGGTTVTSS
Bos taurus .L.....

```

Figura 34. Allineamento della sequenza proteica ovina e bovina

La sostituzione della glicina con la valina determina l'inserimento di un amminoacido non polare, chirale e con catena laterale rappresentata dall'isopropile al posto di un amminoacido non polare, non chirale e con la catena laterale costituita dal solo idrogeno (Figura 35 e 36).

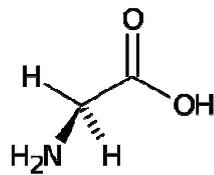


Figura 35. Glicina

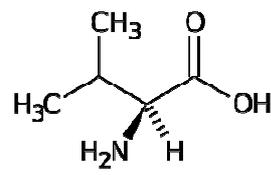


Figura 36. Valina

La sostituzione invece della glicina con la serina introduce un amminoacido polare, chirale e con l'ossidrile come catena laterale. (Figura 37 e 38).

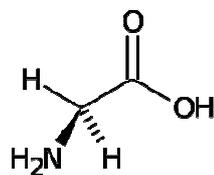


Figura 37. Glicina

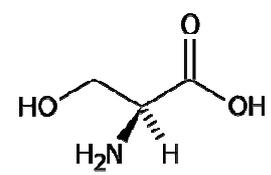


Figura 38. Serina

Nella tabella 10 sono riportate le sostituzioni nucleotidiche presenti nei frammenti esaminati, i genotipi individuati, le frequenze alleliche, le

frequenze genotipiche mentre nella tabella 11 sono indicate le associazioni tra genotipo con la produzione di latte nonché il contenuto in grasso e proteine.

Tutti gli SNPs messi in luce risultano in equilibrio di Hardy-Weinberg ($P > 0,05$).

Attraverso l'elaborazione dei dati sono stati individuati 12 aplotipi ma in tabella sono rappresentati solo quelli che presentano la frequenza superiore a 0,02.

Per ogni aplotipo sono riportate le produzioni di latte e il contenuto percentuale di grasso e proteine (Tabella 12).

Tabella 10. Genotipo e frequenza allelica

Posizione mutazione	Allele	Frequenza allelica	Genotipo	Frequenza genotipo
G980T	G	0.90	GG	0.84
	T	0.10	GT	0.15
			TT	0.01
G981T	G	0.90	GG	0.84
	T	0.10	GT	0.15
			TT	0.01
C1686T	C	0.70	CC	0.49
	T	0.30	CT	0.46
			TT	0.05
C4294T	C	0.60	CC	0.35
	T	0.40	CT	0.52
			TT	0.13
C5448T	C	0.98	CC	0.95
	T	0.02	CT	0.05
G5657A	G	0.80	GG	0.68
	A	0.20	GA	0.32
G5688A	G	0.85	GG	0.75
	A	0.15	GA	0.21
			AA	0.04

Tabella 11. Genotipo e valori medi della produzione di latte e del contenuto in grassi e proteine.

Posizione SNPs	Genotipo	Produzione latte (gr)	Grasso (%)	Proteine (%)
G980T	GG	974.9±268.1	6.3±0.7	5.8±0.5
	GT	875.3±99.5	6.5±0.7	6.2±0.5
	TT	-	-	-
G981T	GG	974.9±268.1	6.3±0.7	5.8±0.5
	GT	875.3±99.5	6.5±0.7	6.2±0.5
	TT	-	-	-
C1686T	CC	993.9±276.7	6.3±0.8	5.8±0.4
	CT	918.6±222.5	6.3±0.7	5.9±0.5
	TT	1091±265.3	6.3±0.5	5.9±0.6
C4294T	CC	924.7±236.9	6.2±0.6	5.9±0.5
	CT	986.1±269.8	6.3±0.8	5.8±0.5
	TT	987.3±243.4	6.6±0.8	5.9±0.5
C5448T	CC	936.1±254.4	6.3±0.7	5.9±0.5
	CT	989.7±280.9	6.4±0.7	5.7±0.4
G5657A	GG	880.6±188.6	6.1±0.5	6.0±0.5
	GA	1003.3±271.8	6.3±0.8	5.8±0.5
G5688A	GG	1060.7±355.0	5.8±0.4	5.7±0.6
	GA	882.2±268.5	6.0±0.8	5.6±0.5
	AA	983.3±244.2	6.4±0.7	5.9±0.5

L'elaborazione dei dati per la valutazione dell'associazione tra i genotipi individuati nella sequenza e i caratteri produttivi (produzione di latte, contenuto in grasso e proteine) non ha evidenziato alcuna significatività

Tabella 12. Aplotipo e relativa media della produzione di latte e del contenuto in grassi e proteine.

Aplotipo	Frequenza	Produzione latte (gr)	Grasso (%)	Proteine (%)
GGCTCGG	0,28	1021,1±21,0	6,5±0,2	5,7±0,1
GGCCCGA	0,12	967,0±50,4	5,9±0,2	5,5±0,1
GGCCCGG	0,19	1019,0±43,1	6,4±0,2	5,6±0,1
GGCCTGG	0,03	1030,4±3,0	6,4±0,4	5,5±0,2
GGTCCAG	0,15	862,9±51,7	6,2±0,2	6,0±0,1
GGTCCGG	0,13	1069,2±42,9	6,6±0,2	5,8±0,1
TTCTCGG	0,08	977,3±21,8	6,4±0,2	6,0±0,1

L'analisi statistica non ha evidenziato associazioni significative tra gli aplotipi e i caratteri produttivi.

Discussione

Il nostro studio ha permesso di conoscere l'intera sequenza codificante del gene SREBP-1 nell'ovino. Tale dato è di estrema importanza per lo studio dei geni regolatori della secrezione lipidica del latte negli ovini, in quanto fino ad oggi, per quanto riguarda gli animali lattiferi, era presente in banca dati solo la sequenza del bovino.

Il confronto della sequenza ovina, determinata tramite la nostra ricerca, con quelle depositate del bovino e dell'uomo mostra il 98% e 88% di similitudine rispettivamente e corrisponde alla variante SREBP-1a. La variante 1c presente nell'uomo, topo e in specie correlate (Shimomura et al. 1997) non è stata riscontrata nell'ovino.

Pertanto il gene SREBP-1 della pecora Sarda ha una diversità notevole rispetto alla sequenza dell'uomo e meno rispetto a quella del bovino. La maggiore similitudine tra ovino e bovino è sicuramente legata alla vicinanza tassonomica e produttiva delle due specie.

La sequenza del gene SREBP-1 dell'ovino riportata in questo studio mostra poca variabilità a livello di sequenza. Infatti sono state rilevate 7 mutazioni nelle regioni codificanti e una nell'introne 11 che invece non sono state riscontrate nel bovino. Tuttavia due mutazioni nelle regioni codificanti della sequenza nucleotidica (esone 3 e 16) determinano un cambio amminoacidico.

Nella pecora Sarda questi SNPs non hanno mostrato influenzare la composizione del latte. Tale risultato ci ha lasciato sorpresi in quanto l'espressione di questo gene nella pecora è risultato correlato con la quantità di grasso prodotta giornalmente da ciascun animale (Carcangiu et al., 2013).

La sequenza ottenuta nella presente ricerca non può essere confrontata con quella di altre razze ovine in quanto in banca dati non sono presenti queste informazioni. L'unico paragone possibile è con il bovino in quanto sono state fatte alcune ricerche sul gene SREPB-1. In quest'ultima specie sono presenti mutazioni a carico dell'esone 14 e dell'introne 5.

Nel bovino la delezione di 84 bp nell'introne 5 o lo SNP nell'esone 14 influenzano la composizione degli acidi grassi nel latte, nella carcassa e l'espressione di altri geni implicati nella sintesi lattea (Hoashi et al., 2007; Rincon et al., 2010). La delezione nel presente studio non è stata rilevata mentre per quanto riguarda lo SNP nell'esone 14 si riscontra solo il genotipo C/C che nel bovino determina una diminuzione della produzione del grasso nel latte (Cecchinato et al., 2012). Tale fatto ci fa ipotizzare che nell'ovino questo SNP non sia importante per la sintesi del grasso nel latte, o che nel bovino questa mutazione sia legata ad altre variazioni in altre parti della sequenza che determinano un effetto sulla secrezione dei lipidi.

Tuttavia, sia nell'ovino che nel bovino le mutazioni riscontrate nella sequenza di SREBP-1 sono in numero abbastanza contenuto e tale fatto indica che questo gene è altamente conservato. Inoltre, la ridotta variabilità potrebbe essere dovuta alla intensa selezione genetica operata negli ultimi 100 anni nella razza Sarda. Infatti, in questa razza anche altri geni coinvolti nella produzione di latte, come il POU1F1, mostrano limitata variabilità rispetto ad altre razze ovine che vivono in Europa (Bastos et al., 2006; Mura et al., 2012)

I nostri dati non hanno evidenziato alcuna associazione tra i polimorfismi e le caratteristiche produttive degli animali e su tale risultato si possono fare diverse ipotesi.

La prima ipotesi è che la pecora Sarda produce alti livelli di grasso e questo è sicuramente frutto di una selezione genetica molto spinta nel migliorare la materia utile del latte. Quindi, è ragionevole pensare che nel corso degli anni siano stati esclusi dalla selezione gli animali portatori di genotipi che influenzavano negativamente le caratteristiche organolettiche del latte.

La seconda ipotesi potrebbe essere che, poiché il gene in oggetto svolge un ruolo chiave nel regolare la sintesi del grasso nel latte, variazioni della sua sequenza non sono tollerate perché potrebbero portare al blocco o alla scarsa produzione lipidica nel secreto mammario. Ciò comprometterebbe lo sviluppo dell'agnello con conseguente eliminazione del soggetto dalla selezione genetica.

Altra ipotesi potrebbe essere che poiché SREBP-1 avvia la trascrizione a livello nucleare di molti altri geni (circa 30) che intervengono nella secrezione delle diverse tipologie di lipidi nel latte, piccole variazioni della sequenza del gene, non alteranti la funzionalità dei domini, non siano in grado di determinare diminuzione della concentrazione di grasso nel latte. Pertanto, SREBP-1 nell'ovino di razza Sarda, nonostante sia importantissimo per la secrezione dei lipidi nel latte come ribadito sopra, non presenta mutazioni nelle regioni codificanti che possano influenzare la quantità di grasso prodotta nel latte.

La regolazione fine della sintesi dei lipidi mammari potrebbe spettare agli altri geni che SREBP-1 attiva a livello nucleare.

Conclusioni

I risultati della presente tesi forniscono la sequenza intera della regione codificante e parte di quella intronica del gene SREBP-1 dell'ovino.

Queste informazioni sono un punto di partenza nello studio dei geni che regolano la secrezione dei lipidi a livello mammario.

Inoltre, sono state messi in evidenza diversi SNPs che comunque non hanno determinato associazione con le caratteristiche del latte.

Sicuramente, la selezione genetica operata da diversi anni nella razza Sarda ha portato alla eliminazione dei soggetti che presentavano un latte con bassi tenore di grasso.

Tuttavia, lo studio delle regioni introniche mancanti e di quelle dei promotori amplierà la conoscenza sul gene oggetto della tesi e chiarirà ulteriormente la funzione di questo gene nella regolazione della sintesi dei lipidi mammari.

Al fine di espandere la ricerca è opportuno indagare sulle relazioni esistenti tra il gene SREBP-1 ed i geni direttamente coinvolti nel sintesi mammaria del latte.

Bibliografia

- Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juárez M., (1999). Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain and trans fatty acids. *J. Dairy Sci.* 82, 878–884.
- Argenzio R.A., (2002). Digestione ed assorbimento dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine. In: *Fisiologia degli animali domestici* : Swenson MJ, Reece WO. Idelson Gnocchi, Napoli, pp. 389-403.
- Azzout-Marniche D., Bécard D., Guichard C., Foretz M., Ferré P. and Foufelle F., (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 350, 38-393.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T., Vernon R.G., (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland, *Biochim. Biophys. Acta* 1347, 101–126.
- Bastos E., Santos I., Parmentier I., Castrillo J.L., Cravador A., Guedes-Pinto H. and Renaville R., (2006). *Ovis aries* POU1F1 gene: cloning, characterization and polymorphism analysis. *Genetica* 126, 303–314.
- Bauman D.E., Griinari J.M., (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M., (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*

- Bauman D.E., Griinari J.M., (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203–227.
- Bauman D.E., Harvatine K.J., Lock A.L., (2011b). Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 2011b. 31, 299–319.
- Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L., (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89, 1235–1243.
- Bauman D.E., McGuire M.A. and Harvatine K.J., (2011a). Mammary gland, milk biosynthesis and secretion: Milk fat. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*: Fuquay J.W., Fox P.F. and McSweeney L.H., Elsevier. Pages 352-358
- Bauman D.E., Perfield J.W. II, Harvatine K.J., Baumgard L.H., (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138, 403–409
- Beghelli V., (2002). Apparecchio digerente. In *Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di etologia*. Aguggini G., Beghelli V., Clemente M.G., d'Angelo A., Benedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmo R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R. Seconda edizione, UTET. pp 527-57.

Berton A., Rouvellac S., Robert B., Rousseau F., Lopez C. and Crenon I. (2012). Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids* 29, 123–134.

BioEdit <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>

Bionaz M., Loor J.J., (2008a). Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9, 366.

Bionaz M., Thering B.J. and Loor J.J., (2012). Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient–gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-*α* activation. *British Journal of Nutrition*, 107, 179–191.

Bionaz M., Hausman G.J., Loor J.J. and Mandard S., (2013a). Physiological and nutritional roles of PPAR across species. *PPAR Research*. Article ID 807156, 3 pages.

Bionaz M., Chen S., Khan M.J. and Loor J.J., (2013b). Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Research*. Article ID 684159, 28 pages.

Blasi F., Montesano D., De Angelis M., Maurizi A., Venura F., Cossignani L., Simonetti M.S., Damiani P., (2008). Results of stereospecific

analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk. *J. Food Comp. Anal.* 21, 1–7.

BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

Brown M.S., Goldstein J.L., (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89, 331–340

Brown M.S., Goldstein J.L., (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11041–11048.

Burgess J.M., Neville T., Rouillard P., Harder Z., Beanlands D.S., Sparks D. L., (2005). Phosphatidylinositol increases HDL-C levels in humans. *J. Lipid Res.* 46, 350–355.

Carcangiu V., Mura M.C., Daga C., Luridiana S., Bodano S., Sanna G.A., Diaz M.L. and Cosso G., (2013). Association between SREBP-1 gene expression in mammary gland and milk fat yield in Sarda breed sheep. *Meta Gene* 1,43–49.

Cecchinato A., Ribeca C., Maurmayr A., Penasa M., De Marchi M., Macciotta N.P.P., Mele M., Secchiari P., Pagnacco G and Bittante G., (2012). Short communication: Effects of β -lactoglobulin, stearoyl-coenzyme A desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein gene allelic variants on milk production,

composition, acidity and coagulation properties of Brown Swiss cows. *J. Dairy Sci.* 95, 450–454.

Chilliard Y., Delouis C., Smith M.C., Sauvant D., Morand-Fehr P., (1986).

Mammary metabolism in the goat during normal or hormonally-induced lactation, *Reprod. Nutr. Dev.* 26, 607–615.

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M. and Doreau M., (2000). Ruminant

milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49, 181–205.

Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberet G., (2003). A review of

nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86, 1751–1770.

Creamer L.K. and MacGibbon A.K.H., (1996). Some recent advances in the

basic chemistry of milk protein and lipids. *Int. dairy J.* 6, 539-568

Dillehay D.L., Webb S.K., Schmelz E.M., Merrill A.H., (1994). Dietary

sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.* 124:615–620.

Doege H., Stahl A., (2005). Protein-mediated fatty acid uptake: novel

insights from in vivo models. *Physiology* 21, 259–268.

Eberle D., Hegarty B., Bossard P., Ferre P., Fougère F., (2004). SREBP

transcription factors, master regulators of lipid homeostasis.

Biochimie 86 (11), 839–848

- El-Zeini H.M., (2006). Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2, 147–154.
- Eskin N.A.M. and Goff H.D., (2013). Milk. In: *Biochemistry of Foods (Third Edition)* : Eskin N.A.M, Shahidi F. Elsevier, pages 187-214.
- Franke W.W., Schmid E., Freudenstein C., Appelhans B., Osborn M., Weber K., Keenan T.W., (1980). Intermediate-sized filaments of the prekeratin type in myoepithelial cells. *J. Celt. Biology* 84, 633–654.
- GENEPOP (4.1—http://kimura.univ-montp2.fr/*rousset/Genepop.htm).
- Gervais R., McFadden J.W., Lengi A.J., Corl B.A., Chouinard P.Y., (2009). Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 5167–5177.
- Goudjil H., Fontecha J., Luna P., Fuente de la, M.A., Alonso L., Juárez M., (2004). Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Lait* 84, 473–482.
- Griinari J.M., Cori B.A., Lacy S.H., Chouinard P.Y., Nurmela K.V.V., Bauman D.E., (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. *J. Nutr.* 130, 2285–2291.

Griinari J.M., McGuire M.A., Dwyer D.A., Bauman D.E., Palmquist D.L., (1997). Role of Insulin in the Regulation of Milk Fat Synthesis in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 80, 1076–1084

Harvatine K.J., Bauman D.E., (2006). SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr.* 136, 2468–2474.

Heida H.W., Keenanb T.W., (2005). Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 245–258

Hirano Y., Murata S., Tanaka K., Shimizu M., Sato R., (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 16809–16819.

Hirano Y., Yoshida M., Shimizu M., Sato R., (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36431-36437.

Hoashi S., Ashida N., Ohsaki H., Utsugi T., Sasazaki S., Taniguchi M., Oyama K., Mukai F. and Mannen H., (2007). Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm. Genome*, 12, 880-886.

- Hua X., Nohturfft A., Goldstein J.L., Brown M.S., (1996a). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage activating protein. *Cell*. 87, 415–426.
- Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125-1131.
- Hua X., Sakai J., Brown M.S., Goldstein J.L., (1996b). Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 10379–10384.
- Hua X., Sakai J., Ho Y. K., Goldstein J.L., Brown M.S., (1995b). Hairpin Orientation of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 in Cell Membranes as Determined by Protease Protection. *J. Biol. Chem.* 270, 29422-29427.
- Hua X., Wu J., Goldstein J.L., Brown M.S., Hobbs H.H., (1995a). Structure of the Human Gene Encoding Sterol Binding Protein-1 (SREBF1) and Localization of Regulatory Element SREBF1 and SREBF2 to Chromosomes 17p11.2 and 22q13. *GENOMICS* 25, 667-673
- Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X., (1993). SREBP-2, a second basic–helix–loop–helix–leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11603– 11607.

- Hussein M., Harvatine K.H., Weerasinghe W.M.B.P., Sinclair L.A., Bauman D.E., (2013). Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J. Dairy Sci.* 96, 3825–3834
- Irisawa M., Inoue J., Ozawa N., Mori K., Sato R., (2009). The sterol sensing endoplasmic reticulum (ER) membrane protein TRC8 hampers ER to Golgi transport of sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2)/SREBP cleavage-activated protein and reduces SREBP-2 cleavage. *J. Biol. Chem.* 284, 28995–29004.
- Jensen R.G., (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85, 295–350
- Katz I., Keeney M., (1966). Characterization of the octadecenoic acids in rumen digesta and rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 49:962–966
- Keenan T.W. and Mather I.H., (2002). Lipids: Milk Fat Globule Membrane. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*: Roginski H., Fuquay J and Fox P., Elsevier. Pages 1568-1576
- Kemp P., Lander D.J., (1984). Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 130, 527–533.
- Kepler C.R., Hirons K.P., McNeill J.J. and Tove S.B., (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241, 1350-1354.

- Kucuk O., Hess B. W., Ludden P. A., Rule D. C., (2001). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *J. Anim. Sci.* 79, 2233–2240.
- Knudsen J. and Grunnet I., (1982). Transacylation as a chain-termination mechanism in fatty acid synthesis by mammalian fatty acid synthetase. Synthesis of medium-chain-length (C8-C12) acyl-CoA esters by goat mammary-gland fatty acid synthetase. *Biochem. J.* 202, 139-143.
- Lee S.J., Sekimoto T., Yamashita E., Nagoshi E., Nakagawa A., Imamoto N., Yoshimura M., Sakai H., Chong K.T., Tsukihara T. and Yoneda Y., (2003). The Structure of Importin-beta Bound to SREBP-2: Nuclear Import of a Transcription Factor. *Science* 302, 1571-1575.
- Leek B.F., (2002). La digestione nei ruminanti. In: *Fisiologia degli animali domestici* : Swenson MJ, Reece WO. Idelson Gnocchi, Napoli, pp. 416-449.
- Lerch S., Shingfield K.J., Ferlay A., Vanhatalo A., Chilliard Y., (2012). Rapeseed or linseed in grass-based diets: Effects on conjugated linoleic and conjugated linolenic acid isomers in milk fat from Holstein cows over 2 consecutive lactations. *J. Dairy Sci.* 95, 7269–7287

- Lock A. L., Teles B.M., Perfield J.W., Bauman D.E., Sinclair L.A. (2006).
A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12
reduces milk fat synthesis in lactating sheep. *J. Dairy Sci.* 89:1525–
1532.
- Lock A.L., Rovai M., Gipson T.A., de Veth M.J., Bauman D.E., (2008). A
conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12
conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats.
J. Dairy Sci 91, 3291–3299.
- MacGibbon A.K.H. and Taylor M.W., (2006). Composition and structure of
bovine milk lipids. *Advanced Dairy chemistry vol 2 lipids*, pp 1-42.
- Månsson H.L., (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res.* 2008,
52.
- Martini M., Altomonte I. and Salari F., (2012). Relationship between the
nutritional value of fatty acid profile and the morphometric
characteristics of milk fat globules in ewe's milk. *Small Rumin. Res.*
105, 33– 37.
- Mather I.H., (2011). Milk Lipids: Milk Fat Globule Membrane. In:
Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition): Fuquay J.W., Fox
P.F. and McSweeney L.H., Elsevier. Pages 680-690
- Mather I.H., Keenan T.W., (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J.*
Mammary Gland Biol. Neoplasia 3, 259–273.

McGuire M.A. and Bauman D.E., (2002). Milk biosynthesis and secretion: Milk fat. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Roginski H., Fuquay J and Fox P., Elsevier. Pages 1828-1834

Meena S., Rajput Y.S., Sharma R., (2014). Comparative fat digestibility of goat, camel, cow and buffalo milk. *International Dairy Journal* 35, 153–156.

Menard O., Ahmed S., Rousseau F., Briard-Bion V., Gaucheron F., Lopez C., (2010). Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry* 120, 544–551.

Mesilati-Stahy R. and Argov-Argaman N.,(2014). The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage. *Food Chemistry* 145, 562-570

Mesilati-Stahy R., Mida K. and Argov-Argaman N., (2011). Size-dependent lipid content of bovine milk fat globule and membrane phospholipids. *J. Agri. Food Chem.* 59, 7427–7435.

Michalski M.C., Leconte N., Briard-Bion V., Fauquant J., Maubois J.L., Goudèdranche H., (2006). Microfiltration of raw whole milk to select fractions with different fat globule size distributions: process optimization and analysis. *J. Dairy Sci.* 89, 3778–3790

- Moore J.H., Christie W.W., (1981). Lipid metabolism in the mammary gland of ruminants. In: *Lipid Metabolism in Ruminant Animals* (W.W. Christie, ed.), Pergamon Press, Oxford, UK. pp. 227–277.
- Mosley E.E., Shafii B., Moate P.J., McGuire M.A., (2006). Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 136, 570–575.
- Mosley E.E., McGuire M.A., (2007). Methodology for the in vivo measurement of the delta9-desaturation of myristic, palmitic, and stearic acids in lactating dairy cattle. *Lipids* 42, 939–945.
- Mura M.C., Daga C., Paludo M., Luridiana S., Pazzola M., Bodano S., Dettori, M.L., Vacca G.M. and Carcangiu V., (2012) Analysis of polymorphism within POU1F1 gene in relation to milk production traits in dairy Sarda sheep breed. *Mol. Biol. Rep.* 39, 6975-6979.
- Nagoshi E., Imamoto N., Sato R., Yoneda Y., (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLHZip. *Mol Biol Cell* 10 (7), 2221–2233.
- Nagoshi E and Yoneda Y., (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2779-2789.

- Naitana S., (2009). Fisiologia della digestione e dell'assorbimento. In Fisiologia Veterinaria : Clement MG. Point Veterinaire Italie, Milano pp. 787-828.
- Nohturfft A., Brown M.S., Goldstein J.L., (1998). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J. Biol. Chem.* 273, 17243-17250.
- Ntambi J.M., (1999). Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40, 1549-1558.
- Ntambi J.M., Miyazaki M., (2004). Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. in Lipid Res.* 43, 91–104
- Palmquist D.L., (2006). Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In *Advanced Dairy Chemistry, volume 2: Lipids*, 3rd edition : Fox P.F. and McSweeney P.L.H., Springer, New York, pp 43-92.
- Palmquist D.L., Beaulieu A.D. and Barbano D.M., (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76, 1753-1771.
- Park C.S., Jacobson N.L., (2002). Ghiandola mammaria e lattazione. In: *Fisiologia degli animali domestici* : Swenson MJ, Reece WO. Idelson Gnocchi, Napoli, pp. 770-786.

- Park Y.W., Juarez M., Ramos M., Haenlein G.F.W., (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum. Res.* 68, 88–113.
- Parodi P. W., (1977). Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60, 1550–1553.
- Parodi P.W., (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82, 1339–1349
- Perfield J.W., Lock A.L., Griinari J.M., Sæbø A., Delmonte P., Dwyer D.A., Bauman D.E., (2007) Trans-9, cis-11 Conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 90, 2211–2218.
- Peterson D.G., Matitashvili E.A., Bauman D.E., (2004). The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. *J. Nutr.* 134, 2523–2527.
- Piccione G., (2009). Fisiologia della digestione e dell'assorbimento. In *Fisiologia Veterinaria : Clement MG. Point Veterinaire Italie, Milano* pp. 527-600.

Piperova L.S., Sampugna J., Teter B.B., Kalscheur K.F., Yurawecz M.P., Ku Y., Morehouse K.M. and Erdman R.A. (2002). Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 132, 1235-1241.

Pulina G., Nudda A., Battacone G. and Cannas A., (2006). Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 255–291.

Primer3Plus www.bioinformatics.nl/primer3plus/

R Core Team, (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.]

Ramos M. and Juarez M., (2011). Milk: Sheep Milk. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*: Fuquay J.W., Fox P.F. and McSweeney L.H., Elsevier. Pages 494-502

Raymond M. and Rousset F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249.

Raynal-Ljutovaca K., Lagriffoul G., Paccard P., Guillet I., Chilliard Y., (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rum. Res.* 79, 57–72.

Rincon G., Islas-Trejo A., Castillo A.R., Bauman D.E., German B.J. and Medrano J.F., (2012). Polymorphisms in genes in the SREBP1 signalling pathway and SCD are associated with milk fatty acid composition in Holstein cattle. *J. Dairy Res* 79, 66–75.

Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.

Sakai J., Duncan E.A., Rawson R.B., Hua X., Brown M.S., Goldstein J.L., (1996). Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85, 1037–1046.

Sakai J., Rawson R.B., Espenshade P.J., Cheng D., Seegmiller A.C., Goldstein J.L., Michael S. Brown M.S., (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2, 505–514.

Sato R., Yang J., Wang X., Evans M.J., Ho Y.K., Goldstein J.L., Brown M.S., (1994). Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1). *J. Biol. Chem.* 269, 17267–17273.

- Scolozzi C., Martini M. and Abramo F., (2003). A method for identification and characterization of ewe's milk fat globules. *Milchwissensch* 58, 490–493.
- Shimano H., (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. in Lipid Res.* 40, 439–452.
- Shimano, H., Horton J.D., Hammer R.E., Shimomura I., Brown M.S., Goldstein J.L., (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98, 1575–1584.
- Shimano H., Horton J.D., Shimomura I., Hammer R.E., Brown M.S., Goldstein J.L., (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 846–854.
- Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., and Brown M.S., (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 838–845.
- Shimomura I., Shimano H., Korn B.S., Bashmakov Y., Horton J.D., (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.* 273, 35299-35306.

- Shingfield K.J., Bernard L., Leroux C. and Chilliard Y., (2010). Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:7, pp 1140–1166.
- Shingfield K.J., Rouel J. and Chilliard Y., (2009). Effect of calcium salts of a mixture of conjugated linoleic acids containing trans-10, cis-12 in the diet on milk fat synthesis in goats. *Brit. J. Nutr.* 101, 1006–1019.
- Sinnwell J.P. and Schaid D.J., (2013). haplo.stats: Statistical Analysis of Haplotypes with Traits and Covariates when Linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.6.3. <http://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>].
- Spitsberg V. L., (2005). Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88, 2289–2294.
- Sun L.P., Li L., Goldstein J.L., Brown M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* 280, 26483-26490.
- Valivullah H.M., Bevan D.R., Peat A., Keenan T.W., (1988). Milk lipidglobules: control of their size distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8775–8779.
- Varricchio M.L., Di Francia A., Masucci F., Romano R and Proto V., (2007). Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 6 (Suppl. 1), 509-511.

- Watkins P.A., Maiguel D., Zhenzhen J., Pevsner J., (2007). Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J. Lipid Res.* 48, 2736–2750.
- Weerasinghe W. M. P. B., R. G., Wilkinson A. L., Lock M. J., de Veth M.J., Bauman D.E., Sinclair L.A., (2012). Effect of a supplement containing trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on the performance of dairy ewes fed 2 levels of metabolizable protein and at a restricted energy intake. *J. Dairy Sci.* 95, 109–116.
- Xiao-Ying D. and Sheng-Qiu T., (2010). Insulin-induced gene: A new regulator in lipid metabolism. *Peptides* 31, 2145–2150.
- Yabe D., Brown M.S., Goldstein J.L., (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12753-12758.
- Yang T., Espenshade P.J., Wright M.E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J.L., Brown M.S., (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.