

L. BALDELLI, G. PRINCIPATO,  
N.G. FREGA

## Analisi dei promotori di geni differenzialmente co-espressi (“accesi o spenti”) durante la lattazione

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 11, N. 3, 183-196, 2009

**TITLE**  
Analysis of promoters of a set genes differentially co-regulated during lactation

**KEY WORDS**  
Lactation, genes, promoters, transcription factors

**PAROLE CHIAVE**  
Lattazione, geni, promotori, fattori di trascrizione

Dipartimento di Scienze degli Alimenti e Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Indirizzo per corrispondenza:  
Dott.ssa Luisa Baldelli  
Dipartimento di Scienze degli Alimenti e Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

### Summary

This work constitutes a step of an advanced research that has taken in consideration two groups of simultaneously co-regulated genes obtained by computer analysis of microarray data. Group (1) contains genes that are simultaneously up-regulated during lactation and down-regulated at the onset of involution of mammary gland; group (2) contains genes that are simultaneously down-regulated during lactation and up-regulated at the onset of involution of mammary gland. The simultaneous activation and the simultaneous extinction depend in great part from the presence of groups transcription factors that can be bound to the promoters and/or to modification of the organization of the nuclear chromatin. We have performed a complex computational research in order to isolate the sequences of the promoters of the genes from the two groups, (1) and (2), and have identified transcription factors that could be bound to the sequences of the promoters thus isolated. The whole process of lactation appears very conserved in the man and in the mouse, the data showed here are referred to the man.

### Riassunto

Questo lavoro costituisce uno stadio di avanzamento di una più vasta ricerca che ha preso in considerazione due gruppi di geni che dagli esperimenti di microarray risultavano (1) simultaneamente co-attivati durante la lattazione e spenti simultaneamente al momento dell'involuzione della ghiandola mammaria e (2) simultaneamente spenti durante la lattazione e co-attivati al momento dell'involuzione della ghiandola mammaria. La simultanea attivazione ed il simultaneo spegnimento dipendono in gran parte dalla presenza di gruppi di proteine di regolazione della trascrizione che si legano ai promotori anche se un certo contributo può derivare dall'organizzazione della cromatina. Abbiamo condotto una complessa ricerca computazionale per isolare le sequenze dei promotori dei geni dei due gruppi, (1) e (2) ed abbiamo identificato fattori di trascrizione che si potevano legare alle sequenze dei promotori così isolati. Il processo della lattazione appare molto conservato nell'uomo e nel topo, i dati qui riportati si riferiscono all'uomo.

## Introduzione

Il latte materno è un fluido complesso che contiene un perfetto equilibrio dei nutrienti necessari per sostenere la crescita di un neonato, uomo o animale che sia. Il latte è l'alimento più completo per il bambino ed è adatto a soddisfare tutti i suoi bisogni alimentari ed emotivi dato che contiene tutti gli elementi nutritivi e non di cui ha bisogno, tra cui ormoni e anticorpi. Questo è il risultato di un perfetto bilanciamento tra sintesi *de novo*, acquisizione con la dieta e mobilizzazione dai depositi nei tessuti.

La lattazione è uno dei più pregevoli prodotti del processo evolutivo che ha portato alla comparsa dei Mammiferi. Essa costituisce la marcata distinzione e la base dell'emergente competitività dei Mammiferi, compresi gli esseri umani, rispetto agli altri animali: la produzione di un alimento iniziale e completo per i piccoli attraverso la madre. I processi di lattazione includono lo sviluppo del tessuto mammario, così come la sintesi e la secrezione del latte. Allo svezzamento, la ghiandola mammaria ritorna morfologicamente ad uno stato vicino a quello della pre-gravidanza. La lattazione ha tutte le caratteristiche per essere considerata un importante risultato prodotto dalla pressione selettiva darwiniana, tuttavia poco si

conosce delle sue origini molecolari o della sua regolazione. Gli eventi molecolari che sono alla base dello sviluppo mammario durante la gravidanza, la lattazione e l'involutione non sono ancora del tutto compresi.

È noto che quasi un terzo del trascrittoma fluttua per costruire, fare funzionare e disassemblare l'apparato della lattazione, anche se la diversità della parte endogena del proteoma del latte è derivata da meno di un centinaio di trascritti. Le pathway di regolazione dell'espressione genica sono critiche per la produzione di un latte che abbia una corretta composizione e per il buon funzionamento della ghiandola mammaria.

In questo lavoro sono stati analizzati, mediante metodologie bioinformatiche applicate a dati trascrittomici opportunamente validati ed analizzati statisticamente, un totale di 12.488 geni la cui espressione era stata determinata in dieci differenti momenti, dalla gravidanza alla lattazione fino all'involutione della ghiandola mammaria Rudolph et al. (1). Un recente *data mining* di questi dati sperimentali ha riguardato l'analisi statistica della componente principale e l'analisi dei dati per mezzo di Gene Ontology (2).

## Metodi

I dati sperimentali di microarray utilizzati in questo studio sono stati realizzati e resi disponibili da Rudolph et al. (1) e successivamente sono stati utilizzati per la ricerca di network genici regolatori nella lattazione mediante analisi bioinformatica da Lemay et al. (2). L'esperimento di microarray era stato realizzato su campioni di ghiandola mammaria di topo preparati ed ibridizzati su chip Affymetrix MG\_U74Av2 (che analizza in totale 12.488 geni), prendendo in esame dieci tempi di sviluppo mammario con quattro repliche biologiche per ciascun tempo, dalla gravidanza alla lattazione fino all'involutione. Questi dati sono stati depositati in NCBI Gene Expression Omnibus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>] e sono accessibili tramite GEO Series con il seguente numero di accesso, GSE8191.

L'analisi dei geni che risultavano differenzialmente espressi nella lattazione rispetto all'involutione è stata curata manualmente e sono stati selezionati quei geni che erano risultati in modo significativo up-regolati o down-regolati. Abbiamo usato questo database per evidenziare due particolari set di geni che presentavano la caratteristica di essere co-espressi e co-inibiti in due differenti condizioni, quella della lattazione e quella del-

l'involuzione. Questi geni risultano quindi strettamente co-regolati ed acquista un notevole interesse lo studio dei loro promotori e dei fattori di trascrizione che possono ad essi legarsi.

Abbiamo preso in considerazione due pool di geni, il primo contenente 38 geni che erano tutti espressi nel corso della lattazione ed erano tutti spenti durante la gravidanza e l'involuzione, il secondo contenente 1210 geni che erano invece tutti spenti nel corso della lattazione ed erano invece tutti espressi nel corso dell'involuzione. Abbiamo trovato la denominazione di ciascun gene (indicato da una sigla), abbiamo cercato l'ID SwissProt sia nel topo che nell'uomo usando le tabelle del database Ensembl, e la localizzazione cromosomica nel database Entrez Gene.

Abbiamo deciso di estrarre i promotori di questi geni limitandoci alle sequenze di 1000 nucleotidi che precedevano il l'inizio della trascrizione (TSS, Transcription Start Sites). Per l'estrazione dei promotori abbiamo usato il Table Browser in UCSC Genome Browser (versione hg18) e, nel caso di TSS multipli, abbiamo usato tutte le varianti trovate. Come controllo sono state usate sequenze casuali da noi generate con una metodica messa a punto presso l'Istituto di Biologia e Genetica (3). Per la predizione dei fattori di tra-

scrizione che si possono legare ai promotori da noi estratti abbiamo usato il web tool rVista che usa il database Transfac 10.2. Abbiamo preso in considerazione i seguenti parametri: Biological Species = Vertebrates, matrix similarity = 0.85. Le query al database e la creazione delle matrici sono state realizzate mediante programmi in Perl costruiti e messi a punto dall'Ing. Piva nel sito [www.introni.it](http://www.introni.it).

## Risultati

Abbiamo preso in considerazione due gruppi di geni che dagli esperimenti di microarray risultavano:

- 1) simultaneamente co-attivati durante la lattazione e spenti simultaneamente al momento dell'involuzione della ghiandola mammaria (Tab. 1);
- 2) simultaneamente spenti durante la lattazione e co-attivati al momento dell'involuzione della ghiandola mammaria (Tab. 2. Nota: delle 23 Tabelle 2 viene riportata qui solo la prima, le altre sono disponibili su richiesta).

La simultanea attivazione ed il simultaneo spegnimento dipendono probabilmente dalla presenza di gruppi di proteine di regolazione della trascrizione che si legano ai promotori.

Abbiamo condotto una complessa ricerca computazionale per isolare le sequenze dei promotori dei geni

dei due gruppi, (1) e (2). Abbiamo deciso di considerare un tratto di 1000 nucleotidi per prendere in esame la regione più direttamente vicina all'inizio della trascrizione, quella dove si lega l'enzima RNA polimerasi.

Abbiamo quindi identificato i fattori di trascrizione che si potevano legare alle sequenze dei promotori così isolati (Tabb. 3, 4).

L'analisi delle 1210 proteine del gruppo (2) ha messo in evidenza due insiemi di geni relativi a proteine mitocondriali (50 geni, Tabella 5) ed alla pathway di proteolisi ubiquitina-dipendente (30 geni, Tab. 6).

## Discussione

Sono stati analizzati due set, il primo composto da geni che sono up-regolati durante la lattazione e down-regolati al momento dell'involuzione della ghiandola mammaria, il secondo composto da geni che sono down-regolati al momento della lattazione ed up-regolati al momento dell'involuzione. Complessivamente sono stati dettagliatamente analizzati quasi 1300 geni, presenti sia nell'uomo che nel ratto, dei quali è stata esaminata la localizzazione cromosomica e sono stati estratti i promotori sui quali è stata fatta la ricerca dei fattori di trascrizione che si possono associare. I geni presi in esame sono tutti

**Tabella 1** - Set di 38 geni simultaneamente up-regolati durante la lattazione e simultaneamente down-regolati durante l'involutione della ghiandola mammaria. Di ciascun gene è riportata da sigla, l'identificativo SwissProt (ID) e la localizzazione cromosomica

GENE	SwissProt ID	Localizzazione cromosomica	GENE	SwissProt ID	Localizzazione cromosomica
COL9A2	1298	1p33-p32	COMMD9	29099	11p13
NUDC	10726	1p35-p34	FADS1	3992	11q12.2-q13.1
EPHA8	2046	1p36.12	DNAJB13	374407	11q13.4
B4GALT3	8703	1q21-q23			
UHMK1	127933	1q23.3	PTHLH	5744	12p12.1-p11.2
QSOX1	5768	1q24	IGF1	3479	12q22-q23
TOR3A	64222	1q25.2			
			RAB20	55647	13q34
CCT4	10575	2p15			
SLC23A3	151295	2q35	ISG20	3669	15q26
DAP	1611	5p15.2	TUFM	7284	16p11.2
CAMK4	814	5q21.3			
CSF1R	1436	5q33-q35	ALOX15B	247	17p13.1
			C17orf79	55352	17q11.2
MRPS18A	55168	6p21.3	KRT32	3882	17q12-q21
MAPK13	5603	6p21.31	HOXB3	3213	17q21.3
HIST1H2AE	3012	6p22.2-p21.1			
			STXBP2	6813	19p13.3-p13.2
FIGNL1	63979	7p12.2			
AOAH	313	7p14-p12	ACSS1	84532	20p11.23-p11.21
			BMP2	650	20p12
AZIN1	51582	8q22.3			
			USP25	29761	21q11.2
CTNNA1	8727	9q31.2			
NR5A1	2516	9q33	PRDX4	10549	Xp22.11

insieme up-regolati (o down-regolati) in una condizione, ad esempio la lattazione, e tutti insieme down-regolati (o up-regolati) nella condizione successiva, ad esempio l'involutione della ghiandola mammaria al momento dell'interruzione

ne della lattazione. Lo scopo del presente lavoro è di fornire elementi per la comprensione dei principi biologici globali che governano gli eventi molecolari durante la lattazione e l'involutione. La trascrizione ha un ruolo im-

portante nella lattazione, quasi un terzo del trascrittoma fluttua per costruire, fare funzionare e disassemblare l'apparato della lattazione. La diversità della parte endogena del proteoma del latte è derivata da meno di cento trascritti.

**Tabella 2-1 - Set di 1210 geni simultaneamente down-regolati durante la lattazione e simultaneamente up-regolati durante l'involuzione della ghiandola mammaria. Di ciascun gene è riportata da sigla, l'identificativo SwissProt (ID) e la localizzazione sul cromosoma 1**

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
PSMA5	5686	1p13	ADSS	159	1cen-q12
RHOC	389	1p13.1	RBM8A	9939	1q12
SARS	6301	1p13.3-p13.1	MEF2D	4209	1q12-q23
CAPZA1	829	1p13.2			
NRAS	4893	1p13.2	CLIC1	1196	1q21
			CTSS	1520	1q21
FRRS1	391059	1p21.2	MRPL9	65005	1q21
TMEM56	148534	1p21.3	PSMB4	5692	1q21
CNN3	1266	1p22-p21	S100A1	6271	1q21
			S100A10	6281	1q21
BCL10	8915	1p22	S100A11	6282	1q21
CSDE1	7812	1p22	S100A13	6284	1q21
GBP2	2634	1p22.2	S100A6	6277	1q21
GBP4	115361	1p22.2	SCAMP3	10067	1q21
ZNF644	84146	1p22.2	SHC	6464	1q21
			VPS72	6944	1q21
ACADM	34	1p31	PSMD4	5710	1q21.2
LEPROT	54741	1p31.3	ANP32E	81611	1q21.2
			FAM63A	55793	1q21.2
MACF1	23499	1p32-p31	CDC42SE1	56882	1q21.2
EPS15	2060	1p32	F11R	50848	1q21.2-q21.3
CPT2	1376	1p32	LMNA	4000	1q21.2-q21.3
NRD1	4898	1p32.2-p32.1	C1orf77	26097	1q21.3
ATP6V0B	533	1p32.3	PYGO2	90780	1q21.3
			SNAPIN	23557	1q21.3
AKR1A1	10327	1p33-p32	SELENBP1	8991	1q21-q22
YIPF1	54432	1p33-p32.1	MRPL24	79590	1q21-q22
			RUSC1	23623	1q21-q22
MAGOH	4116	1p34-p33	HDGF	3068	1q21-q23
LAPTM5	7805	1p34	TAGLN2	8407	1q21-q25
FUCA1	2517	1p34			
PTPRF	5792	1p34	C1orf85	112770	1q22
RRAGC	64121	1p34	IFI16	3428	1q22
CTPS	1503	1p34.1	RIT1	6016	1q22r
PRDX1	5052	1p34.1	CD1D	912	1q22-q23
PSMB2	5690	1p34.2	SKI	6497	1q22-q24
NCDN	23154	1p34.3			

(continua)

Tabella 2-1 - *segue*

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
SF3A3	10946	1p34.3	MGST3	4259	1q23
SFPQ	6421	1p34.3	CCT3	7203	1q23
SNIP1	79753	1p34.3	NDUFS2	4720	1q23
THRAP3	9967	1p34.3	TIPRL	261726	1q23.2
TRAPPC3	27095	1p34.3	SDHC	6391	1q23.3
			UFC1	51506	1q23.3
STX12	23673	1p35-p34.1	UHMK1	127933	1q23.3
MARCKSL1	65108	1p35.1	PFDN2	5202	1q23.3
ARID1A	8289	1p35.3	MRPS14	63931	1q23-q25
DNAJC8	22826	1p35.3			
			KIFAP3	22920	1q24.2
STMN1	3925	1p36.1-p35	GAS5	60674	1q25.1
LYPLA2	11313	1p36.12-p35.1	PRDX6	9588	1q25.1
PRKACB	5567	1p36.1	STX6	10228	1q25.3
CDC42	998	1p36.1	LAMC2	3918	1q25-q31
ECE1	1889	1p36.1			
C1QC	714	1p36.11	PSEN2	5664	1q31-q42
SRRM1	10250	1p36.11			
SYF2	25949	1p36.11	LAMB3	3914	1q32
USP48	84196	1p36.12	MAPKAPK2	9261	1q32
C1QB	713	1p36.12	NUCKS1	64710	1q32.
HP1BP3	50809	1p36.12	TIMM17A	10440	1q32.1
C1orf151	440574	1p36.13	ZC3H11A	9877	1q32.1
PARK7	11315	1p36.23	ZNF281	23528	1q32.1
TPRG1L	127262	1p36.32	ANGEL2	90806	1q32.3
AGRN	375790	1p36.33	GUK1	2987	1q32-q41
C1orf86	199990	1p36.33			
GNB1	2782	1p36.33	C1orf58	148362	1q41
SSU72	29101	1p36.33	IARS2	55699	1q41
RPL22	6146	1p36.3-p36.2	SMYD2	56950	1q41
			CAPN2	824	1q41-q42
ATPIF1	93974	1	GALNT2	2590	1q41-q42
			ARF1	375	1q42
			EPHX1	2052	1q42.1
			TSNAX	7257	1q42.1
			C1orf57	84284	1q42.2
			DEGS1	8560	1q42.11
			WDR26	80232	1q42.11

**Tabella 2-2 - Set di 1210 geni simultaneamente down-regolati durante la lattazione e simultaneamente up-regolati durante l'involuzione della ghiandola mammaria. Di ciascun gene è riportata da sigla, l'identificativo SwissProt (ID) e la localizzazione sul cromosoma 2**

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
CAPG	822	2p11.2	TMEM131	23505	2q11.2
MRPL35	51318	2p11.2	TXNDC9	10190	2q11.2
RBED1	84173	2p11.2	UNC50	25972	2q11.2
RNF103	7844	2p11.2	MAP4K4	9448	2q11.2-q12
TMSB10	9168	2p11.2	MAP4K4	9448	2q11.2-q12
			LIMS1	3987	2q12.3-q13
ANXA4	307	2p13	DBI	1622	2q12-q21
AUP1	550	2p13	NCL	4691	2q12-qter
DCTN1	1639	2p13			
DGUOK	1716	2p13	RALB	5899	2cen-q13
MOBKL1B	55233	2p13.1			
DUSP11	8446	2p13.2	BIN1	274	2q14
CCT7	10574	2p13.2	ACTR3	10096	2q14.1
PCBP1	5093	2p13-p12	COL5A2	1290	2q14-q32
SMYD5	10322	2p13.2			
			POLR2D	5433	2q21
ACTR2	10097	2p14	FAM128B	80097	2q21.1
SNRPG	6637	2p14	PLEKHB2	55041	2q21.1
MTIF2	4528	2p14-p16	UBXD2	23190	2q21.3
CCT4	10575	2p15	PKP4	8502	2q23-q31
ACYP2	98	2p16.2	GPD2	2820	2q24.1
CCDC128	129285	2p16.3	PSMD14	10213	2q24.2
RTN4	57142	2p16.3	RBMS1	5937	2q24.2
RHOQ	24433	2p21	NFE2L2	4780	2q31
CRIP1	9419	2p21	DYNC1I2	1781	2q31.1
CALM2	805	2p21			
COX7A2L	9167	2p21	ATF2	1386	2q32
CYP1B1	1545	2p21	NCKAP1	10787	2q32
			SDPR	8436	2q32-q33
STRN	6801	2p22-p21	DNAJB2	3300	2q32-q34
ZFP36L2	678	2p22.3-p21			
HNRPLL	92906	2p22.1	C2orf47	79568	2q33.1
MAP4K3	8491	2p22.1	IGFBP5	3488	2q33-q36

(continua)

Tabella 2-2 - segue

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
FAM98A	25 940	2p22.3	ACADL	33	2q34-q35
HADHB	3032	2p23	AAMP	14	2q35
BRE	9577	2p23.2	TUBA4A	7277	2q35
GTF3C2	2976	2p23.3	PTMA	5757	2q35-q36
GPN1	11321	2p23.3	ARPC2	10109	2q36.1
VPS24	51652	2p24.3-p24.1	HRB	3267	2q36.3
RHOB	388	2p24	RAMP1	10267	2q36-q37.1
ROCK2	9475	2p24	SEPT2	4735	2q37
ASNSD1	54529	2p24.3-q21.3	COL6A3	1293	2q37
YWHAQ	10971	2p25.1	ITM2C	81618	2q37
PDIA6	10130	2p25.1	UGT1A3	54659	2q37
TTC15	51112	2p25.3	PSMD1	5707	2q37.1
SF3B14	51639	2pter-p25.1	HES6	55502	2q37.3
			ILKAP	80895	2q37.3

Tabella 2-3 - Set di 1210 geni simultaneamente down-regolati durante la lattazione e simultaneamente up-regolati durante l'involuzione della ghiandola mammaria. Di ciascun gene è riportata da sigla, l'identificativo SwissProt (ID) e la localizzazione sul cromosoma 3

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
CHMP2B	25978	3p11.2	CPOX	1371	3q12
CGGBP1	8545	3p12-p11.1	TOMM70A	9868	3q12.2
			PCNP	57092	3q12.3
			CD47	961	3q13.1-q13.2
FLNB	2317	3p14.3	ATP6V1A	523	3q13.2-q13.31
			COX17	10063	3q13.33
			FSTL1	11167	3q13.33
CTNNB1	1499	3p21	MYLK	4638	3q21
TCTA	6988	3p21	SNX4	8723	3q21.2
UBA7	7318	3p21	MGLL	11343	3q21.3
GNAI2	2771	3p21			

(continua)

Tabella 2-3 - *segue*

GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte p)	GENE	SwissProt ID	Cromosoma (parte q)
DAG1	1605	3p21			
ALAS1	211	3p21.1	ATP1B3	483	3q23
NISCH	11188	3p21.1	CP	1356	3q23-q25
TWF2	11344	3p21.1			
VPRBP	9730	3p21.2	MBNL1	4154	3q25
QARS	5859	3p21.3-p21.1	COMMD2	51122	3q25.1
USP4	7375	3p21.3	SELT	51714	3q25.1
CCDC12	151903	3p21.31	MFSD1	64747	3q25.33
CDCP1	64866	3p21.31			
SHISA5	51246	3p21.31	MFN1	55669	3q26.32
SELK	58515	3p21.31	TBL1XR1	79718	3q26.32
SLC25A20	788	3p21.31	ZNF639	51193	3q26.32
WDR6	11180	3p21.31	NDUFB5	4711	3q26.33
ZDHHC3	51304	3p21.31			
			PARL	55486	3q27.1
WDR48	57599	3p21.33	DNAJB11	51726	3q27.3
CLEC3B	7123	3p22-p21.3	CCDC50	152137	3q28
MYD88	4615	3p22	LPP	4026	3q28
EIF1B	10289	3p22.1	POLR2H	5437	3q28
SNRK	54861	3p22.1			
CRTAP	10491	3p22.3	FBXO45	200933	3q29
PDCD6IP	10015	3p22.3	PAK2	5062	3q29
			PCYT1A	5130	3q29
ACAA1	30	3p23-p22			
CAPN7	23473	3p24			
TRAK1	22906	3p25.3-p24.1			
RAF1	5894	3p25			
FBLN2	2199	3p25.1			
LSM3	27258	3p25.1			
TMEM43	79188	3p25.1			
JAGN1	84522	3p25.2			
THUMPD3	25917	3p25.3			
C3orf10	55845	3p25.3			
ARPC4	10093	3p25.3			

**Tabella 3 - Fattori di trascrizione che possono legare i promotori dei 38 geni simultaneamente up-regolati nella lattazione e down-regolati nell'involutione**

Fatt. Trascr.	Freq.								
AP2ALPHA	41	MYC	38	CAAT	27	NMYC	18	ERR1	11
AR	41	RFX	38			UF1H3BETA	18	GABP	11
AREB6	41			ER		26		HFH4	11
CREB	41	AP2	37	GLI	26	ACAAT	17	MUSCLE	11
E2F1	41	EGR	37	HIC1	26	ETS1	17	NFE2	11
ETS	41	GC	37	MAZR	26	HSF1	17	PBX	11
GR	41	STAT	37	ZNF219	26	MINI19	17		
HNF4	41					NFKAPPAB	17	AHRARNT	10
PAX2	41	FOXO1	36	MEIS1	24	WHN	17	HAND1E47	10
PAX4	41	YY1	36					RORA1	10
SMAD	41			VMYB	23	MAF	16	SP3	10
SREBP1	41	AP1	35			NFKAPPAB65	16		
STAT1	41	PBX1	35	EVI1	22			ARNT	9
STAT3	41	TCF11	35	KROX	22	E47	15	GFI1B	9
STAT5A	41			NFY	22	ETS2	15	NFMUE1	9
T3R	41	MYCMAX	34			BACH2	14	PTF1BETA	9
				IPF1	21	MEF2	14	RREB1	9
CEBP	40	E2F1DP1	33	OCT	21			TEL2	9
CETS1P54	40	FOXO4	33			ELK1	13		
E2F	40	GFI1	33	AHR	20	MINI20	13	AML	8
IRF1	40	MYOD	33	ATF6	20	NANOG	13	EGR3	8
P53	40			E2F1DP1RB	20	NF1	13	ICSBP	8
USF	40	CBF	32			ATF1	12	NFKAPPAB50	8
		ZF5	32	ATF4	19	CREBP1	12	NKX61	8
AP4	39			E2F4DP1	19	DEC	12	NRF1	8
MAZ	39	CP2	29	FOX	19	HIF1	12	PAX	8
OCT1	39	IRF	29	GCM	19	IK1	12	POU3F2	8
PR	39	RBPJK	29	HES1	19	IK3	12		
SP1	39	SREBP	29	NRF2	19	NFKB	12		
TBX5	39	TAL1	29	SMAD4	19	NGFIC	12		

La secrezione durante la lattazione deriva non dalla up-regolazione di nuove funzioni genomiche, ma da una diffusa soppressione trascrizionale di funzioni come la degra-

dazione delle proteine e la comunicazione cellula-ambiente. L'interruttore dell'involutione è primariamente mediato dalla trascrizione ed i fattori di trascrizione

comuni ai due set di geni da noi identificati costituiscono un importante punto di partenza per ulteriori approfondimenti. È interessante notare che durante

**Tabella 4 - Fattori di trascrizione che possono legare i promotori dei 1210 geni simultaneamente down-regolati nella lattazione e up-regolati nell'involuzione**

Fatt. Trascr.	Freq.								
AHNF4	1341	CEBP	1296	CBF	1099	AHR	795	ACAAT	455
STAT3	1341			OCT1	1099	E2F4DP1	795	UF1H3BETA	448
STAT5A	1341	P53	1285	MYOD	1079	ER	784	SP3	443
						NFY	775	GABP	431
PAX2	1340	AP4	1275	FOXO1	1062			NANOG	425
		MAZ	1275	TCF11	1060	KROX	745	MINI20	421
STAT1	1359	GC	1274	CP2	1025	NFKAPPAB	710	BACH2	416
								NRF1	416
SMAD	1336	RFX	1266	PBX1	989	MAF	698	ETS2	381
		CETS1P54	1262			NRF2	660	PTF1BETA	380
T3R	1335			CAAT	939	ELK1	618	CREBP1	379
		MYC	1234	TAL1	927			IPF1	376
AP2ALPHA	1331	ZF5	1231	FOXO4	920	ATF6	591	SMAD4	371
E2F1	1331					E47	591	DEC	369
		AP2	1219	GFI1	911	EVI1	580	ERR1	361
ETS	1329	EGR	1219	VMYB	908	ATF4	572	NF1	358
		AP1	1204	GLI	899			NGFIC	353
PAX4	1327			RBPJK	898	WHN	551	TEL2	350
		IRF1	1193	MAZR	890	HES1	548	AHRARNT	349
SREBP1	1322	USF	1191			HSF1	548	HIF1	332
		TBX5	1176	ZNF219	878	MINI19	543	ATF	324
AREB6	1317			IRF	877			NFKAPPAB50	317
		PR	1158	HIC1	859	ETS1	524	BLIMP1	315
E2F	1315	E2F1DP1	1142			FOX	522	IK1	311
				E2F1DP1RB	834	NFKAPPAB65	520	PBX	308
SP1	1313	YY1	1128	MEIS1	818	NFKB	509	HFH4	303
		MYCMAX	1124	SREBP	807			NFE2	300
AR	1308					GCM	498		
GR	1308	STAT	1101			MEF2	494		
CREB	1304					NMYC	482		
						OCT	477		

la gravidanza e la lattazione la maggior parte delle proteine di secrezione sono down-regolate e solo pochissime sono up-regolate.

Infatti, meno di cento trascritti con peptide segnale sono up-regolati durante la lattazione. Questo significa che le proteine secrete so-

no limitate a quelle importanti per la composizione del latte e che le altre funzioni secretive sono sopresse mentre la ghiandola segue il

**Tabella 5 - Geni che codificano per proteine mitocondriali che sono simultaneamente down-regolati nella lattazione e up-regolati nell'involutione**

Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	ACAA1	Mitochondrial ribosomal protein L51	MRPL51
Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial)	ACAA2	Mitochondrial ribosomal protein L52	MRPL52
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain	ACADL	Mitochondrial ribosomal protein L9	MRPL9
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12	ACADM	Mitochondrial ribosomal protein S12	MRPS12
Hypothetical protein LOC100145745	ACOT9	Mitochondrial ribosomal protein S14	MRPS14
Cytochrome c oxidase subunit XVII assembly protein	COX17	Mitochondrial ribosomal protein S17	MRPS17
COX4 neighbor	COX4NB	Mitochondrial ribosomal protein S18B	MRPS18B
Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide	COX7A2L	Mitochondrial ribosomal protein S34	MRPS34
2,4-dienoyl Co A reductase 1, mitochondrial	DECR1	Mitochondrial translational initiation 2	MTIF2
Dihydroipoamide S-succinyltransferase	DLST	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	NDUFA2
Mitochondrial trifunctional protein, beta subunit	HADHB	NADH ubiquinone oxidoreductase B9 subunit	NDUFA3
Lipoic acid synthetase	LIAS	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	NDUFA5
Mitochondrial ribosomal protein L11	MRPL11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	NDUFA6
Mitochondrial ribosomal protein L16	MRPL16	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha	NDUFA7
Mitochondrial ribosomal protein L18	MRPL18	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta	NDUFB5
Mitochondrial ribosomal protein L24	MRPL24	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	NDUFS2
Mitochondrial ribosomal protein L27	MRPL27	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein	NDUFV1
Mitochondrial ribosomal protein L34	MRPL34	Oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)	OGDH
Mitochondrial ribosomal protein L35	MRPL35	Succinate dehydrogenase complex, subunit C	SDHC
Mitochondrial ribosomal protein L36	MRPL36	Succinate dehydrogenase complex, subunit D	SDHD
Mitochondrial ribosomal protein L4	MRPL4	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier)	SLC25A4
Mitochondrial ribosomal protein L43	MRPL43	Translocase of outer mitochondrial membrane 7	TOMM7
Mitochondrial ribosomal protein L45	MRPL45	Translocase of outer mitochondrial membrane 70A	TOMM70A
		Electron transferring flavoprotein, beta polypeptide	ETFB

particolare percorso della lattazione. Appare quindi evidente che le componenti della pathway secretoria servano soprattutto per sintetizzare e secernere grandi quantità ma solo di poche proteine.

Le caseine sono le proteine sintetizzate con grande abbondanza nella ghiandola mammaria. Rudolph et al. (1) hanno studiato i profili di espressione dei diciassette geni principali delle proteine del

latte: alfa-caseina, beta-caseina, gamma-caseina, kappa-caseina, proteina E8 della membrana del globulo di grasso, inibitore della proteinasi extracellulare, proteina relativa alla differenziazione adiposa, proteina acida del siero di latte, alfa-lattoalbumina, lipasi stimolata dai sali biliari, lattotransferrina, butirfilina, mucina 1, xantina deidrogenasi, delta-caseina, epidermal growth factor e pep-

tide simile all'ormone paratiroido.

L'analisi dei 1210 geni simultaneamente down-regolati durante la lattazione e simultaneamente up-regolati durante l'involutione fornisce interessanti risultati. Analizzando la tabella 5, appare evidente che il turnover delle proteine (e quindi della funzione mitocondriale) appare fortemente inibito durante la lattazione.

**Tabella 6 - Geni che codificano per il macchinario di demolizione di proteine ubiquitina-dipendente che sono simultaneamente down-regolati nella lattazione e up-regolati nell'involuzione**

Proteasome maturation protein	POMP	Proteasome 26S non-ATPase subunit 8	PSMD8
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA2	Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	PSME1
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA3	Proteasome activator subunit 2	PSME2
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA4	Proteasome activator subunit 3	PSME3
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA5	Ubiquitin-associated protein 1	UBAP1
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA6	Ubiquitin B	UBB
Proteasome (prosome, macropain) subunit alpha	PSMA7	Ubiquitin-activating enzyme E1-like	UBA7
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB1	Ubiquitin-activating enzyme E1	UBA1
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB10	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog	UBE2B
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	UBE2D2
Proteasome beta 4 subunit	PSMB4	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog)	UBE2D3
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	UBE2L3
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M	UBE2M
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	UBE2N
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	UBE2R2
Proteasome (prosome, macropain) subunit beta	PSMB9	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UBE2V1
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	PSMC1	Ubiquitin-like 5	UBL5
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	PSMC2	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	UBA2
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	PSMC3	UBX domain containing 2	UBXD2
Proteasome 26S ATPase subunit 6	PSMC6	UBX domain containing 6	UBXD6
Proteasome 26S non-ATPase subunit 1	PSMD1	Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1	UFC1
Proteasome 26S non-ATPase subunit 11	PSMD11	Ubiquitin specific peptidase 3	USP3
Proteasome 26S non-ATPase subunit 13	PSMD13	Ubiquitin specific protease 4 (proto-oncogene)	USP4
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	PSMD14	Ubiquitin specific protease 48	USP48
Proteasome 26S non-ATPase subunit 3	PSMD3	Ubiquitin specific protease 5 (isopeptidase T)	USP5
Proteasome 26S non-ATPase subunit 4	PSMD4	Ubiquitin specific peptidase 8	USP8
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	PSMD7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Z	UBE2Z

Il set di geni riportato nella tabella 6 dimostra che la soppressione della pathway di ubiquitinazione delle proteine è quasi totale durante la lattazione e che soltanto all'inizio dell'involutione questi geni saranno nuovamente up-regolati. Questi risultati implicano che le cellule epiteliali mammarie,

nel loro stato altamente specializzato durante la lattazione, richiedono la completa soppressione della degradazione di proteine attraverso la via dell'ubiquitina. La modulazione della pathway di ubiquitinazione delle proteine è un importante elemento che appare caratteristico delle cellule epiteliali

mammarie nel corso dell'allattamento. La soppressione trascrizionalmente regolata del macchinario proteolitico durante la lattazione suggerisce che un momento iniziale dell'evoluzione mammaria possa essere stato l'acquisizione della tolleranza per quantità di proteine ben oltre quelle normal-

mente accettabili all'interno delle cellule. Una tale soppressione della proteolisi potrebbe essere stata necessaria per permettere l'emergere di proteine eccellenti dal punto di vista nutrizionale ma dotate di una struttura poco compatta con i gruppi idrofobici esposti che ne comporterebbe la rapida distruzione all'interno delle cellule. Durante la lattazione le cellule mamma-

rie si comportano in modo veramente unico al punto da costituire un modello utile per rispondere a questioni biologiche che oltrepassano la biologia mammaria.

### **Bibliografia**

1. Rudolph MC, et al. Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 287-307.
2. Lemay DG, et al. Gene regulatory networks in lactation: identification of global principles using bioinformatics. *BMC Systems Biology* 2007; 1: 56.
3. Piva F, Principato G. RANDNA: a random DNA sequence generator. *In Silico Biol* 2006; 6 (3): 253-8.