

Sığır, Keçi ve Koyunlarda MikroRNA'ların (miRNA) Meme Bezi Gelişimi ve Süt Üretimine Etkisi

Deniz DİNÇEL^{1*} Sena ARDIÇLI¹ Hale ŞAMLI¹ Faruk BALCI¹

¹Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Öz: Ruminantlarda meme bezi (MB) gerek yeni doğanlara gerekse insan tüketimine süt üretimiyle önemli fonksiyona sahip olan ve yavru doğumundan sonra büyüyüp gelişen kompleks bir organdır. MB'nin gelişimi ile sütün sentez ve salgılanması ise laktasyon süreci ile ilişkilidir. MB'nin verimi; beslenme, genetik, ırk ve epigenetik faktörlerin etkisi altındadır. Epigenetik faktörlerin başında gelen mikroRNA'lar (miRNA) ortalama 22 nükleotit (19-24 nt) uzunluğunda, kodlamayan RNA molekülleridir. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynayan miRNA'lar post transkripsiyonel regülatör olarak gen ekspresyonunda görev almaktadır. Karsinogenezden embriyogeneze kadar pek çok alanda yoğun olarak çalışılan miRNA'lar sığır, keçi ve koyun türünde sırasıyla; 1045, 436 ve 153 (olgun) adet tanımlanmıştır. Tanımlanmış miRNA'lar içerisinde kolostrumda 230, sütte ise 213 miRNA tipi tespit edilmiştir. Ayrıca kuru dönemde ve laktasyonun pik evresinde miRNA tipleri ve ekspresyon seviyelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bir başka çalışmada, sütte tespit edilen miRNA'ların miktar olarak kan serumundan iki kat daha fazla olduğu ve serumdan farklı 47 tip miRNA içerdiği görüldüğü; MB'nin kendine özgü miRNA'lar sentezlediği sonucuna varılmıştır. Ancak miRNA'ların meme bezi gelişimi ve laktasyon regülasyonundaki spesifik fonksiyonuna ilişkin bilgiler kısıtlıdır. Bu nedenle, miRNA'ların laktogenez mekanizmalarına olan etkilerinin aydınlatılmasına ve laktasyon süt verim ile bileşimine olan etkisinin anlaşılmasına yönelik moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu derlemede çiftlik hayvanlarında miRNA'ların MB gelişimi ve süt üretimine olan etkilerine yönelik güncel bilgiler ve gelecekteki olası çıkarımlar üzerine odaklanılmıştır.

Anahtar sözcükler: Sığır, keçi, koyun, meme bezi, laktasyon, miRNA.

Atf yapmak için: Dinçel, D., Ardiçlı, S., Şamlı, H. & Balcı, F. (2018). Sığır, keçi ve koyunlarda mikroRNA'ların (miRNA) meme bezi gelişimi ve süt üretimine etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 3(3), 124-130.

The Impact of MicroRNA's (miRNA) on Mammary Gland Development and Milk Production in Cattle, Goat and Sheep

Abstract: Mammary gland (MG) of ruminants has important functions in producing milk for both newborns and human consumption and is a complex organ that grows and develops after calving. Development of MG with the synthesis and secretion of milk are both associated with the lactation process. The productivity of MG is under the influence of nutrition, genetics, race and epigenetic factors. The microRNAs (miRNAs), precede the epigenetic factors, are non-coding RNA molecules that have an average length of 22 (19-24nt) nucleotides. The miRNAs, which play a role in important biological processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis, participate in gene expression as a post transcriptional regulators. In cattle, goat and sheep species miRNA's, which are extensively studied from carcinogenesis to embryogenesis, were defined 1045, 436 and 153 (mature) respectively. 230 miRNAs were detected in the colostrum and 213 miRNAs in the milk within the identified miRNAs. It was also defined that miRNA types and expression levels differed in the dry period and the lactation peak period. In another study, it was seen that the miRNA's detected in the milk were two times more than the serum and milk contained 47 different miRNAs compared to serum; consequently it is thought that MG synthesized its own miRNAs. However, the information about miRNAs on mammary gland development and the specific function of lactation regulation is limited. Molecular studies are required to illuminate the effects of miRNAs on lactogenesis mechanisms and to understand its effect on lactation milk yield. This review focuses on the current knowledge and possible future implications of miRNAs both in the development of MG and the milk production in livestock.

Keywords: Cattle, goat, sheep, mammary gland, lactation, miRNA.

How to cite: Dinçel, D., Ardiçlı, S., Şamlı, H. & Balcı, F. (2018). The impact of microRNA's (miRNA) on mammary gland development and milk production in cattle, goat and sheep. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 3(3), 124-130.

GİRİŞ

Süt, canlıların gelişimi için temel besin öğelerinin tümünü içererek; memeli yaşamının erken döneminde başlıca besin kaynağını oluşturmaktadır (Jabed vd., 2012). Yapısında bulunan birçok organik ve inorganik madde besleyici değerini ve işleme sürecini etkilemektedir. Gerek

yeni doğan yavrulara gerekse insan tüketimine süt üretimi yaparak önemli fonksiyona sahip olan meme bezi (MB); ruminantlarda yavru doğumundan sonra büyüyüp gelişen kompleks bir organdır (Knight vd., 1982; 1998). Meme bezi genel olarak epitelyum ve stroma olmak üzere iki doku komponentinden oluşmaktadır. Epitelyum kısmında kanallar ve süt üreten alveolar hücreleri bulunmaktadır. Epitelyal

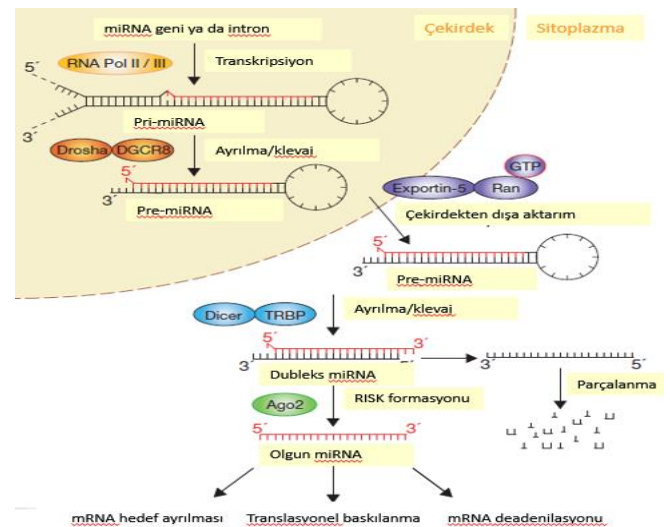
hücrelerin büyük bir kısmı sekresyon yapmakta ve gebelik boyunca fonksiyonel olarak süt üretimi için farklılaşmaktadır (Li vd., 2012b). MB'nin üretkenliği; beslenme, genetik, ırk ve epigenetik faktörlerin etkisi altındadır (Qing-zhang vd., 2014). MB'nin gelişimi ile sütün sentez ve salgılanması ise laktasyon süreci ile ilişkilidir. Dinamik bir süreç olan laktasyon, her evresinde; bakım, besleme, sağlık ve moleküler mekanizmalar gibi faktörlerin etkisi altındadır (Do vd., 2017). Bu açıdan laktasyon, kuru dönem ya da süt verilmeyen dönem arasında gerek morfolojik gerekse moleküler düzeyde bir takım farklılıklar görülmektedir (Li vd., 2012b). Moleküler düzeyde görülen farklılıklar; genetik ve epigenetik değişimler sonucu oluşmaktadır. Nükleotid diziliminde herhangi bir değişim olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişimler; bir başka deyişle genotipik değişimi olmadan gerçekleşen fenotip değişimleri epigenetik olarak adlandırılmaktadır (Qing-zhang vd., 2014). Epigenetik faktörler arasında yer alan miRNA'lar, son yıllarda aralarında çiftlik hayvanlarının da olduğu pek çok türde gerek deneysel gerekse bilgisayar sistemleri aracılığıyla keşfedilmiştir. Post transkripsiyonel regülatör olarak gen ekspresyonunda görev aldığı düşünülen yeni keşif miRNA'lar; karsinogenezden embriyojeneze kadar pek çok alandan yoğun olarak çalışılmaktadır (Bhaskaran & Mohan, 2014). Verim açısından bakıldığında; miRNA'ların süt üretimindeki rollerinin belirlenmesi amacıyla MB, süt ve kolostrumdaki varlıkları tespit edilmesi ile farklı doku ve sıvılarda belirlenen miRNA'ların laktasyon boyunca değişimlerini anlamaya yönelik çalışmalar yapıldığı görülmektedir (Barozai vd., 2012; Chen vd., 2010; Hou vd., 2017; Javed vd., 2012; Ji vd., 2012; Li vd., 2012a; Mobucho vd., 2015; Wang vd., 2012;). Bu derlemede, çiftlik hayvanlarında miRNA'ların MB gelişimi ve laktasyon sürecine olan etkilerine yönelik güncel bilgiler ve gelecekteki olası çıkarımlar üzerine odaklanılmıştır.

miRNA: *Lin-4* adı verilen ilk küçük RNA'lar nematodlarda (*Caenorhabditis elegans*- *C. elegans*) 1993 yılında keşfedilmiştir (Lee vd., 1993; Wightman vd., 1993). Yapılan çalışmada *Lin-4*'ün, antisense RNA-RNA interaksyonunu ile *Lin-14* translasyonunu bloke ederek; *Lin-14*'ün ekspresyonunu baskıladığı ileri sürülmüştür (Lee vd., 1993). Bu kısa *Lin-4* RNA'lar; düzenleyici RNA'ların bağımsız sınıfını oluşturan miRNA (mikroRNA)'ların kaynağı olarak tanımlanmaktadır (Wahid vd., 2010). miRNA'lar ortalama 22 nükleotit (19-24 nt) uzunluğunda, kodlamayan RNA molekülleridir (Alvarez-Garcia vd., 2005; Bhaskara & Mohan, 2014). miRNA genlerinin, bilinen memeli genlerindeki payının yaklaşık %2-5 olduğu tahmin edilmektedir (Alvarez-Garcia vd., 2005; Berezikov vd., 2005). Bu miRNA genlerinin, tüm protein kodlayan genlerin %60 kadarının ekspresyonlarını düzenlediği düşünülmektedir (Do & Ibeagha-Awemu, 2017; Mobuchon vd., 2015). Kodlamayan miRNA'lar, hücre çoğalması,

farklılaşması ve apoptoz gibi birçok önemli hücrel süreçte rol oynamaktadır (Liu vd., 2009; Peng vd., 2015). Bugüne kadar 23 farklı türde (insan, sığır, köpek hamster, domuz vs.) toplam 4076 miRNA saptanmıştır (miRTarBase 7.0). miRBase (2018) güncel verilerine göre sığırlarda (bta-miR-...) 1084 prekürsör/öncü, 1045 olgun; koyunlarda (aor-miR-...) 106 prekürsör, 153 olgun; keçiye ise (chi-miR-...) 267 prekürsör ve 436 olgun miRNA tanımlanmıştır.

miRNA biyogenezi ve etki mekanizması:

miRNA'ların sentezi RNA polimeraz II enzimi aracılığı ile çekirdekte DNA'nın transkripsiyonu ile başlamaktadır (Wahid vd., 2010). Transkripsiyon sonucu oluşan saç tokası yapısındaki pri-miRNA'lar, RNaz III enzimi olan Drosha ve kofaktörü DGCR8-DiGeorge sendrom kritik bölgesi (Pasha) protein kompleksi tarafından kesilerek 60-70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ları oluştururlar (Liu vd., 2010). Oluşan pre-miRNA'lar, nüklear transport reseptör-5 (Exportin-5) aracılığı ile çekirdekte sitoplazmaya geçer (Bhaskaran & Mohan, 2014; Winter vd., 2009). Sitoplazmada pre-miRNA'lar bir başka RNaz III enzimi olan Dicer ile transaktivasyon cevabı yaratan RNA bağlama proteiniyle (Trans-activation response RNA-binding protein-TRBP) saç tokası yapısını keserek, 21-24 nükleotid uzunluğundaki kısa çift iplikli dubleks miRNA'lara dönüşür (Wahid vd., 2010; Winter vd., 2009). Sentezlenen dublex yapıdaki miRNA'ların fonksiyonel zinciri katalizör olarak görev yapan Argonot protein 2 (Ago 2) ile RISK adı verilen "RNA indüklenmiş susturma kompleksi" "ne yüklenerek olgun formuna dönüşür (Winter vd., 2009). Fonksiyonel olmayan diğer zincir ise endonükleazlar ile yıkılır. Olgun miRNA etkisini üç yolla gösterir; bunlardan ilki mRNA hedef ayrılması, ikincisi translasyonel represyon üçüncüsü ise mRNA deadenilasyondur (Qing-zhang vd., 2014; Winter vd., 2009) (Şekil 1).



Şekil 1. miRNA biyogenezi ve olgun miRNA'nın etki mekanizmasını gösteren yolak haritası (Winter, 2009).

Meme bezi ve laktasyon üzerine yapılmış miRNA çalışmaları: miRNA çalışmaları genel olarak; miRNA tanımlanması (farklı türlerle karşılaştırma ve dizi analizleri) (Barozai vd., 2012; Gu vd., 2007; Ji vd., 2012/2013; Li vd., 2012b) ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması, doku ve organ gelişimine etkilerinin belirlenmesi (Cui vd., 2017; Gu vd., 2007; Li HM vd., 2012), hedef gen çalışmaları (Cui vd., 2017; Javed vd., 2012), protein düzeyinde regülasyonun belirlenmesi, etki mekanizmalarının anlaşılması (hangi yollarda görevli olduğu), vücut fonksiyonlarına olan etkilerinin belirlenmesi (süt verimi, et verimi, yapağı özellikler ve kanser gibi) amacıyla gerçekleştirilmektedir (Javed vd., 2012; Ji vd., 2012; Mobucho vd., 2015). miRNA'ları hücrel oluşum ve gelişimdeki rolü insan dahil olmak üzere birkaç farklı türde tespit edildiğinden; bu miRNA'ların organların gelişiminde de görevli olabileceği ve meme bezinin gelişim ve laktasyona bağlı olarak farklılaşmasında etkin olabileceği düşünülmüştür (Silveri vd., 2006). Bu amaçla miRNA'ların meme bezi gibi çeşitli dokular ve vücut sıvılarındaki varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Örneğin; tanımlanmış miRNA'lar içerisinde kolostrumda 230, sütte ise 213 miRNA tespit edilmiştir (miRBase, 2018). Tespit edilen miRNA'ların süt üretimi ve laktasyon sürecine etkilerinin belirlenmesi için ise sığır, koyun ve keçilerde epigenetik çalışmalar güncel olarak devam etmektedir.

Sığırlarda miRNA: Ruminantlarda miRBase (2018) verilerine göre en çok miRNA sayısının sığırlarda tespit edildiği görülmektedir. Genom/RNA sekanslama ya da array sistemleri yardımıyla laktasyonun farklı dönemlerinde veya laktasyon dışında meme bezi ve sütte miRNA profillerinin belirlendiği çalışmalar literatürlerde yer almaktadır. Örneğin; Li ve arkadaşları (2012b), tarafından laktasyon ve laktasyon dışındaki ineklerde, meme bezinde toplamda 884 adet pre-miRNA tespit edilmiştir. İncelenen sürüde laktasyon ve laktasyon dışı miRNA tiplerinin ve ekspresyon seviyelerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bulgulara göre; laktasyondaki ineklerin meme bezlerinde 56 adet miRNA'nın laktasyon dışı ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin önemli derecede değiştiği ve değişim gösteren miRNA'ların laktasyon mekanizmasının kontrolünde görev alabileceği sonucuna varılmıştır (Li vd., 2012b). Ayrıca miRNA lokalizasyonuna bakıldığında en yüksek skorun sığır 21. kromozomunda (BTA-21) yer aldığı belirlenmiştir. Aynı yazarın 2016 yılında süt fraksiyonu ve meme bezi dokusunda yaptığı çalışmada ise süt yağı, serumu ve hücreleri ile meme bezi dokusunda sırasıyla; 210, 200 ve 249 bilinen; 33,31 ve 36 yeni miRNA tanımlanmıştır (Li vd., 2016). Gu ve arkadaşlarının (2007), yaptığı çalışmada ise; 59 adet miRNA tespit edilmiş; miR-23a, miR-24 ve miR-133'ün sığırlarda meme bezi gelişimine ve laktasyonuna etki edebileceği sonucuna varılmıştır.

Laktasyonun farklı periyodlarında kolostrum, çiğ süt ve serumdaki miRNA profilini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmada ise; yüksek düzeyde eksprese olan ve potansiyel markör olması muhtemel miR-26a, miR-26b, miR-200c, miR-21, miR-30d, miR-99a ve miR-148a Solexa sekanslama ile karşılaştırılmıştır (Chen vd., 2010:5). Elde edilen bulgulara göre; incelenen tüm miRNA'lar için en yüksek ekspresyon seviyeleri laktasyonun 5. ayında tespit edilirken; miR-21'in incelenen 4 periyodun ortalamasında, miR-200c'nin ise çiğ sütte en yüksek miktarda ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada serumdan farklı olarak 47 adet miRNA'nın süt için özgün olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 2010:5). Wang ve arkadaşları (2012), miR-10a, 15b, 16, 21, 33b, 145, 146b, 155, 181a, 205, 221 ve 223 olmak üzere kuru dönemde 12 adet miRNA'nın laktasyon dönemine göre down-regüle olduğu yani ekspresyonunun azaldığı, miR-31'in ise laktasyon ve kuru dönemde benzer düzeyde eksprese olduğunu bildirmiştir. 2014 yılına geldiğinde sığır ve fare genomunu miRNA profilleri açısından karşılaştırdığı çalışmada; Holstein ırkı sütçü sığırlarda, 167 miRNA belirlemiştir. Belirlenen miRNA'ların arasında 30 tanesinin (24 miRNA her iki türde de aynıdır) meme bezi dokusunda yüksek düzeyde eksprese olduğu; bunların arasından 6 adet miRNA'nın (miR-199a-3p, miR-99a-5p, miR92a-3p, miR26b-5p, miR23b-3p, miR20a-5p) ise sadece sığır meme bezinde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bta-5_32567-5p, bta-10_2736-3p, bta-16_10094-5p, bta-miR-2285t sığır meme bezinde olmak üzere; toplamda 7 adet miRNA ilk kez söz konusu çalışmada ortaya konulmuştur (Le Guillou vd., 2014). Do ve arkadaşları (2017), tarafından Holstein ırkı sığırlarda yapılan çalışmada ise; 475 bilinen ve 238 yeni miRNA tespit etmiştir. Laktogenez evresinde 344, galaktopoiez evresinde 366 ve involusyon evresinde 209 adet miRNA belirlenerek; miRNA sayılarının laktasyonun farklı evrelerinde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, miR-29b/miR-363 ve miR-874/miR-6254'ün; laktogenez-galaktopoiez ve galaktopoiez-involusyon evrelerine geçişte önemli bir aracı olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Bir sonraki aşamada farklı doku ve sıvılarda tespit edilen miRNA'ların etki mekanizmalarını anlamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Javed ve arkadaşları (2012), insan sütünde bulunmayan ve bu açıdan inek sütüne karşı başlıca alerjen olan β -laktoglobulini kontrol eden *BLG* geni, miRNA 3 ve 4 ile susturularak; β -laktoglobulini olmayan ve kazein içeriği yüksek süt elde edilmiştir. Bta-miR-15a (miR-15a)'nın meme epiteline olan etkisini incelendiği bir başka çalışmada ise; miR-15a'nın kazein ve Büyüme Hormon Reseptör (*Growth Hormone Receptor gene-GHR*) geninin ekspresyonunu inhibe ettiği; meme epitel hücrelerinin canlılığını düşürdüğü tespit edilmiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda; bta-miR-15a'nın

meme bezi fizyolojisinde önemli rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (Li HM. vd., 2012). Cui ve arkadaşlarının (2017), yaptığı çalışmada ise; miR-139'un sığır meme epitel hücrelerinin çoğalmasında görev aldığı ve β -kazein sentezini baskıladığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada *GHR* geni ve Tip-1 insülin benzeri büyüme faktörünün (*Type-1 insulin-like growth factor-IGFR*) miR-139 için hedef gen olduğu bildirilmiştir.

Tablo 1. Süt, kolostrum ve meme bezinde eksprese olan miRNA özet tablosu.

Tür	Eksprese olduğu doku	miRNA	Referans
Keçi	Süt / Kolostrum	chr16_12774_mat ure	Hou ve ark.,2017
		chr2_1026_mature let-7b-5p	
		miR-142-5p	
		miR-155-5p	
		miR-223-3p	
		miR-199a-5p	
		miR-2904	
		miR-375	
		miR-93-5p	
		let-7b	
Keçi	Meme bezi	let-7c	Li ve ark. (2012)
		miR-128	
		miR-145	
		miR-181b	
		miR-199a-3p	
		miR-199b	
		miR-221	
		miR-222	
		miR-2478	
		miR-25	
Koyun	Meme bezi	miR-200	Galio ve ark. (2013)
		miR-21	
Sığır/koyun	Meme bezi	miR-205	Wang ve ark. (2012); Galio ve ark. (2013)
		miR-100	
Sığır	Süt	miR-128-1	Lawless ve ark., (2013)
		miR-128-2	
		miR-148a	
		miR-200c	
		miR-21	
Sığır	Süt / Kolostrum	miR-26a	Chen ve ark. (2010)
		miR-26b	
		miR-30d	
		miR-99a	
		miR-15a	
Sığır	Meme epitel hücre hattı	miR-31	Li ve ark. (2012); Wang ve ark. (2012); Lawless ve ark., (2013)
		miR-10a	
Sığır	Meme bezi	miR-145	Wang ve ark. (2012)
		miR-146b	
		miR-155	
		miR-15b	
		miR-16	
		miR-181a	
		miR-199a-3p	
		miR-20a-5p	
		miR-21	
		miR-221	
		miR-223	
		miR-23b-3p	
		miR-26b-5p	
		miR-33b	
		miR-92a-3p	
miR-99a-5p			

Keçilerde miRNA: Süt üretimi açısından dünya verilerine göre 15,262,078 ton (Food and Agriculture Organization of United Nation [FAOSTAT], 9) ile üçüncü sırada yer alarak üretimde önemli payı olan keçilerde, laktasyonun farklı dönemlerine ait miRNA profilleri karşılaştırılarak; meme bezi, süt ve kolostrumda miRNA

identifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Hou vd., 2017; Ji vd., 2012; Li vd., 2012a; Mobucho vd., 2015). Li ve arkadaşları (2012a) keçi meme bezinde laktasyonun pik periodunda ve kuru dönemde miRNA profilini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada; toplamda 346 farklı miRNA tespit edilirken; 95 yeni miRNA tanımlanmıştır. miRNA ekspresyonlarının qRT-PCR ile farklı dokularda (meme bezi dahil) teyit edilerek, bazı miRNA'ların meme bezi gelişimi ve laktasyon süreci ile ilişkili olmaya aday olabileceği belirtilmiştir. Laoshan ırkı keçilerde laktasyondaki meme bezinden miRNA kütüphanesi oluşturmak üzere Solexa derin dizileme yöntemi kullanılarak gerçekleştirdikleri çalışmada; sığır miRNA kütüphanesiyle yapılan karşılaştırmalar sonucu, 131 adet yeni miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların 38 tanesi ikinci bir kütüphane kullanılarak doğrulanmıştır (Ji vd., 2012). Ji ve arkadaşlarının (2013), yaptığı çalışmada ise; 50 adet yeni miRNA tespit edilmiştir. Yeni keşfedilen miRNA'lardan 39 adeti tek kütüphanede, 1 adeti (Novel-miR-7) üç farklı kütüphanede tespit edilirken; 10 adeti (Novel_miR_7, 16, 24, 5, 25, 27, 32, 35, 3, 10) ise her iki kütüphanede de belirlenerek meme bezi dokusunda aday miRNA olarak belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada, laktasyonun pik düzeyinde (doğumdan 48±2 gün sonra) Alpin ırkı keçilerde protein kodlayan gen bölgesinde 263 prekursor miRNA tespit etmiştir. Toplamda 46 adet miRNA kümesi belirlenen çalışmada; 114 prekursor miRNA'nın süt verim ve kompozisyonuna ilişkin kantitatif özellik lokusunda (QTL) lokalize olduğu görülmüştür (Mobucho vd., 2015). Guanrong ırkı keçilerde yapılan bir çalışmada; kolostrum ve laktasyonun pik seviyesinde sütte 131 miRNA (57 bilinen + 74 yeni miRNA) tespit edilmiştir (Hou vd., 2017). Belirlenen miRNA'ların 86 adeti kolostrumda down-regüle olurken; 45 adetinin up-regüle olduğu görülmüştür. Rastgele seçilen 10 adet miRNA'nın doğrulaması RT-qPCR'da yapılırken; miRNA hedef gen ağına göre bta-miR-574'ün *LEPR* geni aracılığıyla meme bezi gelişimi ve laktasyon üzerine etki gösterebileceği bildirilmiştir.

miRNA'ların sirkülasyonda, çeşitli doku ve vücut sıvılarında varlıklarının ve ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinin yanı sıra tespit edilen miRNA'ların hedefledikleri genler ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda; Lin ve arkadaşlarının (2013a) araştırmasında; keçilerde laktasyonun orta döneminde yüksek düzeyde eksprese olan 30 farklı miRNA tespit edilerek; bunlardan miR-103'ün meme dokusu epitel hücrelerinde süt yağ sentezi ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu arttırarak, trigliserid birikimine sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı yazarın Saanen ırkı keçilerde gerçekleştirdiği bir başka çalışmada ise; miR-27a'nın over ekspresyonunun trigliserid birikimini down-regüle ettiği ve meme bezi epitel hücrelerinde doymuş/doymamış yağ asidi oranını düşüğü

tespit edilmiştir (Lin vd., 2013b). Elde edilen bulgulara göre; miR-27a'nın keçi meme bezi epitellerinde trigliserid sentezini düzenlediği sonucuna varılmıştır. Bir diğer araştırma verilerine göre, miR-26 ailesinin (miR-26a, miR-26b) ve host/konakçı genlerin down-regüle olması durumunda insulin-induced gene-1 (*INSIG1*) geninin ekspresyonunun azaldığı böylelikle miR-26a/b'nin keçi meme epitel hücrelerinde süt yağ sentezinin kontrol ettiği sonucuna varılmıştır (Wang vd., 2016). Li ve arkadaşlarının (2017), yaptığı çalışmada sütçü keçilerin meme bezi dokusunda laktasyonun pik seviyesinde up-regüle olan miR-2478'in hedef geni ve etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada; miRNA-2478'in Transforme edici büyüme faktör beta 1 (*Transforming growth factor beta-1/TGFβ-1*)'i inhibe ederek, meme bezi gelişimine etki ettiği belirlenmiştir. Guanzhong ırkı keçilerde, 5,10-Metilentetrahidrofolat Redüktaz (*5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase/MTHFR*) geninde meydana gelen *MTHFR* 2244 A→G SNP'sinin hsa-miR-1266'nın söz konusu genin 3'UTR bölgesine bağlanma aktivitesini arttırdığı; *MTHFR* 2264 A→G SNP'sinin ise hsa-miR-616'nın bağlanma aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Hou vd., 2015). Elde edilen bulgulara göre, folat metabolizmasında rol oynadığı bilinen *MTHFR* geninde tespit edilen yeni SNP'lerin miRNA'lara etki ederek, süt verimine etkili olabileceği çıkarımı yapılmıştır.

Koyunlarda miRNA: Koyun türünde ise gerek tespit edilen miRNA sayısı gerekse hedef gen ve etki mekanizmasına yönelik çalışmalar oldukça kısıtlı olmakla birlikte genellikle kas gelişimi ve döl verimi konularına yoğunlaşmıştır. Koyunlarda yapılan bir çalışmada 140 adet prekürsor miRNA'dan 172 adet yeni miRNA tespit etmiştir (Barozai vd., 2012). Ayrıca belirlenen miRNA'ların NCBI blastn programı kullanılarak 292 potansiyel hedef geni olduğu bildirilmiştir. Hedef genlerin; transkripsiyon faktörü, sinyalizasyon, metabolizma, transport, büyüme ve gelişim ile yapısal proteinlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Galio ve arkadaşlarının (2013), östrus ve gebeliğin farklı dönemdeki koyunlarda yaptığı çalışmada ise; miR-21, miR-205 ve miR-200'ün meme bezindeki varlığını belirleyerek, miR-205 ve miR-200'ün gebeliğin ikinci yarısında da eksprese olarak bahsedilen miRNA'ların memede epitel gelişimine etki edebileceği ve süt salgılanmasını etkileyebileceği düşünülmüştür.

miRNA'ların stabilitesi: Yapılan bazı çalışmalarda, miRNA'ların stabilitesinin oda ısısında sabit olduğu; tekrarlanan dondurup çözündürme sikluslarına ve asit ortama karşı, eksosom veya mikrovezikül içerisine olmasına bağlı olarak dirençli olduğu bildirilmiştir (Gigli vd., 2013; Hata vd., 2010; Izumi vd., 2012; Zhou vd., 2012). Elde edilen bulgulara göre; bitki kaynaklı bazı miRNA'lar (miRNA168a) insan serumunda tespit edilirken (Zhang vd.,

2012); inek sütü kökenli bazı miRNA'ların ise endüstriyel olarak işlenmiş ürünlerde izole edildiği belirtilmiştir (Izumi vd., 2012). miRNA'ların endüstriyel süreçlere dayanıklı olması ya da türler arası geçiş yapması; miRNA'lar açısından son tüketicinin kim olacağı sorusunu ya da karşı türde bu miRNA'ların epigenetik rolü olabileceği ihtimallerini akla getirmiştir (Gigli vd., 2013). Ayrıca elde edilen sonuçlar, miRNA'ların endüstriyel süreçlere uygun olmasının tıbbi ve biyoteknolojik olarak işlenebilirliğine olanak sağlayacağını düşündürmüştür (Gigli vd., 2013). Öte yandan bir başka çalışmada ise, pastörizasyon ve homojenizasyon sonrası bazı miRNA'ların (miR-200c) miktarının azaldığı, soğuk depolamada ise minör bir kayıp yaşandığı bildirilirken; ısıtma ile herhangi bir kayıp yaşanmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, sütün kompozisyonuna bağlı olarak farklı miRNA'ların stabilizasyonunun farklı olduğu görülmüş ve sütün işlenmesinin önemli ölçüde miRNA kaybına neden olduğu ileri sürülmüştür (Howard vd., 2015). miRNA'ların değişik koşullardaki stabilitesi ile ilgili literatürlerin birbirinden farklılık göstermesi, bu konu ile ilgili daha fazla sayıda ve kapsamlı bilgiye ihtiyaç olduğunu açıkça göstermektedir.

SONUÇ

Süt kalitesinin, içeriğine bağlı olarak geliştirilmesi, hem insan sağlığı hem de karlılık açısından süt üretiminin en önemli hedeflerinden biridir. İçeriğinin geliştirilmesinde çevresel etkenlerin yanı sıra moleküler ve genetik mekanizmaların da anlaşılması gerekmektedir. miRNA'ların meme bezi gelişimi ve laktasyon üzerine olan etkilerine yönelik çalışmalar sıklıkla miRNA'ların tanımlanması üzerinedir. Meme bezi, süt ya da sirkülasyonda tespit edilen miRNA'ların süt verim ve bileşimine olan etkilerine ve laktasyon regülasyonundaki spesifik fonksiyonuna ilişkin bilgiler kısıtlıdır. Bu nedenle, miRNA'ların laktogenez mekanizmalarına olan etkilerinin ortaya konulmasına yönelik moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi, laktasyon süt verim ve içeriği açısından biyomarkörlerin tanımlanmasına; sütün besleyici özelliğinin genetik modifikasyon yoluyla geliştirilmesine imkan sağlayacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alvarez-Garcia, I. & Miska, E.A. (2005).** MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, *132*(21), 4653-62.
- Barozai, M.Y.K. (2012).** The novel 172 sheep (*Ovis aries*) microRNAs and their targets. *Mol Biol Rep*, *39*, 6259-6266.
- Berezikov, E., Guryev, V., Van De Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H. & Cuppen, E. (2005).** Phylogenetic

shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, **120**(1), 21-24.

- Bhaskaran, M. & Mohan, M. (2014).** MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary Pathology*, **51**(4), 759-774.
- Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C.Y. (2010).** Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research*, **20**(10), 1128-1137.
- Cui, Y., Sun, X., Jin, L., Yu, G., Li, Q., Gao, X., Ao, J. & Wang, C. (2017).** MiR-139 suppresses β -casein synthesis and proliferation in bovine mammary epithelial cells by targeting the GHR and IGF1R signaling pathways. *BMC Veterinary Research*, **13**(1), 350.
- Do, D.N. & Ibeagha-Awemu, E.M. (2012).** Non-coding RNA roles in ruminant mammary gland development and lactation, current topics in Lactation Isabel Gigli, *IntechOpen*, doi: 10.5772/67194. (Available from: <https://www.intechopen.com/books/current-topics-in-lactation/non-coding-rna-roles-in-ruminant-mammary-gland-development-and-lactation>).
- Do, D.N., Li, R., Dudemaine, P.L. & Ibeagha-Awemu, E.M. (2017).** MicroRNA roles in signalling during lactation: an insight from differential expression, time course and pathway analyses of deep sequence data. *Scientific Reports*, **7**, 44605.
- Food and Agriculture Organization of United Nation (Faostat):** “Faostat 2016: The fresh goat milk production in worldwide.”, 14 Mayıs 2018 Tarihinde wep'den alındı, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>.
- Galio, L., Droineau S., Yeboah P., Boudiaf H., Bouet S., Truchet S. & Devinoy E. (2013).** MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205, and miR-200. *Physiology Genomics*, **45**(4), 151-161.
- Gigli, I. & Maizon, D.O. (2013).** MicroRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. *Genetics and Molecular Biology*, **36**(4), 465-474.
- Gu, Z.L., Eleswarapu, S. & Jiang, H.L. (2007).** Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Letters*, **581**(5), 981-988.
- Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T. & Aoki, N. (2010).** Isolation of bovine milk-derived micro vesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**, 528-533.
- Hou, J., An, X., Song, Y., Gao, T., Lei, Y. & Cao, B. (2015).** Two mutations in the caprine MTHFR 3'UTR regulated by MicroRNAs are associated with milk production traits. *PLoS One*, **7**, e0133015.
- Hou, J., An, X., Song, Y., Cao, B., Yang, H., Zhang, Z., Shen, W. & Li Y. (2017).** Detection and comparison of microRNAs in the caprine mammary gland tissues of colostrum and common milk stages. *BMC Genetics*, **18**(1), 38.
- Howard, K.M., Jatki Kusuma, R., Baier, S.R., Friemel, T., Markham, L., Vanamala, J. & Zempleni, J. (2015).** Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(2), 588-592.
- Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T. & Takase, M. (2012).** Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, **95**, 4831-4841.
- Jabed, A., Wagner, S., Mccracken, J., Wells, D.N. & Laible, G. (2012).** Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk. In proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **109**(42):16811-16816. doi:10.1073/pnas.1210057109.
- Ji, Z., Wang, G., Xie, Z., Zhang, C. & Wang, J. (2012).** Identification and characterization of microRNA in the dairy goat (*Capra hircus*) mammary gland by Solexa deep-sequencing technology. *Molecular Biology Reports*, **39**(10), 9361-9371.
- Ji, Z., Wang, G., Zhang, C., Xie, Z., Liu, Z. & Wang J. (2013).** Identification and function prediction of novel MicroRNAs in Laoshan Dairy Goats. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, **26**(3), 309-315.
- Knight, C.H. & Peaker, M. (1982).** Development of the mammary gland. *Journal of Reproduction and Fertility*, **65**, 521-36.
- Knight, C.H., Peaker, M. & Wilde, C.J. (1998).** Local control of mammary development and function. *Reviews of Reproduction*, **3**, 104-112.
- Le Guillou, S., Marthey, S., Laloë, D., Laubier, J., Mobuchon, L., Leroux, C. & Le Provost F. (2014).** Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes, *PLoS One*, **9**(3), e91938.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Li, H.M., Wang, C.M., Li, Q.Z., Gao, X.J. (2012).** MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell, viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression. *Molecules*, **17**(10), 12037-12048.
- Li, R., Dudemaine, P.L., Zhao, X., Lei, C. & Ibeagha-Awemu, E.M. (2016).** Comparative analysis of the miRNome of bovine milk fat, whey and cells. *PLoS One*, **11**(4), e0154129.
- Li, Z., Lan, X., Guo, W., Sun, J., Huang, Y., Wang, J., Huang, T., Lei, C., Fang, X. & Chen, H., (2012a).** Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and peak lactation mammary gland tissues. *PLoS One*, **7**(12), e52388.
- Li, Z., Lan, X., Han, R., Wang, J., Huang, Y., Sun, J., Guo, W. & Chen H., (2017).** miR-2478 inhibits TGF β 1 expression by targeting the transcriptional activation region downstream of the TGF β 1 promoter in dairy goats. *Scientific Reports*, **7**, 42627.
- Li, Z., Liu, H., Jin, X., Lo, L. & Liu, J. (2012b).** Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*, **13**, 731.

- Lin, X., Luo, J., Zhang, L., Wang, W. & Gou, D. (2013a).** MiR-103 controls milk fat accumulation in Goat (*Capra hircus*) mammary gland during lactation. *PLoS One*, *8*(11), e79258.
- Lin, X.Z., Luo, J., Zhang, L.P., Wang, W., Shi, H.B. & Zhu, J.J. (2013b).** miR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene*, *521*(1):15-23.
- Liu, H.C., Hicks JA., Trakooljul, N. & Zhao, S.H., (2010).** Current knowledge of microRNA characterization in agricultural animals. *Animal Genetics*, *41*(3), 225-231.
- miRBase (2018).** The number of mature and precursor miRNA in ruminants. 30 Nisan 2018 Tarihinde wep'den alınmıştır, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>.
- mirTarbase (2018).** The presence of miRNA according to the species, 30 Nisan 2018 Tarihinde wep'den alınmıştır, <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>.
- Mobuchon, L., Marthey, S., Boussaha, M., Le Guillou, S., Leroux, C. & Le Provost, F. (2015).** Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC Genomics*, *16*, 285.
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M. & Haenlein, G.F.W. (2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1-2), 88-113.
- Peng, J., Zhao, J.S., Shen, Y.F., Mao, H.G. & Xu, N.Y. (2015).** MicroRNA expression profiling of lactating mammary gland in divergent phenotype swine breeds. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 1448-1465.
- Qiang-Zhang, L., Chun-Mei, W. & Xue-Jun, G. (2014).** Role of miRNA in mammary gland development and lactation. *Journal of Northeast Agriculture University*, *21*(1), 70-74.
- Silveri, L.G., Tilly, J.L., Vilotte, J.L. & Provost, F.L. (2006).** MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reproduction Nutrition Development*, *46*(5), 549-556.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. & Kim, Y.Y. (2010).** MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1803*(11), 1231-1243.
- Wang, M., Moisés, S., Khan, M.J., Wang, J., Bu, D. & Loor, J.J. (2012).** MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, *9*, 6529-6535.
- Wang, H., Luo, J., Zhang, T., Tian, H., Ma, Y., Xu, H., Yao, D. & Loor, J.J. (2016).** MicroRNA-26a/b and their host genes synergistically regulate triacylglycerol synthesis by targeting the INSIG1 gene. *RNA Biology*, *13*(5), 500-510.
- Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G., (1993).** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, *75*, 855-862.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. & Diederichs, S. (2009).** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 228-234.
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X. (2012).** Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of crosskingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, *22*, 107-126.
- Zhou, Q., Li M., Wang, X., Li Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X. & Li X., (2012).** Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*, *8*, 118-123.

Received date: 18.04.2018

Accepted date: 12.06.2018

***Corresponding author's:**

Arş. Gör. Dr. Deniz DİNÇEL

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi A Blok Kat:2

Genetik Anabilim Dalı Görükle Kampüsü Nilüfer/BURSA.

E-mail: deniz@uludag.edu.tr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8015-9032>