

Prolaktin Reseptör (PRLR) Gen Ekspresyonunun Süt Kompozisyonuna Etkisi

Abdulkerim Diler¹ ✉ , Tamer Turgut²

¹Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Erzurum

Geliş Tarihi (Received): 20.10.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 09.12.2016

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): akerimd@atauni.edu.tr (A. Diler)*

☎ 0 442 231 58 04 📠 0 442 231 25 03

ÖZ

Süt üretiminde sadece sütün miktarı değil, aynı zamanda kaliteli olması da büyük önem taşır. Süt sığırlarında bazı genler süt performans özellikleri ilgili potansiyel aday gen olarak önerilmektedir. Farklı aday genler arasında, prolaktin reseptör (PRLR) geni laktojenik hormonlardan süt protein gen promotörlerine sinyal iletilmede kritik rolü olmasından dolayı dikkat çekici görülmektedir. Bu çalışmada süt kompozisyonu ile ilişkili olduğu düşünülen prolaktin reseptör (PRLR) gen ekspresyon seviyesinin süt kompozisyonu üzerindeki etkisi Real-Time PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. PRLR gen ekspresyon seviyesi günlük protein verimini istatistiksel olarak önemli derecede ($P<0.01$) etkilemiştir. Süt yağı oranı (%) ise önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Gen ekspresyon seviyeleri diğer süt bileşenlerini etkilememiştir. Sonuç olarak, PRLR gen ekspresyonu protein ve yağ verimini olumlu yönde etkilemiştir. Ancak süt bileşenleri üzerine etkisini daha etkin belirleyebilmek için daha fazla sayıda çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Süt, Süt kompozisyonu, Prolaktin reseptör, RT-PCR

Effects of Prolactin Receptor Gene (PRLR) Expression in Milk Composition

ABSTRACT

In milk production, good milk quality is of great importance as well as milk quantity. In dairy cattle, certain genes are proposed as potential candidates associated with dairy performance traits. Among different candidates, prolactin receptor gene (PRLR) seems to be promising because of its crucial role in transmitting signal from lactogenic hormones to milk protein gene promoters. In this study, the effect of PRLR gene expression levels on milk composition was determined by using the Real-Time PCR method. Daily protein yields were significantly ($P<0.01$) influenced by the expression levels of PRLR genes. Percentages of the milk fat were also significantly affected by expression levels ($P<0.05$). Gene expression levels did not have a significant influence on other milk components. Results of this study suggested that PRLR genes expression had a positive influence on protein and fat yields. However, further studies are needed to clarify the effect of the PRLR gene on other milk components.

Keywords: Milk, Milk composition, Prolactin receptor, RT-PCR

GİRİŞ

Süt canlıların büyümesi ve gelişimi için en önemli besin kaynağıdır. Canlıların tüm yaşamında önemli yeri olan süt, yeterli ve dengeli beslenme için gerekli olan

hayvansal kaynaklı protein, yağ, laktoz ile vitamin ve mineral maddeleri yeterli oranda içermektedir. Süt beslenme değerinin üstünlüğü yanında, vücut fonksiyonlarını düzenleyen, gelişmesini sağlayan, kemik

ve diř oluřumunda önemli rol alan bir gıda maddesidir [1, 2].

Günümüzde süt hem doğrudan tüketilebilen hem de yağ, peynir vb. ürünlere işlenebilen vazgeçilmez bir besin maddesidir. Süt koyun, keçi, manda, deve gibi memeli türlerinden elde edilirse de süt üretiminin birincil kaynağı sığırlar ve özelliklede sütçü sığırlardır. Üretilen sütün sadece miktarı değil, aynı zamanda kaliteli olmasının da büyük önemi vardır. Sütün kalitesini belirleyen temel kriterlerden birisi de sütün içeriğidir. (yağ, protein, laktoz, KM, mineral, vitamin miktar veya oranları). Özellikle sütte protein ve yağ oranları hem beslenmede hem de ürüne işlemede önemli bir yere sahiptir [2,3].

Hızlı bir şekilde artan dünya nüfusu süt ve süt ürünlerine olan talebi artırmıştır. Bu talebi karşılayabilmek amacı ile yetiştiriciler ve bilim adamları birim hayvan başına düşen verim miktarını artırmak amacıyla genetik bakımdan üstün hayvan popülasyonları oluşturabilmek için çeşitli islah çalışmaları yürütmektedirler.

Bu çalışmalarda süt üretimi açısından ilgi çekici genlerden bir tanesi prolaktindir [4]. PRL memelilerde hipofiz bezinden salgılanan ve laktasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde önemli rol oynayan bir hormondur. PRL süt proteinlerinin sentezlenmesi ve salgılanması için meme alveollerini uyarması yanı sıra tüm temel süt bileşenlerinin sentezlenmesinden de sorumludur [5]. Prolaktin reseptör (PRLR) genin ise süt protein promotorleri için sinyal iletmede merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir [6]. Prolaktin hedef hücrelerde PLR reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterir. Bu yapı JAK2 kinazlarının (Janus kinase 2) aktivasyonuna ve daha sonra Süt protein genlerinin hücre içi transkripsiyonunu düzenleyen STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna katkıda bulunur. JAK-STAT sinyal yolağı ekstraselüler kimyasal sinyallerden çekirdeğe bilgi aktarır ve bu mekanizma DNA transkripsiyonu ve ilgili genlerin ekspresyonu ile sonuçlanır [6, 7]. Bu nedenle PRLR geninin süt sığırlarında süt protein ve yağ verimi ile ilişkili önemli bir aday gen olduğu ifade edilmektedir [7, 8].

Süt bileşenleri ile ilgili gen bölgelerindeki polimorfizmler arasındaki ilişkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır [9, 10]. Ancak bu özelliklerle ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri bakımından incelenen çalışma yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada temel süt bileşenlerinin özelliklede protein ve yağın sentezlenmesinden önemli rol oynayan aday gen PRLR'nin mRNA gen ekspresyonu düzeyinin artışına karşı süt kompozisyonunda meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali ve Yemleme

Araştırma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Sığırcılık Şubesi bağlı duraklı kapalı ahırlarda yetiştirilen orta laktasyonda bulunan 18 baş Siyah Alaca süt sığırları

üzerinde gerçekleştirilmiştir. Denemeye alınan hayvanlar benzer rasyonla yemlenmiştir. Hayvan başına ortalama günlük 6 kg süt yemi ve 10 kg mısır slajı verilmiştir. Kuru çayır otu ise *ad-libitum* olarak sunulmuştur.

Örnek Alımı ve Süt Analizleri

Her bir hayvandan Süt örnekleri 100 mL'lik steril kaplara alınmış laboratuvarında somatik hücre izolasyonu yapılarına kadar soğuk zincir korunmuştur. Örnekler birer hafta arayla üç defa sabah sağıma esnasında alınmıştır. Süt örneklerinin Süt kompozisyonu (yağ, yağsız kuru madde, laktoz, protein, yoğunluk ve kül) analizleri süt analiz cihazı (Lactoscan MMC, Boeckel Co, Hamburg, Almanya) ile yapılmıştır. Yağ ve protein verimleri örneklerin alındığı günlerin toplam süt verimleri ortalamasının yüzdesi alınarak hesaplanmıştır (Ortalama günlük toplam süt verimi (kg) * % oran).

Somatik Hücre İzolasyonu

Somatik hücre izolasyonu; her bir örnekten 10 mL alınarak 4°C'de 1500g'de 30 dakika santrifüj edildi. Üstte biriken yağ tabakası alınıp, süpernatant kısmı atıldı ve geriye kalan hücre peleti 5 mL soğuk PBS (phosphate buffered saline, pH 7.5) ile yeniden süspansedildi. Elde edilen süspansed 15 dakika 460g'de 4°C'de santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı [11].

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Somatik hücreden toplam mRNA izolasyonu High Pure RNA Isolation kit (Roche, Almanya) ile üretici firma protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Saf RNA konsantrasyonları spectrophotometry (Nanodrop) ile belirlenmiştir. Saf RNA için OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı >1.8 olan örnekler cDNA sentezinde kullanıldı. cDNA sentezi, Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya) ile üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar daha sonra kullanılarına kadar -20°C'de saklandı.

Primer Dizaynı Real-Time PCR

Primerler PRL ve GAPDH sekansları kullanılarak Primer3software (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) programında dizayn edildi. mRNA dizilerinin doğruluğunu tespit için BLAST yapıldı. PRLR (GeneBank accession number NM_174155.3) forward 5'-TATCACAGCCTTCTCGCCTT-3' ve reverse 5'-TTTCCAGAGCTCGCAGAAGT-3', GAPDH (GeneBank accession number XM_015462071.1) forward 5'-AGGAGCACGAGAGGAAGAGTT-3' ve reverse 5'-TCAGGGCCTTAGAGATGGAA-3' Primer sekansları kullanılmıştır.

Real-Time PCR

Gen ekspresyonu Stratagene MxPro3000 marka Real-Time PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi; 2.5 µL cDNA, 1.5 µL forward ve reverse primer, 12.5 µL SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) ve 7 µL PCR-

grade water eklenerek her bir reaksiyon için toplam hacim 25 µL olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR programı; AmpErase UNG enziminin aktivasyonu için 50°C'de 2 dakika, AmpliTaq Gold DNA polymerase enziminin aktivasyonu için 95°C'de 10 dakikayı takiben 45 döngü 95°C'de 15 saniye denatürasyon ve 60°C'de 1 dakika bağlanma ve uzama şeklinde yapılmıştır. Çoğaltılan cDNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığının tespiti için erime eğrisi analizi (melting curve) yapılmıştır.

Real-Time PCR verileri, hedef genin ekspresyonundaki değişimin belirlendiği efficiency ($e^{-\Delta\Delta Ct}$) [12] metoduna göre analiz edilmiştir. Amlifikasyon etkinliği (e) $e = 10^{(-1/\text{slope})}$ formülüne göre hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Araştırmada incelenen özellikler ile ilgili olarak elde edilen veriler SPSS-20.0 paket programında varyans analizi yapılmış, önemli olan ortalamalar arasındaki önemlilik Duncan testi kullanılarak analiz edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada incelenen inek sütü örneklerinin PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyelerine göre Süt kompozisyonu değerleri ve önemlilik durumu Tablo 1'de verilmiştir. Araştırmada elde edilen süt kompozisyonu ortalamaları yağsız kuru madde %9.07, yoğunluk %28.19, süt yağı %3.57, yağ verimi 0.24 (kg), protein %3.05, protein verimi 0.21 (kg), laktoz %4.32 ve kül %0.76 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyelerine göre süt kompozisyonundaki değişim
PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyeleri

Varyasyon Kaynakları	Düşük		Orta		Yüksek		Önemlilik
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=6)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=7)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=7)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=5)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=5)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$ (n=5)	
Yağsız KM (%)	9.16	0.07	9.08	0.07	8.97	0.10	ÖS
Yoğunluk (%)	28.39	0.26	28.18	0.26	28.02	0.37	ÖS
Süt Yağı (%)	3.91	0.14 ^a	3.71	0.14 ^a	3.10	0.20 ^b	*
Süt Yağı Verimi (kg)	0.23	0.01	0.24	0.01	0.25	0.02	OS
Protein (%)	3.08	0.02	3.05	0.03	3.01	0.04	ÖS
Protein Verimi (kg)	0.19	0.01 ^a	0.20	0.01 ^a	0.25	0.01 ^b	**
Laktoz (%)	4.37	0.04	4.33	0.04	4.27	0.05	ÖS
Kül (%)	0.77	0.01	0.76	0.01	0.75	0.01	ÖS

*: P<0,05; **: P<0,01, ÖS: Önemsiz

Elde edilen sonuçlara göre örneklerin süt komponentleri bakımından yağsız kuru madde, yoğunluk, yağ verimi, protein, laktoz ve kül içerikleri PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyesinden etkilenmediği ve düzeyler aradaki farklılıkların önemsiz olduğu bulunmuştur.

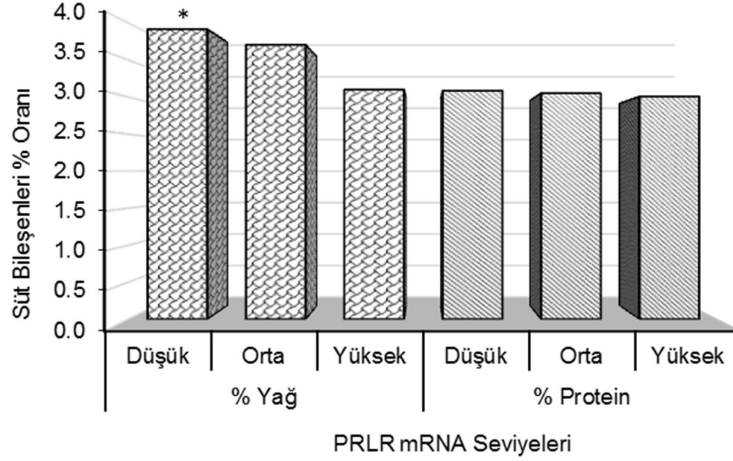
Süt kompozisyonu incelendiğinde gen ekspresyon düzeyi arttıkça % yağ oranında bir düşüş olduğu ve farklılıkların istatistiksel olarak önemli (P<0.05) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). % yağ oranındaki bu düşüş PRL ve PRLR gen ekspresyonuna bağlı olarak süt verimindeki artışla beraber oransal olarak bir düşüş olduğu ifade edilebilir. Ancak istatistiksel olarak önemsiz olmasına rağmen günlük yağ veriminde bir artışın olduğu görülmektedir (Şekil 2).

Gen ekspresyon seviyesi yüzde protein oranını etkilememiştir (Şekil 1). Ancak günlük protein verimini önemli (P<0.01) derecede etkilemiştir (Şekil 2). Gen ekspresyon seviyesi arttıkça protein veriminde artışın olduğu ve bu artışın PRLR gen ekspresyonunun en fazla olduğu yüksek seviyede tespit edilmiştir (Şekil 2). PRL ve PRLR gen ekspresyon miktarı hem süt verimini hem de protein verimi olumlu yönde etkilediği söylenebilir.

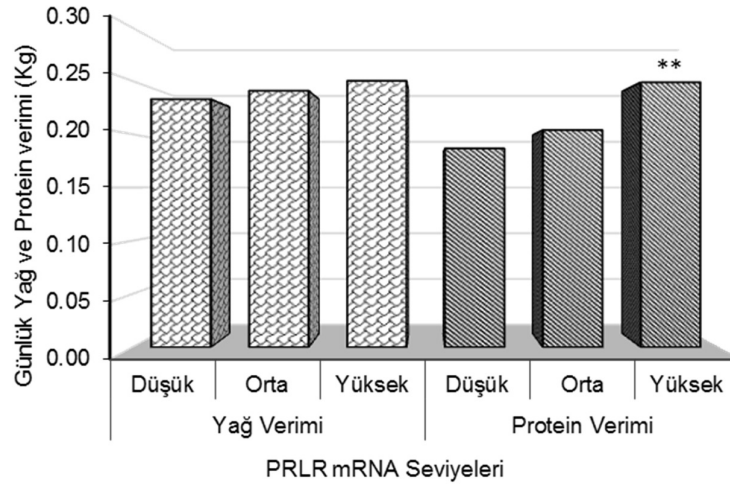
Yapılan çalışmalar arasında Viitala ve ark. [13] PRLR geninin süt protein ve yağ verimini belirgin bir şekilde etkilediğini belirtmiştir. Benzer şekilde Blott ve ark. [14] ve Javed ve ark. [15] PRLR genini süt protein ve yağ verimi ile ilişkili olduğunu açıkça ifade etmiştir. Brym ve ark. [6] ise PRLR genini daha yüksek protein verimine neden olduğunu tespit etmiştir. Elde edilen bulgular süt protein verimi bakımından bu çalışmalar ile uyum içerisindedir.

Wang ve ark. [16] yapmış olduğu çalışmada PRL ekspresyon seviyesinin sütte beta-kazein, trigliserid ve laktoz salgısını artırdığını bildirmiştir. Diğer taraftan Hou ve ark. [17] PRLR geni Meme bezi gelişimini, süt salgısının artmasını ve süt proteinlerinin gen ekspresyonu düzenleyici bir rol oynadığını ifade etmiştir.

Meme dokusunda süütün önemli komponentlerinden süt proteinleri, laktoz ve lipid sentezinden esas sorumlu olan hormon PRL dir [17]. Çok fonksiyonlu hormon olan PRL çeşitli fonksiyon ve çok karmaşık olayları düzenlemektedir. Bu karmaşık işlemlerini reseptörleri ile yaptığı açıktır [8]. Bu yüzden PRLR süt verim ve bileşenlerinin takibi bakımından önemli bir yere sahiptir.



Şekil 1. PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyelerine göre % yağ ve % protein oranındaki değişim. * P< 0.05



Şekil 2. PRLR mRNA gen ekspresyonu seviyelerine göre günlük (kg) yağ ve protein verimindeki (kg) değişim **P< 0.01

SONUÇ

Bu çalışmada mRNA süt somatik hücresinden izole edilerek Real-Time PCR ile PRLR gen ekspresyonu belirlenmiştir. PRLR gen ekspresyonu ile günlük protein verimi arasında istatistiksel olarak önemli derecede ilişki olduğu tespit edilmiştir. Günlük yağ verimini ise pozitif etki yaptığı görülmüştür.

Süt sığırlarında PRLR geni süt bileşenlerini etkileme potansiyeline sahiptir. Bu yüzden genetik bakımdan üstün hayvan popülasyonları oluşturabilmek için yapılan ıslah çalışmalarında üstün verimli ve kaliteli süt üreten hayvanların genetik kapasitelerinin tahmin edilmesinde yararlı bir genetik marker durumundadır. Süt üreticileri için bu gen ekonomik olarak önemli fenotipik özelliklere sahip hayvanların seçiminde, seleksiyon programlarının etkin bir şekilde kullanımı, kaliteli süt eldesi ve kaliteli sütünde ürüne işlenmesi bakımından önemli bir yere sahiptir.

Elde edilen sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi için süt kalitesini etkileyen ilgili gen bölgelerinin tespiti ve ilişkilerinin incelendiği çalışmaların artırılması ve özellikle gen ekspresyon alanındaki çalışmalar açısından var olan boşluğun doldurulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Fagundes, H., Pompeu, L.B., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., 2011. Microbiological analysis and somatic cell counts in raw milk from farms of So Paulo State, Brazil. *African Journal of Microbiology Research* 5(21): 3542-3545.
- [2] Diler, A., Baran, A., 2014. Erzurum'un Hınıs ilçesi çevresindeki küçük ölçekli işletme tank sütlerinden alınan çiğ süt örneklerinin bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Alın Teri Zirai Bilimler Dergisi* 26(1): 18-24.
- [3] Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2010. Süt serum proteinleri ve türevlerinin

- biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda* (1): 23-31.
- [4] Özdemir, M., Dođru, Ü., 2008. Sığırların verim özellikleri üzerine etkili önemli moleküler markörler. *Journal of the Faculty of Agriculture* 39(1).
- [5] Şahin, Ş., Öner, Y., Elmacı, C., 2013. Esmer ve Siyah Alaca ırkı sığırlarda bazı ekonomik özellikler ile ilişkili gen bölgelerinin PCR-RFLP tekniği ile incelenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 19: 235-244.
- [6] Brym, P., Kaminski, S., Wojcik, E., 2005. Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene [PRLR]. *Animal Science Papers and Reports* 23(1): 61-66.
- [7] Deepika, Salar, R.K., 2014. Polymorphism studies of Prolactin Receptor (PRLR) gene in Indigenous Grey Cattle breeds of India. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences* 5(1): 314-321.
- [8] Zhang, J., Zan, L., Fang, P., Zhang, F., Shen, G., Tian, W., 2008. Genetic variation of PRLR gene and association with milk performance traits in dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 88(1): 33-39.
- [9] Lewin, H.A., Schmitt, K., Hubert, R., van Eijk, M.J., Arnheim, N., 1992. Close linkage between bovine prolactin and BoLA-DRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. *Genomics*, 13(1): 44-48.
- [10] Chung, E.R., Rhim, T.J., Han, S.K., 1996. Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. *Korean Journal of Animal Science* (Korea Republic).
- [11] Sarikaya, H., Prgomet, C., Pfaffl, M.W., Bruckmaier, R.M., 2004. Differentiation of leukocytes in bovine milk. *Milchwissenschaft* 59(11-12): 586-589.
- [12] Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29(9): e45-e45.
- [13] Viitala, S., Szyda, J., Blott, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., Georges, M., Vilkki, J., 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics* 173(4): 2151-2164.
- [14] Blott, S., Kim, J.J., Moio, S., Schmidt-Küntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., Cambisano, N., Ford, C., Grisart, B., Johnson, D., Karim, L., Simon, P., Snell, R., Spelman, R., Wong, J., Vilkki, J., Georges, M., Farnir, F., Coppieters W., 2003. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 163(1): 253-266.
- [15] Javed, R., Gautam, S.K., Vijn, R.K., Tandia, M.S., 2011. Six novel PCR-RFLP loci in milk quality candidate genes in *Bubalus bubalis*. *International Journal of Livestock Production* 2(6): 79-83.
- [16] Wang, Z., Hou, X., Qu, B., Wang, J., Gao, X., Li, Q., 2014. Pten regulates development and lactation in the mammary glands of dairy cows. *PLoS one* 9(7): e102118.
- [17] Hou, J.X., An, X.P., Song, Y.X., Wang, J.G., Ma, T., Han, P., Fang, F., Cao, B.Y., 2013. Combined effects of four SNPs within goat PRLR gene on milk production traits. *Gene* 529(2): 276-281.
-
-