

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ MELEZ KOYUN IRKLARINDA PRİON
GENİ ANALİZİ

Tıbbi Biyolog İlker GÖNÜLALP

FBE Biyoloji Anabilim Dalında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Cemal ÜN

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
SİMGE LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. PRİON PROTEİNLERİ.....	3
2.1 Prionlar.....	3
2.2 Sadece Protein Hipotezi	4
2.3 PrP ^C Hücre Biyolojisi	6
2.3.1 PrP ^C ,nin fonksiyonu	6
2.3.2 PrP ^{Sc} ,nin yapısı ve biyosentezi.....	7
2.3.3 PrP ^{Sc} ,nin hücre içi lokalizasyonu ve dolaşımı	9
2.4 PrP ^{Sc} Hücre Biyolojisi ve Çoğalımı.....	10
2.4.1 PrP ^{Sc} ,nin PrP ^C ,ye dönüşümü.....	11
2.4.2 PrP ^{Sc} ,nin birikimi	13
3. PRİON HASTALIKLARI	15
3.1 Koyunlarda Prion Hastalıkları.....	16
3.1.1 Scrapie.....	16
3.1.2 Nor98	20
3.2 Sığırlarda Prion Hastalıkları.....	21
3.2.1 BSE	21
3.3 İnsanlarda Prion Hastalıkları	24
3.3.1 Kuru	24
3.3.2 Creutzfeldt-Jakob (CJD) Hastalığı	25
3.3.3 Gertsmann-Straussler-Scheinker (GSS) Hastalığı.....	28
3.4 Diğer Canlılarda Prion Hastalıkları	29
3.4.1 CWD	29

4.	PrP GENİ	350
4.1	Koyun Prion Geni	30
4.2	İnsan Prion Geni	32
4.3	Sığır Prion Geni	33
5.	MATERYAL METOD	35
5.1	Hayvan Materyali	35
5.2	Kimyasallar	36
5.3	DNA İzolasyonu	37
5.4	PCR İşlemi	37
5.5	Sekanslama	39
5.6	Sekansların Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi	40
6.	SONUÇLAR	41
6.1	Allel Frekansları	41
6.2	Genotip Frekansları	42
6.3	Ek Polimorfizmler	44
6.4	Nor98 Genotip Frekansı ve Polimorfizmler	45
7.	TARTIŞMA	47
7.1	Yerli Irkların Önemi ve Dünya'da Scrapie Çalışmaları	47
7.2	Allel Frekansları	48
7.3	Genotip Frekansları	49
7.4	Ek Polimorfizmler	51
	KAYNAKLAR	52
	ÖZGEÇMİŞ	77

KISALTIMA LİSTESİ

BASE	Sığır Amiloditik Süngerimsi Ensefalopati (Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy)
BSE	Sığır Süngerimsi Ensefalopati (Bovine Spongiform Encephalopathy)
CJD	Creutzfeldt Jakob Hastalığı (Creutzfeldt Jakob Disease)
CWD	Kronik Atık Hastalığı (Chronic Waste Disease)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat (Deoxyribonucleotide triphosphate)
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EEG	Elektroensefalogram
FFI	Ölümcül Ailesel Uyku Hastalığı (Fatal Familial Insomnia)
GPI	Glikozil Fosfatidilinositol (Glycosylphosphatidylinositol)
GSS	Gertsmann Straussler Sendromu (Gertsmann Straussler Syndrome)
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MR	Manyetik Rezonans
NaOH	Sodyum Hidroksit
ORF	Açık Okuma Bölgesi (Open Reading Frame)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PI	Fosfatidilinositol (Phosphatidylinositol)
PrP ^C	Hücre Prion Proteini (Cellular Prion Protein)
PrP ^{Sc}	Hastalık Yapıcı Prion Proteini (Scrapie Prion Protein)
RFLP	Kesim Fragment Uzunluğu Polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDS	Sodyum Dodesilsülfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
Sip	Scrapie İnkübasyon Süresi Geni (Scrapie Incubation Period)
TSE	Bulaşıcı Süngerimsi Ensefalopati (Transmissible Spongiform Encephalopathy)
UV	Ultraviyole

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
μ	mikro
μl	mikrolitre
μmol	mikromol
U	Ünite
mg	miligram
ml	mililitre
%	Yüzde oranı
kDA	kilo Dalton

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Memeli PrP geninin primer translasyon ürünü ve olgun proteinin yapısı.....	7
Şekil 2.2	PrP ^C biyosentezindeki adımlar.....	8
Şekil 2.3	PrP molekülünün hücresel dolaşımı ve kesilimi	10
Şekil 2.4	Normal PrP molekülü (PrP ^C) ve hastalığa yol açan değişmiş PrP molekülü (PrP ^{Sc}).....	12
Şekil 2.5	PrP ^C molekülünün PrP ^{Sc} 'ye konformasyonel dönüşüm modelleri	14
Şekil 3.1	Scrapie koyunlar ve scrapie ile enfekte olmuş beyinde vakuolizasyon	18
Şekil 3.2	İnsan beyinde klasik CJD sonucu oluşan spongiform görünüm.....	26
Şekil 4.1	Koyun PrP geni (ovPrP) ve amino asit dizilimi.....	31
Şekil 4.2	Koyun PrP geninde görülen polimorfizmler	32
Şekil 4.3	İnsan <i>Prnp</i> geninde hastalık oluşturduğu tespit edilmiş ya da şüphelenen mutasyonlar ve polimorfik değişimler	33
Şekil 4.4	Sığır PrP geni üzerinde meydana gelen insersiyon ve delesyonlar ve bu polimorfizmler sonucu etkilenen transkripsiyon faktörleri	34
Şekil 5.1	PCR işlemi ile çoğaltılmış ovPrP geni agaroz jel elektroforezi	39

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	Prion hastalıklarının görüldüğü diğer hayvan türleri	16
Çizelge 3.2	Bildirilmiş BSE vakaları	22
Çizelge 3.3	Klasik CJD ile vCJD arasındaki klinik ve patolojik farklılıklar	27
Çizelge 5.1	Çalışma sırasında kullanılan kimyasal listesi	36
Çizelge 6.1	Melez ırkların dünyada en sık görülen allel frekanslarına göre frekansları	41
Çizelge 6.2	Melez ırklarda kodonlara göre allellerin yüzdesel dağılımı	42
Çizelge 6.3	Melez ırklardaki PrP genotip frekansları dağılım tablosu	43
Çizelge 6.4	Polimorfizmlerin melez ırklar ve genotiplere göre dağılım sayıları	45
Çizelge 7.1	Çalışmamızda yer alan melez ırkların ana ırklarının scrapie açısından duyarlılıkları için yapılan çalışmalar ve sonuçları	50

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yapmış olduğu değerlendirmeleri ile beni yönlendiren, yardım eden ve beni destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Cemal ÜN'e;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını ve her türlü desteği sağlayan İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Kemal ÖZTABAK'a;

Deneysel çalışmalarında bilgisi ve yardımseverliğiyle bana destek veren değerli çalışma arkadaşlarım Bandırma Araştırma Enstitüsü'nden Yalçın YAMAN ve İ.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. İraz AKIŞ'a;

Tez jürimde yer alma nezaketini gösteren ve çalışmama katkılarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet MENGİ ve Yrd. Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR'e;

Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü başkanı Prof. Dr. Nezhun GÖREN'e bana sağladığı bölüm olanaklarından dolayı;

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tezimin hazırlanma aşamasındaki bu zorlu süreçte de ilgi ve desteklerini yanımda hissettiğim sevgili dostlarım ve sınıf arkadaşlarıma;

Tüm hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek beni bugünlere getiren biricik annem Safiye GÖNÜLALP ve babam Hasan GÖNÜLALP'a;

Ve buraya isimlerini yazamasamda hayatımın her anında bana inanan ve destek veren tüm herkese;

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2008

İlker GÖNÜLALP

TÜRKİYE'DEKİ MELEZ KOYUN IRKLARINDA PRİON GENİ ANALİZİ

ÖZET

Scrapie koyun ve keçilerde görülen merkez sinir sistemine ait hücrelerin prion moleküllerini etkileyerek ölümle sonuçlanan bir bulaşıcı süngerimsi ensefalopati hastalığıdır. Hastalığın bulaşıcı olması ve hastalık etkeninin birçok dezenfektana dirençli olması engellenmesinin güç olmasına neden olmaktadır. Koyunda PrP genindeki polimorfizmler hayvanın hastalığa olan duyarlılığını belirler. Bu amaçla Avrupa Birliği Avrupa koyun ırkları için genotipleme ve seçici üreticilik programları oluşturmuştur. Türkiye'deki koyun ırkları için genotipleme çalışmaları ise yetersiz kalmıştır.

Bu tezin amacı Türkiye'de bulunan ve Türk ırklarıyla yabancı ırkların melezlenmesiyle daha birçok iyi özelliği bünyesinde barındırması amaçlanan Siyah başlı Alman-Kıvırcık, Hampshire-Merinos ve Rambouillet-Dağlıç melezlerinin değerlendirilmesi ve risk gruplarının bulunmasıdır. Bu amaçla bu melez ırkların genotipleri PCR ve sekanslama ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda bulunan polimorfik alleller ARR, ARQ, ARK, ARL, TRR, TRQ, VRR ve 9 genotip ARR/ARR, ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/TRQ, ARQ/ARL, ARR/VRR, ARR/TRR, ARK/ARK ve ARL/ARL'dur. Ayrıca PrP geni üzerinde M112T, K113N, A116E, A116D, M173V, S173N ve V179E ek polimorfizmleri bulunmuştur. Elde edilen veriler melez ırkların yüksek değişkenlikte ve dirençlilik açısından 1. ve 2. risk grubuna (dirençli) dahil olduğunu göstermiştir. Bu çalışma araştırılan koyunların klaisk scrapieye dayanıklılığının %100 düzeyde olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Scrapie, PrP geni, bulaşıcı süngerimsi ensefalopati, prion, Türk koyun ırkları, genotip, sekanslama, PCR, polimorfizm, Kıvırcık, Merinos, Ramlıç, melez ırk.

PRION GENE ANALYSIS OF THE TURKISH CROSBREDS

ABSTRACT

Scrapie is an infectious spongiform encephalopathy fatal disease of sheep and goat that effects the prions of cells of central nervous system. It's an hard to stop the outspread because the infectious agent is contagious and resistant to many disinfectant. Polymorphism in the PrP gene of the sheep related to scrapie susceptibility. Selection programmes of European sheep breeds for scrapie based on PrR genotypes are available and supported by European Union. So far these genotyping data for Turkish sheep breeds are insufficient.

The aim of the thesis was the genotyping of PrP gene in crossbreds of Turkish native breeds and foreign breeds- Black headed German-Kivircik, Hampshire-Merinos and Rambouillet-Daglic and find out their risk groups. Therefore these crossbreds genotyped by means of PCR and direct sequencing in this thesis.

The polymorphic alleles were ARR, ARQ, ARK, ARL, TRR, TRQ, VRR and 9 genotypes were ARR/ARR, ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/TRQ, ARQ/ARL, ARR/VRR, ARR/TRR, ARK/ARK and ARL/ARL. Also 7 different additional polimorphism were identified on PrP gene M112T, K113N, A116E, A116D, M173V, S173N and V179E. According to our PrP genotype analysis data the crossbreds are high variable and most of the genotypes belong to risk group 1 and 2 for their resistance of scrapie. The investigated breeds found to be not 100% resistant against classical scrapie.

Keywords: Scrapie, PrP gene, transmissible spongiform encephalopathy, prion, native Turkish sheep breeds, genotype, sequencing, PCR, polymorphism, Kivircik, Merinos, Ramliç, crossbred

1. GİRİŞ

PrP geni insan, koyun, keçi, sığır ve birçok memeli canlıda korunmuş; özellikle merkezi sinir sistemi nöron ve destek hücrelerinde olmak üzere birçok dokuda (lenf sistemi, lökositler ve periferik hücreler) sentezlenen ve hücre membranı yüzeyinde hücre tanınması ve adezyon, ligand alınımı ve transmembran sinyalizasyonda görev alan prion molekülünü kodlar. Bu moleküle prion ismi, İngilizce “proteinaceous infectious particle” yani protein tipinde enfeksiyonel partikül kelimesinin kısaltılması olarak verilmiştir. PrP geninde meydana gelen değişimler koyun ve keçide scrapie ve Nor98, sığırdaki BSE ve insanda Creutzfeldt-Jakob (CJD), Fatal Familial Insomnia (Ölümcul Ailesel Uykusuzluk) ve Gertsman-Straussler-Schinker (GSS) gibi hastalıklara neden olurlar.

Scrapie, koyunlarda 17. yüzyıldan beri bilinen bir bulaşıcı spongiform ensefalopati ya da prion hastalığıdır. Hastalık nedeni, hücrede normal şekilde bulunan prion (PrP^{Cell} - PrP^{C}) moleküllerinin hastalık yapıcı ve proteaza dirençli başka bir PrP izoformuyla ($\text{PrP}^{\text{Scrapie}}$ - PrP^{Sc}) etkileşmesi sonucunda merkezi sinir sistemine ait sinir hücrelerinde bu hastalık yapan formun birikmesidir. Hastalık çoğunlukla uzun bir inkübasyon süresi (1–3 yıl) sonunda hayvanın hareketlerinde değişiklikler/bozukluklar ve psikolojisinde değişiklikler şeklinde belirtiler gösterir; belirtilerin ortaya çıkmasının ardından 3–5 aylık dönem sonunda ölüm gerçekleşmektedir.

Koyunlarda scrapie hastalığının görülmesi ve inkübasyon süresinin uzunluğu hayvanın PrP genindeki polimorfizmlerle ilgilidir; 136. [Alanin (A) ya da valin (V)], 154. [Arginin(R) ya da histidin (H)] ve 171. [R, H ya da glutamin (Q)] kodonlardaki polimorfizmler hayvanın scrapie için duyarlı ya da dirençli olmasını yüksek oranda belirler (Goldmann vd., 1994; Belt vd., 1995; Hunter vd., 1996). ARR/ARR homozigot genotipi en yüksek oranda dirençlilik gösterirken, VRQ/VRQ ise en yüksek scrapie duyarlılığına sahip genotiptir. ARQ genotipi doğada görülen wild tipte alleldir (Elsen vd., 1999).

Avrupa’da Norveç, İtalya, Avusturya, İngiltere, Fransa, Almanya, İrlanda, İspanya, Portekiz, Yunanistan, Slovakya ve Estonya gibi birçok ülke kendi koyun türleri için genotip belirleme çalışmaları yapmış, Avrupa Birliği tarafından ortadan kaldırılmak istenen scrapieye dirençliliği sağlamak üzere seçici üreticilik programı geliştirmiş ve uygulamaktadır. Birçok koyun türüne sahip olan ülkemizde yakın zamanda Ün vd.’nin (2007) çalışması dışında yerel koyun ırklarında scrapie dirençlilik allellerinin araştırılması için bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamızda yabancı ırkların özelliklerinin Türk ırklarıyla birleştirilerek çevre koşullarına daha dayanıklı ve et açısından daha verimli ırklar elde edilmesi amaçlanmış melez ırklar kullanılmıştır. Scrapieye olan dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla hastalık taşımayan Ramlıç (n=45), Siyah başlı Alman - Kıvırcık (n=43) ve Hampshire - Merinos (n=45) melez ırklarına ait koyunlarda 149 kan örneği alınarak DNA izolasyonunun ardından PCR ve direkt sekanslamayla genotipler elde edilmiştir.

2. PRİON PROTEİNLERİ

2.1 Prionlar

Son 30 yılda yapılan çalışmalar, özellikle bir protein molekülünü bilinen enfeksiyöz etkenler olan bakteriler ve virüsler dışında yeni bir hastalık yapıcı etken olarak ortaya koymuştur. Proteinin keçi ve koyunlarda oluşturduğu hastalıkların 17. yüzyıldan itibaren (Parry ve Oppenheimer, 1983) bilinmesine rağmen **Prion** (proteinaceous infectious particle - PrP) (Prusiner, 1982) adını alarak çalışılması ancak 20. yy'da gerçekleşmiştir.

Normal prionlar, 27–30 kDA (türlerine göre 30–35 kDA) ağırlığında, geniş bir α heliks ve kısa bir β yaprak yapısında olan ve hücre membranının dış yüzeyine bir glikofosfatidilinositol (GPI) aracılığıyla bağlanan glikoproteinlerdir (Prusiner, 1982; McKinley vd., 1983, Hope, 2000). Hastalığa neden olan prionlarsa benzer ağırlıkta, daha kısa bir α heliks ve daha çok β yaprak yapısına sahip, proteazlara direçli glikoproteinlerdir. PrP^{Sc} 'ler hücre içinde bulunduklarında, PrP^C 'lerin sentezi sırasında şablon görevi görerek hastalığa neden olan forma dönüşmelerine neden olurlar (Prusiner vd., 1998; Hope, 2000; Hopp vd., 2001). Hücre içinde oluşan PrP^{Sc} 'ler hücre dışında birikerek TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathies–Bulaşıcı Süngerimsi Ensefalopatiler) ya da Prion Hastalıkları adı verilen nörodejeneratif merkezi sinir sistemi hastalıklarını oluştururlar (Prusiner vd., 1998; Hope, 2000; Hopp vd., 2001).

Hayvanlarda görülen prion hastalıklarından koyun ve keçilerde scrapie, sığırlarda görülen BSE (Bovine Spongiform Encephalopathies), mule geyik ve elklerde CWD (chronic wasting disease), mink ve kedigil bulaşıcı süngerimsi ensefalopatiler en önemlileridir (Hope, 2000, Castilla vd., 2005; Goldmann vd., 2005; Ronzon vd., 2006). Son dönemde bulunan ve sporadik olgular olan koyunda Nor 98 ve sığırlarda BASE gibi hastalıklarda bulunmaktadır (Benestad vd., 2003; Casalone vd., 2004; Watts vd., 2006). İnsanlarda bilinen prion hastalıkları ise Gerstman-Sträussler-Schinker Sendromu (GSS), sporadik ve ailesel ölümcül uykusuzluk hastalığı (FFI – Fatal Familial Insomnia), Kuru ve sporadik, ailesel, iatrojenik formu bulunan ve son olarak ortaya çıkan değişken Creutzfeldt-Jakob Hastalığı' (sCJD, fCJD, iCJD, vCJD) dır (Gajdusek, 1977; Castilla vd., 2005; Goldmann vd., 2005).

PrP^{Sc} 'nin inkübasyon süresi aylardan 5–10 yıla kadar sürebildiği gibi bütün GSS ve FFI vakaları ile CJD vakalarının % 10'u kalıtsal olarak aktarılmaktadır. Bu tür hastalıklar genetik kökene sahip olsalarda hastalığın organ nakli, kan transfüzyonu ve diyaliz gibi yöntemlerle başkalarına bulaşma riski bulunmaktadır.

Prion hastalıklarının diğer bakteriyal ya da yavaş virüs hastalıklarıyla, protein katlanma hastalıklarından ayırt edilmesinde hastalığa neden olan PrP^{Sc}'nin birkaç özelliğinin bulunması sayesinde ulaşılmıştır. PrP^{Sc}'nin en önemli özelliği proteazlara, yüksek ısı ve basınca, çeşitli dezenfektanlara (β -propiolaktan, etanol, fenol, çamaşır suyu, aseton, üre, bazı kuvvetli deterjanlar), formaldehite, UV'ye ve iyonize radyasyona dirençlilik (Gordon, 1946; Alper vd., 1966; Alper vd., 1967; Latarjet vd., 1970; Gibbs vd., 1978; Prusiner, 1982; Prusiner, 1998; Brown vd., 2000; Brown vd., 2003).

Prionların çalışılmasıyla prionların genel özellikleri olarak görülebilecek 4 yeni sonuca varılmıştır (Prusiner, 2001; Weissman, 2004), bunlar:

- 1 Prionlar genetik materyal taşımayan enfeksiyöz ajanlardır, bilinen diğer tüm enfeksiyon ajanları genetik materyale sahiptir ve onların kodladığı etkenler ile enfeksiyon gösterme yeteneğindedir.
- 2 Prion hastalıkları, diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi genetik kökenli ya da sporadik mutasyonlar sonucu oluşabilir ancak onların tersine bulaşıcı olabilirler.
- 3 Prionlar nöronlarda hücrede protezalara olan direnci nedeniyle yıkılamadıklarından merkezi sinir sisteminde nöronlarda birikerek hücre ölümüyle nörodejenerasyona yol açarlar (DeArmond ve Bouzamondo, 2002).
- 4 PrP^{Sc}'ler oluşmasına neden olan değişik mutasyonlar nedeniyle değişik konformasyonlara sahip olabileceklerinden farklı hastalık fenotiplerine neden olabilirler (Telling vd., 1996).

2.2 Sadece Protein Hipotezi

Sadece Protein Hipotezi, Stanley Prusiner tarafından “ prionlar nükleik asit taşımayan, protein yapısında bulaşıcı ve PrP^C'nin yapısını değiştirerek enfeksiyona neden olan partiküllerdir ” şeklinde tanımlanmıştır (Prusiner, 1982; Prusiner 1997). Prionlar ve prion hastalıkları üzerinde yapılan çalışmalar, bu hipotezin doğruluğunu kanıtlayan birçok bulguyu göstermiştir:

1. Biyokimyasal ve immünolojik çalışmalar göstermiştir ki PrP^{Sc} ve scrapie enfeksiyonları birbirleriyle örtüşmektedir, bu nedenle hastalığın bulaşıcı etkeni PrP^{Sc} 'dir (Prusiner vd., 1984).

2. PrP^{Sc}'nin aktivitesini azaltacak/ortadan kaldıracak uygulamalar enfeksiyon oluşturma riskini azaltır/ortadan kaldırır (Prusiner vd., 1993).
3. PrP^{Sc}'nin hücrede bulunan miktarı direkt olarak prion miktarlarıyla orantılıdır (Gabizon vd., 1988).
4. PrP^{Sc} dışında hastalığa neden olduğu düşünülebilecek virüs benzeri partiküller ya da bilinmeyen bir genoma ait nükleik asit dizisi bulunmamıştır (Safar vd., 2005). Enfeksiyona neden olan ajan nükleik asitleri parçaladığı bilinen uygulamalardan etkilenmemektedir (Alper vd., 1967; Prusiner, 1982).
5. PrP^{Sc} birikimi sonucu amiloid plak oluşumu şeklindeki patoloji, nerdeyse istisnasız olarak prion hastalıklarıyla ilişkilidir.
6. PrP geni mutasyonları, PrP^{Sc} oluşumuna ve genetik olarak kalıtsal prion hastalıklarına neden olurlar.
7. PrP geni için knock out fareler prion enfeksiyonuna direçlidirler (Bueler vd., 1993). Ayrıca PrP^C'nin aşırı ekspresyonu, PrP^{Sc} oluşum hızını arttırdığından inkübasyon süresini kısaltır.
8. Türlerin PrP geni dizilerindeki farklılıklar, her zaman için geçerli olmasa da türler arasında prion hastalıklarının aktarımını engeller.
9. Kimerik olarak hazırlanmış ya da bir kısmı çıkarılmış PrP genleri türler arasındaki prion hastalıklarının aktarımına olan engeli ortadan kaldırabilir (Legname vd., 2004, Legname vd., 2005).
10. FFI'ya neden olduğu bilinen D178N mutasyonunun aynı zamanda fCJD'de de görülmesi, prionların farklı patolojik durumlara neden olabildiğini göstermektedir (Montagna vd., 2003).
11. PrP^{Sc} *in vitro*da hücredekine benzer şekilde PrP^C'nin dönüşümünü gerçekleştirebilmektedir (Kocisko vd., 1994; Caugney vd., 1999; Saborio vd., 2001).

2.3 PrP^C Hücre Biyolojisi

PrP^C, bütün memelilerde beyin ve omurilikte bulunan sinir hücreleri ve glialar ile çeşitli periferik dokular ve lökositler tarafından sentezlenen bir glikoprotein molekülüdür. Normalde bu hücrelerin, özellikle sinir hücrelerinin sinaptik membranlarında, dış yüzeyine bir glikofosfatidilinositol kancası (GPI anchor) ile bağlı olarak bulunurlar (Stahl vd., 1987; Moser vd., 1995; Dodelet ve Cashman, 1998).

2.3.1 PrP^C nin fonksiyonu

PrP mRNA'sı fare ve tavukta embiyogenezin erken dönemlerinde ilk olarak beyinde görülmeye başlanır ve gelişim devam ettikçe miktarları artar. Yetişkin merkezi sinir sisteminde PrP ve mRNA'sı yaygın olarak görülürken özellikle neokortikal ve hipokampal nöronlarda, Purkinje hücrelerinde, omurilik motor nöronlarında daha yüksek konsantrasyonlarda görülür (Kretschmar vd., 1986; DeArmond vd., 1987; Hope, 2000). Merkezi sinir sistemi dışında gelişimin ilerleyen aşamalarında iskelet kasları, böbrek, kalp, ikincil lenfoid organlarda da PrP mRNA'sına rastlanılmaktadır (Harris vd., 1993; Moser vd., 1995; Dodelet ve Cashman, 1998; Ford vd., 2002).

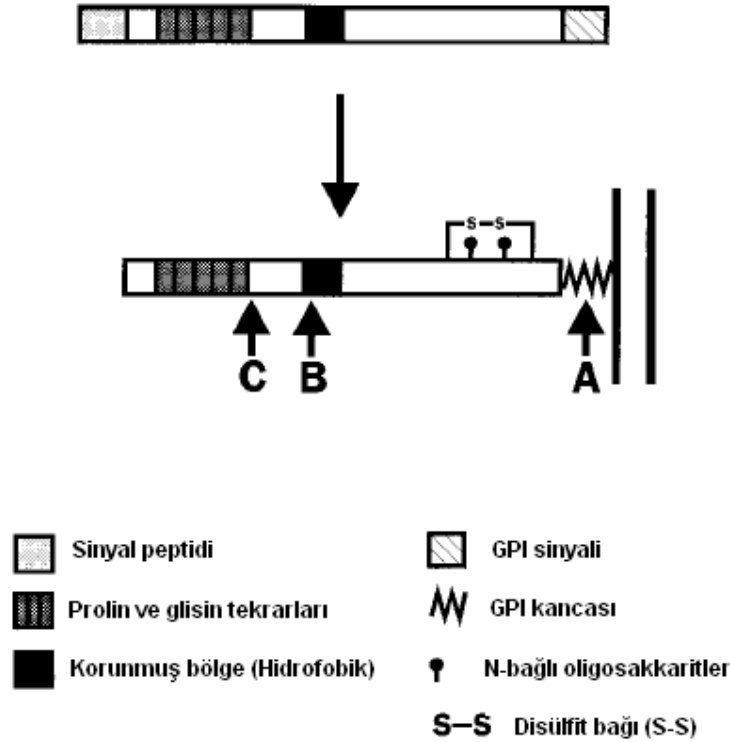
PrP^C 'nin normal fonksiyonları halen tam olarak bilinmese de hücre yüzeyinde yer alması adhezyon ve hücre tanınması, ligand alınımı veya transmembran sinyalizasyonda rol aldığı düşünülmektedir. Bunların dışında immün düzenleme, sinyal iletimi, sinaptik iletim ve apoptosizi indüklemeye ya da önleme gibi görevleri olduğu da ileri sürülmüştür. Saflaştırılmış PrP^C 'nin peptid tekrar bölgesinin bakır bağlaması, PrP null farelerin membran aracılı bakır alımının azalması nedeniyle düşük hücre içi bakır içeriği, buna bağlı olarak azalmış bakır-çinko süperoksit dismutaz aktivitesi PrP^C 'nin bakır metabolizmasında görev aldığını göstermiştir (Brown vd., 1997a; Brown vd., 1997b; Hornshaw vd., 1995). Yakın zamanda yapılan çalışmalar PrP^C 'nin uzun dönemde hemapoetik kök hücrelerinin yeniden oluşturulmasında da sentezlenmekte olduğunu (Zhang vd., 2006), memeli gelişimsel ve yetişkin dönemde nöral haberci aracılığıyla çoğalmada düzenleyici role sahip olduğunu (Steele vd., 2006) ve eksozomal yollarla hücre-hücre iletişimde rol aldığını göstermiştir (Fevrier vd., 2004).

Prnp^{0/0} farelerin kesin olarak prion enfeksiyonlarına dirençli olması, PrP^{Sc} 'haline dönüşüm gerçekleştiğinde prion proteinin normal görevlerini yerine getirememesi gibi durumlar PrP^C 'nin fizyolojik fonksiyonlarının belirlenmesini, hastalık oluşumu nedenlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha da önemli hale getirmiştir (Harris, 1999). PrP geni hasarlanmış

farede yapılan çalışmalar herhangi bir gelişimsel ya da anatomik bozukluk oluşumunu göstermemiştir, ancak bazı çalışmalar hipokampusta elektrofizyolojik ve yapısal anormallikler (Collinge vd., 1994; Colling vd., 1996), Purkinje hücre kaybı (Sakaguchi vd., 1996), sirkadyan ritim ve uyuma düzeninde değişiklikler (Tobler vd., 1996) ve öğrenme ile hafıza da değişikliklere neden olduğunu (Nishida vd., 1997) bildirmiştir.

2.3.2 PrP^C yapısı ve biyosentezi

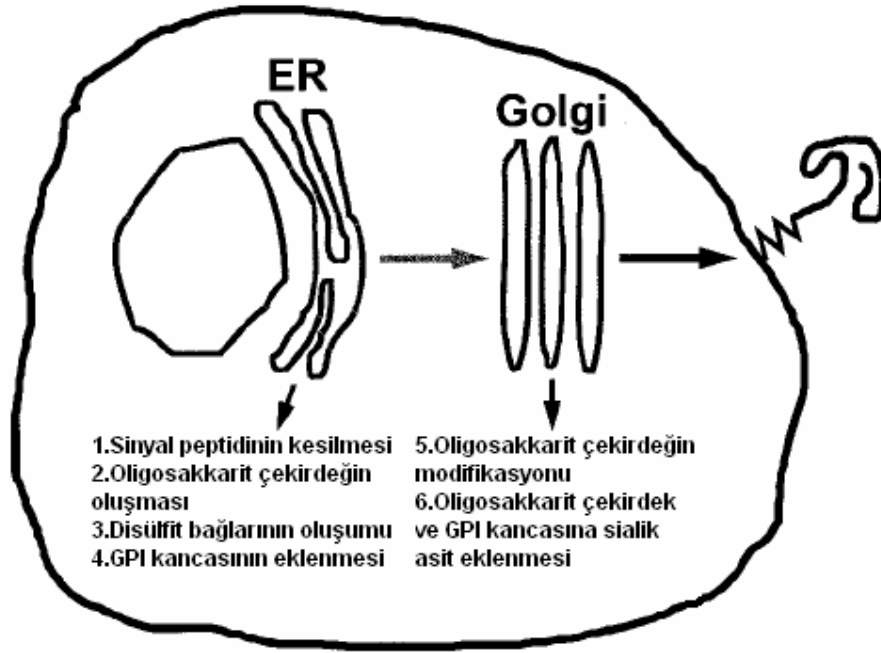
Memeli PrP geni yaklaşık 250 amino asitten ve çeşitli farklı alanlardan oluşur; N-terminal sinyal peptidi, bir dizi prolin ve glisinden zengin 8 tekrarlı peptid dizisi, yüksek oranda korunan bir hidrofobik merkez ve GPI kancaya ek olarak sinyal görevi yapan C-terminal hidrofobik bölge (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Memeli PrP geninin primer translasyon ürünü (Üst şekil) ve olgun proteinin yapısı (Alt şekil). A ve B okları PrP^C nin kesim bölgelerini göstermektedir, C oku PrP^{Sc} içerisindeki bir kesim bölgesini göstermektedir (Harris, 1999).

PrP^C de diğer membran proteinleri gibi düz endoplazmik retikulumdan sentezlenerek golgiye geçer, oradan da membran yüzeyine aktarılır (Harris, 1999). Biyosentezi sırasında PrP^C N-terminal sinyal peptidinin kesilimi, iki yerden (192. ve 208. amino asitten) N-bağlı

oligosakkarit zincirlerinin eklenmesi, bir disülfid bağının oluşması (190 ve 225. amino asitler arasında) ve GPI kancasının eklenmesi gibi (Stahl vd., 1987; Turk vd., 1988; Harper ve Lansbury, 1997) bir çok translayon sonrası modifikasyon geçirir (Şekil 2.2). Yüksek oranda mannoz içeren ve endoglikosidaz H ile sindirime duyarlı N-bağlı oligosakkaritler ilk olarak düz endoplazmik retikulumda eklenir. Bunlar daha sonra golgide endoglikosidaz H'ye dirençli sialik asit içeren kompleks zincirlerle değiştirilir. Endoplazmik retikulumda C-terminal hidrofofik bölgenin kesiminden sonra eklenen GPI kancası diğer glikolipid kancalı proteinlere benzer şekilde bir çekirdek yapısına sahiptir. Bu çekirdek yapı C-terminal amino asidine bağlı bir etanolamin parçası, üç mannoz parçası, bir asetillenmemiş glukozamin parçası ve lipid çift tabakasının dış kısmına gömülü bir fosfotidilinositol molekülünden oluşur. Yapılan çalışmalar PrP^C ve PrP^{Sc}'nin oligosakkarit zincirleri ve GPI kancaları bakımından farklılık taşımadıklarını göstermiştir (Endo vd., 1989; Stahl vd., 1992).



Şekil 2.2 PrP^C biyosentezindeki adımlar (Harris, 1999).

PrP^C nin her iki N-glikozilasyon bölgesinde oluşan mutasyonlar sadece proteinin hatalı katlanmasına ve golginin ortasına yakın bir bölgede ayrı bir bölme olarak birikmesine neden olur (Rogers vd., 1993; Lehmann ve Harris, 1997). Bununla birlikte doğru N-glikozilasyon biyosentetik taşıma için mutlak gerekli değildir; C-terminal bölgede oluşan mutasyonlar ya da

glikozilasyon inhibitörü tunicamycin varlığında PrP^C sentezinde bile az sayıda prion molekülünün hücre yüzeyinde bulunduğu görülmüştür (Lehmann ve Harris, 1997). Normalde hiçbir etkileyici durum olmadığında da hücre yüzeyinde az miktarda glikozillenmemiş PrP^C bulunmaktadır (Caughey vd., 1989; Lehmann ve Harris, 1997). Bir ya da iki N-glikozilasyon bağlanma bölgesi mutasyona uğramış PrP^C molekülü PrP^{Sc} 'ye benzer çeşitli biyokimyasal özellik gösterir (Lehmann ve Harris, 1997). Bu sonuç doğal olarak PrP^C 'nin normal şekilsel olgunlaşma işlemi sırasında PrP^{Sc} 'ye benzeme isteğinin bulunduğunu ancak N- bağlı glikan zincirlerin bu değişimi önlediğini göstermektedir (Harris, 1999).

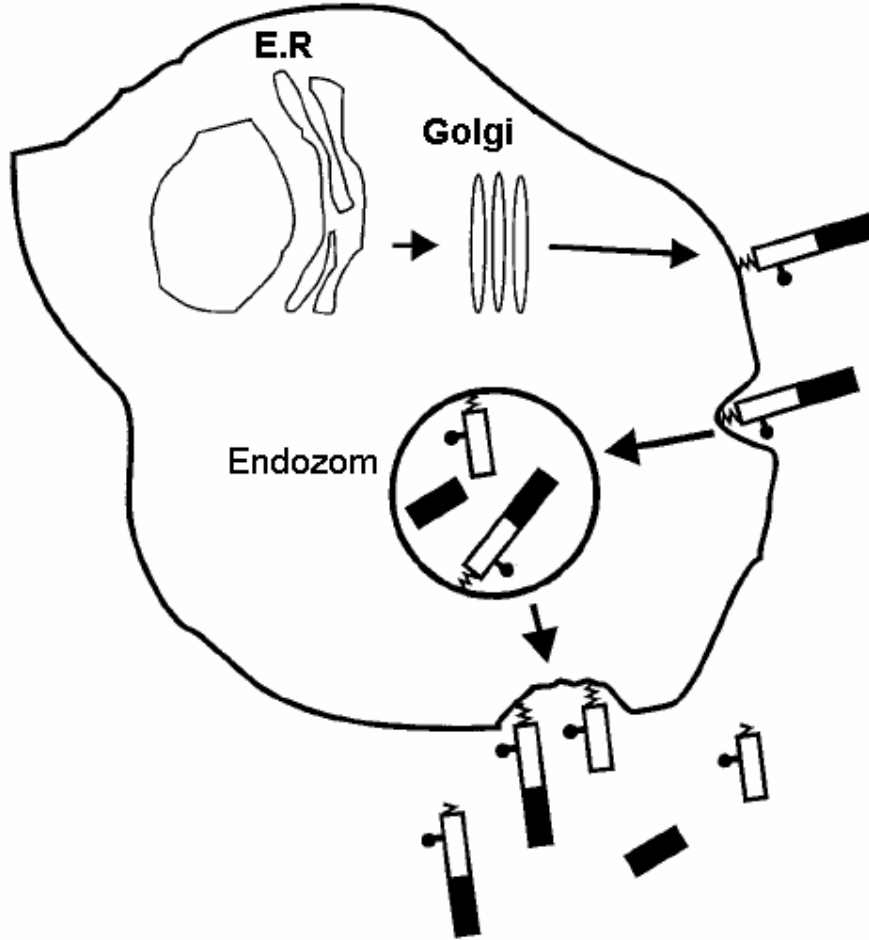
2.3.3 PrP^C'nin hücre içi lokalizasyonu ve dolaşımı

PrP^C plazma membranı üzerinde bulunan bir hücre yüzey proteinidir. PrP^C hücre yüzeyine bağlanışını GPI kancası sayesinde gerçekleştirdiğinden bakteriyal fosfolinositol (PI) seçici fosfolipaz C ile muamele edildiğinde kancanın diasilgliserol kısmı kesilerek serbest kalabilmektedir (Borchelt vd., 1990; Caughey vd., 1990; Lehmann ve Harris, 1996). PrP^C 'nin aksonlarla sinir uçlarına taşındığına dair biyokimyasal bulgular immünoelektron mikroskopuyla kanıtlanmıştır (Fournier vd., 1995; Salès vd., 1998). Işık mikroskobu kullanılarak yapılan immünositokimya çalışmaları PrP^C 'nin öncelikli olarak olfaktör bulb, limbik yapılar ve striato-nigral komplekste, daha az olarak nöronal perikarya ya da olfaktör sinir dışında diğer sinir yollarında görüldüğünü göstermiştir (Salès vd., 1998). Bu morfolojik bulgular PrP^C 'nin sinaptik bir fonksiyonu olduğunu gösterse de daha kesin bulgular halen gerekmektedir.

Shyng ve arkadaşlarının (1993) tavuk PrP^C 'si üzerinde yaptığı çalışmalar PrP^C 'nin sadece hücre yüzeyinde kalmadığını, düzenli olarak plazma membranı ve bir endositik kompartıman arasında dönüşler gerçekleştirdiğini göstermiştir (Şekil 2.3). Tavuk PrP^C 'si, kuşgiller ve memeli PrP^C 'si arasındaki homologluk nedeniyle elde edilen bu sonucun memeliler içinde yüksek olasılıkla doğru olabileceğini düşündürmektedir. Bu endositik geri dönüşüm yolu iki nedenle önemlidir. Bunlardan ilki PrP^C 'nin PrP^{Sc} 'ye dönüşümünün bu endositik geri dönüşüm yolunun gerçekleştiği sırada oluşması olasılığıdır. Bu olasılığı doğrulayacak şekilde scrapieyi önleyici maddeler olarak kullanılan sülfatlanmış glikanlar, PrP^C 'nin endositozunu artırıp endozomların lizozomlara dönüşmesini ve lizozomlarla yıkılmasını sağlayarak yetersiz PrP^{Sc} dönüşümüne neden olur (Shyng vd., 1995).

Bu dönüşüm yolu aynı zamanda fizyolojik olarak PrP^C 'nin reseptör olarak görev aldığını da doğrular. PrP^C yapısal benzerlik olarak bakıldığında düşük yoğunluklu lipoprotein, transferrin

veya bakır iyonu için reseptör görevi görebilir. Pauly ve Harris (1998), çalışmalarında bakır iyonlarının varlığının geri dönüşümlü olarak PrP^{C} nin hücre yüzeyinden endositozla alınımını hızlandırıcı etkiye neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, PrP^{C} nin hücre yüzeyinde bağladığı bakır iyonlarını endositozla hücre içine aldıktan sonra bakır iyonu bağlayan proteinlere aktarıp daha sonra tekrar hücre yüzeyine döndüğü şeklinde bir döngüye sahip olabileceğini göstermektedir (Pauly ve Harris, 1998).



Şekil 2.3 PrP molekülünün hücresel dolaşımı ve kesilimi (Shyng vd., 1993'den alınmıştır).

2.4 PrP^{Sc} 'nin Hücre Biyolojisi ve Çoğalımı

Bilinen virüs hastalıklarında olduğu gibi prion hastalıkları ile ilgili deneysel sonuçlar, enfeksiyona neden olan ajanların hücre kültürlerinde büyütülmesi şeklinde elde edilmiştir. PrP^{Sc} , *in vivo* enfeksiyon işlemi sonucunda nöronlar, astrositler ve lenforetiküler hücreler gibi çeşitli hücrelerin kültürleriyle üretilmektedir (DeArmond vd., 1987; Diedrich vd., 1991; Blattler vd., 1997; Raymond vd., 1997). Ancak bu hücre kültürlerini stabil bir şekilde

prionlarla enfekte tutmak oldukça zordur. Stabil olarak enfekte edilebilen hücre kültürlerinin büyük çoğunluğu nöronsal kökenli hücrelerdir; bazı nöronal orijinli olmayan hücre kültürleri de yakın zamanda elde edilebilmiştir (Race vd., 1987; Butler vd., 1988; Schatzl vd., 1997; Sabuncu vd., 2003; Archer vd., 2004; Vorberg vd., 2004; Raymond vd., 2006). Bu stabil enfekte hücreler devamlı olarak düşük miktarda PrP^{Sc} üretirler. Üretilen PrP^{Sc} 'ler, proteinaz dirençliliği, deterjanlarla çözünmezlikleri ve hayvan deneylerine enfeksiyon oluşturmaları gibi klasik belirtilere sahiptirler.

Enfekte hücreler hiçbir sitopatoloji göstermezler, tek istisna prion enfeksiyonunun ardından apoptozise giren GT1 hücreleridir (Schatzl vd., 1997). Scrapie ile enfekte edilmiş N2a hücreleri bradikinin aracılıklı cevaplar ve membran akışkanlığında değişiklikler gösterse de bu değişiklikler hücrelerin büyüme ve yaşamasında etkiye sahip değildir (Kristensson vd., 1993; Wong vd., 1996).

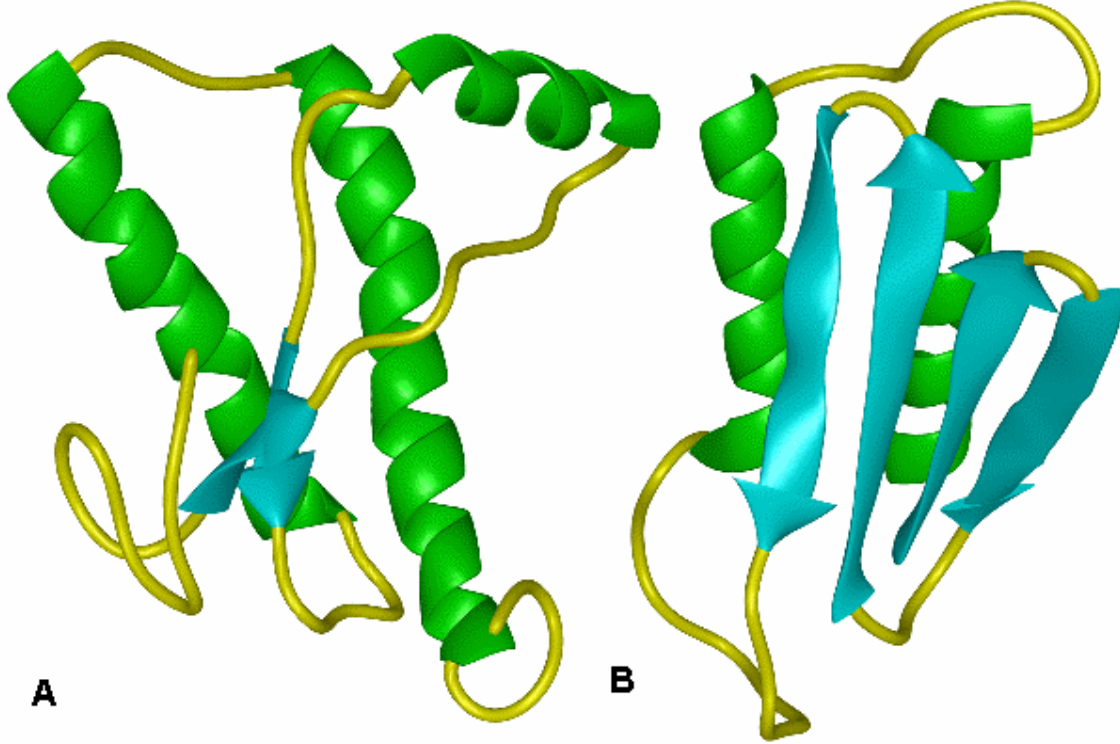
Kültür hücrelerinde yapılan çalışmalar patojenik mutasyonların PrP^C metabolizması üzerinde belirgin değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Mutasyonun bir etkisi proteinin PrP^{Sc} benzeri biyokimyasal özellikler kazandırmasıdır; ancak bu durum hücre tipi ve mutasyonun gerçekleştiği yerle de ilişkilidir (Harris, 1999). Bu nedenle bu kültür sistemleri, PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşümünün önemli özelliklerinin anlaşılması için modeldirler. Bununla birlikte kültür hücrelerinde üretilen PrP^{Sc}'ler insan ya da hayvanların beyinlerinden izole edilen PrP^{Sc}'lerden daha düşük proteaz dirençliliğine sahiptir (Lehmann ve Harris, 1996; Singh vd., 1997; Priola ve Chesebro, 1998). Bu değişikliğin asıl nedeninin, değişik kaynaklardan alınan scrapie kökenleri arasında görülen farklı proteaz dirençliliğine (Bessen ve Marsh, 1992) benzer bir durum mu olduğu yoksa kültür hücrelerinin dönüşüm işlemi sırasında bazı kritik aşamaları tam olarak gerçekleştirememesi mi olduğunun anlaşılması gerekmektedir.

2.4.1 PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşümü

PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşümü translasyon sonrası gerçekleşen bir olaydır. Oluşumdan sonra PrP^{Sc}, PrP^C gibi 24 ile 48 saat boyunca stabil kalır, yarı ömrü 4 ile 6 saat arasındadır (Borchelt vd., 1990; Caughey vd., 1990; Borchelt vd., 1992). Enfekte hücrelerde PrP^C moleküllerinin küçük bir kısmı (yaklaşık %5'i) PrP^{Sc}'ye dönüşürken geri kalanlar endozom ve lizozomlar gibi asidik kompartmanlarda yıkılırlar (Borchelt vd., 1990; Taraboulos vd., 1995).

Yapılan tüm çalışmalar sonucunda elde edilen kanıtlar PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye konformasyonel dönüşümünün eş değerli olduğunu ve her iki izoformun aynı amino asit dizisine ve aynı

translasyonel eklemelere sahip olduğunu göstermektedir (Stahl vd., 1993; Prusiner vd., 1998). Konformasyonel değişim proteinin β -yaprak yapısında ufak bir artış ve α - heliks yapısında da düşüş şeklinde gerçekleşir. Kızılötesi spektroskopi çalışmaları PrP^{C} 'nin yapısının yaklaşık %42 α - heliks ve %3 β -yaprak yapısında olduğunu, PrP^{Sc} 'nin %30 α - heliks ve %43 β -yaprak yapısında olduğunu göstermiştir (Caughey vd., 1991; Pan vd., 1993; Safar vd., 1993).



Şekil 2.4 Normal PrP molekülü (PrP^{C}) ve hastalığa yol açan değişmiş PrP molekülü (PrP^{Sc})[8].

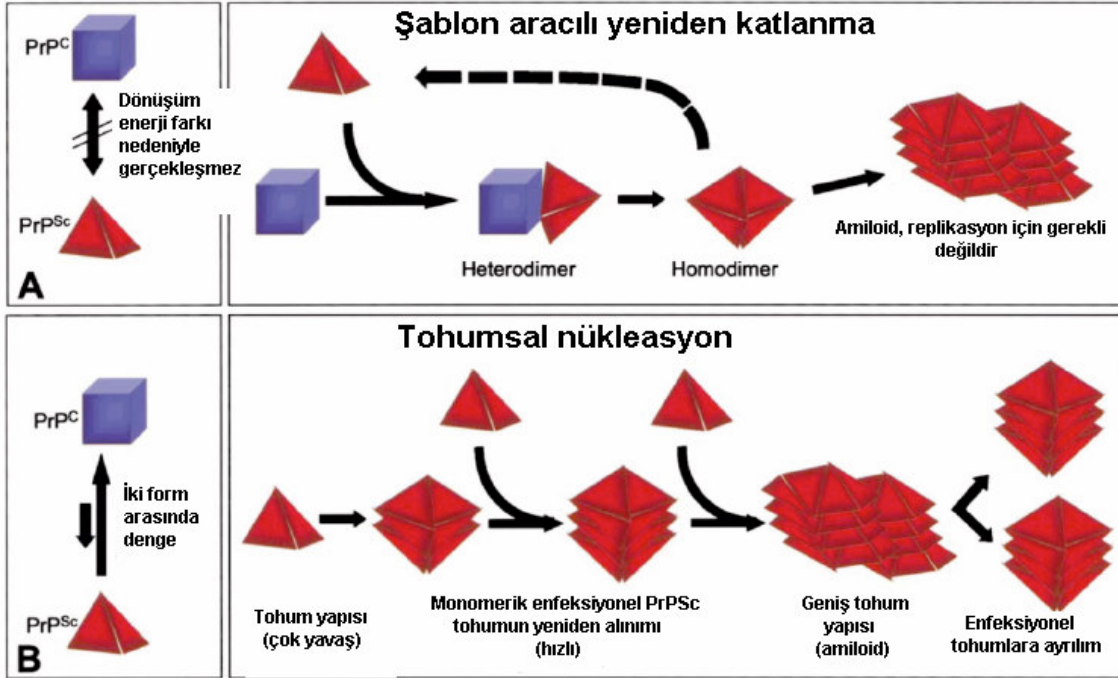
Prion enfeksiyonu sırasında PrP^{C} ve PrP^{Sc} arasında gerçekleşen ve yüksek özgüllükte bir fiziksel etkileşim sonucunda yeni PrP^{Sc} moleküllerinin oluştuğu çeşitli bulgularla kanıtlanmıştır. İlk ve en önemli bulgu, PrP^{C} sentezleyen genleri alınmış null farelerin prion enfeksiyonuna tamamen dirençli olmasıdır (Büeler vd., 1993; Sailer vd., 1994). İkinci bulgu genetik olarak değiştirilmiş PrP molekülleri sentezleyen transgenik fareler ve hücre kültürlerinde prion enfeksiyonuna olan duyarlılıkta görülen değişikliklerdir. Örneğin fareler normalde hamsterlerden alınan PrP^{Sc} 'ye duyarlı değilken hamsterde sentezlenen fare/hamster rekombinant geninin ürettiği PrP^{Sc} moleküllerine duyarlıdırlar (Scott vd., 1989; Prusiner vd., 1990; Scott vd., 1993).

Yapılan çalışmalar PrP^{C} molekülünün hangi kısımlarının PrP^{Sc} ile etkileşim için varlığının gerekli olduğunu koymuştur. PrP^{C} molekülünün N-terminal kısmında bulunan 66 amino asitlik kısmı ve birinci heliks yapıyla ikinci β yaprak yapısı (Rogers vd., 1993; Fischer vd., 1996; Muramoto vd., 1996) iki N bağlı oligosakkarit zincirinden birinin varlığı da dönüşüm için gerekli değildir (Taraboulos vd., 1990b; DeArmond vd., 1997). PrP^{C} nin orta bölgesinde bulunan amino asitlerin enfeksiyonel PrP^{Sc} ile olan homolojisi de dönüşüm işleminin verimliliğini etkiler, bu bölgedeki tek bir amino asit uyumsuzluğu dönüşüm işleminin gerçekleşmesini önleyebilmektedir (Scott vd., 1992; Scott vd., 1993; Priola vd Chesebro, 1995; Telling vd., 1995). Bu durum türler arasında prionların yayılımlarını engelleyen en önemli bariyerdir.

2.4.2 PrP^{Sc} nin birikimi

PrP^{C} nin PrP^{Sc} ye dönüşüm mekanizmasının açıklanmasında iki modelden yararlanmaktadır. Şablon aracılı yeniden katlanma modeline göre (diğer adıyla monomer aracılı heterodimer model) PrP^{C} belli boyuta kadar açılıp daha sonra şablon olarak PrP^{Sc} yi kullanarak tekrar katlanmaktadır (Prusiner vd, 1991; Telling vd., 1995; Kaneko vd., 1997). Bu modelde PrP^{C} ve PrP^{Sc} arasında ki kinetik bariyer PrP^{Sc} nin katalitik etkisiyle aşılmaktadır. Deneysel kanıtlar bu teoriyle uyum gösterse de henüz kesin olarak kanıtlanmamıştır.

Diğer model olan tohumal nükleasyon modeline göreyse (nükleasyona bağımlı polimerizasyon modeli) PrP^{C} , PrP^{Sc} ile dengededir ancak denge daha çok PrP^{C} nin tarafındadır. Dönüşen PrP^{C} monomerleri daha önceden oluşmuş PrP^{Sc} polimerlerine eklendikten sonra kristal benzeri tohum yapısında stabil duruma geçer (Come vd., 1993; Jarrett ve Lansbury, 1993). Bu modelde monomer eklenmesi tohum yapısı olduğu sürece hızlı bir şekilde devam eder. PrP^{Sc} nin enfeksiyon sırasında daha da hızlı artışı için bazen agregatların parçalanması gerekmektedir. Tohumal nükleasyon modeli enfeksiyon ajanının PrP^{Sc} moleküllerinin yüksek oranda düzenlenmiş agregatlarından oluşabileceği izlenimi vermektedir. Agregat durumu enfeksiyona özel olarak değişiklik gösterebilir, PrP^{Sc} monomeri zararsız olsa da PrP^{Sc} agregat oluşumuna neden olabilir. Silveira ve arkadaşları (2005) yakın zamanda yaptıkları çalışmalarda en enfeksiyonel prion partikülünün PrP^{C} molekülünün fibriler olmayan 14-28 amino asitlik partikülleri olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.5 PrP^C molekülünün PrP^{Sc} ye konformasyonel dönüşüm modelleri (Aguzzi ve Polymenidou, 2004'ten alınmıştır).

Prionlar beyinde yüksek oranda ve daha düşük oranda da olsa bazı konakların dalaklarında çoğalırlar. Merkezi sinir sisteminde prion çoğalımı sonucunda süngerimsi dejenerasyon, astrosit ve sinir hücrelerinin ölümü gerçekleşir. Patolojik mekanizma halen tam bilinmese de hastalık oluşumu PrP^C moleküllerinin ortadan kalkmasıyla gerçekleşmez; doğuştan PrP geni olmayan fareler herhangi bir hastalık belirtisi göstermezler (Büeler vd., 1992; Mallucci vd., 2002). PrP^{Sc}, merkezi sinir sisteminde çoğalır ve amiloidler olarak birikir, bu durum nöronal apoptozise neden olan bir toksisite oluşturur (DeArmond ve Prusiner, 2003). Yapılan bazı deneyler PrP^C taşıyan nöronların PrP^{Sc} moleküllerinden etkilenmediğini göstermiştir (Büeler vd., 1994; Brandner vd., 1996). Bu bakımdan ilginç bir bulgu, intraserebral aşılanmanın 7-8 hafta sonrasında koşullu ve geçici olarak nöronlarında ki PrP geni susturulmuş farede, PrP^{Sc} molekülleri astrositlerde çoğalmıştır ve herhangi bir nöronal zarara ya da klinik semptomu neden olmamıştır (Mallucci vd., 2003).

3. PRİON HASTALIKLARI

PrP^{Sc}' nin merkezi sinir sisteminde (özellikle beyinde) ve ikincil lenf organlarında (Peyer plakları, lenf nodülleri, dalak) birikmesiyle uzun bir inkübasyon süresinde oluşan nöronal vakuolasyon ve nörodejenerasyonu sonucu ölümle sonlanan hastalıklardır. Prion hastalıkları ya da TSE'ler sporadik olgular olarak, kalıtsal olarak aktarılması ya da bulaşma sonucu görülebilir. Bulaşma hasta bireylerden organ ve kan nakli dışında enfekte beyin ya da sakatatın yenilmesi şeklinde olabilir. Oral yolla bulaşma barsaklarda lenfoid hücreler tarafından parçalanmış PrP^{Sc}' nin lenf dolaşım sistemine alınması ve oradan da sinir hücreleri ile spinal kord, beyin ve diğer merkezi sinir sistemi bölgelerine ulaşması şeklinde gerçekleşir. Sporadik olgular, PrP geninde meydana gelen nokta mutasyonları şeklinde oluşur. Prion hastalarında üretilen PrP^{Sc} proteinleri vücut tarafından yabancı olarak tanımlanamadığından herhangi bir immün yanıt ortaya çıkmaz.

Prion hastalıkları insanlar, koyunlar ve sığırlar dışında birçok hayvanda benzer belirtilerle görülmektedir. Bu hastalıkların büyük çoğunluğu başka bir prion hastalığına ait PrP^{Sc} proteinlerinin oral yolla diğer canlıya geçmesi şeklinde oluşmaktadır. Bunun dışında genetik temelli olarak ortaya çıkan hastalıklarda bulunmaktadır.

Günümüzde prion hastalıkları için biyopsi ile doku örneği alınması dışında geliştirilmiş ve doğru sonuç veren bir tanı testi bulunmadığından sadece genel hastalık belirtilerine bakılarak teşhis konulabilmektedir. Bunun dışında şu anda hastalıkların tedavisi için çeşitli yöntemler denenmekte olsa da henüz özgül bir tedavi bulunmaktadır.

Çizelge 3.1 Prion hastalıklarının görüldüğü diğer hayvan türleri

Hayvan türü	Hastalık
Arabistan antilobu	Süngerimsi ensefalopati
Kedi	Kedigil süngerimsi ensefalopatisi
Çita	Kedigil süngerimsi ensefalopatisi
Afrika geyiği	Süngerimsi ensefalopati
Mink (Vizon)	Mink süngerimsi ensefalopatisi
Katır geyiği	CWD
Puma	Kedigil süngerimsi ensefalopatisi
Hançer boynuzlu antilop	Süngerimsi ensefalopati
Benekli yabankedisi	Kedigil süngerimsi ensefalopatisi
Yabani dağ koyunu	Scrapie
Spiral boynuzlu güney Afrika antilobu	Süngerimsi ensefalopati
Güney Afrika ceylanı	Süngerimsi ensefalopati

3.1 Koyunlarda Prion Hastalıkları

3.1.1 Scrapie

Bilinen en eski prion hastalığı olan scrapie yaklaşık iki yüz yıldır koyun ve keçilerde görülmektedir (Stockman, 1913) ve hastalığın ortadan kaldırılması konusunda çalışmalarını tamamlamış olan Avustralya ve Yeni Zelanda haricinde Dünya'nın her yerinde rastlanabilmektedir.

Hastalık 19. yüzyıldan beri bilinsede ilk olarak Cuille ve Chelle'nin (1939) deneysel olarak koyunlardan keçilere aktarılabildiğini kanıtlamasıyla ilgi çekmiştir (Aguzzi, 2006). 20 yıl kadar sonra Gajdusek insanlarda görülen bir prion hastalığı olan kurunun bulaşıcı bir süngerimsi ensefalopati olduğunu ispatlamasının ardından, Hadlow (1959) scrapienin kuruya

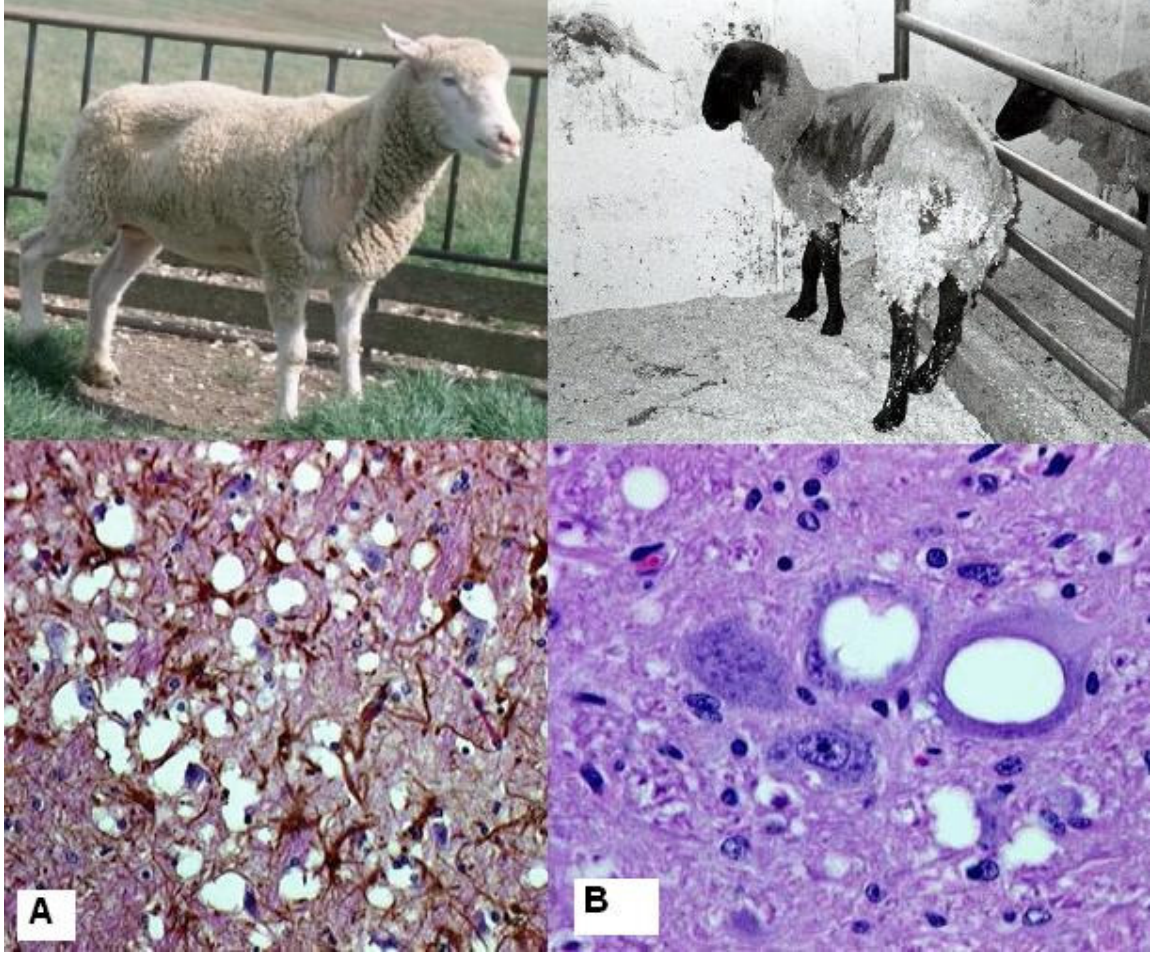
olan benzerliği nedeniyle inkübasyon süresinin uzunluğunun araştırmacıların beklediğinden daha uzun olabileceğini ileri sürdü. 1961’de Pattison ve Millson scrapieye neden olan birden fazla PrP^{Sc} türünü tanımlamış, aynı yıl Chandler tarafından scrapie farelere bulaştırılmıştır (Aguzzi, 2006). 1966 yılında Alper vd. tarafından PrP^{Sc} ‘lerin iyonize radyasyon ve ultraviyole ışığa dayanıklı olduğunun gösterilmesi ile scrapie ve PrP^{Sc} molekülleri daha büyük bir ilgi görmeye başlamıştır (Aguzzi, 2006).

Scrapienin insanlar üzerinde tür bariyeri nedeniyle direkt olarak hastalık oluşturduğu görülmemiştir, Brown ve arkadaşlarının (1987) yaptığı araştırmalar ve taramalar hastalığın görüldüğü ilk zamanlardan (yaklaşık 250 yıl) bu yana hasta hayvanların yenilmiş olabilmesine rağmen insanlara geçmediğini yönündedir. Gombojav vd. (2003) yaptıkları çalışmada İnsan/Fare kimerik transgenik fareleri koyun ya da fareye adapte edilmiş scrapie ile enfekte edememişlerdir. Gajdusek vd. de (1973) şempanzelerin koyun scrapiesiyle enfekte edilmesinde zorluklar yaşamışlardır. Scrapienin başka canlılar aracılığıyla (kuşlar, küçük memeliler ve parazitler) bulaştığına dair kanıt bulunmamaktadır (Hartwig, 2000).

Scrapie, enfekte hayvanın bulunduğu sürülerde hayvandan hayvana, ortak kullanılan otlaklarda sürüden sürüye ya da koyunlardan keçilere horizontal olarak yayılabilir (Hartwig, 2000; Hopp vd., 2001). Dikey bulaşma embriyo transferiyle görülse de embriyo transfer sonuçları tutarlı gözükmemektedir (Foster vd., 1992; Foote vd., 1993). Scrapienin en yaygın bulaşma şekli koyunlardan kendi ya da diğer koyunların kuzularına, özellikle de doğumu takiben ilk birkaç ayda gerçekleşir. Koçlardan kuzulara bulaşma nadir olarak görülür (Hartwig, 2000). Enfeksiyon kaynakları enfekte dişi koyunların fetal membranları (Onodera vd.,1993) ya da tam olarak gösterilmemişse de hasta hayvanın diğer kontamine olmuş salgıları ve dışkılarıdır (Hoinville, 1996). Enfeksiyonun bulaşması oral yol (Pattison vd., 1972), deride oluşan yaralar (Stamp vd., 1959) ve konjunktival (Haralambiev vd., 1973) yol şeklinde olabilir. Bunun dışında sürüler arası ortak koç kullanılması da hastalığın yayılmasında etkisi bulunmaktadır. Hayvanların barınma koşulları ve bu yerlerde bulunan diğer hayvanların hastalığın yayılması üzerinde etkisi görülmemiştir (Hopp vd., 2001).

Scrapienin en önemli belirtisi “pruritus” yani hastalığa ismini de veren hayvanın vücudunun yan ve arka kısımlarını çit ve direk gibi katı nesnelere sürterek yünlerini kopartması (scraping off)’dır (Williams, 2003). Bunun dışında tahriş edici olarak dişlerin gıcırdatılması, arka ayaklarla kulak ya da omuzun kaşınması, ayak, bacak ya da vücudun diğer kısımlarının kemirilmesi, dolayısıyla aşırı yün kaybı ve deride hasar oluşumu görülür (Şekil 2.1). Hayvan gürültü, hareket ve temasa anormal tepkiler gösterir; kolay heyecanlanan, saldırgan ve

depresif ruh hallerine geçişler görülür, boş bakma, geride kalma ve kulaklarını düşürme şeklinde davranışlar gösterir. Hayvanın hareketlerinde koordinasyon bozukluğu, tökezleme, arka ayaklarıyla tavşan benzeri zıplama, titreme ilerleyen safhalarda zayıf arka ayaklar ve ayakta duramama görülür. Hastalığın son döneminde normal iştaha rağmen kilo kaybı, bir süre sonra da ölüm gerçekleşir.



Şekil 3.1 Scapieli koyunlar (Üst), scrapie ile enfekte olmuş koyunların beyinde görülen vakuolizasyon ve astositlerde hipertrofi (A- hematoksil ve eozin boyama; B - glial fibriller asit protein boyası).

Scrapie, hayvancılık sektörü açısından büyük bir mali kayba neden olması dışında, insan sağlığına olan etkilerinden emin olunmaması nedeniyle de kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Hastalık etkeninin birçok dezenfektana dirençli olması, uzun inkübasyon süresi nedeniyle erken teşhisin konulamaması ve hastalık için henüz kesin sonuç veren bir tanı testinin bulunmaması (koyunun üçüncü göz kapağından biyopsi ile doku alınarak yapılan teşhis yöntemi teknik olarak uygun olsa da bu yöntemin yeterli laboratuvar kaynakları ile

yeterli beceride personel gerektirmesi nedeniyle uygulanması zordur), biyopsi dışında immünolojik testlerin kullanılamaması hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır (Hartwig, 2000, O'Rourke vd.,2002). Bu amaçla Avrupa Birliği başta İngiltere olmak üzere tüm üye ülkelerde uygulanması amaçlanan ve uzun süreçte scrapie hastalığının ortadan kaldırılması ve dirençli hayvanların yetiştirilmesini hedefleyen Ulusal Scrapie Planı'nı hazırlamıştır [1].

3.1.1.1 Scrapie duyarlılık allelleri

Koyunlarda doğal scrapie ya da deneysel scrapielere maruz kalındığında hastalık oluşması ve yaşama süresinin uzunluğu prion genindeki polimorfizmlerle ilişkilidir. 136. kodonda alanin veya valin (A veya V), 154. kodonda histidin veya arginin (H veya R) ve 171. kodonda histidin veya glutamin (H veya Q) şeklinde oluşan polimorfizmler, kodlanan proteinde değişik amino asitlerin yer almasıyla koyunlarda scrapie dirençliliğinde neden olur (Goldmann vd., 1994; Belt vd., 1995; Hunter vd., 1996). ovPrP allelinde en sık görülen polimorfizmlerin direnci en fazla olandan aza doğru sıralaması "ARR > AHQ > ARH > ARQ > VRQ" şeklindedir.

Hücreden bağımsız *in vitro* yapılan PrP^C 'nin PrP^{Sc} 'ye dönüşme göreceli hızları araştırıldığında sadece 136. kodonda V ya da A taşıyan PrP^C 'ler hızla PrP^{Sc} formu alırken, 171. kodonda R taşıyan PrP^C 'ler güçlükle PrP^{Sc} 'ye dönüşmektedir (Bossers vd., 1997; Bossers vd., 2000; Raymond vd., 2000). Bu gözlemler, PrP allelindeki polimorfizmlerin hastalığa neden olan forma dönüşmede etkileri olduğunu göstermektedir.

136. kodon için alanin homozigot (AA) koyunların heterozigot (AV) ya da valin homozigot (VV) koyunlara göre scrapieye daha dirençli oldukları görülmüştür. 154. kodon üç polimorfizm arasında en az etkiye sahip olan kodon olsa da arginin homozigot (RR) koyunların heterozigot (RH) ya da histidin homozigot (HH) koyunlara göre daha dirençli oldukları görülmüştür. 154. kodonun bu durumunun farklı scrapie kökenleri için ters etkiye sahip oldukları da görülmüştür. 171. kodon scrapie dirençliliği için en fazla etkiye sahip polimorfizmlere sahiptir. 171. kodon bakımından arginin homozigot (RR) olan koyunlarda scrapieye rastlanılma olasılığı oldukça düşüktür. Heterozigot koyunlardaysa (RQ) scrapie enfeksiyonu taşıyanların sayısı ise oldukça düşüktür, glutamin homozigotlar (QQ) için aynı sayı yüksektir. Duyarlı genotipte (VHQ) koyunda hastalığın görülme durumu dirençli genotipe (ARR) göre daha kolaydır ve inkübasyon süresi de göreceli daha kısadır.

Genotipteki bu farklılıkların scrapienin oluşmasına olan etkileri koyunlarda hastalığın ortadan kaldırılması ya da riskin azaltılması amacıyla kullanılabilir. Dirençli homozigot (ARR/ARR) genotipe yaygın olarak sahip ırkların belirlenmesi, bu ırktaki koyun ve koçları temel alan üretim programlarının yapılması ve duyarlı genotipin aza indirilmesi scrapienin yayılımını azaltacaktır.

3.1.2 Nor98

En son keşfedilen prion hastalığı olan Nor98, ilk olarak 1998 yılında Norveç'te klasik scrapieden farklı bir scrapie türü görülmüştür (Benestad vd., 2003). Daha sonra yapılan çalışmalarla Avrupa'da da benzer atipik vakalar görülmüştür (De Bosschere vd., 2005; Gavner-Widen vd., 2004; Onnasch vd., 2004; Everest vd., 2006) ve tüm bu hastalıklara atipik scrapieeler ya da Nor98 adı verilmiştir (Benestad vd., 2003).

Nor98, klasik scrapieden epidemiyoloji, klinik görünüm ve hasta hayvan genotipleri bakımından farklılıklar taşımaktadır (Benestad vd., 2003). Epidemiyolojik olarak Nor98, Avrupa koyun popülasyonunda 1/10000 oranında görülmektedir. Nor98'in ve diğer atipik scrapieelerin sporadik olarak ortaya çıktığı ve ilerlemiş yaştaki koyunlarda ortaya çıktığı düşünülmektedir (Lühken vd., 2007). Nor98'de klasik scrapienin nörolojik belirtileri daha zayıf olarak görülür, PrP^{Sc} birikimi sadece merkezi sinir sisteminde görülür ve bu birikim sonucu beyinde vakuolizasyon yerine daha farklı biçimde ve sık olarak mikrovakuolizasyon görülür (Benestad vd., 2003). PrP^{Sc} molekülleri bakımından farklılıklara bakıldığında ise Nor98'e ait PrP^{Sc} molekülü protein kinazla muamele edildiğinde 7 kDA ağırlığına yakın ve Western blotlamada hızlı ilerleyen bir fragment oluşur (Klingeborn, 2006). Klasik scrapie ekstraktlarında görülen en ufak fragment C-terminal ucu içeren 19–21 kDA ağırlığındaki fragmenttir (Hope,1999; Hayashi, 2005).

Dikkat çekici olarak Nor98, scrapieye göreceli olarak yüksek dirençlilik sağladığı düşünülen (ARR) ya da daha az duyarlı olduğu düşünülen (AHQ) genotipi taşımakta olan hayvanlarda görülmektedir (Benestad vd., 2003; Gavner-Widen vd., 2004; Moum vd., 2005; Everest vd., 2006; Klingeborn vd., 2006). Bununla birlikte scrapieye en duyarlı olan VRQ genotipininse Nor98'e kısmen dirençlilik sağladığı görülmüştür (Benestad vd., 2003; Buschmann vd., 2004; De Bosschere vd., 2005; Madec vd., 2004; Moum vd., 2005; Orge vd., 2004). Son yapılan çalışmalar ise scrapie kökenine bağlı olarak AHQ genotipini taşıyan koyunların Nor98'e daha duyarlı olabileceğini göstermiştir (Baylis ve McIntyre, 2004). Scrapieye duyarlılığı belirleyen 136., 154. ve 171. kodonlar dışında diğer kodonlarda yapılan polimorfizm araştırmaları

141.kodondaki lösin fenilalanin amino asit değişiminin (L/F) Nor98'e duyarlılığı arttırıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. 141. kodonda fenilalanin amino asitinin yer aldığı alleller sıklıkla ARQ allelleriyle birlikte görülmektedir (Bossers vd., 1996; Hunter vd., 1996; Moum vd., 2005). Ancak 141. kodonda lösin amino asitinin yer alması Nor98'e kesin bir dirençlilik sağlamaktadır (Lühken vd., 2007).

3.2 Sığırlarda Prion Hastalıkları

3.2.1 BSE

İngiltere'de 1986'da başlayan BSE (daha bilinen adıyla Deli Dana hastalığı) epidemisi, 200.000 sığırın öldürülmesine neden olmuş ve insanlarda değişik türevde bir Creutzfeldt Jakob hastalığının da (vCJD)  ıkışına neden olmuştur (Brown vd., 2001). Hastalık BSE taşıyan canlı hayvan ihracatı ve kontamine olmuş sığır etinden hazırlanan ürünlerin yurt dışına satılması nedeniyle İngiltere ile sınırlı kalmamış, kontamine besinlerle beslenen diğer sığırlar ve hayvanat bahçesinde bulunan egzotik ( zellikle *Felidae* ve *Bovidae* ailelerine ait) hayvanlar ve hastalığı taşıyabileceği d ş n len 5 yaştan küçük sığırlar dahilinde 1.000.000'a yakın hayvanı da etkilemiştir (Collinge, 2001; Cunningham vd.,2004).

BSE prionunun insanları da etkilediğinin anlaşılmasının ardından İngiltere'de BSE ve vCJD'nin ortaya çıkış kaynağının araştırılması ve takip edilmesi amacıyla BSE Araştırma Komitesi kurulmuştu. 20 Mart 1996'da bu kurul bulgularını açıkladı [2], bunlar arasında en önemlileri:

1. 1986 ve 1988 tarihleri arasında tespit edilen BSE vakaları indeks vakalar olmadıkları gibi scrapienin geçmesi şeklinde de oluşmamışlardır. Bu vakalar, BSE ile enfekte olmuş sığırların kullanılmayan karkaslarının besin (et-kemik yemi) olarak tekrar kullanılması ile oluşmuşlardır.
2. BSE'nin ortaya çıkış nedeni kesin olarak bilinemeyecek olsa da 1970'lerde sporadik bir mutasyon ya da prion proteinin spontane bir şekil değişikliği sonucunda oluşmuş olabilir.
3. Yem hazırlanırken kullanılan metodlar daha öncede TSE'ye neden olan etkenleri ortadan kaldırmaya yeterli olmasa da 1970'lerin ortasında bu metodlarda gerçekleştirilen değişiklikler daha fazla BSE prionunun yemlere bozulmadan geçmesine neden olmuştur.

Çizelge 3.2 Bildirilmiş BSE vakaları [3].

Ülke	1989–1993	1994–1997	1998–2001	2002–2005	2006–2007	Toplam
Birleşik Krallık	122.325	51.542	8.181	2.323	163	184.534
Avusturya	0	0	1	2	2	5
Almanya	1*	5*	132	237	20	395
A.B.D.	0	0	0	0	2	2
Belçika	0	1	64	66	2	133
Çek Cum.	0	0	2	21	3	26
Danimarka	1*	0	7	7	0	15
Fransa	6	25	484	461	8	984
Hollanda	0	2	26	52	2	82
Japonya	0	0	3	18	12	33
İrlanda	80	188	469	701	57	1.495
İspanya	0	0	83	529	68	680
İsveç	0	0	0	0	1	1
İsviçre	54	229	125	51	5	464
İtalya	0	2*	48	82	7	139
Kanada	1*	0	0	4	7	12
Polonya	0	0	0	39	16	55
Portekiz	6*	88	545	357	33	1.037
Slovakya	0	0	5	18	0	23
Slovenya	0	0	1	5	2	8

*: İthal edilmiş hayvanlarda BSE'ye rastlanmıştır.

Hasta hayvanların öldürülmesinin ardından 1996 ile 2001 yılları arasında BSE vakalarında düşüşler görülmüştür. Ancak tersine aynı süre içinde vCJD vakalarında artış görülmüştür [4], [5]. Bu dönemde Avrupa Birliği de İngiltere'den sığır ve kontamine olasılığı taşıyan yemlerin ihracını engellemiş, üye ülkelerinde sığırlar için belirli standartlar getirmiş ve BSE epidemisini engelleyici kararlar almıştır.

BSE'nin inkübasyon süresi ortalama 5 yıldır (Prusiner, 1998), belirtilerin görülmesinin ardından 1–2 ay içinde ölüm gerçekleşir. Hastalığın sığırlar arasında horizontal geçişi görülmemekte ancak hasta hayvanın doğumu sonrasında yavruya geçişin görüldüğü vakalar bulunmaktadır [3]. BSE'li beyin ekstraktlarının intraserebral aşılama yoluyla ve oral olarak verilmesi sonucunda sığır, koyun, fare, domuz ve minklerde bulaşma görülmüştür (Prusiner, 1998).

BSE'nin belirtileri scrapieyle benzer olarak davranış, duyarlılık ve hareket bozuklukları şeklinde görülür. Davranış bozuklukları sinirlilik, korkaklık, kas titremesi, başın sürekli olarak aşağıda durması, diş gıcırdatma ve salya artışı, başı duvara sürme, burun oynatma ve son safhalarda ise sabit şekilde durma şeklinde görülebilir. Işık, ses ve dokunmaya karşı aşırı duyarlıdırlar, sağında ve baş boyun bölgesine dokunulduğunda şiddetli savunma tepkileri görülür. Hareketlerde yürürken arka bacaklarda uyumsuzluk ve güçsüzlük, dönmede zorlanma görülür. Son safhalarda hayvan yığılıp çöker ya da hareketsiz yatar. Bunun dışında bradikardi, ağırlık kaybı, vücut görünümünde düşüş ve süt üretiminde azalma gibi genel belirtilerde görülür [3].

Ülkemizde 3285 sayılı Hayvan Sağlığı Zabıtası Kanunu'nun 7. ve yönetmeliğin 15. maddesi gereğince 25.05.1990 tarihiyle ülkemizdeki insan ve hayvan sağlığının korunması amacıyla İngiltere, Kuzey İrlanda ve İskoçya'dan çift tırnaklı canlı hayvan, hayvan ürünleri, hayvansal yem katkı maddeleri ve bu maddeleri içeren yemlerin ithali yasaklanmıştır. Ayrıca 27.03.1996 tarihinde Fransa, Portekiz ve İsviçre'ye gelen yasaklamalar daha sonraki yıllarda sırasıyla Hollanda, Belçika, Danimarka, Almanya, İspanya, Lihteynştayn, Lüksemburg ve İtalya içinde getirilmiştir.

3.3 İnsanlarda Prion Hastalıkları

3.3.1 Kuru

Yerel dilde titreme ya da ürperme anlamına gelen kuru, insan prion hastalıklarının klinik özelliklerin anlaşılması hakkında en kapsamlı bilgiyi veren hastalıktır. Kurunun epidemiyolojisi, prionların enfeksiyonel ancak diğer hastalık etkenlerine benzer şekilde bulaşıcı olmadığı ve dikey geçişin (hamilelikte anneden çocuğa geçişin) olmadığını kesin olarak kanıtlamıştır.

Kuru ilk olarak Papua Yeni Gine'nin ulaşımın çok zor olduğu doğu dağlık kesimlerinde yaşayan Foré kabilesi arasında bir epidemiye dönüşmesiyle 1957 yılında keşfedilmiş, Gajdusek ve Zigas (1959) hastalığın dinsel kökenli bir yamyamlık sebebiyle görüldüğünü ortaya koymuştur. Foré kabilesinin inanışına göre bir kişi öldükten sonra özellikle beyni ve diğer iç organları kişinin ruhunun yaşamına kabile halkının bedeninde devam etmesi için yenilirdi. Özellikle ölen kabile erkeklerinin beyninin kişinin ailesi tarafından yenilmesi hastalığın kadınlar ve küçük yaştaki bireylerde daha sık görülmesine neden olmaktaydı (Gajdusek ve Zigas, 1959). 1959 yılında kabile içinde bu tür bir yamyamlığın hastalığa neden olduğunun belirtilerek durdurulmasıyla hastalığın aktarılması engellendi. Hasta kadınların yamyamlığın engellenmesinden sonra doğan ya da bu dinsel inanışa katılmamış çocuklarında hastalığa daha sonra rastlanmamıştır.

Hastalığın ilk ortaya çıkışının sporadik bir mutasyon olduğu, bu kişinin ölümünün ardından da beyninin dinsel inanış nedeniyle yenmesiyle diğer bireylere geçtiği düşünülmektedir (Gajdusek ve Zigas, 1959). 1959 yılında Hadlow, scrapie ile kuru arasında nöropatolojik benzerlikler bulunduğunu belirtmiş, aynı yıl Klatzo vd. kuru ile CJD arasında da nöropatolojik benzerlikler olduğunu belirtmiştir. 1966 yılında Gajdusek vd. kurunun şempanzelere aktarılabilir bir hastalık olduğunu kanıtlamasının ardından 1968 yılında Gajdusek vd. CJD'nin de şempanzelere aktarılabilirliğini kanıtlamıştır (Dalsgaard, 2002).

Hastalığın belirtileri değişmez bir şekilde başlarda baş ağrısı ve eklem ağrıları, 6 ile 12 hafta sonrasında ek olarak titreme ile ataksi (kas gücü eksilmeden istemli hareketlerde düzensizlik görümesi) ve bu nedenle yürümekte zorluktur. Hastalığın ileri safhalarında birey ayağa kalkmakta ve ayakta durmakta zorluk yaşamakta, bunama görülmekte, nefes alma zorluğu, deride yaralar ve yorgunluk nedeniyle semptomların ilk ortaya çıkışının 6–24 ay sonrasında ölmektedir. Bu safhalar sırasında hasta bireyde gülme, uygunsuz ruh hali değişiklikleri ve delirme gibi davranışsal belirtiler görülmektedir. Kurunun inkübasyon süresi 4,5 yıl gibi kısa

sürelili olabildiği gibi yamyamlığın kaldırılmasının öncesinde hastalığa neden olan prionu almış olan bireylerde 30–40 yıl sonra da hastalık görülmüştür (Prusiner, 1993; Gajdusek ve Zigas, 1959; Dalsgaard, 2002).

3.3.2 Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD)

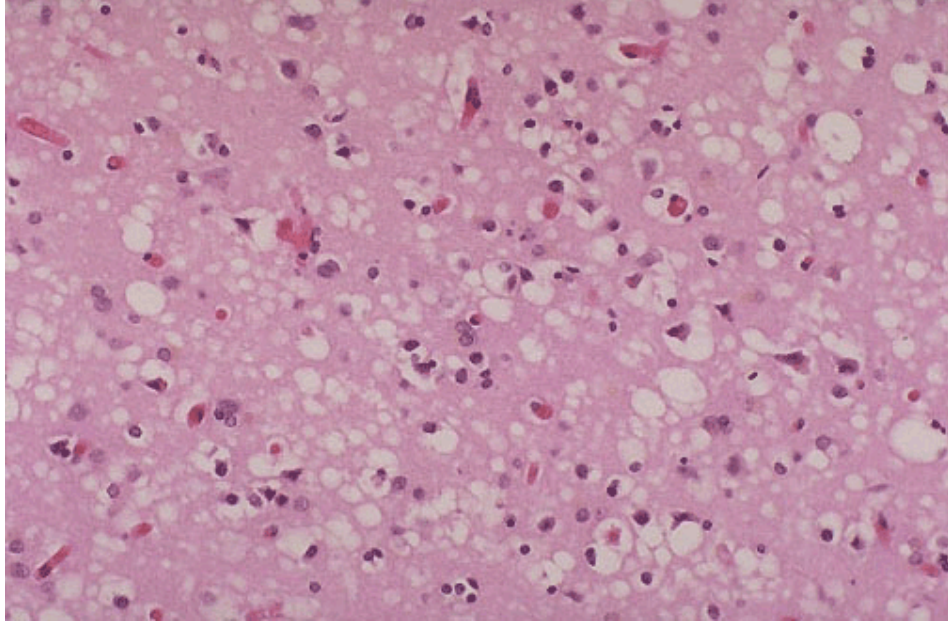
Bilinen en yaygın insan prion hastalığıdır ve dünya çapında milyonda 1 görülme sıklığına sahiptir. Bunun dışında görülme nedenlerine bakılarak CJD, sporadik (sCJD), ailesel (fCJD), iatrojenik (iCJD) ve varyant (vCJD) olmak üzere 4 alt kategoriye ayrılabilir (Prusiner, 1998; Aguzzi, 2006).

Sporadik olgular birçok CJD vakasını ve az sayıda GSS hastalığını kapsar. Hastalığın görülme nedeni bilinmemektedir, bu hastalarda prion geninde mutasyonlara rastlanmamıştır. Hastalığın oluşmasında başka insanlardan ya da hayvanlarda hastalığa neden olan prion proteinlerinin alınması, *Prnp* geninde oluşan somatik mutasyonlar ya da PrP^C 'nin spontane şekilde hastalığa neden olacak başka bir forma dönüşmesi gibi hipotezler bulunmaktadır (Gajdusek, 1977; Hsiao vd., 1989; Prusiner, 1989). Bunun dışında başka bir insan ya da hayvan prion hastalığı ile sCJD arasında bağlantı kurmaya yönelik çalışmalar başarıya ulaşmamıştır (Prusiner, 1998).

Ailesel CJD otozomal olarak kalıtılan ve prion proteinini kodlayan *Prnp* geninde oluşan mutasyonlar sonucu görülür (Hsiao vd., 1989). Hastalık ileri yaşlarda (50–70) artmış PrP^{Sc} birikimi nedeniyle unutkanlıkla başlar, bunama, halusinasyonlar, kişilik değişiklikleri, tremor, hareket koordinasyon bozuklukları, serebellar ataksi, felç, koma ve ölüm şeklinde bir seyir izler. *Prnp* dışında bazı lokuslarında insanda fCJD'ye neden olduğu ileri sürülse de (Jackson ve Collinge, 2001) bazı araştırmacılar bunun doğruluğundan şüphe etmektedir. Bütün fCJD vakaları *Prnp* mutasyonlarıyla ilişkili olsa da bazı *Prnp* mutasyonlarının protein hastalıklarından farklı protein bozukluklarına neden olması mümkündür. Bu duruma örnekler farede tanımlanmıştır ve hem farede hem de insanda oktapeptid tekrar genişlemesi mutantları şeklinde örneklenmiştir (Aguzzi, 2006).

Hastalığa neden olan mutasyonlar dışında *Prnp* geni prion hastalıklarına duyarlılığa neden olan polimorfizmleri kapsayabilir. Bu konuyla ilgili ilk düşünceler görülen ilk vCJD vakalarıyla ortaya çıkmıştır. 1986'da başlayan BSE salgınının geç fark edilmesi, hastalığın insanlara geçişinin önlenmesinde de geç kalınmasına neden olmuştur. vCJD'nin ilk hastaları 1995 Mayıs ve Ekim aylarında İngiltere'de teşhis edilen 16, 19 ve 29 yaşlarında ve geniş plak oluşumuna sahip bireylerdi. Hastalarda CJD ile benzer semptomlar görülmesine rağmen

yaşlarının daha genç olması hastalığın nedeninin genetik kökenli olmadığını göstermekteydi. Yapılan incelemeler sonucunda CJD'den farklı olarak hasta bireylerde genç yaşta görülen psikiyatrik değişiklikler, gözle görülür düzeyde hareket koordinasyon bozukluğu, periyodik elektroensefalografik aktivite eksikliği bulunmaktaydı. vCJD'ye benzer semptom gösteren bireyler daha sonra diğer ülkelerde de görülmüş, bu kişilerin bir süre boyunca İngiltere'de ikamet ettikleri ya da BSE'li hayvanlardan hazırlanarak ihraç edilmiş konserve tükettikleri anlaşılmıştır (Brown, 2001).



Şekil 3.2 İnsan beyninde klasik CJD sonucu oluşan spongiform görünüm [6].

vCJD hastalarında yapılan araştırmalar BSE'li et tüketimi dışında *Prnp* geninin 129. kodonundaki polimorfizmlerinde etkili olduğunu düşündürmektedir (Collinge vd., 1996; Zeidler vd., 1997; Brown, 2001; Aguzzi, 2006). Kafkas ırkının 129. kodon açısından %50'si Metionin/Valin, %40'ı Metionin/Metionin ve %10'u Valin/Valin olduğu bilinirken, dünya çapındaki 76 hastada yapılan incelemeler bütün bireylerin Metionin/Metionin homozigot olduklarını göstermiştir. Bu durumun BSE kökeni için hastalığa duyarlılığa neden olduğu, diğer genotiplerin vCJD dışında kuru ve iCJD içinde dirençliliğe ya da daha uzun inkübasyon süresine neden olduğu gösterilmiştir (Collinge vd., 1996; Zeidler vd., 1997; Brown vd., 2001). *Prnp* genindeki polimorfizmler üzerinde yapılan çalışmalar 219. kodondaki glutamin/lizin amino asit değişiminin sCJD'ye direnç sağladığını göstermiştir (Shibuya vd., 1998). vCJD'nin inkübasyon süresi bilinmediği için olası bir salgının kapsamı da bilinmemektedir. Eğer hastalığın inkübasyon süresi 10 ile 15 yıl arasındaysa önümüzdeki yıllarda vCJD

hastalarında artış görülebilir.

Çizelge 3.3 Klasik CJD ile vCJD arasındaki klinik ve patolojik farklılıklar, [6]' dan alıntılanmıştır.

Ayırt edici özellik	Klasik CJD	vCJD
Ortalama ölüm yaşı	68	28
Hastalığın ortalama süresi	4–5 ay	13–14 ay
Klinik belirtiler/semptomlar	Bunama, erken nörolojik belirtiler	Dikkat çekici psikiyatrik ve davranışsal semptomlar, gecikmiş nörolojik belirtiler, dokunma hissinde bozulma
EEG’de periyodik keskin dalgalar	Sıklıkla görülür	Sıklıkla görülmez
MR’da Pulvinar işaret	Görülmemiştir	Vakaların %75’inden fazlasında görülmüştür
Nöropatolojide florid plakların varlığı	Oldukça az ya da hiç görülmemiştir	Çok fazla sayıda görülmüştür
Beyin dokusunun immünohistokimyasal analizi	Değişik türde birikmeler	İşaretlenmiş proteaz dirençli prion proteinin birikimi
Lenf dokusunda hastalık yapıcı etkenin varlığı	Kolayca belirlenmez	Kolayca belirlenir
Proteaza dirençli prion proteini immüno blot analizinde artmış glikoform oranı	Görülmemiştir	İşaretlenmiş proteaz dirençli prion proteinin birikimi

Şu anda inkübasyon safhasında olan ve bu nedenle tespit edilememiş Dünya'nın birçok ülkesinde bulunan hastalar ise farklı bir risk oluşturmaktadır. iCJD yani iatrojenik olarak (tıbbi müdahale nedeniyle istenmeyen şekilde oluşan) görülen CJD, özellikle nörolojik amaçlı ameliyatlar, endoskopiler, organ nakilleri gibi operasyonlar sonucunda kontamine olan kullan-at olmayan tıbbi ekipmanların prionlardan arındırılacak şekilde dezenfekte edilmemesi nedeniyle oluşmaktadır (Brown vd., 2001). Bu şekilde bir bulaşma sonucu ilk ölen birey, CJD nedeniyle ölmüş bir hastanın korneasının nakli nedeniyle enfekte olmuş daha sonra CJD nedeniyle ölmüştür. Bunun dışında kan bağışı (Peden vd., 2004) veya ölmüş hasta bireylerin hipofiz salgılarının (özellikle gonadotropin) ihtiyacı olan hastalarda kullanılması da iCJD'nin oluşmasına neden olabilir (Aguzzi, 2006).

iCJD'nin oluşumunu azaltmak için Dünya Sağlık Organizasyonu tarafından tavsiye edilen dezenfeksiyon metodu kullan-at olmayan ameliyat aletlerinin bir saat boyunca 1M NaOH içerisinde bekletilmesi ve daha sonra 134 °C' de otoklavlanmasıdır [6].

3.3.3 Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) hastalığı

İnsan PrP geninde meydana gelen mutasyon sonucu tüm dünyada 100 milyonda 1 oranında görülen nadir bir kalıtsal otozomal hastalıktır ve bugüne kadar dünyada 24 ailede tanımlanmıştır. PrP geninde oluşan nokta mutasyonu sonucunda 102. pozisyonundaki kodonda prolin amino asidi yerine lösin amino asidi (P102L) yer alması GSS hastalığına neden olur (Prusiner, 1998).

GSS hastalığı 35–55 yaşlarında ortaya çıkar ve belirtilerin ortaya çıkmasının ardından 2 ile 10 yıl sonra ölüm gerçekleşir. Hastalığın erken aşamalarında spingoserebellar dejenerasyon nedeniyle değişik düzeylerde kas koordinasyon bozukluğu (ataksi), hantallık, titreme ve yürüme bozukluğu görülür. Hastalık ilerledikçe koordinasyon bozukluğu artarken merkezi sinir sistemi üzerinde etkiler başlar ve çoğu hastada bunama görülür. Diğer semptomlar konuşurken heceleri karıştırma, nistagmus (gözlerin istemsiz hareket etmesi), kas sertliği ve bazen körlüğe varan görüş bozukluklarıdır. Bu semptomlar dışında sağırılık oluşumu ve Parkinson hastalığına benzer özelliklerde görülmektedir. Ayrıca hasta ağır depresyona girer ve psikoz görülür. Hastalığın ilerleyen safhalarında birey normal yaşama fonksiyonlarını kaybederek komaya girer, bunun ardından da ikincil bir enfeksiyon sonucunda da ölüm gerçekleşir.

Hasta bireylerin merkezi sinir sisteminde spongiform oluşumlar oldukça az düzeydedir ya da görülmez. Nöronal kayıp ve astrositoz tipik olarak beyinde görülür. Hastalığın günümüzde herhangi bir tedavisi bulunmamaktadır [7].

3.4 Diğer Canlılarda Prion Hastalıkları

3.4.1 CWD

Doğal ortamlarında yaşamakta olan hayvanlarda görüldüğü bilinen ilk prion hastalığıdır. Hastalık ilk olarak 1967’de Amerika’nın Colorado ve Wyoming eyaletlerine ait vahşi yaşamı araştırma birimleri tarafından kontrol altında tutulan mule (katırlık) geyiklerinde bilinmeyen bir klinik sendrom olarak tanımlanmıştır (Watts vd., 2006; Williams, 2003). 1978’de hasta hayvanların merkezi sinir sistemlerinde yapılan histopatolojik kontroller biyokimyasal ve histopatolojik özellikleri bakımından prion hastalıklarıyla örtüştüğünü göstermiştir (Williams ve Young, 1980).

Şu anda doğada *Cervidae* ailesinin CWD’ye dirençsiz olduğu bilinen üç türü bulunmaktadır: mule geyik, beyaz kuyruklu geyik (*Odocoileus virginianus*) ve Rocky Dağı geyiği (*Cervus elaphus nelsoni*). Bununla birlikte CWD yatay geçişin çok yaygın olarak görüldüğü bir hastalıktır (Miller vd., 1998; Miller vd., 2000). Bu nedenle CWD çok hızlı bir yayılma etkisine sahiptir (bazı yerel geyik popülasyonlarının %30’unda ve araştırma fakültelerinde bakılanların %100’ünde) ve şu anda Kuzey Amerika’da doğada bulunan ve kontrol altında bulunan geyikleri arasında yayılmaktadır. Bu yayılım CWD şu anda sadece üç türü etkilese de BSE benzerinde olduğu gibi tür bariyerini aşarak insanlar ve diğer canlı türlerine etkileyebileceği şeklinde kaygı uyandırmaktadır (Raymond vd., 2000; Mathiason vd., 2006).

4. PrP GENİ

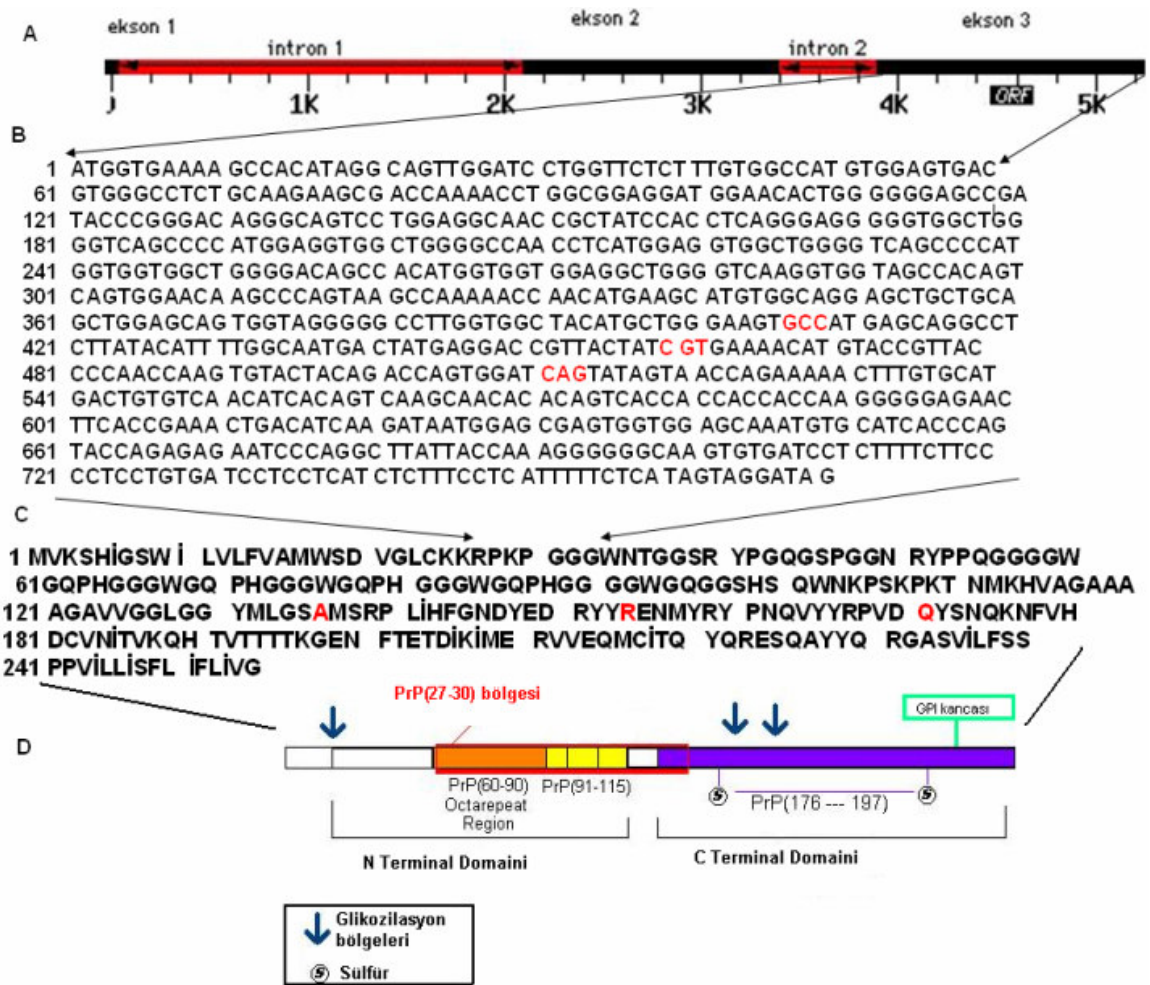
Beyin, milyonlarca nöron ile bu sayının 10–50 katı da destek hücresi ve gliadan oluşan kompleks bir organdır; hepsi olmasa da bütün bu hücreler prion proteinini sentezler (Hope, 2000). Sinir sistemi dışındaki diğer bazı dokularda (lenf dokuları, lökositler ve periferik organlar) değişik düzeylerde prion proteinini sentezler (Brown vd., 1990; Makrinou vd., 2002). PrP geni memelilerde evrim sırasında yüksek oranda korunmuştur ve benzerleri memeli olmayan kaplumbağa, tavuk, amfibiler ve balıkta da bulunmaktadır (Klingeborn, 2006). DNA hibridizasyonu ile yapılan çalışmalar memelilerinkinden farklı da olsa benzer *Drosophila*, *C. Elegans* ve mayalarda da prion benzeri genlerin varlığını kanıtlamıştır (Iwasaki vd., 1992). Bu durum PrP'nin muhtemelen evrimin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıktığını göstermektedir (Goldmann., 1993). Gen, insanlarda *Prnp* geni olarak, farede *Prn-p* ve diğer canlılarda PrP geni olarak gösterilir.

4.1 Koyun Prion Geni

PrP geni koyunda 13. kromozomda üzerinde üç ekson ve iki intron içerecek şekilde yer alır (Gama vd., 2006). 768 baz çiftinin 256 amino asitlik prion proteinini kodladığı ORF (Açık okuma bölgesi) üçüncü ekson üzerinde yer almaktadır (Tranulis, 2002). Koyunlara benzer şekilde fare, sığır ve sıçan PrP geni de üç eksona sahiptir, benzer şekilde 3. ekson ORF'nin bulunduğu kısımdır. PrP geni Dickinson vd. (1968) tarafından ilk olarak Sip (scrapie incubation period) geni olarak tanımlanmıştır, daha sonra bu tanımlama PrP'yi kodlayan gen olarak değiştirilmiştir.

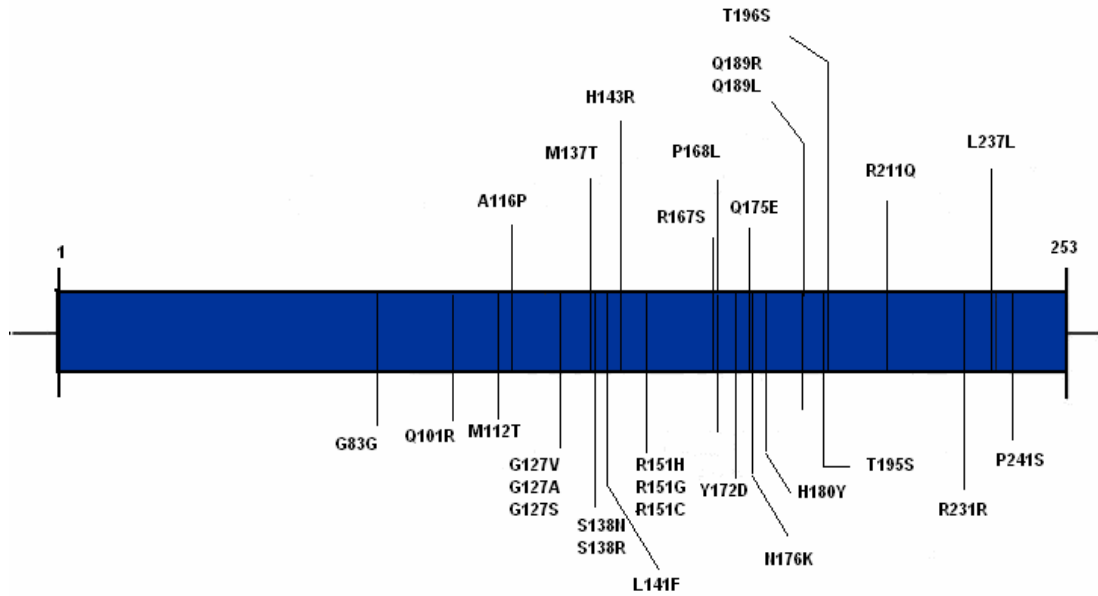
PrP geninin 16 kb aşağısında (downstream) yer alan başka bir ORF bölgesi PrP^C ile belirgin benzerlikler gösteren bir proteini kodlar (Moore vd., 1999). 179 amino asitlik bir proteini kodlayan bu gene *Prnd*, kodladığı proteine ise Dpl (downstream of the *Prnp* locus) adı verilmiştir (Moore vd., 1999). Bu bölge büyük olasılıkla daha önceden yer alan tek bir atasal PrP geninin duplikasyonu sonucunda oluşmuş bir bölgedir; Dpl PrP^C 'nin C terminal ucunun 3'te 2'siyle benzerlik göstermektedir (Moore vd., 1999). *Prnd* geninin koyun, sığır ve insanda da korunmuş olması Dpl'nin evrimsel açıdan önemli olduğunu göstermiştir (Tranulis vd., 2001). Farede yapılan çalışmalarda Dpl yetersiz fareden alınan spermatozoaların ovumun zona pellusidasından geçmeye yeterli akrozom reaksiyonunu gerçekleştiremediğini göstermiştir. Şu anda bunun dışında Dpl'nin prion hastalıklarının oluşumundaki olası etkileşimleriyle ilgili yeterli deneysel veri bulunmamaktadır (Rossi vd., 2001; Aguzzi ve Polymenidou, 2004, Klingeborn, 2006).

Prion hastalıklarının özelliklerinden biri de PrP genindeki mutasyonların/polimorfizmlerin hastalıklara duyarlılıkta rol oynamasıdır. Koyunda 136, 154 ve 171. kodondaki polimorfizmler scrapie duyarlılığında etkilidir (Şekil 3.1). Homolog ARR genotipi dirençliliği sağlarken VRQ genotipi duyarlılığı artırır. Bu iki genotip dışında AHQ ve ARQ genotipleri de sırasıyla göreceli olarak orta düzeyde ya da minimum düzeyde dirençlilik sağlar (Eghiaian vd., 2004). Diğer PrP polimorfizmlerinin insan ve farede prion hastalıklarına duyarlılık ya da inkübasyon süresinde etkili olduğu gösterilse de hiçbir genotipin koyundaki gibi dirençlilik sağladığı bilinmemektedir (Goldmann vd., 1990; Moore vd., 1998; Liemann ve Glockshuber, 1999).



Şekil 4.1 A- Koyun PrP geni. B- Koyun PrP gen dizisi; kırmızı renkte gösterilen kodonlar scrapieye duyarlılığı belirleyen polimorfizmlerin olduğu kodonlardır; üstten sırasıyla 136., 154. ve 171. kodonlar (Genbank ulaşım numarası: AF195247). C- Koyun PrP geni amino asit dizisi; kırmızı renkte gösterilen amino asitler polimorfizmlerin olduğu amino asitlerdir. D- PrP proteininin şematik olarak görünümü.

Koyun ve keçilerde dirençlilik ve ya duyarlılık sağladığı tam olarak bilinmeyen ancak sıklıkla görülen diğer polimorfizmler TRR, TRQ, ARK, ARH, VHQ ve VRR'dir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda 141. kodondaki fenilalanin amino asidinin değişiminin de Nor 98 atipik scrapie hastalığının görülmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Benestad vd., 2003; Moum vd., 2005). 142. kodondaki metionin amino asidinin değişiminin de deneysel amaçlı oluşturulmuş scrapie ve BSE'de inkübasyon süresini uzattığı görülmüştür (Goldmann vd., 1996).



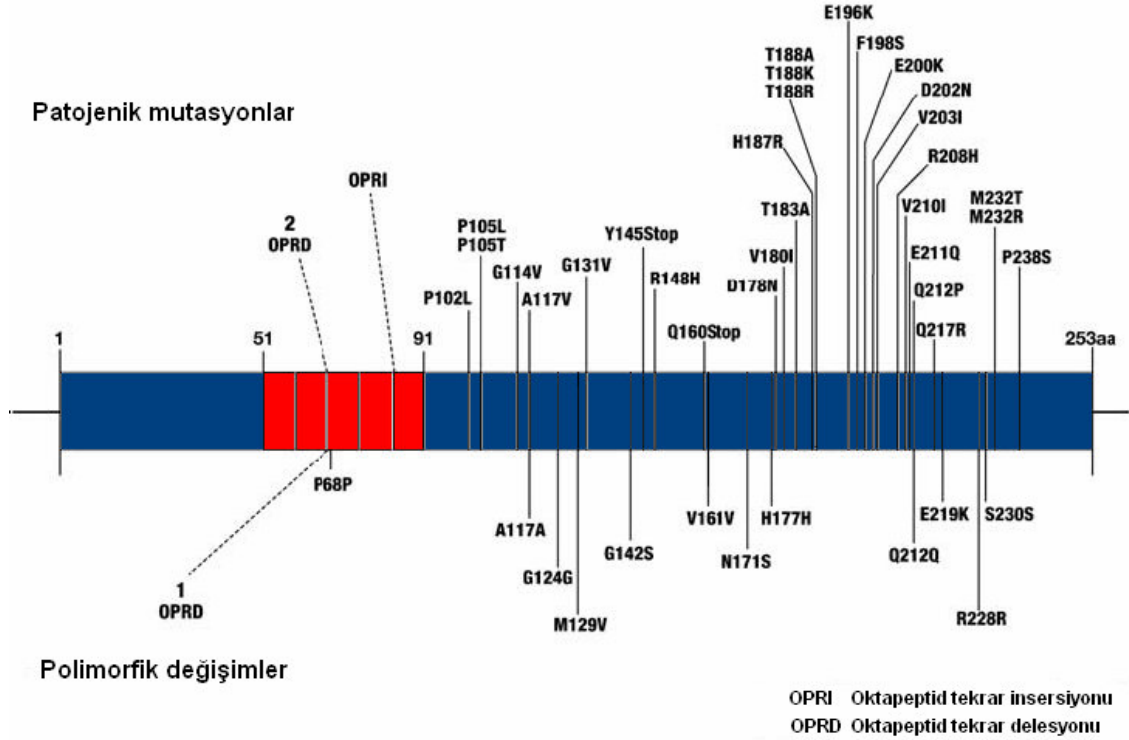
Şekil 4.2 Koyun PrP geninde görülen polimorfizmler, (Goldmann vd., 2005)'deki polimorfizmlerden yararlanılarak çizilmiştir.

4.2 İnsan *Prnp* Geni

İnsanda *Prnp* geni 20. kromozomun kısa kolunda, ORF'i ise koyundan farklı olarak 2 eksona sahip genin 2. eksonunda yer alır (Basler vd., 1986; Kretzschmar vd., 1986; Puckett vd., 1991; Lee vd., 1998; Makrinou vd., 2002). İnsan *Prnp* geni koyundan farklı olarak 256 yerine 253 amino asitlik bir protein kodlar (Klingeborn, 2006).

İnsanda prion hastalıkları için bilinen hiçbir duyarlılık ya da direnç alleli bulunmamaktadır. Ancak vCJD'nin ortaya çıkmasının ardından yapılan çalışmalar bu hastalığın 129.kodondaki Metionin/Metionin homozigotluğu sonucunda bir duyarlılığın oluştuğunu göstermiştir. Aynı kodondaki metionin dışında taşınan diğer amino asitler vCJD dışında kuru ve iCJD hastalığı

için göreceli bir dirençlilik oluşturmaktadır. Üreme hücrelerinin PrP genlerinde 129. kodondaki mutasyonlar ile metionin amino asidi değişimi ayrıca bazen Ölümcül Ailesel Uykusuzluk hastalığına (FFI) neden olabilmektedir. Yine aynı hücrelerde 178. kodondaki aspartik asit – asparagin amino asit değişimleri de FFI'ye neden olabilmektedir (Prusiner, 1998). 102. kodonda meydana gelen mutasyonlar ise GSS hastalığına yol açmaktadır. Bu mutasyon dışında daha düşük oranda görülen 105., 117., 145., 198., ve 217. kodonda meydana gelen mutasyonlarda GSS'ye neden olmaktadır (Belay, 1999).



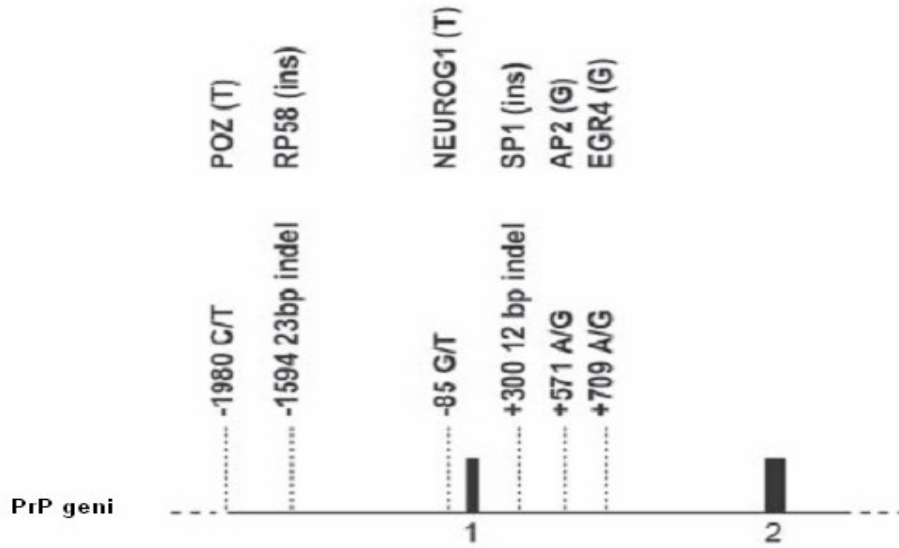
Şekil 4.3 İnsan *Prnp* geninde hastalık oluşturduğu tespit edilmiş ya da şüphelenilen mutasyonlar ve polimorfik değişimler, (Mead, 2006)'dan uyarlanılmıştır.

4.3 Sığır Prion Geni

29 kromozoma sahip sığırdaki prion geni 13. kromozom üzerinde yer almaktadır. Prion geni koyunda olduğu gibi 2 intron ve 3 ekson içermektedir. Prion molekülü de benzer şekilde 3. eksondan sentezlenir. BSE ile ilgili çalışmalar başladığında ilgilenilen ilk konu çeşitli bulaşıcı spongiform ensefalopatiler ve koyunda scrapieye olduğu gibi sığırlarda da BSE'ye karşı duyarlılık/dirençliliğin canlının genotipine bağlı olup olmadığı şeklindeydi. İlk yapılan çalışmalar sığırlarda PrP geninin kodlama yapan bölgesinde oluşan polimorfizmlerin BSE duyarlılığında etkisi olmadığını göstermiştir. Bununla beraber PrP geninin promotor bölgesinin PrP molekülünün sentezini düzenlediği, bu nedenle inkübasyon süresi üzerinde bir

etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (Bossers vd., 1996). Sander vd. (2005) yaptıkları çalışmayla PrP geni promoter bölgesinde oluşan polimorfizmlerin BSE duyarlılığıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Sander vd. (2004) sağlıklı ve BSE'li sığırlarda yaptıkları çalışmada en sık görülen polimorfizmlerin sığır PrP geni promoter bölgesi üzerinde gerçekleşen ikili insersiyonlar (ins/ins) ya da ikili delesyonlar (del/del) olduğunu, sağlıklı sığırlarda (ins/ins) polimorfizminin, hastalıklı sığırlarda ise (del/del) polimorfizminin daha sık olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra yaptıkları çalışmada (2005) promoter bölgenin transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı kısmında gerçekleşen insersiyon/delesyon polimorfizm araştırılmış, RP58 ve SP1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinde oluşan insersiyonların aynı bölgede oluşan delesyonlara göre PrP molekülünün sentezlenme düzeyini düşürdüğünü, bu nedenle hastalığın inkübasyon süresinin arttığını göstermişlerdir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4 Sığır PrP geni üzerinde meydana gelen insersiyon ve delesyonlar ve bu polimorfizmler sonucu bağlanma bölgeleri etkilenen transkripsiyon faktörleri (Sander vd., 2005)'den alıntılanmıştır.

5. MATERYAL METOD

5.1 Hayvan Materyali

Çalışmamızda Bandırma Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilmekte olan melez ırklardan yararlanılmıştır. Bu amaçla 43 Kıvırcık-Alman siyah başlı melezi, 45 Rambouillet-Dağlıç (Ramlıç) melezi ve 45 Hampshire-Merinos melezinden kan alınarak genotipleri çalışılmıştır. Her 3 melez ırkı da yetiştiriciye yüksek et verimine sahip alternatif ırkların elde edilmesi amacıyla üretilmiştir.

Hampshire-Merinos melez ırkı

Baba hattı olarak kullanılan Hampshire down ırkı ile Karacabey Merinos ırkı melezlenerek elde edilmiştir. Melezleme F1 düzeyinde, kendi erkeği dişi ile çiftleştirilerek F2 genotipli koyunlar elde edilmiştir. Elde edilen %50 Hampshire down ve %50 Karacabey Merinosu genotipine Hampshire-Merinos denilmiştir. Hampshire down koyunu dünyanın her tarafına yayılmış, et koyunu üretimi için tercih edilen bir türdür. Melezlemenin yapılma nedeni Hampshire'nin et kalitesini Merinos ırkına aktarmaktır.

Ramliç melez ırkı

Dağlıç'ın var olan koşullardaki yüksek yaşam gücü ve Rambouillet ırkının iyi olan et yapağı verim özelliklerinin birleştirilmesi amacıyla üretilmiş bir melez ırktır. Rambouillet koç ve Dağlıç koyun çiftleştirilerek elde edilen F1 dölünün dişi Rambouillet koçla çiftleştirilerek G1 genotipli koyunlar elde edilmiştir. G1 koç ve F1 koyun çiftleştirilerek elde edilen G1F1 koyunların dişilerinin G1 koçlarla çiftleştirilmesi sonucunda Ramliç koyunlar elde edilir. Ramliç koyunu % 60–65 oranında Rambouillet ve % 30–35 Dağlıç genotipi taşımaktadır.

Kıvırcık- Alman siyah başlı melez ırkı

Kıvırcıkların döl verimini ve et verimi düzeyini arttırmak, aynı zamanda Alman siyah başlı ırkının bölgeye adaptasyon özelliklerinden yararlanmak amacıyla oluşturulan bir melez ırktır. Siyah başlı alman koç ile Kıvırcık koyunun çiftleştirilmesiyle F1 dölü elde edilmiş, F1 dölünün dişilerinin Siyah başlı koçlarla çiftleştirilmesiyle de G1 melez ırkı elde edilmiştir.

5.2 Kimyasallar

Çizelge 5.1 Çalışma sırasında kullanılan kimyasal listesi

Kullanılan kimyasalın adı	Üretici firmanın adı	Katalog No
NH ₄ Cl	Sigma - Japonya	017K01282
KHCO ₃	Sigma - ABD	09012ME
EDTA	Sigma - ABD	066K0018
NaCl	Calbiochem – Almanya	567441
C ₂ H ₇ NO ₂	Fluka – Hollanda	1345818
SDS	Sigma – Japonya	015K0179
Proteinaz K	Roche – Almanya	03115836001
Agaroz	Sigma – ABD	025K01041
TBE Buffer (10x)	Amresco – ABD	2758L42
EtBr	Sigma – ABD	083K8937
Loading Buffer (6x)	Takara – Japonya	A129
dNTP seti (4x25 µmol)	Fermentas	00016618
Taq DNA polimeraz	Fermentas	00016337
PCR Reaksiyon Buffer (10x)	BioBasic	37A
MgCl ₂	BioBasic	37B
Primer	İontek – İstanbul	Sipariş No:0708011533

5.3 DNA İzolasyonu

Genomik DNA, EDTA'lı tüplere alınarak -20 °C'de saklanmış kanların çözülmesinin ardından amonyum asetatlı tuzla çöktürme (Miller vd., 1998) yöntemiyle izole edilmiştir.

Kan alımı sonrasında pıhtı oluşumunu önlemek için tüpler iyice çalkalanarak EDTA'nın yayılması sağlanmıştır.

Kandan 2 ml alınarak üzerine alyuvarların hücre duvarlarını ozmozla parçalayarak genetik materyalin serbest kalmasını sağlayacak Lizis bufferden 15 ml eklenir ve vortekslenir. 15 dk. buzdolabından bekletilir. 15 dk sonunda 6600 rpm'de 4 °C'de 11 dk. santrifüjlenerek genetik materyal ve membran fraksiyonu ayrılır. Üst sıvı DNA'yı içeren pellete zarar vermeden dökülür. Pellet üzerine 10 ml Lizis buffer eklenerek vortekslenir. 6600 rpm'de 4 °C'de 11 dk. tekrar santrifüjlenir. Santrifüj sonunda üst sıvı pelletten ayrılan kısmın dökülmemesine dikkat edilerek dökülür. Pellet üzerine 3 ml Nükleaz buffer, 400 µl steril distile su, 50 µl SDS ve 30 µl Proteinaz K eklenerek kısa süreyle vortekslenir. 37 °C'de 1 gece veya 56 °C'de 3 saat bekletilir.

İnkübasyondan sonra tüpe 1,8 ml amonyum asetat eklenir, düşük seviyede kısa süre vortekslenir. 10600 rpm'de 4 °C'de 25 dk santrifüjlenir. Süpernatant kirlilik oluşturmaması için pellet karıştırılmadan dikkatlice başka bir tüpe alınır. Süpernatant %99'luk soğuk etanol ile 15 ml'ye tamamlanır. Tüp hafifçe çalkalanır ve yavaşça DNA ipliğinin olduğu görülür. DNA steril pipet ucuyla tüpün kenarından etanol süzülerek alınır ve 400 µl steril distile su içeren eppendorf tüpe aktarılır, oda sıcaklığında etanol uçana kadar birkaç gün bekletilir. DNA hemen çalışılmayacaksa - 20 °C'de saklanır.

5.4 PCR işlemi

Polimeraz zincir reaksiyon işlemi 1985'te Kary Mullis tarafından bulunan ve herhangi bir organizmaya ait DNA materyalindeki özgül bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan in vitro DNA sentez yöntemidir. PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için kalıp DNA molekülü, bu DNA molekülüne uygun dizayn edilmiş primerler, deoksiniükleotidler, DNA polimeraz enzimi ve magnezyum içeren reaksiyon tamponu gereklidir. PCR işlemi tekrarlanan 3 basamağa dayanır: Çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu, primerlerin DNA'daki hedef bölgelere özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıkta bağlanma reaksiyonu ve Taq polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72 °C'de primerlerin uzaması ile tamamlayıcı zincir sentezi. Günümüzde PCR işlemi kalıtsal hastalıkların taşıyıcı ve hasta

tanısında, prenatal tanıda, patojen organizmaların tanınmasında, adli tıpta, kanser çalışmalarında, DNA dizi analizlerinde, bilinmeyen dizilerin belirlenmesinde, evrim çalışmalarında, RFLP analizinde, invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerde gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Arı vd., 1999;[9], [10]).

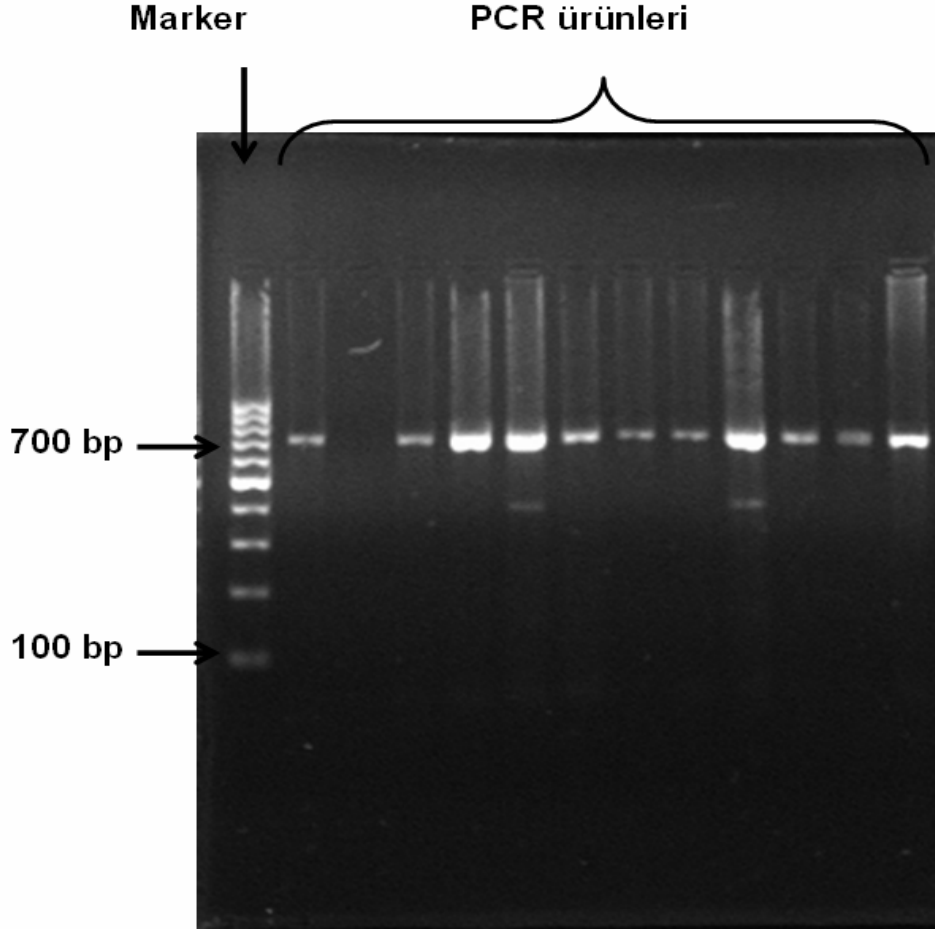
Çalışmamızda PCR işlemiyle çoğaltılacak olan *PrP* kodlama bölgesi (Gen-Bank ulaşım numarası AF195247 nükleotid 8-752'den) için kullanılan primer dizileri aşağıdaki şekilde dizayn edilmiştir:

Forward primer: 5'-AAAGCCACATAGGCAGTTG-3'

Reverse primer: 5'-AATGAGGAAAGAGATGAGGAG-3'

PCR işlemi, 25 µl'lik eppendorf tüplerde 3 µl (50-100 ng) genomik DNA, 14, 9 µl 1x Mg⁺²'siz reaksiyon bufferi, 2 µl MgCl₂ (2,5 mM), her dNTP'den 0,1 µl, primerlerden 1 µl (10 µM) ve 0,2 µl 1U Taq polimeraz ile DNA Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR çoğaltım işleminin koşulları 2 dakika 94 °C'de denatürasyon aşaması, 30 siklus boyunca 94 °C'de 1 dakika, 57 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika DNA uzaması aşaması ve son siklus sonunda 10 dakika 72 °C'de bekleme şeklindedir.

PCR ürünleri daha sonra %2'lik agaroz jelde 110 V'de 15 dk. yürütülerek uzun dalga boylu UV cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.



Şekil 5.1 PCR işlemi ile çoğaltılmış ovPrP geni agaroz jel elektroforezi. 100 bp'lik marker ve PCR işlemi ile PrP gen bölgesi çoğaltılmış Hampshire-Merinos melez ırkına ait PCR ürünleri. PCR işlemi ardından agaroz jel elektroforezinde 110 V'ta 15 ile 25 dk. yürütülen ürünler UV görüntüleme cihazı ile fotoğraflandı.

5.5 Sekanslama

Sekanslama yani DNA dizi analizi işlemi, DNA dizilerinin baz dizilim sıralarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Özel aletler tarafından otomatik olarak yapılan sekanslama işlemi Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yönteminin gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmasıyla gerçekleştirilir. Bu otomatik sistemlerde Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metodla farklı bazlarda sonlanan DNA sentez ürünlerine farklı renkte floresans veren boyalar eklenir. Elektroforez işlemi kapillerde, örnek kapillerden geçerken uygulanır. Bu geçiş sırasında floresans boyaları uyarmak için bir lazer, boyalardan yayılan ışığı toplamak içinse bir CDD kamera kullanılır. Geçiş sırasında lazer uyarımının ardından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık böylece kamera tarafından ayırt edilir.

Floresans miktarının ölçülmesi ve ardından yorumlanmasıyla DNA örneğinin baz dizisi saptanır.

5.6 Sekansların Değerlendirilmesi ve Genotiplerin Belirlenmesi

Çalışmamızda sekanslama işlemi İontek Firması (İstanbul) tarafından gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin saflaştırılmasının ardından forward primer kullanılarak sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir. 136., 154. ve 171. kodonlardaki tek nükleotid polimorfizmleri ChromasPro [11] yazılımı ile direkt olarak kontrol edilmiştir. Geri kalan PrP gen dizilerinin karşılaştırılması DNAMAN v3.2 paket yazılım programı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

6. SONUÇLAR

6.1 Allel Frekansları

Üç melez ırkın dünyada en sık görülme oranlarına sahip alleller olan ARR, ARQ, AHQ, VRQ, TRQ ve ARH allel frekansları araştırılmıştır. En sık allel frekansı ARR'dir (0,5451), onun ardından en sık görülen frekanslar ARQ (0, 3684) ve ARK (0,0602)' dur. En az görülen allel frekansları ise (0,0038) ile VRQ ve VRR'dir.

En dirençli allel olan ARR alleli tüm ırklarda en yüksek frekansa sahip olarak görülmektedir. Bunun dışında duyarlılığa neden olan VRQ alleleline ise sadece iki kez rastlanmıştır.

Dünyada en sık görülen allel frekansları dışında Siyah başlı Alman-Kıvırcık melezlerinde VRR (0,0116), ARL (0,0116) ve TRQ (0,0233) allellerine rastlanmıştır. Hampshire-Merinos melezlerinde aynı şekilde ARL (0,0222) alleleline ve Ramlıç melezlerinde ise ARK (0,1778) allellerine rastlanmıştır. Sadece Ramlıç melezlerinde görülen ARK alleli bu melez ırkta en sık görülen 3. alleldir. VRQ ve TRQ allelleri ise sadece Siyah başlı Alman-Kıvırcık melezlerinde görülmektedir.

Çizelge 6.1 Melez ırkların allel frekansları

PrP alleli	SbA. x Kıvırcık	Hamps. x Merinos	Rambouil.x Dağlıç
ARR	0,6977	0,4889	0,4556
ARQ	0,2442	0,4889	0,3667
VRQ	0,0116	0,0000	0,0000
VRR	0,0116	0,0000	0,0000
TRQ	0,0233	0,0000	0,0000
ARK	0,0111	0,0000	0,1778
ARL	0,0116	0,0222	0,0000

Çizelge 6.2 Melez ırklarda kodonlara göre dirençli ve duyarlı allellerin yüzdesel dağılımı.

	Sayı	136. kodon (%)			154. kodon (%)			171. kodon (%)		
İrki		AA	AV	VV	RR	RH	HH	RR	RQ	QQ
SbA.x Kıvırcık	45	91,1	4,4	-	100	-	-	51,1	40	6,6
Hamp.xMerinos	45	100	-	-	100	-	-	33,3	31,1	33,3
Ramb. x Dağlıç	45	100	-	-	100	-	-	26,6	37,7	15,5

6.2 Genotip Frekansları

Melez ırklarda tespit edilen genotipler 10 farklı şekildedir, bunlar; ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/VRQ, ARR/VRR, ARR/TRQ, ARQ/ARQ, ARQ/ARK, ARQ/ARL, ARK/ARK ve ARL/ARL'dir. Daha önce Tongue ve arkadaşları (2004) yaptığı çalışmada sık rastlanan genotipleri scrapie için dirençlilikten duyarlılığa olacak şekilde 5 farklı risk grubuna ayırmıştır. Bu risk gruplarına göre çalışmamızda kullanılan melez ırkların genotipik değerlendirilmesi Çizelge 6.2'de gösterilmiştir.

Toplam değerlendirmede en sık olarak görülen genotip en dirençli olduğu bilinen ARR/ARR genotipidir. ARR/ARR genotipi Siyah başlı Alman-Kıvırcık ve Hampshire-Merinos melez ırklarında en çok görülen genotiptir. Toplam değerlendirmede ARR/ARR genotipinden sonra en sık görülen genotip ARR/ARQ genotipidir. ARR/ARQ genotipi en sık olarak Ramlıç melez ırkında görülmektedir. Toplam değerlendirmede ARQ/ARQ genotipi ise 3. en çok görülen genotiptir. Bu genotiplerden sonra en sık görülen genotip ARK/ARK genotipidir.

En fazla genotipsel çeşitlik Siyah başlı Alman –Kıvırcık melezinde görülmüştür. Onun ardından, Ramlıç melezinde ve Hampshire-Merinos melezinde eşit sayıda genotipsel çeşitlilik görülmektedir.

Çalışılan tüm melez ırklar arasında scrapie dirençliliği en yüksek olacak şekilde (ARR/ARR) genotipe sahip ırk Siyah başlı Alman–Kıvırcık melezidir. Çalışılan tüm ırklar scrapieye dirençlilik açısından daha değerli genotipe sahiptir ancak bu üç ırk arasında bir kıyaslama yapılırsa en duyarlı melez ırk Ramlıç olarak gözükmemektedir. Duyarlılığa neden olan VRQ genotipine sadece Siyah başlı Alman–Kıvırcık melezinde rastlanmıştır. Allellerde önem taşıyan kodonlara bakıldığında ise en çok çeşitlilik 171. kodonda görülmüş, wild tipte bulunan glutamin (Q) amino asidi yerinde arginin (R), lösin (L) ve lizin (K) amino asitleri gelmiştir.

Çizelge 6.3 Melez ırklardaki PrP genotip frekansları dağılım tablosu.

Risk Grubu	PrP Genotipi	SbA.xKıvırcık (43)	Hamps.xMerinos (45)	Ramlıç (Ramb.xDağlıç) (45)
1	ARR/ARR	0,490	0,333	0,266
2	ARR/TRQ	0,050	0,000	0,000
2	ARR/ARQ	0,320	0,311	0,377
3	ARQ/AHQ	0,000	0,000	0,000
3	ARH/TRQ	0,000	0,000	0,000
3	ARQ/ARK	0,000	0,000	0,044
3	ARQ/ARL	0,025	0,000	0,000
3	ARQ/ARQ	0,070	0,333	0,155
3	ARL/ARL	0,000	0,022	0,000
3	ARK/ARK	0,000	0,000	0,155
4	ARR/VRQ	0,070	0,000	0,000
5	ARR/VRR	0,025	0,000	0,000

6.3 Ek Polimorfizmler

Melez ırkların sekanslanmasının ve 136., 154. ve 171. kodonlarındaki genotiplerinin bakılmasının ardından geri kalan PrP geni dizisi diğer polimorfizmler için tarandı. Bu taramalarda tüm melez ırklarda K176N ve A116E polimorfizmine rastlandı. Bu polimorfizm dışında ek olarak 6 farklı polimorfizm görülmüştür, bunlar; M112T, K113N, A116D, S173N, M173V ve V179E şeklindedir.

Polimorfik çeşitlilik olarak en zengin melez ırk 6 farklı polimorfizmle Ramlıç melezi'dir. Siyah başlı Alman-Kıvırcık melezlerinde A116E polimorfizmi sadece ARR/ARR genotipinde görülmüştür. Aynı şekilde M112T polimorfizmi sadece ARQ/ARQ genotipinde görülmüştür. Bu melez ırkta görülen diğer polimorfizm olan V179E ise ARR/ARR genotipinde 4 örnekte ve ARR/ARQ tek örnekte görülmüştür.

Hampshire-Merinos melez ırkında polimorfizmler tüm genotiplerde görülmüştür. Sadece M173V polimorfizmi ARQ/ARQ genotipinde görülmüştür. A116E polimorfizmi ARR/ARR, ARR/ARQ ve ARQ/ARQ genotiplerinin her birinde 6 örnekte görülmüştür. V179E polimorfizmi ARR/ARR genotipinde 8 kez, ARQ/ARQ genotipinde 5 kez ve ARR/ARQ genotipinde 10 kez görülmüştür. ARL/ARL genotipinde görülen polimorfizmler ise A116E ve V179E' dir.

En çok polimorfizmin görüldüğü Ramlıç melezi'de en az görülen polimorfizm bir kez ARQ/ARQ genotipinde görülen A116D polimorfizmidir. En çok görülen polimorfizm ise 8 kez ARR/ARQ genotipinde görülen V179E polimorfizmidir. K113N polimorfizmi 2 kez ARR/ARR genotipinde ve bir kez de ARR/ARQ genotipinde görülmüştür. A116E polimorfizmi 4 kez ARR/ARR genotipinde, 3'er kez ARR/ARQ ve ARQ/ARK genotipinde, 2 kez ARK/ARK genotipinde ve bir kez de ARQ/ARQ genotipinde görülmüştür. S173N polimorfizmi en çok farklı genotiplerde dağılım gösteren polimorfizm olarak bulunmuştur. Bu polimorfizm ARR/ARR ve ARQ/ARQ genotipinde birer kez, ARR/ARQ genotipinde 2 kez görülmüştür. ARK/ARK genotipinde 173. kodon için AAT-AGT heterozigoluğuna sahip olarak tek bir örnekte ve ARR/ARR genotipinde de aynı heterozigotluk durumu şeklinde 4 kez S173N polimorfizmine rastlanmıştır. Bu melez ırkta en sık görülen polimorfizm olan V179E ise ARR/ARQ genotipinde 8 örnekte, ARR/ARR genotipinde 6 örnekte, ARQ/ARQ genotipinde 2 örnekte ve ARR/ARK genotipinde 3 örnekte görülmüştür (Çizelge 5.3).

Çizelge 6.4 Polimorfizmlerin melez ırklar ve genotiplere göre dağılım sayıları.

	SBA-Kıvırcık			Hamp-Merinos			Ramlıç		
Polimorfizm	ARR/ARR	ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARR/ARR	ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARR/ARR	ARR/ARQ	ARQ/ARQ
M112T	0	0	1	0	0	0	0	0	0
K113N	0	0	0	0	0	0	2	1	0
A116E	4	0	0	6	6	6	4	3	1
A116D	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M173V	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S173N	0	0	0	0	0	0	1	2	1
V179E	4	1	0	8	5	10	6	2	8

6.4 Nor98 Genotip Frekansları ve Polimorfizmler

Nor98 için duyarlılık allelleri scrapie için dirençli olduğu düşünülen ARR, ARQ ve AHQ allelleridir. Bu alleller içerisinde duyarlılığı en fazla olandan daha aza doğru sıralama göreceli olarak ARQ-AHQ-ARR şeklindedir. Çalışmamızda bu alleller için elde edilen genotipler ARR/ARR, ARR/ARQ ve ARQ/ARQ şeklinde olmuştur. Elde edilen sonuçlar bakımında Nor98'e en duyarlı melez ırk ARQ/ARQ homozigot 0,452 genotip frekansıyla Ramlıç melez ırkıdır. Bu melez ırkı ARQ/ARQ homozigot 0,380 genotip frekansıyla Hampshire-Merinos ırkı takip etmektedir. Siyah başlı Alman-Kıvırcık melez ırkı ARQ/ARQ homozigot genotip frekansı 0,024'tür. ARR/ARQ heterozigot genotip frekansı oranları bakımından bakıldığında 0,472 oranıyla Ramlıç melez ırkı, 0,465 oranıyla Siyah başlı Alman-Kıvırcık melez ırkı ve 0,376 oranıyla Hampshire-Merinos melez ırkı duyarlı bulunmuştur. Scrapieye en dirençli genotip olan ARR/ARR homozigot frekansları Siyah başlı Alman-Kıvırcık melez ırkı için 0,492, Hampshire-Merinos melez ırkı 0,388 ve Ramlıç melez ırkı 0,356 şeklinde bulunmuştur.

Melez ırkların scrapie için sekanslanmasının ve 131., 154. ve 171. kodon için polimorfizmlerine bakılmasının ardından Nor98 için duyarlılığı belirlediği düşünölen 141. kodonda kontrol edildi. Çalışmamızda yer alan melez ırkların hepsinde 141. kodonda Lösin amino asidi (L¹⁴¹) yer almaktaydı.

7. TARTIŞMA

7.1 Yerli Irkların Önemi ve Dünya’da Scrapie Çalışmaları

Türkiye, 25.341.000 baş koyuna ve 15 civarında koyun ırkına sahiptir. Bu koyunlardan elde edilen 28.000 ton et ve 770.000 ton koyun süt üretimi ile koyunculukta Avrupa’nın en ileri ülkelerinden biridir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992; Türkiye Yıllık İstatistiksel Verileri, 2004). Bu durum ekonomik ve çevresel değişimler nedeniyle hayvancılık sektöründe de çeşitli zorunlu değişiklikler yapılmasına, düşük maliyetlerle yetişen ve verimi yüksek olan kültür ırklarının düşük verimli yerli ırklarla değişmesine yol açmaktadır. Bu değişim günümüzde hızla sürmekte ve yerel ırkların gen kaynaklarının yavaşça ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Yerli ırkların yüzyıllardır yetiştirildiği ülkemizin özelliklerine göre sağladıkları uyum, düşük verimli olmalarına rağmen ülkemiz koşullarına dayanıklı olmalarını sağlamıştır. Yerli ırkların hali hazırda bulunan bu özelliklerinin diğer ırkların adaptasyon özelliklerine göre olan üstünlüğü kültür ırklarının tercih edilmesi nedeniyle risk altında bulunmaktadır ve göz ardı edilmektedir. Ayrıca gelecekte yerel ırkların hangi diğer özelliklerine ihtiyaç duyulabileceğinin bilinmemesi ülkemize özel bu ırkların gen kaynaklarının korunmasını gerektirmektedir. Bu amaçla ülkemize ait ırkların genotiplerinin belirlenmesi, hangi özellikleri bakımından diğer ırklardan avantajlı olduklarının belirlenmesi ve bu özelliklerine katkıda bulunacak diğer ırklarla melezlenmesi yerel ırklarında korunmasına katkı sağlayacaktır.

Türkiye’nin coğrafi konumu scrapie gibi hastalıklar açısından hem Türkiye hem de Avrupa açısından kritik bir rol taşımaktadır. Scrapie koyunlar arasında hızla yayılabildiğinden ve hastalık etkeninin kontrol altına alınmasındaki zorluklar nedeniyle büyük riske sahip bir hastalıktır. Bu nedenle scrapie hastalığının Türkiye ve tüm Avrupa ülkelerinde ortadan kaldırılması gerekmektedir. Scrapieye olan duyarlılığın genetik olarak taşınan bilgiyle belirlendiğinin öğrenilmesinin ardından birçok Avrupa ülkesi, Avrupa Birliği’nin de desteğiyle scrapieyi ortadan kaldırılması ve dirençli ırkların yetiştirilmesi amacıyla seçici yetiştiricilik programları geliştirmiş ve uygulamaktadır.

Scrapieye dirençli yetiştiricilik programları prion proteini kodlayan PrP genotipine dayanarak geliştirilir (Sipos vd.,2002; Defra 2003, Roden vd., 2006) ve bu genotip birçok Avrupa koyun ırkı için elde edilmiştir. Bu ülkeler Norveç (Tranulis vd., 1999), İtalya (Vaccari vd., 2001), Avusturya (Sipos vd., 2002), İngiltere (Arnold vd., 2002), Fransa (Palhie’re vd., 2002), Almanya (Drogemuller vd., 2004), İrlanda (O’Doherty vd., 2006), İspanya (Legarra vd.,

2004), Portekiz (Orge vd., 2003; Gama vd., 2006), Yunanistan (Billinis vd., 2004), Slovakya (Holko vd., 2005) ve Estonya (Sild vd., 2006)'dir. Bu konuda ülkemizde yapılan tek çalışma Kıvırcık, İmroz ve Sakız yerli ırkları için Ün ve ark.'ları (2007) tarafından yapılmıştır.

7.2 Allel Frekansları

Scrapie şu ana kadar Türk koyun ırklarında ve Türk ırklarının yabancı ırklarla melezlenmiş koyunlarında daha önce görülmemiş olsa da bunun bu ırkların PrP genotipiyle ilgili olup olmadığı büyük bir ilgi oluşturmaktaydı. Ün vd.'nin yaptığı çalışmaya göre duyarlılığa neden olan genotip olan VRQ allellinin frekansının çok düşük olduğunu göstermiştir. Bizim tez çalışmamızda yaptığımız sonuçlarda bu bulguları destekler şekildedir. Araştırılan melez ırklar risk grubu olarak yüksek dirençli-dirençli olarak tanımlanabilecek 1., 2. ve 3. gruba aittirler.

Araştırılan melez ırkların hiçbirinde en yüksek duyarlılık alleli olan VRQ'ye homozigot olarak rastlanmamıştır. Ayrıca tüm ırklarda en yüksek dirençliliği sağlayan ARR alleli homozigot olarak yüksek sayıda hayvanda görülmüştür. Bu açıdan en dirençli melez ırk Siyah başlı Alman-Kıvırcık ırkıdır. Görülen en düşük duyarlılık alleli VRQ olmuştur ve sadece 1 Siyah başlı Alman-Kıvırcık melezinde görülmüştür. Diğer en sık görülen allel ARQ'dür. ARQ homozigot genotipi wild genotip olarak tahmin edilmektedir ve çalışmamızın bulguları bunu doğrular şekildedir.

PrP geninin 136., 154. ve 171. kodonlarında ki değişkenlik açısından bakıldığında Siyah başlı Alman-Kıvırcık melezi 7 farklı allele en değişken melez ırk olarak bulunmuştur. Hampshire-Merinos melezi 5 farklı allel taşıırken, Ramlıç melezi 4 farklı allel taşımaktadır. 171. kodon dirençlilik üzerinde en fazla etkiye sahip olan kodondur. Bu kodon açısından bakıldığında 4 farklı kodon görüşmüştür. Bunlar dirençlilik sırasına göre R, Q, K ve L şeklinde sıralanmıştır. En az değişim 154. kodonda görülmüştür, bu kodon tüm melez ırklarda sadece R şeklinde görülmüştür. 136. kodon açısından dirençlilik sırasına göre A, T ve V şeklinde bir dağılım, A yönüne kayacak şekilde görülmüştür. Bu açıdan melez ırkların dirençlilik oranları Türk yerel ırkları ile örtüşür şekilde oldukça dirençli bulunmuşlardır.

7.3 Genotip Frekansları

Allel frekansı sonuçlarına bakıldığında elde edilen sonuçlar melez ırkların scrapie için dirençli olduğunu göstermekteydi. Genotip frekanslarına bakıldığında çalışmamızda yer alan en dirençli ırkın Siyah başlı Alman-Kıvırcık melez ırkı olduğu görülmektedir. Drogemüller vd.'nin (2003) Siyah başlı Alman koyun ırkı üzerinde ve Ün vd.'nin Kıvırcık koyun ırkı üzerinde yaptığı çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması ile çalışmamızda yer alan melez ırkın dirençliliğinin daha çok Siyah başlı Alman ırkından kaynaklandığını söyleyebiliriz (Çizelge 7.1). İki ana ırkın diğer genotip frekanslarının karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen sonuçlar tutarlı şekildedir.

Genotip frekansları açısından Hampshire-Merinos melez ırkı orta derecede dirençlidir. Bu melez ırkta görülen genotip dağılımı ARR homozigot, ARR/ARQ ve ARQ homozigot şeklinde olmuştur. Alexander vd.'nin (2002) yaptığı çalışmada Hampshire ana ırkta benzer şekilde orta derecede dirençli bulunmuştur. Yaptıkları çalışmada ARR/ARQ heterozigot genotip çalışmamıza göre daha yüksek bulunmuştur. Merinos ana ırkı için benzer bir çalışma bulunmadığı için ARR homozigot genotipteki bu artışın Merinos ırkının yüksek ARR genotip frekansına bağlı olduğunu kesin olarak söyleyemeyiz. Yine de sonuçlar üzerinden yorum yapıldığında Merinos ırkının Hampshire ırkına göre melez ırka daha büyük bir dirençlilik kattığı söylenebilir. Bu bulguyu desteklemek üzere Merinos ana ırkı üzerinde benzer genotipleme çalışmasının yapılması, ülkemizde yaygın bulunan bu koyun ırkı için scrapieye dirençli yetiştiriciliğin yapılmasını da kolaylaştıracaktır.

Ramlıç melez ırkı genotip frekansları açısından çalışmamızda yer alan en dirençsiz ırktır. ARQ homozigot ve ARR/ARQ genotip frekansları bakımından bu melez ırk en yüksek değerlere sahiptir. Alexander vd.'nin (2002) Rambouillet ana ırkında yaptıkları çalışma ana ırkın scrapie açısından yüksek bir dirençliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Dağlıç ana ırkı için ise benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile Alexander'ın sonuçları üzerinden karşılaştırma yapıldığında dağlıç ırkının ARR homozigot genotip açısından dirençli olmadığı sonucuna varılabiliriz. Dağlıç ana ırkının wild tipte olduğu düşünülen ARQ homozigot genotip frekansını daha yüksek oranda taşıdığı düşünülebilir. Ancak bu bulguların tam anlamıyla doğrulanması için bu ana ırk içinde genotipleme çalışmasının yapılması gerekmektedir.

Çizelge 7.1 Çalışmamızda yer alan melez ırkların ana ırklarının scrapie açısından duyarlılıkları için yapılan çalışmalar ve sonuçları.

Risk Grubu	PrP Genotipi	SbA.xK ıvırcık (45)	SbA. ***	Kıvırcık	Hamps.x Merinos (45)	Hamps.*	Merinos **	Ramlıç (Ramb.x Dağlıç) (45)	Ramb.*	Dağlıç **
1	ARR/ARR	0,492	0,540	0,136	0,333	0,145	-	0,266	0,620	-
2	ARR/TRQ	0,050	0,000	0,068	0,000	0,000	-	0,011	0,000	-
2	ARR/ARQ	0,320	0,378	0,454	0,311	0,592	-	0,377	0,354	-
3	ARQ/AHQ	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
3	ARH/TRQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
3	TRQ/TRQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
3	ARQ/TRQ	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
3	ARQ/ARQ	0,070	0,058	0,272	0,333	0,263	-	0,155	0,250	-
3	ARQ/ARH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
3	ARH/ARH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
4	ARR/VRQ	0,025	0,012	0,045	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
5	ARQ/VRQ	0,000	0,008	0,022	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-

* (Alexander vd., 2002)

**Merinos ve Dağlıç yerli ırkları için yapılmış genotipleme çalışması bulunmamaktadır.

***Drogemüller., vd.

7.4 Ek Polimorfizmler

Ek polimorfizmlere bakıldığında melez ırklarda Ün ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde 7 farklı polimorfizm bulunmuştur. Bunlar sırasıyla M112T, K113N, A116E, A116D, M173V, S173N ve V179E polimorfizmleridir. Yakın zamanda Kirby vd. (2006) yaptıkları çalışmada ek polimorfizmlerin scrapie üzerindeki etkilerini araştırmış ve 168. kodonun önemli bir role sahip olduğunu ileri sürmüştür. Ancak bu kodon için bir polimorfizme rastlanmamıştır.

Nor98 için önemli olduğu düşünülen 141. kodon için yaptığımız çalışmada tüm melez ırklarda bu kodonda sadece lösin amino asidine rastlanılmıştır. Bu nedenle melez ırkların sadece bu kodon üzerinden değerlendirilmesinde hepsinin dirençli olduğu görülmüştür. Ancak Nor98 yeni bulunan ve çalışılan bir hastalık olduğu için elde edilen tüm yeni bulguların ve etkili olduğu düşünülen diğer polimorfizmlerinde kontrol edilmesi gerekmektedir. Ancak bu şekilde yerel ırkların ve melez ırkların Nor98 açısından durumu tam olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamız Ün ve ark.'nın sonuçlarına benzer şekilde yerel ırkların scrapie için genotip olarak dirençli olduğunu göstermiştir. Türk ırklarının genotipik olarak dirençli olması melezleme yapılan koyun ırklarının başka özelliklerinin Türk ırklarına aktarılmasıyla aynı özelliklerin scrapieye dirençli olarak tek bir canlıda toplanmasını kolaylaştırmaktadır. Tüm melez ırklarda ARR allelinin bulunması seçici üreticilik programlarının başarı oranını arttırmaktadır ve bu programların tamamlanma süresini kısaltmaktadır. Scrapieye olan dirençliliğe diğer ek polimorfizmlerin etkilerinin daha iyi araştırılması ve Türk ırkları ile Türk ırklarıyla yabancı ırkların melezlerinin bu açıdan da değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Alexander, B. M., Stobart, R. H., Russell, W. C., O'Rourke, K. I., Taylor, A. N. ve Moss, G. E. (2002), " Incidence of Genetic Susceptibility to Scrapie in Selected Purebred and Commercial Flocks", Proceedings, West Section, American Society of Animal Science, 53.

Alper, T., Haig, D. A. ve Clarke, M. C. (1966), " The Exceptionally Small Size of the Scrapie Agent", Biochem. Biophys. Res. Commun., 22: 278-284.

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. ve Clarke, M. C. (1967), " Does the Agent Of Scrapie Replicate without Nucleic Acid?", Nature, 214: 764-766.

Aguzzi, A. ve Polymenidou, M. (2004), " Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts", Cell, 116: 313-327.

Aguzzi, A. (2006), " Prion Diseases of Humans and Farm Animals: Epidemiology, Genetics and Pathogenesis", Journal of Neurochemistry, 97: 1726-1739.

Archer, F., Bachelin, C., Andreoletti, O., Besnard, N., Perrot, G., Langevin, C., Le Dur, A., Vilette, D., Baron-Van Evercooren, A., Vilotte, J. L. ve Laude, H. (2004), "Cultured Peripheral Neuroglial Cells are Highly Permissive to Sheep Prion Infection", J. Virol., 78: 482-490.

Arnold, J. E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M. ve Mayer, R. J. (1995), "The Abnormal Isoform of the Prion Protein Accumulates in Late-Endosome-like organelles in Scrapie-Infected Mouse Brain", J. of Pathol., 176: 403-411.

Arnold, M., Meek, C., Webb, C. R. ve Hoinville, L. J. (2002), "Assessing the Efficacy of a Ram-Genotyping Programme to Reduce Susceptibility to Scrapie in Great Britain" Preventive Veterinary Medicine, 56: 227-249.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., Mc Kinley, M. P., Prusiner, S. B. ve Weissmann, C. (1986), " Scrapie and Cellular PrP Isoforms are Encoded by the Same Chrosomal Gene", Cell, 46: 417-428.

Baylis, M. ve McIntyre, K. M. (2004), "Transmissible Spongiform Encephalopathies: Scrapie Control Under New Strain", Nature, 432:810-811.

- Belay, D. (1999), "Transmissible Spongiform Encephalopathies in Human", *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 283-314.
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Screuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L. ve Smits, M. A. (1995), "Identification of Five allelic Variants of the Sheep Gene and Their Association with Natural Scrapie", *J. Gen. Virol.*, (Pt 3):509-517.
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M. A. ve Bratberg, B. (2003), "Cases of Scrapie with Unusual Features in Norway and designation of a New Type, Nor98", *Vet. Rec.*, 153: 202-208.
- Bessen, R. A. ve Marsh, R. F. (1992), "Biochemical and Physical Properties of the Prion Protein from Two Strains of the Transmissible Mink Encephalopathy Agent", *J. Virol.*, 66:2096-2101.
- Billinis, C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyrodus, S., Vlemmas, L., Leontides, S., Sklaviadis, T. ve Papadopoulos, O. (2004), "Prion Protein Gene Polymorphisms in Healthy and Scrapie-Affected Sheep in Greece", *Journal of General Virology*, 85: 547-554.
- Blatter, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C. ve Aguzzi, A. (1997), "PrP-expressing Tissue Required for Transfer of Scrapie Infectivity from Spleen to Brain", *Nature*, 389:69-73.
- Borchelt, D. R., Rogers, M., Stahl, N., Telling, G. ve Prusiner, S. B. (1993), "Release of the Cellular Prion Protein from Cultured Cells After Loss of Its Glycoinositol Phospholipid Anchor", *Glycobiology*, 3: 319-329.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. ve Prusiner, S. B. (1990), "Scrapie and Cellular Prion Proteins Differ in Their Kinetics of Synthesis and Topology in Cultured Cells", *J. of Cell Biol.*, 110: 743-752.
- Borchelt, D. R., Taraboulos, A. ve Prusiner, S. B. (1992), "Evidence for Synthesis of Scrapie Prion Proteins in the Endocytic Pathway", *J. of Biol. Chem.*, 267: 16188-16199.
- Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B. ve Smits, M. A. (1996), "prP Genotype Contributes to Determining Survival Times of Sheep with Natural Scrapie", *J. Gen. Virol.*, 77: 2669-2973.

- Bossers, A., Belt, P., Raymond, G. J., Caughey, B., de Vries, R. ve Smits, M. A. (1997), "Scrapie Susceptibility-linked Polymorphisms Modulate the in vitro Conversion of Sheep Prion Protein to Protease-resistant Forms", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4931-4936.
- Bossers, A., de Vries, R. ve Smits, M. A. (2000), "Susceptibility of Sheep for Scrapie as Assessed by in vitro Conversion of Nine Naturally Occurring Variants of PrP", *J. Virol.*, 74:1407-1414.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. ve Aguzzi, A. (1996), "Normal Host Prion Protein Necessary for Scrapie-induced Neurotoxicity", *Nature*, 379:339-343.
- Brown, D. R., Cathala, F., Raubertas, R. F., Gajdusek, D. C. ve Castaigne, P. (1987), "The Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob Disease: Conclusion of a 15-Year Investigation in France and Review of the World Literature.", *Neurology*, 37: 895-904.
- Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Merz, G. S., Wolfe, G. C., Wisniewski, H. M. ve Robakis, N. K. (1990), "The mRNA Encoding the Scrapie Agent Protein is Present in a Variety of Non-Neuronal Cells", *Acta. Neuropathol. (Berl)*, 80: 1-6.
- Brown, D. R., Schulzschaeffer, W. J., Schmidt, B. ve Kretzschmar, H. A. (1997a), "Prion Protein-deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity", *Exp. Neurol.*, 146: 104- 112.
- Brown, D. R., Qin, K. F., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Eraser P. E., Kruck, T., Vonbohlen, A., Schulzschaeffer, W. J., Giese, A., Westaway, D. ve Kretzschmar, H. A.(1997b), "The Cellular Prion Protein Binds Copper in vivo", *Nature*, 390: 684-687.
- Brown, P., Preece, M., Brandel, J. P., Sato, T., McShane, L., Zerr, I., Fletcher, A., Will, R. G., Pocchiari, M., Cashman, N. R., d'Aignaux, J. H., Cervenakova, L., Fradkin, J., Schonberger, L. B. ve Collins, S. J. (2000), "Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease at the Millenium", *Neurology*, 55:1075-1081.
- Brown, P. (2001), "Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease." *BMJ.*, 322: 841-844.
- Brown, P., Will, R. G., Bradley, R., Asher, D. M. ve Detwiller, L. (2001), "Bovine Spongiform Encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Background, Evolution and Current Concerns", *Emerg. Infect. Dis.*, 7: 6-16.

- Brown, P., J. H., Cervenakova, McShane, L. M., Barber, P., Rubenstein, R. ve Drohan, W. N. (2003), “ Further Studies of Blood Infectivity in an Experimental Model of Transmissible Spongiform Encephalopathy, with an Explanation of Why Blood Componenets do not Transmit Creutzfeldt-Jakob Disease in Humans”, *Transfusion*, 39: 1169-1178.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. ve Weissmann, C. (1992), “Normal Development and Behaviour of Mice Lacking the Neuronal Cell-surface PrP Protein”, *Nature*, 356: 577-582.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. ve Weissmann, C. (1993), “ Mice Devoid of PrP are Resistant to Scrapie”, *Cell*, 73: 1339-1347.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. ve Weissmann, C. (1994), “High Prion and PrpSc Levels but Delayed Onset of Disease in Scrapie-inoculated Mice Heterozygous for a Disrupted PrP Gene”, *Mol. Med.*, 1: 19-30.
- Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T. ve Prusiner, S. B. (1988), “Scrapie-infected Murine Neuroblastoma Cells Produce Protease-resistant Prion Proteins”, *J. Virol.*, 62: 1558-1564.
- Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., Erhardt, G. ve Groschup, M. H. (2004), Neuronal accumulation of Abnormal Prion Protein in Sheep Carrying a Scrapie-resistant Genotype (PrPARR/ARR)”, *J. Gen. Virol.*, 85: 2727-2733.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. ve Caramelli, M. (2004), “ Identification of a Second Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy: Molecular Similarities with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease”, *Nat. Acad. Science.*, 101: 3065-3070.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. ve Soto, C. (2005), “ In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions”, *Cell*, 121: 195-206.
- Caughey, B., Race, R. E. ve Chesebro, B. (1988), “Detection of Prion Protein mRNA in Normal and Scrapie-infected Tissues and Cell Lines”, *j. Gen. Virol.*, 69 (Pt3): 711-716.
- Caughey, B., Race, R. E., Vogel, M., Buchmeier, M. J. ve Chesebro, B. (1988), “ In Vitro Expression in Eukaryotic Cells of a Prion Protein Gene Cloned from Scrapie-infected Mouse Brain”, *Proc. Natl. Acad. Sci. ABD* 85: 4657-4661.

- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. ve Chesebro, B. (1989), “ Prion Protein Biosynthesis in Scrapie-infected and Uninfected Neuroblastoma Cells”, *J. Virol.*, 63: 175-181.
- Caughey, B., Neary, K., Buller, R., Ernst, D., Perry, L. L., Chesebro, B. ve Race, R. E. (1990), “ Normal and Scrapie-associated Forms of Prion Protein Differ in Their Sensitivities to Phospholipase and Proteases in Intact Neuroblastoma Cells”, *J. Virol.*, 64: 1093-1101.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. ve Caughey, W. S. (1991), “ Secondary Structure Analysis of the Scrapie-associated Protein PrP 27-30 in Water by Infrared Spectroscopy”, *Biochemistry*, 30:7672-7680.
- Caughey, B. W., Raymond, G. J., Priola, S. A., Kocisko, D. A., Race, R. E., Bessen, R. A., Lansbury, P. T., Jr. ve Chesebro, B. (1999), “ Methods for Studying Prion Protein (PrP) Metabolism and the Formation of Protease-resistant PrP in Cell Culture and Cell-free Systems. An Update”, *Mol. Biotechnol.*, 13: 45-55.
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P. ve Autilio-Gambetti, L. (1995), “Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases”, *J. Biol. Chem.*, 270: 19173-19180.
- Colling, S. B., Collinge, J. ve Jefferys, J. G. R. (1996), “ Hippocampal Slices from Prion Protein Null Mice: disrupted Ca^{+2} Activated K^{+} Currents”, *Neurosci. Lett.*, 209:49-52.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. ve Jefferys, J. G. (1994), “ Prion Protein is Necessary for Normal Synaptic Function”, *Nature*, 370:295-297.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. ve Hill, A. F. (1996), “ Molecular Analysis of Prion Strain Variation and the Aetiology of “New Variant” CJD”, *Nature*, 383: 685-690.
- Collinge, J., Beck, J., Campbell, T., Estibeiro, K. ve Will, R. G. (1996), “ Prion Protein Gene Analysis in New Variant Cases of Creutzfeldt-Jakob Disease”, *Lancet.*, 348: 56.
- Collinge, J. (2001), “Prion Diseases of Humans and Animals: Their Causes and Molecular Basis”, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24: 519-550.
- Come, J. H., Fraser, P. E. ve Lansbury, P. T., Jr. (1993), “A Kinetic Model for Amyloid Formation in the Prion Diseases: Importance of Seeding”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5959-5963.

- Cuille, J. ve Chelle, P. L. (1939), “ Experimental Transmission of Trembling to the Goat”, *Comptes Rendus des Seances de L’academie des Sciences*, 208: 1058-1060.
- Cunningham, A. A., Kirkwood, J. K., Dawson, M., Spencer, Y. I., Green, R. B. ve Wells, G. A. (2004), “Bovine Spongiform Encephalopathy Infectivity in Greater Kudu (*Tragelaphus strepsiceros*)”, *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 1044-1049.
- Dalsgaard, N. J. (2002), “ Prion Disease. An overview”, *APMIS*, 110: 3-13.
- DeArmond, S. J., Mobley, W. C., DeMott, D. L., Barry, R. A., Beckstead, J. H. ve Prusiner, S. B. (1987), “ Changes in the Localization of Brain Prion Proteins During Scrapie Infection”, *Neurology*, 37:1271-1280.
- DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchakasey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M. R., Cohen, F. E. ve Prusiner, S. B. (1997), “ Selective Neuronal Targetting in Prion Disease”, *Neuron*, 19:1337-1348.
- DeArmond, S. J. ve Bouzamondo, E. (2002), “ Fundamentals of Prion Biology and Diseases”, *Toxicology*, 181-182: 9-16.
- DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (2003), “Perspectives on Prion Biology, Prion Disease Pathogenesis and Pharmacologic Approaches to Treatment”, *Clin. Lab. Med.*, 23: 1-41.
- De Bosschere, H., Roels, S., Dechamps, P. ve Vanopdenbosch, E. (2005), “ TSE Detected in a Belgian ARR-Homozygous Sheep via Active Surveillance”, *Vet. J.*,doi 10.1016/j.tvjil.2005.07.014.
- Defra, 2003. “National Scrapie Plan for Great Britain”, Department for Food, Environment and Rural Affairs “<http://www.defra.gov.uk/corporate/regulat/forms/Ahealth/nsp/nsp1.pdf>.” 8 Şubat 2007.
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M. ve Fraser, H. (1968), “ Identification of a Gene Which Controls the Incubation Period of Some Strains of Scrapie Agent in Mice”, *J. Comp Pathol.*, 78. 293-299.
- Diedrich, J. F., Bendheim, P. E., Kim, Y. S., Carp, R. I. ve Haase, A. T. (1991), “Scrapie-associated Prion Protein Accumulates in Astrocytes During Scrapie Infection”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 375-379.

Dodelet, V. C. ve Cashman, N. R. (1998), “ Prion Protein Expression in Human Leukocyte Differentiation”, *Blood*, 91:1556-1561.

Drogemüller, C., De Vries, F., Hamann, H. ve Distl, O. (2003), “ PrP-Allelfrequenz-Ermittlung und Simulationsstudien zur Selektion auf Scrapie-Resistenz in Deutschen Schafzuchtpopulationen”, *Züchtungskunde*, 75: 259-273.

Drogemüller, C., De Vries, F., Hamann, H., Leeb, T. ve Distl, O. (2004) “Breeding German Sheep for Resistance to Scrapie”, *Vet. Rec.*, 154: 257–260.

Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, P., Treguer, E., Rezaei, H. ve Knossow, M. (2004), “Insight into the PrPC $\rightarrow$ PrPSc Conversion from the Structures of Antibody-Bound Ovine Prion Scrapie-Susceptibility Variants”, *Biochemistry*, 101: 10254-10259.

Elsen, J. M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andreoletti, O., Eychenne, F., Tien Khang, J. V., Poivey, J. P., Lantier, F. ve Laplanche, J. L. (1999), “ Genetic Susceptibility and Transmission Factors in Scrapie: Detailed Analysis of An Epidemic in a Closed Flock of Romanov”, *Archives of Virology*, 144: 431-445.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. ve Kobata, A. (1989), “ Diversity of Oligosaccharide Structures Linked to Asparagines of the Scrapie Prion Protein”, *Biochemistry*, 28:8380-8388.

Everest, S. J., Thorne, L., Barnicle, D. A., Edwards, J. C., Elliott, H., Jackman, R. ve Hope, J. (2006), “ Atypical Prion Protein in Sheep Brain Collected During the British Scrapie-Surveillance Programme”, *J. Gen. Virol.*, 87: 471-477.

Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H. ve Raposo, G. (2004), “Cells Release Prions in Association with Exosomes”, *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 101: 9683-9688.

Fischer, M., Rüllicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, S., Brandner, S., Aguzzi, A. ve Weismann, C. (1996), “ Prion Protein (PrP) with Amino-proximal Deletions Restoring Susceptibility of PrP Knockout Mouse to Scrapie”, *EMBO J.*, 15:1255-1264.

Foote, W. C., Clark, W., Maciulis, A., Call, J. W., Hourrigan, J., Evans, R. C., Marshall, M. R. ve de Camp, M. (1993), “ Prevention of Scrapie Transmission in Sheep, Using Embryo Transfer”, *Am. J. Vet. Res.*, 54: 1863-1868.

- Ford, M. J., Burton, L. J., Li, H., Graham, C. H., Frobert, Y., Grassi, J., Hall, S. M. ve Morris, R. J. (2002), “ A Marked Disparity Between the Expression of Prion Protein and Its Message by Neurones of the CNS”, *Neuroscience*, 111: 533-551.
- Foster, J. D., McKelvey, W. A., Mylne, M. J., Williams, A., Hunter, N., Hope, J. ve Fraser, H. (1992), “ Studies on Maternal Transmission of Scrapie in Sheep by Embryo Transfer”, *Vet. Rec.*, 130: 341-343.
- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., Bilette de Villemeur, T. ve Robain, O. (1995), “ Ultrastructural Localization of Cellular Prion Protein (PrP^C) in Synaptic Boutons of Normal Hamster Hippocampus”, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 318:339-344.
- Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. ve Prusiner, S. B. (1988), “ Immunoaffinity Purification and Neutralization of Scrapie Prion Infectivity”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6617-6621.
- Gajdusek, D. C. ve Zigas, V. (1959), “ Kuru; Clinical, Pathological and Epidemiological Study of an Acute Progressive Degenerative Disease of the Central Nervous System among Natives of the Eastern Highlands of New Guinea”, *Am. J. Med.*, 26: 442-469.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, J. C. Jr., Asher, D. M. ve David, E. (1968), “ Transmission of Experimental Kuru to the Spider Monkey”, *Science*, 162: 693-694.
- Gajdusek, D. C. ve Gibbs, C. J. Jr., (1973), “ Subacute and Chronic Diseases Caused by Atypical Infections with Unconventional Viruses in Aberrant Hosts”, *Perspect Virol.*, 8: 279-311.
- Gajdusek, D.C. (1977), “ Unconventional Viruses and the Origin and Disappearance of Kuru”, *Science*, 197: 943-960.
- Gama, L. T., Carolino, M. I., Santos-Silva, M. F., Pimanta, J. A. ve Costa, M. S. (2006), “ Prion Protein Genetic Polymorphisms and Breeding Strategies in Portuguese Breeds of Sheep”, *Livestock Science*, 99: 175-184.
- Gavier-Widen, D., Noremark, M., Benestad, S., Simmons, M., Renstrom, L., Bratberg, B., Elvander, M. ve af Segerstad, C. H. (2004), “ Recognition of the Nor98 Variant of Scrapie in the Swedish Sheep Population”, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 16: 562-567.

- Gibbs, C. J., Jr, Gajdusek, D. C. ve Latarjet, R. (1978), “ Unusual Resistance to Ionizing Radiation of the Viruses of Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease and Scrapie”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 6268-6270.
- Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K. ve Hope, J. (1990), “ Two Alleles of Neural Protein Gene Linked to Scrapie in Sheep”, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87: 2476-2480.
- Goldmann, W. (1993), “ PrP Gene and Its Association with Spongiform Encephalopahties”, *British Medical Bulletin*, 49: 839-859.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. ve Hope, J. (1994), “PrP Genotype and Agent Effects in Scrapie: Change in Allelic Interaction with Different Isolates of Agent in Sheep, A Natural Host of Scrapie”, *J. Gen. Virol.*, 75: 989-995.
- Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M. ve Hunter, N. (1996), “ Novel Polymorphisms in the Caprine PrP Gene: A Codon 142 Mutation Associated with Scrapie Incubation Period”, *J Gen Virol.*, 77: 2885-2891.
- Goldmann, W., Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E. ve Hunter, N. (2005), “Frequencies of PrP Gene Haplotypes in British Sheep and the Implications for Breeding Programmes”, *Journal of Applied Microbiology* 98: 1294-1302.
- Gombojav, A., Shimauchi, I., Horiuchi, M., Ishguro, N., Shingawa, M., Kitamoto, T., Miyoshi, I., Mohri, S. ve Takata, M. (2003), “Susceptibility of Transgenic Mice Expressing Chimeric Sheep, Bovine and Human PrP Genes to Sheep Scrapie”, *J. Vet. Med. Sci.*, 65: 341-347.
- Gordon, W. S. (1946), “ Louping Ill, Tick-borne Fever and Scrapie”, *Vet. Rec.*, 58: 516-525.
- Griffith, J.S. (1967), “ Self-replication and Scrapie”, *Nature*, 215: 1043-1044.
- Hadlow, W. J. (1959), “ Scrapie and Kuru”, *Lancet*, ii:289-290.
- Haralambiev, H., Ivanov, I., Vesselinova, A. ve Mermerski, K. (1973), “ An Attempt to Induce Scrapie in Local Sheep in Bulgaria”, *Zentralbl Veterinarmed B.*, 20: 701-709.
- Harper, J. D. ve Lansbury, P. T. (1997), “ Models of Amyloid Seeding in Alzheimer’s Disease and Scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-dependent Solubility of Amyloid Proteins”, *Annu. Rev. Biochem.*, 66:385-407.

- Harris, D. A., Lele, P. ve Snider, W. D. (1993), “ Localization of the mRNA for a Chicken Prion Protein by in situ Hybridization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4309-4313.
- Harris, D. A. (1999), “ Cell Biological Studies of the Prion Protein”, *Curr, Issues Mol, Biol.*, 1: 65-75.
- Hartwig, N. DVM (2000), “ Control of Internal Parasites of Sheep”, Iowa State University, Nisan 2000.
- Hay, B., Prusiner, S. B. ve Lingappa, V. R. (1987), “ Evidence for a Secretory Form of the Cellular Prion Protein”, *Biochemistry*, 26:8110-8115.
- Hayashi, H. K., Yokoyama, T., Takata, M., Iwamaru, Y., Imamura, M., Ushiki, Y. K. ve Shinagawa, M. (2005), “ The N-Terminal Cleavage Site of PrP^{Sc} from BSE Differs from that of PrP^{Sc} from Scrapie”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328:1024-1027.
- Hoinville, L. J. (1996), “ A Review of the Epidemiology of Scrapie in Sheep”, *Rev. Sci. Tech.* 15: 827-852.
- Holko, I., Novackova, A., Holkova, T. ve Kmet, V. (2005), “PrP Genotyping of Sheep Breeds in Slovakia”, *Veterinary Record*, 157: 628-30.
- Hope, J., Wood, S. C., Birkett, C. R., Chong, A., Bruce, M. E., Cairns, D., Goldmann, W., Hunter, N. ve Bostock, C. J. (1999), “ Molecular, Analysis of Ovine Prion Protein Identifies Similarities between BSE and an Experimental Isolate of Natural Scrapie, CH1641”, *J. Gen. Virol.* 80: 1-4.
- Hope, J. (2000), “ Prions and Neurodegenerative Diseases”, *Current Opinion in Genetics& Development*, 10: 568-574.
- Hopp, P., Ulvund, M. J. ve Jarp, J. (2001), “ A Case- Control Study on Scrapie in Norwegian Sheep Flocks”, *Preventive Veterinary Medicine*, 51: 183-198.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R. ve Candy, J. M. (1995), “ Copper Binding to the N-terminal Tandem Repeat Regions of Mammalian and Avian Prion Protein” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207:621-629.
- Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. ve Prusiner, S. B. (1989), “ Linkage of a Prion Protein Missense Variant to Gerstmann-Straussler Syndrome”, *Nature*, 338: 342-345.

Hsiao, K., Meiner, Z., Kahana, E., Cass, C., Kahana, I., Avrahami, D., Scarlato, G., Abramsky, O., Prusiner, S. B. ve Gabizon, R. (1991), “ Mutation of the Prion Protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob Disease”, *N. Engl. J. Med.*, 324: 1091-1097.

Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J. ve Bostock, C. (1996), “Natural Scrapie in a Closed Flock of Cheviot Sheep Occurs Only in Specific PrP Genotypes”, *Arch. Virol.*, 141: 809-824.

Iwasaki, M., Okumura, K., Kondo, Y., Tanaka, T. ve Igarashi, H. (1992), “ cDNA Cloning of a Novel Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein Gene Homologue in *Caenorhabditis Elegans* Using Hamster Prion Protein cDNA as a Hybridization Probe”

Jackson, G. S. ve Collinge, J. (2001), “ The Molecular Pathology of CJD: Old and New Variants”, *Mol Pathol.*, 54: 393-399.

Jarrett, J. T. ve Lansbury, P. T., Jr. (1993), “Seeding “One Dimensional Crystallization” of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer’s Disease and Scrapie?”, *Cell*, 73: 1055-1058.

Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Bruce, M. E., McBride, P. A., Scott, J. R. ve Halliday, W. G. (1992), “ Infection Specific Prion Protein (PrP) Accumulates on Neuronal Plasmalemma in Scrapie Infected Mice”, *Neurosci. Lett.*, 147:106-109.

Jimenez-Huete, A., Lievens, P. M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. ve Prelli, F. (1998), “Endogenous Proteolytic Cleavage of Normal and Disease-associated Isoforms of the Human Prion Protein in neural and Non-neural Tissues”, *Am. J. Pathol.*, 153: 1561-1572.

Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., CFooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. ve Prusiner, S. B. (1997), “Evidence for Protein X Binding to a Discontinuous Epitope on the Cellular Prion Protein During Scrapie Prion Propagation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10068-10074.

Kaymakçı, M. ve Sönmez, R. (1992), “ Koyun Yetiştiriciliği”, *Hasad Dergisi Hayvancılık Serisi 3, Koyun Yetiştiriciliği*.

Klatzo, I., Gajdusek, D. C. ve Zigas, V. (1959), “ Pathology of Kuru”, *Lab Invest.*, 8: 799-847.

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P.T. ve Caughey, B. (1994), “ Cell-free Formation of Protease-resistant Prion Protein”, *Nature*, 370: 471-474.

Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. ve DeArmond, S. J. (1986), “ Scrapie Prion Proteins are Synthesized in Neurons”, *Am. J. Pathol.*, 122:1-5.

Kristensson, K., Feuerstein, B., Taraboulos, A., Hyun, W. C., Prusiner, S. B. ve DeArmond, S. J. (1993), “ Scrapie Prions Alter Receptor-mediated Calcium Responses in Cultured Cells”, *Neurology*, 43:2335-2341.

Latarjet, R., Muel, B., Haig, D. A.; Clarke, M. C. ve Alper, T. (1970), “ Inactivation of the Scrapie Agent by Near Monochromatic Ultraviolet Light”, *Nature*, 227: 1341-1343.

Legarra, A., Ugarte, E. ve Beltra'n De Heredia, I. (2004), “Ana'lisis de asociacio'n entre genotipos de PrP y produccio'n de leche en la raza Latxa”, *Proc. XII Reunio'n Nacional de Mejora Gene'tica Animal. Las Palmas, Spain.*

Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (2004), “ Synthetic Mammalian Prions”, *Science*, 305: 673-676.

Legname, G., Nguyen, H. O., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (2005), “ Strain-specified Characteristics of Mouse Synthetic Prions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2168-2173.

Lehmann, S. ve Harris, D. A. (1995), “ A Mutant Prion Protein Displays an Aberrant Membrane Association When Expressed in Cultured Cells”, *J. Biol. Chem.*, 270:24589-24597.

Lehmann, S. ve Harris, D. A. (1996), “ Mutant and Infectious Prion Proteins Displays Common Biochemical Properties in Cultured Cells”, *J. Biol. Chem.*, 271:1633-1637.

Lehmann, S. ve Harris, D. A. (1997), “ Blockade of Glycosylation Promotes Acquisition of Scrapie-like Properties by the Prion Protein in Cultured Cells”, *J. Biol. Chem.*, 272:21479-21487.

Liemann, S. ve Glockshuber, R. (1999), “ Influence of Amino Acid Substitutions Related to Inherited Human Prion Diseases on the Thermodynamic Stability of the Cellular Prion Protein”, *Biochemistry*, 38: 3258-3267.

- Lopez, C. D., Yost, C. S., Prusiner, S. B., Myers, R. M. ve Lingappa, V. R. (1990), “ Unusual Topogenic Sequence Directs Prion Protein Biogenesis”, *Science*, 248:226-229.
- Lühken, G., Buschmann, A., Brandt, H., Eiden, M., Groschup, M. H. ve Erhardt, G. (2007), “ Epidemiological and Genetical Differences between Classical and Atypical Scrapie cases”, *Vet. Res.*, 38: 65-80.
- Madec, J. Y., Simon, S., Lezmi, S., Bencsik, A., Grassi, J. ve Baron, T. (2004), “ Abnormal Prion Protein in Genetically resistant Sheep from A Scrapie-infected Flock”, *J. Gen. Virol.*, 85: 3483-3486.
- Makrinou, E., Collinge, J. ve Antoniou, M. (2002), “ Genomic Characterization of the Human Prion Protein (PrP) Gene Locus”, *Mamm. Genome*, 13: 696-703.
- Mallucci, G., Rate, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. ve Collinge, J. (2002), “Post-natal Knockout of Prion Protein alters Hippocampal CA1 Properties, But Does Not Result in Neurodegeneration”, *Embo. J.*, 21: 202-210.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Kohn, P. C., Brandner, S. ve Collinge, J. (2003), “Depleting Neuronal PrP in Prion Prevents Disease and Reverses Spongiosis”, *Science*, 302: 871-874.
- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C. ve Hoover, E. A. (2006), “Infectious Prions in the Saliva and Blood of Deer with Chronic Wasting Disease”, *Science*, 314: 133-136.
- Mead, S. (2006), “ Prion Disease Genetics”, *European Journal of Human Genetics*, 14: 273-281.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. ve Prusiner, S. B. (1983), “ A Protease-Resistant Protein is a Structural Component of the Scrapie Prion”, *Cell*, 35:57-62.
- McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Steiber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. ve Gonatas, N. (1991), “ Ultrastructural Localization of Scrapie Prion Proteins in Cytoplasmic Vesicles of Infected Cultured Cells”, *Lab. Investig.*, 65:622-630.

- Miller, M., Dykes, D.D. ve Polesky, H.F. (1998), "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells" *Nucl. Acids Res.*, 16: 1215.
- Miller, M. W., Wild, M. A. ve Williams, E. S. (1998), "Epidemiology of Chronic Wasting Disease in Captive Rocky Mountain Elk", *J Wildl Dis.*, 34: 532-538.
- Miller, M. W., Williams, E. S., McCarty, C. W., Spraker, T.R., Kreeger, T. J., Larsen, C. T. ve Throne, E. T. (2000), "Epizootiology of Chronic Wasting Disease in Free Ranging Cervids in Colorado and Wyoming", *J. Wildl. Dis.*, 36: 676-690.
- Moore, R. C., Hope, J., McBride, P. A., McConnell, I., Selfridge, J., Melton, D. W. ve Manson, J. C. (1998), "Mice with Gene Targetted Prion Protein Alterations Show That Prnp, Sinc and Prni are Congruent", *Nat. Genet.*, 18:118-125.
- Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrision, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y., Mastrangelo, P., wang, K., Smit, A. F., Katamine, S., Carlson, G. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Melton, D. W., Tremblay, P., Hood, L. E. ve Westaway, D. (1999), "Ataxia in Prion Protein (PrP)- deficient Mice is Associated with Upregulation of the Novel PrP-like Protein Doppel", *J. Mol. Biol.*, 292: 797-817.
- Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P. ve Lugaresi, E. (2003), "Familial and Sporadic fatal Imsomnia", *Lancet. Neurol.*, 2: 167-176.
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. ve Oesch, B. (1995), "Development Expression of the Prion Protein Gene in Glial Cells", *Neuron*, 14: 509-517.
- Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T. ve Benestad, S. L. (2005), "Polymorpisms at Codon 141 and 154 in the Ovine Prion Protein Gene are Associated with Scrapie Nor98 Cases", *J. Gen. Virol.*, 86:231-235.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E. ve Prusiner, S. B. (1996), "Recombinant Scrapie-like Prion Protein of 106 Amino Acids is Soluble", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:15457-15462.
- Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N. ve Kobayashi, Y. (1999), "Regulation of the Processing and Release of Tumor Necrosis Factor Alpha in a Human Macrophage Cell Line", *J. Leukoc. Biol.*, 66: 968-973.

- Narwa, R. ve Harris, D. A. (1999), “ Prion Proteins Carrying Pathogenic Mutations are Resistant to Phospholipase Cleavage of Their Glycolipid Anchors”, *Biochemistry*, 38:8770-8777.
- Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoke, R., Atarashi, R., Kataoka, Y. ve Miyamoto, T. (1997), “ Prion Protein is Necessary for Latent Learning and Long-term Memory Retention”, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 17:537-545.
- O'Doherty, E., Aherne, M., Ennis, S., Weavers, E., Roche, J.F. ve Sweeney, T. (2004), “ Prion Protein Gene Polymorphisms in Pedigree Sheep in Ireland”, *Res. Vet. Sci.*, 70: 51–56.
- Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., Benestad, S. L. ve Bassett, H. F. (2004), “ Two Irish Cases of Scrapie Resembling Nor98”, *Vet. Rec.* 155: 636-637.
- Onodera, T., Ikeda, T., Muramatsu, T. ve Shinagawa, M (1993), “ Isolation of Scrapie Agent from the Placenta of Sheep with Natural Scrapie in Japan”, *Microbiol. Immunol.*, 37: 311-316
- Orge, L., Galo, A., Sepulveda, N., Simas, J. P. ve Pires, M. (2003), “ Scrapie Genetic Susceptibility in Portuguese Sheep Breeds”, *Veterinary Record* 153: 508.
- Orge, L., Galo, A., Machado, C., Lima, C., Ochoa, C., Silva, J., Ramos, M. ve Simas, J. P. (2004), “ Identification of Putative Atypical Scrapie in Sheep in Portugal”, *J. Gen. Virol.*, 85: 3487-3491.
- O'Rourke, K. I., Duncan, J. V., Logan, J. R., Anderson, A. K., Norden, D. K., Williams, E. S., Combs, B. A., Stobart, Moss, G. E. ve Sutton, D. L. (2002), “ Active Surveillance for Scrapie by Third Eyelid Biopsy and Genetic Susceptibility Testing of Flocks of Sheep in Wyoming”, *Clinical and Diag. Labo. Immun.* 9:966-971.
- Palhie`re, I., Francois, D., Elsen, J.M., Barillet, F., Amigues, Y., Perret, G. ve Bouix, J. (2002), “Allele Frequencies of the PrP Gene in 29 French Sheep Breeds. Possible Use in Selection for Resistance to Scrapie”, *Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France.*
- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, L., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. ve Prusiner, S. B. (1993), “ Conversion of α -Helices into β -sheets Features in the Formation of the Scrapie Prion Proteins”, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:10962-10966.

- Parkin, E. T., Trew, A., Christie, G., Faller, A., Mayer, R., Turner, A. J. ve Hooper, N. M. (2002), “ Structure-activity Relationship of Hydroxamate-based Inhibitors on the Secretases That Cleave the Amyloid Precursor Protein, Angiotensin Converting Enzyme, CD23, and Pro-tumor Necrosis Factor- α ”, *Biochemistry*, 41: 4972-4981.
- Parkin, E. T., Watt, N. T., Turner, A. J. ve Hooper, N. M. (2004), “ Dual Mechanisms for Shedding of the Cellular Prion Protein”, *J. Biol. Chem.*, 279: 11170-11178.
- Parry H. B. ve Oppenheimer, D. R: (1983), “ Scrapie Disease of Sheep”, Academic Press, London, ISBN 0-12-545750-2.
- Pattison, I. H., ve Millson, G. C. (1961), “Further Experimental Observations on Scrapie”, *J Comp Pathol.*, 71: 350-359.
- Pattison, I. H., Hoare, M. N. Jebbett, J. N. ve Watson, W. A. (1972), “ Spread of Scrapie to Sheep and Goats by Oral Dosing with Foetal Membranes from Scrapie- Affected Sheep”, *Vet. Rec.*, 90: 465-468.
- Pauly, P. C. ve Harris, D. A. (1998), “ Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein”, *J. Biol. Chem.*, 273:33107-33110.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E. ve Ironside, J. W. (2004), “ Preclinical vCJD after Blood Transfusion in a PRNP Codon 129 Heterozygous Patient”, *Lancet.*, 364:527-529.
- Perini, F., Frangione, B. ve Prelli, F. (1996), “ Prion Protein Released by Platelets”, *Lancet*, 347: 1635-1636.
- Priola, S. A. ve Chesebro, A. (1995), “ A Single Hamster PrP Amino Acid Blocks Conversion to Protease-resistant PrP in Scrapie-infected Mouse Neuroblastoma Cells”, *J. Virol.*, 69:7754-7758.
- Priola, S. A. ve Chesebro, A. (1998), “ Abnormal Properties of Prion Protein with Insertional Mutations in Different Cell Types”, *J. Biol. Chem.*, 273:11980-11985.
- Prusiner, S. B. (1982), “ Novel Proteinaceous Infectious Particles cause Scrapie”, *Science*, 216: 136-144.

- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. ve Hood, L. E. (1984), “ Purification and Structural Studies of a Major Scrapie Prion Protein”, *Cell*, 38: 127-134.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., Hoppe, P. C., Westaway, D. ve DeArmond, S. J. (1990), “ Transgenic Studies Implicate Interactions Between Homologous PrP Isoforms in Scrapie Prion replication”, *Cell*, 63:673-686.
- Prusiner, S. B., Torchia, M. ve Westaway, D. (1991), “ Molecular Biology and Genetics of Prions- Implications for Sheep Scrapie, “Mad Cows” and the BSE Epidemic. Historical Background” *Cornell. Vet.*, 81: 85-101.
- Prusiner, S. B., Groth, D. Serban, A., Stahl, N. ve Gabizon, R: (1993), “ Attempts to Restore Scrapie Prion Infectivity After Exposure to Protein Denaturants”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2793-2797.
- Prusiner, S. B. (1997), “ Prion Diseases and the BSE Crisis”, *Science*, 278: 245-251.
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. ve Cohen, F. E. (1998),” Prion Protein Biology”, *Cell*, 93:337-348.
- Prusiner, S. B. (1998), “ Prions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13363-13383.
- Prusiner, S. B. (2001), “ Shattuck Lecture- Neurodegenerative Diseases and Prions”, *N. Engl. J. Med.*, 344: 1516-1526.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C. ve Hood, L. (1991), “ Genomic Structure of the Human Prion Protein Gene”, *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 320-329.
- Race, R. E., Fadness, L. H. ve Cheesbro, B. (1987), “ Characterization of Scrapie Infection in Mouse Neuroblastoma Cells”, *J. Gen. Virol.*, 68: 1391-1399.
- Race, R. E., Caughey, B., Graham, K., Ernst, D. ve Chesebro, B. (1988),” Analyses of Frequency of Infection, Specific Infectivity and Prion Protein Biosynthesis in Scrapie-infected Neuroblastoma Cell Clones”, *J. Virol.*, 62:2845-2849.
- Raymond, G. J., Hope, J., Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, L. D., Bossers, A., Ironside, J., Will, R. G., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Rubenstein, R., Smits, M. A., Lansbury, P. T., Jr. ve Caughey, B. (1997), “ Molecular Assessment of the Potential Transmissibilities of BSE and Scrapie to Humans”, *Nature*, 388: 285-288.

- Raymond, G. J., Bossers, A., Raymond, L. D., O'Rourke, K. I., McHolland, L. E., Bryant, P. K., 3rd, Miller, M. W., Williams, E. S., Smits, M. ve Caughey, B. (2000), "Evidence of a Molecular Barrier Limiting Susceptibility of Humans, Cattle and Sheep to Chronic Wasting Disease", *Embo. J.*, 19: 4425-4430.
- Raymond, G. J., Olsen, E. A., Lee, K. S., Raymond, L. D., Bryant, P. K., 3rd, Varon, G. S., Caughey, W. S., Kocisko, D. A., McHolland, L. E., Favara, C., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Mayer, R. T., Miller, M. W., Williams, E. S. ve Caughey, B. (2006), "Inhibition of Protease-resistant Prion Protein Formation in a Transformed Deer Cell Line Infected with Chronic Wasting Disease", *J. Virol.*, 80: 596-604.
- Roden, J.A., Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C., Jones, D.A., Haresing, W. ve Gubbins, S. (2006), "Breeding Programmes for TSE Resistance in British Sheep I Assessing the Impact on Prion Protein (PrP) Genotype Frequencies" *Prev. Vet. Med.* 73: 1-16.
- Rogers, M., Taraboulos, A., Scott, M., Groth, D. ve Prusiner, S. B. (1990), "Intracellular Accumulation of the Cellular Prion Protein after Mutagenesis of its Asn-linked Glycosylation Sites", *Glycobiology*, 1:101-109.
- Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M. ve Prusiner, S. B. (1993), "Conversion of Truncated and Elongated Prion Proteins into the Scrapie Isoform in Cultured Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3182-3186.
- Ronzon, F., Bencsik, A., Lezmi, S., Vulin, J., Kodjo, A. ve Baron, T. (2006), "BSE Inoculation to Prion Diseases-Resistant Sheep Reveals Tricky Silent Carriers", *Biochem. and Biophys. Research Commun.*, 350: 872-877.
- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A. ve Weismann, C. (2001), "Onset of Ataxia and Purkinje Cell Loss in PrP Null Mice Inversely Correlated with Dpl Level in Brain", *Embo. J.*, 20: 694-702.
- Sabuncu, E., Petit, S., Le Dur, A., Lan Tai, T., Vilotte, J. L., Laude, H. ve Vilette, D. (2003), "PrP Polymorphisms Tightly Control Sheep Prion Replication in Cultured Cells", *J. Virol.* 77: 2696-2700.
- Saborio, G. P., Permanne, B. ve Soto, C. (2001), "Sensitive Detection of Pathological Prion Protein by cyclic Amplification of Protein Misfolding", *Nature*, 411: 810-813.

- Safar, J., Ceroni, M., Gajdusek, D. C. ve Gibbs, Jr., C. J. (1991), “ Differences in the Membrane Interaction of Scrapie Amyloid Precursor Proteins in Normal and Scrapie- or Creutzfeldt-Jakob disease-infected Brains”, *J. Infect. Dis.*, 163:488-494.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. ve Gibbs, Jr., C. J. (1993), “ Conformational Transitions, Dissociation and Unfolding of Scrapie Amyloid (Prion) Protein”, *J. Biol. Chem.*, 268:20276-20284.
- Safar, J. G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J. E., Prusiner, S. B. ve Riesner, R. (2005), “ Search for Prion-Specific Nucleic Acid”, *J. Virol.*, 79: 10796-10806.
- Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A. ve Weissmann, C. (1994), “ No Propagation of Prions in Mice Devoid of PrP”, *Cell*, 77:967-968.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. ve Noda, T. (1996), “ Loss of Cerebellar Purkinje Cells in Aged Mice Homozygous for a Distrupted PrP Gene”, *Nature*, 380:528-531.
- Sales, N., Rodolfo, K., Hassig, R., Faucheux, B., Di Giamberardino, L. ve Moya, K. L. (1998), “ Cellular Prion Protein Localization in Rodent and Primate Brain”, *Eur. J. Neurosci.*, 10: 2464-2471.
- Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M., Ziegler, U., Distl, O. ve Leeb, T. (2004), “ Analysis of Sequence Variability of the Bovine Prion Protein Gene (PRNP) in German Cattle Breeds”, *Neurogenetics*, 5: 19-25.
- Sander, P., Hamann, H., Drogemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K. ve Leeb, T. (2005), “ Bovine Prion Protein Gene (PRNP) Promoter Polymorphisms Modulate PRNP Expression and May Be Responsible for Differences in Bovine Spongiform Encephalopathy Susceptibility”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 280: 37408-37414.
- Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. ve Prusiner, S. B. (1995), “ Prion Protein Gene Variation Among Primates” *J. Mol. Biol.*, 245: 362- 274.
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., Mobley, W. C. ve Prusiner, S. B. (1997), “ A Hypothalamic Neuronal Cell Line Persistently Infected with Scrapie Prions Exhibits Apoptosis”, *J. Virol.*, 71:8821-8831.

- Scott, M. R., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D. ve Prusiner, S. B. (1989), “ Transgenic Mice Expressing Hamster Prion Protein Produce Species-specific Scrapie Infectivity and Amyloid Plaques”, *Cell*, 59:847-857.
- Scott, M. R., Köhler, R., Foster, D. ve Prusiner, S. B. (1992), “ Chimeric Prion Protein Expression in Cultured Cells and Transgenic Mice”, *Protein Sci.*, 1: 986-997.
- Scott, M. R., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (1993), “ Prpagation of Prions with Artificial Properties in Transgenic Mice Expressing Chimeric PrP Genes”, *Cell*, 73:979-988.
- Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (2005), “ Transmission Barriers for Bovine, Ovine and Human Prions in Transgenic Mice”, *J. Virol.*, 79: 5259-5271.
- Shyng, S. L., Huber, M. T. ve Harris, D. A. (1993), “ A Prion Protein Cycles Between the Cell Surface and an Endocytic Compartment in Cultured Neuroblastoma Cells”, *J. Biol. Chem.*, 268:15922-15928.
- Shyng, S. L., Lehmann, D., Moulder, K. L. ve Harris, D. A. (1995), “ Sulfated Glycans Stimulate Endocytosis of the Cellular Isoform of the Prion Protein, PrP^C in Cultured Cells”, *J. Biol. Chem.*, 270:30221-30229.
- Sild, E., Volkskiene, R., Vinalass, H., Miceikene, I., Grislis, Z., Distl, O. ve Drogemüller, C. (2006), “ Detection of Prion Protein Gene Polymorphisms in Baltic Breeds of Sheep”, *Veterinary Record*, 159: 247-50.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. ve Caughey, B. (2005), “ The Most Infectious Prion Protein Particles”, *Nature*, 437: 257-261.
- Singh, N., Zanusso, G., Chen, S. G., Fujioka, H., Richardson, S., Gambetti, P. ve Petersen, R. B. (1997), “ Prion Protein Aggregation Reverted by Low Temperature in Transfected Cells Carrying a Prion Protein Gene Mutation”, *J. Biol. Chem.*, 272:28461-28470.
- Sipos, W., Kraus, M., Schmoll, F., Achmann, R. ve Baumgartner, W. (2002), “ PrP Genotyping of Austrian Sheep Breeds”, *J. Vet. Med. A* 49: 415–418.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. ve Prusiner, S. B. (1987), “ Scrapie Prion Protein Contains a Phosphatidylinositol Glycolipid”, *Cell*, 51:229-249.

Stahl, N., Baldwin, M. A., Burlingame, A. L. ve Prusiner, S. B. (1990a), “ Identification of Glycoinositol Phospholipid Linked and Truncated Forms of the Scrapie Prion Protein”, *Biochemistry*, 31:8879-8884.

Stahl, N., Borchelt, D. R. ve Prusiner, S. B (1990b), “ Differential Release of Cellular and Scrapie prion Proteins from Cellular Membranes by Phosphatidylinositol-specific phospholipase”, *C. Biochemistry*, 29: 5405-5412.

Stahl, N., Borchelt, D. R. ve Prusiner, S. B (1990c), “ Glycolipid Anchors of the Cellular and Scrapie Prion Proteins, p. 189-216.” In A. J. Turner (ed.), *Molecular and Cell Biology of Membrane Proteins: Glycolipid Anchors of Cell-surface Proteins*, Ellis Horwood, London, United Kingdom.

Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K. –M., Burlingame, A. L. ve Prusiner, S. B. (1992), “ Glycoylinositol Phospholipid Anchors of the Scrapie and Cellular Prion Proteins Contain Sialic Acid”, *Biochemistry*, 31:5043-5053.

Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, G. W., Burlingame, A. L. ve Prusiner, S. B. (1993), “ Structural Studies of the Scrapie Prion Protein Using Mass Spectrometry and Amino Acid Sequencing”, *Biochemistry*, 32:1991-2002.

Stamp, J. T., Brotherston, J. G., Zlotnik, I., Mackay, J. M. ve Smith, W. (1959), “ Further Studies on Scrapie”, *J. Comp. Pathol.*, 69: 268-280.

Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S. ve Macklis, J. D. (2006), “ Prion Protein (PrPc) Positively Regulates Neural Precursor Proliferation During Developmental and Adult Mammalian Neurogenesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3416-3421.

Stockman, S. (1913), “ Scrapie: An Obscure Disease of Sheep”, *J. Comp. Pathol.*, 26: 317-327.

Tagliavini, F., Prelli, F., Porro, M., Salmona, M., Bugiani, O. ve Frangione, B. (1992), “ A Soluable Form of Prion Protein in HUman Cerebrospinal Fluid: Implications for Prion-related Encephalopathies”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1398-1404.

- Taraboulos, A., Serban, D. ve Prusiner, S. B. (1990a), “ Scrapie Prion Proteins Accumulate in the Cytoplasm of Persistently Infected Cultured Cells”, *J. Cell. Biol.*, 110:2117-2132.
- Taraboulos, A., Rogers, M., Borchelt, D. R., McKinley, M. P., Scott, M., Serban, D. ve Prusiner, S. B. (1990b), “ Acquisition of Protease Resistnace by Prion Proteins in Scrapie-infected Cells Does not Require Asparagine-linked Glycosylation”, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:8262-8266.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. ve Prusiner, S. B. (1995), “ Cholesterol depletion and Modification of COOH-terminal Targeting Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isosform”, *J. Cell. Biol.*, 129:121-132.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastriani, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. ve Prusiner, S. B. (1995), “ Prion Propagation in Mice Expressing Human and Chimeric PrP transgenes Implicates the Interaction of Cellular PrP with Another Protein”, *Cell*, 83:79-90.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. ve Prusiner, S. B. (1996), “ Evidence for the Conformation of the Pathologic Isoform of the Prion Protein Enciphering and Propagating Prion Diversity”, *Science*, 274: 2079-2082.
- Tobler, L., Gaus, S. E., Bedoer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. ve Manson, J. C. (1996), “ Altered Circadian Activity Rhythms and Sleep in Mice Devoid of Prion Protein”, *Nature*, 380:639-642.
- Tranulis, M.A., Osland, A., Bratberg, B. ve Ulvund, M.J. (1999), “Prion Protein Polymorphisms in Sheep with Natural Scrapie and Healthy Controls in Norway”, *J. Gen. Virol.*, 80: 1073–1077.
- Tranulis, M. A., Espenes, A., Comincini, S., Skretting, G. ve Harbitz, I. (2001), “ The PrP-like Protein Doppel Gene in Sheep and Cattle: cDNA Sequence and Expression”, *Mamm. Genome*, 12: 376-379.
- Tranulis, M. A. (2002), “ Influence of the Prion Protein Gene, Prnp, on Scrapie Susceptibility in Sheep”, *APMIS*, 110: 33-42.
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. ve Prusiner, S. B. (1988), “ Purification and Properties of the Cellular and Scrapie Hamster Prion Proteins”, *Eur. J. Biochem.*, 176:21-30.

Türkiye Yıllık İstatistik Verileri (2004), Başbakanlık İstatistik Enstitüsü, Türkiye Cumhuriyeti, 2004.

Tveit, H., Lund, C., Olsen, C. M., Ersdal, C., Prydz, K., Harbitz, I. ve Tranulis, M. A. (2005), “Proteolytic Processing of the Ovine Prion Protein in Cell Cultures”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337: 232-240.

Ün, C., Öztapak, K., Özdemir, N., Akış, I. ve Mengi, A. (2008), “Genotyping of PrP Gene in Native Turkish Sheep Breeds”, *Small Ruminant Research*, 74: 260-264.

Vaccari, G., Petraroli, R., Agrimi, U., Eleni, C., Perfetti, M.G., Di Bari, M.A., Morelli, L., Ligios, C., Busani, L., Nonno, R. ve Di Guardo, G. (2001), “PrP Genotype in Sarda Breed Sheep and its Relevance to Scrapie”, *Arch. Virol.*, 146: 2029–2037.

Vincent, B., Paitel, E., Frobert, Y., Lehmann, S., Grassi, J. ve Checler, F. (2000), “Phorbol Ester-regulated Cleavage of Normal Prion Protein in HEK293 Human Cells and Murine Neurons”, *J. Biol. Chem.*, 275:35612-35616.

Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. ve Checler, F. (2001), “The Disintegrins ADAM10 and TACE Contribute to the Constitutive and Phorbol Ester-regulated Normal Cleavage of the Cellular Prion Protein”, *J. Biol. Chem.*, 276:37743-37746.

Volkel, D., Zimmermann, K., Zerr, I., Bodemer, M., Lindner, T., Turecek, P. L., Poser, S. ve Schwarz, H. P. (2001), “Immunochemical Determination of Cellular Prion Protein in Plasma from Healthy Subjects and Patients with Sporadic CJD or Other Neurologic Diseases”, *Transfusion*, 41: 441-448.

Vorberg, I., Paines, A., Story, B. ve Priola, S. A. (2004), “Susceptibility of Common Fibroblast Cell Lines to Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents”, *J. Infect. Dis.*, 189: 431-439.

Watts, J. C., Balachandran, A. ve Westaway, D. (2006), “The Expanding Universe of Prion Diseases”, *PLoS Pathog.* e26.

Weismann, C. (1991), “A ‘Unified Theory’ of Prion Propagation”, *Nature*, 352: 679-683.

Weismann, C. ve Flechsig, E. (2003), “PrP Knock-out Mouse Prion Protein Gene”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6418-6422.

- Weismann, C. (2004), “ The State of the Prion”, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 861-871.
- Williams, E. S. ve Young, S. (1980), “ Chronic Wasting Disease of Captive Mule Deer: A Spongiform Encephalopathy”, *J. Wildl. Dis.*, 16: 89-98.
- Williams, E. S. (2003), “ Scrapie and Chronic Wasting Disease” *Clin. Lab. Med.* 23: 139-159.
- Wong, K., Qiu, Y., Hyun, W., Nizon, R., Vancleff, J., Sanchezsalazar, J., Prusiner, S. B. ve DeArmond, S. J. (1996), “ Decreased receptor-mediated Calcium Response in Prion-infected Cells Correlates with Decreased Membrane Fluidity and IP₃ Release”, *Neurology*, 47:741-750.
- Yadavalli, R., Guttmann, R. P., Seward, T., Centers, A. P., Williamson, R. A. ve Telling, G. C. (2004), “ Calpain-dependent Endoproteolytic Cleavage of PrPSc Modulates Scrapie Prion Propagation”, *J. Biol. Chem.*, 279: 21948-21956.
- Zeidler, M., Stewart, G., Cousens, S. N., Estiberio, K. ve Will, R. G. (1997), “ Codon 129 Genotype and New Variant CJD”, *Lancet*, 350: 668.
- Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S. ve Lodish, H. F. (2006),” Prion Protein is Expressed on Long-term Repopulating Hematopoietic Stem Cells and is Important for Their Self-renewal”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 2184-2189.
- Zhao, H., Klingeborn, M., Simonsson, M. ve Linne, T. (2006), “ Proteolytic Cleavage and Shedding of the Bovine Prion Protein in Two Cell Culture Systems”, *Virus Res.*, 115: 43-55.
- Zheng, Y., Saftig, P., Hartmann, D. ve BBlobel, C. (2004), “ Evaluation of the Contribution of Different ADAMS to Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFalpha) Shedding and of the Function of the TNFalphaEctodomain in Ensuring Selective Stimulated Shedding by the TNFalpha Convertase (TACE/ADAM17).”, *J. Biol. Chem.*, 279: 42898-42906.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.defra.gov.uk/nsp>
- [2] <http://www.bseinquiry.gov.uk>
- [3] <http://www.oie.int>
- [4] <http://www.dh.gov.uk>
- [5] <http://www.cjd.ed.ac.uk>
- [6] <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cjd/>
- [7] <http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/whodscscraph2003.pdf>
- [8] <http://www.ninds.nih.gov/disorders/gss/gss.htm>
- [9] http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw_prion.gif
- [10] <http://www.accessexcellence.org>
- [11] <http://www.biology.ucsa.edu>
- [12] <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	12.04.1982	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1996-2000	Pertevniyal Lisesi
Lisans	2000-2004	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü
Yüksek Lisans	2005-2008	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı