

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MANDA TÜRÜNDE (*Bubalus bubalis*) PRNP
GENİNİN *İN SILICO* ANALİZİ VE SIĞIR PRNP
GENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Zarifa OSMANLI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 18.07.2017

**Bornova- İZMİR
2017**

Zarifa OSMANLI tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “MANDA TÜRÜNDE (*Bubalus bubalis*) PRNP GENİNİN İN SİLİCO ANALİZİ VE SIĞIR PRNP GENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.07.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Raportör Üye : Yrd. Doç. Dr. Evren KOBAN BAŞTANLAR

Üye : Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

İmza

.....
.....
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “MANDA TÜRÜNDE (*Bubalus bubalis*) PRNP GENİNİN İN SİLİCO ANALİZİ VE SIĞIR PRNP GENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18 /07 /2017

Zarifa OSMANLI

ÖZET**MANDA TÜRÜNDE (*Bubalus bubalis*) *PRNP* GENİNİN *IN SILICO* ANALİZİ VE SIĞIR *PRNP* GENİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

OSMANLI, Zarifa

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal Ün

Temmuz 2017, 57 sayfa

Bu çalışmada, manda popülasyonlarında biyoinformatik yöntemlerle prion hastalığı ile ilişkili olan PrP proteinini kodlayan *PRNP* geni'nin Açık Okuma Çerçevesi'nin (AOÇ) analizi yapılmış, PrP proteininin post-translasyonel modifikasyon olasılıkları hesaplanmış ve Sığır *PRNP* geni ile karşılaştırılmıştır.

Mandalarının seçili DNA verileri polimorfizmlerin bulunması amacıyla analiz edilmiştir. Amino asit değişikliklerini bulmak için, DNA dizileri DNA-protein çevirme aracı ile amino asit sekanslarına çevrilmiş, haplotip, allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır. Prion proteinlerinin birbiriyle etkileşiminde önemli rol oynayan post-translasyonel modifikasyonlar yapan faktörlerden PrP post-translasyonel modifikasyonları çevrimiçi sunucularla hesaplanmıştır. Karşılaştırmalı analiz için prion hastalığına dirençsiz tür olan sığır bireylerinde aynı analizler tekrar edilmiştir.

Manda popülasyonlarının *PRNP* geni kodlama bölgesinde beş SNP saptanmış, haplotip, allel, genotip frekansları hesaplanmış, PrP proteini post-translasyonel modifikasyonları bulunmuştur. Korunan nükleotit ve amino asit dizilerinin yüksek frekansı gözlemlenmiştir. Çalışma evrim sürecinde *PRNP* geninin korunmuş olduğu ve mandada prion hastalığına dirençliliğin protein düzeyindeki etkileşimlerle daha çok ilişkili olduğu ihtimalini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Prion geni, biyoinformatik analiz, manda, sığır.

ABSTRACT***IN SILICO* ANALYSIS OF *PRNP* GENE IN BUFFALO (*Bubalus bubalis*) AND COMPARATIVE ANALYSIS WITH *PRNP* GENE OF BOVINE (*Bos taurus*)**

OSMANLI, Zarifa

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cemal Un

July 2017, 57 pages

In this thesis, ORF of *PRNP* gene encoding PrP protein was analyzed in Anatolian and Murrah buffaloes populations. Also, PTM probability of PrP protein was estimated by bioinformatics methods. Bovine *PRNP* gene was investigated for comparative analysis.

DNA data of buffaloes were analyzed on purpose to find polymorphisms. To find amino acid changes the DNA sequences were translated to amino acid sequences, haplotype, allele, and genotype frequencies were calculated. PrP post-translational modifications, one of the factors that play an important role in the protein-protein interaction, were calculated by online servers. For comparative analysis, the same analysis repeated on bovine data. Bovine has a close phylogenetic relationship with the buffalo and has a susceptibility to prion disease.

We found five SNPs in ORF region and haplotype, allele, genotype frequencies, PTMs of PrP estimated for buffalo population. The high frequency of conserved nucleotide and the amino acid residue was observed. The study supports an issue that *PRNP* gene highly preserved during the evolutionary process and the resistance to prion disease is more likely not to be associated with interactions in gene level.

Keywords: Prion gene, bioinformatics, buffalo, bovine

TEŞEKKÜR

Her Őeyden önce, Anabilim Dalı Başkanı, danıŐmanım Prof. Cemal ÜN'e bana bu ilginç çalıŐmayı yapma fırsatı verdiği ve araştırma sırasında bana destek olduğu için teşekkür ederim. Ayrıca, sabırları ve arkadaŐca yardımları için aileme, bunun yanısıra dostca destekleri için araştırma arkadaşlarıma teŐekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Prion Geni	4
2.2 Prion Geni Polimorfizmleri	5
2.3 Prion Proteini.....	7
2.4 <i>PRNP</i> Geni İle İlişkili Hastalıklar	8
2.5 Mandada (<i>Bubalus bubalis</i>) <i>PRNP</i> Çalışmaları	11
2.6 Populasyon Genetiği	13
2.6.1 Hardy-Weinberg yasası	14
2.6.2 Polimorfizmler	15
2.7 Biyoinformatik Veri Analizi	16
2.8 PrP Proteininin Post-translasyonel Modifikasyonları	17
2.8.1 Glikozilasyon	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1 Manda Verileri	20
3.2 Dizi Karşılaştırmasında Kullanılan <i>Bos Taurus</i> Verileri.....	20
3.3 MEGA Yazılımı	21
3.4 Temel Yerel Hizalama Aracı (BLAST)	22
3.5 Expasy Çeviri Aracı	22
3.6 Clustal Omega Yazılımı	23
3.7 DnaSP (DNA Dizi Polimorfizmi)	23

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.8 Arlequin Programı	24
3.9 PTM Tahmini Sunucuları: NetNGly1.0, NetOGly4.0, NetPhos3.1.....	25
4. BULGULAR	27
4.1 Manda <i>PRNP</i> Geninde SNP Saptanması	27
4.2 <i>Bos Taurus PRNP</i> Geninde SNP Saptanması	28
4.3 DNA Dizilerinin Amino Asit Dizilerine Çevirisi	28
4.4 BLAST Sonucu	30
4.5 Protein Hizalama Sonucu.....	31
4.6 Haplotip Analizi.....	32
4.7 PrP'nin Post-translasyonel Modifikasyonları	35
4.7.1 PrP'nin N-bağlı glikozilasyon sonucu	35
4.7.2 PrP'nin O-bağlı glikozilasyon sonucu.....	36
4.7.3 PrP proteini fosforilasyonu	37
5. TARTIŞMA	39
5.1 SNP Saptanması Ve Analizi	39
5.2. Haplotip, Allel Ve Genotip Frekansı	40
5.3 Prion Proteininde Amino Asit Değişimi	42
5.4 PrP Proteini Post-translasyonel Modifikasyonları.....	43
6. SONUÇLAR.....	46
7. ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR DİZİNİ	48
ÖZGEÇMİŞ.....	57
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Sığır <i>PRNP</i> geninin basitleştirilmiş genomik yapısı.....	7
4.1 MEGA yazılımında hizalandırılmış gen dizileri.....	27
4.2a <i>B.bubalis</i> PrP varyantı1 <i>RRRGR</i>	29
4.2b <i>B.bubalis</i> PrP varyantı2 <i>RRRAR</i>	29
4.2c <i>B.taurus</i> PrP varyant <i>ACC</i>	30
4.3 Hizalama sonucu.....	31
4.4 Polipeptit dizisine çeviri sonuçları.....	32
4.5a DnaSP giriş dosyası parametreleri	33
4.5b DnaSP sonuç dosyası	33
4.6 Haplotip sonuçları.....	34
4.7 NetNGlyc 1.0 sunucusunun N-glikozilasyon tahmini sonucu.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Araştırılan türlerin <i>PRNP</i> gen yapısının özeti.....	4
2.2 İnsan PrP proteininin önemli bölgeleri.....	8
2.3 TSE örnekleri.....	10
2.4 <i>B.bubalis</i> ve <i>B.taurus</i> 'ta <i>PRNP</i> indel polimorfizmleri.....	12
3.1 SNP saptanmasında kullanılan manda ırkları.....	20
3.2 GenBank'tan alınan sığır ırklarının bilgileri	21
4.1 Polimorfik konumlara göre <i>B.bubalis</i> örnekleri.....	28
4.2 Polimorfik lokuslara göre sığır ırkları ve bireylerin miktarı	28
4.3a <i>B.bubalis</i> 'in haplotip grubu.....	34
4.3b <i>B.bubalis</i> 'te polimorfizmlere göre allel ve genotip sıklığı.....	34
4.3c <i>B.taurus</i> 'un haplotip grubu	34
4.3d <i>B.taurus</i> 'ta polimorfizmlere göre allele ve genotip frekansı	35
4.4 N-bağlı glikozilasyon sonucu.....	35
4.5 O-bağlı glikozilasyon sonucu.....	36
4.6 PrP protein varyantlarının fosforillenme olasılıkları.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
a.a.	Amino asit
AP1	Aktivatör protein 1
CD	Sirküler dikroizm
cds	Kodlama dizisi
DNA	Deoksiribonükleik asit
ER	Endoplazmik retikulum
EVI1	Ekotropik viral entegrasyon bölgesi 1
E4BP4	E4 promotor bağlayıcı proteini 4
FTIR	Fourier transformed infrared spektroskopi
GGSGi	Gertsman-Straussler-Scheinker-Sendromu
HSF2	Isı şok faktörü 2
H	Histidin
MEF2	Miyosit arttırıcı faktör 2
M	Metionin
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NMP4/CIZ	Nükleer matriks proteini4/cas etkileşimli Zink parmak
N	Asparajin
PZR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PRNP	Prion protein geni
PRNP ^{Sc}	Prion scrapie
RFX1	Düzenleyici faktör X1
R	Arjinin
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
Sp1	Spesifik protein 1
TEF	Tirotrofik embriyonik faktör
T	Treonin
V	Valin

1.GİRİŞ

Prion protein geni, glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlaşık hücre zarı proteini olan PrP'yi kodlamaktadır. Bu protein, "prion hastalıkları" nın farklı türlerine neden olan prion enfeksiyonların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Birçok fatal nörodejeneratif hastalık; insanlarda görülen Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD), sığırlarda deli dana (BSE), koyunlarda skrapi (scrapie) yanlış katlanmış prion proteininin sonucudur (Sakudo et al., 2010). Tüm sayılan hastalıklar, TSE-Transmissible Spongiform Encephalopathy isimli nörodejeneratif hastalıklar grubunda toplanmıştır.

Prion proteininin sığırlarda rastlanan prion hastalığı-Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) için spesifik izoformu, normal konakçı prionlarla (PrP^c) etkileşim yoluyla BSE hastalığına neden olur; yanlış katlanma sonucu PrP^{Sc}'ye dönüşmesini sağlar. Yanlış katlanmış PrP^{Sc} daha sonra beyinde birikerek süngerimsi vakuollerin oluşumu ile nörodejenerasyona yol açmaktadır (Prusiner, 1998).

Prion hastalıkları memeli türlerinin büyük çoğunluğunu etkilemesine rağmen, prion hastalıklarına (tavşan, köpek, at ve manda) yatkınlık oranının düşük olduğu belirli türler vardır. TSE hastalıklarına duyarlılığı düşük türler prion hastalığı mekanizmasını anlamakta önemlidir (Nathan and Surewicz, 2009). "Deli dana" hastalığı (BSE'nin başka bir adı), çeşitli sığır ırkları arasında yaygın olan bir hastalıktır. Buna karşın evrimsel açıdan çok yakın akraba olan manda türünde prion hastalığına dair bir rapor bulunmamaktadır. Filogenetik ilişkileri nedeniyle manda ve sığır prion geni yapısının çok benzerliği unsuru göz önüne alınmaktadır.

Manda, dünyadaki önemli çiftlik hayvanlarından biridir. Dünya genelinde birçok manda *PRNP* çalışması (Iannuzzi et al., 1998; Imran et al., 2012; Zhao et al., 2012; Uchida et al., 2014) yapılmıştır. Manda Türkiye'ye ilk kez yedinci yüzyılda getirilmiştir (Yavaşoğlu et al., 2014). Manda üzerinde bir sıra araştırmalar yürütülmesine rağmen, manda populasyonlarındaki *PRNP* analizleri henüz sınırlı sayıdadır.

Anadolu ırkı mandalarında *PRNP* geninin *in silico* analizi, gen yapısı analizörü, çeviri sonrası modifikasyon tahminçileri ve populasyon genetiği yapı tanımlayıcı programları ile yapılmıştır. Tek nükleotit polimorfizmleri,

amino asit değişiklikleri, nükleotit diziliminin amino asit dizilimine çevirisi biyoinformatik programlarla gerçekleştirilmiştir.

Hardy-Weinberg yasasına göre, populasyonların allel ve genotip frekansları hesaplanmıştır. Populasyonların haplotip frekansı Arlequin yazılımı ile tahmin edilmiştir. BLAST yöntemi ile manda ve sığırların DNA dizileri (NCBI GenBank'tan alınmış verilere göre) karşılaştırılmıştır. Çevrimiçi tahminler tarafından PTM olasılıkları hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, Anadolu ve Murrah ırkı mandalarının *PRNP* geninin Açık Okuma Çerçevesi bölgesi incelenmiştir.

Tezin amaçları:

- AOÇ bölgesinde manda prion geninin polimorfizmlerini tespit etmek;
- Manda populasyonu allel, genotip ve haplotip frekanslarını hesaplamak;
- Manda prion proteininde PTM'leri tanımlamak;
- Manda prion geninin sığır prion geni ile karşılaştırmalı analizini yapmak.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Henüz tam açıklanamamış bir mekanizmaya sahip olan prion, bulaşıcı hastalıklara neden olan protein izoformudur. Prion hastalıkları genetik, sporadik ve enfeksiyöz gruplar olarak tanımlanmaktadır. Prion hastalıklarının tüm varyantları prion protein modifikasyonları sonucudur ve TSE hastalıkları grubunda yer almaktadırlar. TSE insanlarda Creutzfeldt-Jacob hastalığı (CDJ), koyunlarda skrapie, sığırlarda Deli dana (BSE) gibi hastalıklara neden olmaktadır (Abrams et al., 2011).

Scrapie ve CJD enfeksiyöz ajanlarının araştırılma geçmişi prionun erken modelini oluşturma olanağını sunmuştur. Birçok ülkede yaygın hale gelen prion hastalıkları, ilginç bir çalışma alanı olarak bilim insanlarının dikkatini çekmekte ve bu bozukluğun nedenlerini anlama çabası halen devam etmektedir. Fizyoloji ve Tıp alanında 1997 yılında Nobel Ödülünü alan, Stanley Prusiner (1982), prion hastalığı araştırmasının belirsiz taraflarını yıllarca araştırdıktan sonra elde ettiği prion gen analiz sonuçlarını özetlemiş ve 2 grup bulmuştur: birincisi, proteinleri değiştiren veya yok eden ve scrapie enfektivitesini inaktifleştirmeyen prosedürler; ikincisi, nükleik asitleri değiştiren veya yok eden ve enfektiviteyi inaktive eden prosedürlerdir. Prion çalışmalarına devam edilmesi, bir peptid fragmanı dizisi bulunması ile sonuçlandı. “Prion” terimi, “nükleik asitten yoksun proteinli bulaşıcı ajan”dan türetilmiştir. Çünkü, benzeri bir mekanizması daha önce görülmemiş olan bulaşıcı protein ajanını hem virüs hem de viroidden ayrı sınıflandırma zorunluluğu ortaya çıkmıştır (Prusiner, 1998).

Günümüzde önceki çalışmalara göre, normal hücresel prion proteini olan PrP^C,nin yanlış katlanma sonucu izoform PrP^{Sc}-prion enfeksiyonuna dönüştüğü ve prion hastalıklarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Normal PrP^C α-heliks ve bobin yapısının bir kısmının β-yapraklarına tekrar katlanması sonucu PrP^{Sc}’ye dönüşmektedir. Bu durum prion proteininin fiziko-kimyasal özelliklerinin değişmesine ve sonuçta TSE hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. PrP^{Sc} beyinde mikroskopik sünger benzeri delikler oluşturarak prion hastalığına yol açar (Sakudo et al., 2010). İlk aşamalarda PrP^{Sc}, beyinde nöronları yok eden kümeler oluşturur. Araştırmacılar, organizmada çeşitli kritik süreçte prion proteininin rolünü ileri sürmektedirler. Görevleri arasında olası yaralanmalar, bakır taşınması ve nöronlar arasındaki

iletişimde nöron koruması vardır. Çeşitli prion araştırmalarına rağmen prion hastalığının tüm mekanizması henüz aydınlatılmış değildir (Baybutt and Manson, 1997).

2.1 Prion Geni

Prion geninin konumu farklı memeli türlerinde değişmektedir: sığanda kromozom3'te, koyunlarda ve sığırlarda kromozom13'te, insan genomunda kromozom20'de yer almaktadır. Fare (38kb), sıçan (16kb), koyun (31kb) ve sığır (35kb) *PRNP* geni üç ekzon içermektedir. Araştırılmış tüm memeli türlerinde *PRNP* geninin AOC gen bölgesinin üçüncü ekzonunda yer almaktadır (insan *PRNP* geni hariç). Birçok memelinin *PRNP* geni yapısının özellikleri göz önüne alınmış, gen boyutu, ekzon miktarı, AOC konumu, AOC uzunluğu ve promotor bölgesi özellikleri incelenmiştir (Bkz. Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Araştırılan türlerin *PRNP* gen yapısının özeti (Saeki et al., 1996; O'Neill et al., 2003).

Tür	PRNP geninin kromozomdaki konumu	Gen boyutu (kb)	Ekzon sayı	AOC pozisyonu	AOC uzunluğu
Fare	Kromozom2	38	3	Ekzon3	765
Sıçan	Kromozom3	16	3	Ekzon3	762
Koyun	Kromozom13	31	3	Ekzon3	771
Sığır	Kromozom13	35	3	Ekzon3	795
Manda	konumu belirsiz	17	3	belirtilmemiş	795
İnsan	Kromozom20	35	2	Ekzon2	774

PRNP geninin yapısı ve aynı zamanda PrP protein dizisi memelilerde oldukça korunmuştur. Genin önemli özellikleri şunları içerir: genin AOC'si intronlarla kesilmez; transkripsiyonel başlatma bölgesi 5' bölgesidir, "housekeeping" genleri içerir (virüslerde olduğu gibi metabolizması ve translasyonu için *PRNP* geni mRNAsı proteinin ikincil yapısı üzerinde kararlılığı güçlendirme ihtimali olabilir); mRNA'nın 3'-translasyona uğramayan kısmı çekirdeğe spesifik poliadenilasyonu yapan fonksiyonel diziler (ATTAAG) gibi yüksek seviyede korunan alanlar içermektedir; transkripsiyon faktörleri için olası bağlanma yerleri intron1 bölgesinde yerleşmektedir. Bu faktörler MEF2, E4BP4, HSF2, NMP4 / CIZ, RFX1, TEF, EVI1'dir (Kim et al., 2008).

Önceki çalışmalarda, insan, fare, sığır, koyun ve sıçan *PRNP* genlerinde promotor bölgelerinin özellikleri incelenmiştir. Bu organizmaların *PRNP* geni mRNA'ları için genel bir özellik, *PRNP* mRNA'sının transkripsiyonunun, GC'lerce zengin dizi içeren promotor bölgesi ile başlamasıdır (bu bölgede *TATA* kutusu eksikliği görülmektedir). Sığırların prion geninin promotor bölgesi, -88bç ile -33bç arasında bulunur. İnsan *PRNP* geni ise -148bç ile +125bç arasındadır. Araştırmalar, farelerin *PRNP* geninin ekzon1'de ve ekzon2'de yerleşen iki güçlü promotora sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sıçan *PRNP*'sinin promotor konumu -90bç ile -41bç arasındadır. Bu bölgeler, her iki türde *CCAAT*-inversiyon element ve *PRNP* geni transkripsiyon faktörleri- AP1, Sp1 için bir bağlanma bölgesi içermektedir. Sp1 bağlanma bölgelerini içeren diziler ve *CCAAT* dizileri, sayısız viral ve ökaryotik gen transkripsiyon işleminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Inoue et al., 2007).

Haigh (2007), sığır *PRNP*'si üzerinde çalışarak, intron1'in ifadeyi inhibe ederek ekzon1'in baskılayıcı işlevini yönlendirdiğini göstermiştir. Inoue (1997), ek işlevsel elementlerin yaklaşık 2.5 kb'lik bir bölgede, ekzon1'de mevcut olduğunu ve sığır *PRNP*'sinde 3 potansiyel Sp1 bağlanma bölgesinin (-47 ve -42, -27 ve -22, -11 ve -6) promotor içinde bulunduğunu belirtmiştir. Bu da, Sp1 bağlanma bölgelerinin promotor aktivitesinde önemli olduğunu göstermektedir.

2.2 Prion Geni Polimorfizmleri

PRNP gen mutasyonlarının ve polimorfizmlerinin aydınlatılması prion hastalıklarını anlamada çok önemlidir. Sakudo'ya (2010) göre, AOÇ'deki tek nükleotit mutasyonlar veya polimorfizmler, TSE'ye yakınlıkla ilgilidir. İnsanlarda, geyiklerde ve koyunlarda TSE'ye yakınlık, prion genindeki genetik çeşitlilik ile ilişkilidir.

Hem insan, hem de koyunlarda hastalığa duyarlılık risk faktörlerine en çok katkıda bulunan amino asit farklılıklarıdır. İnsan *PRNP* geninde bulunan önemli polimorfizmlere N171S, AOÇ'de oktamer peptid tekrarı delesyonu (8 amino asit) ve E219K dahildir. *PRNP* geni AOÇ'nin polimorfizmlerine örnekleri, Yamada'nın (1994) çalışmaları sonucu yayınlamıştır.

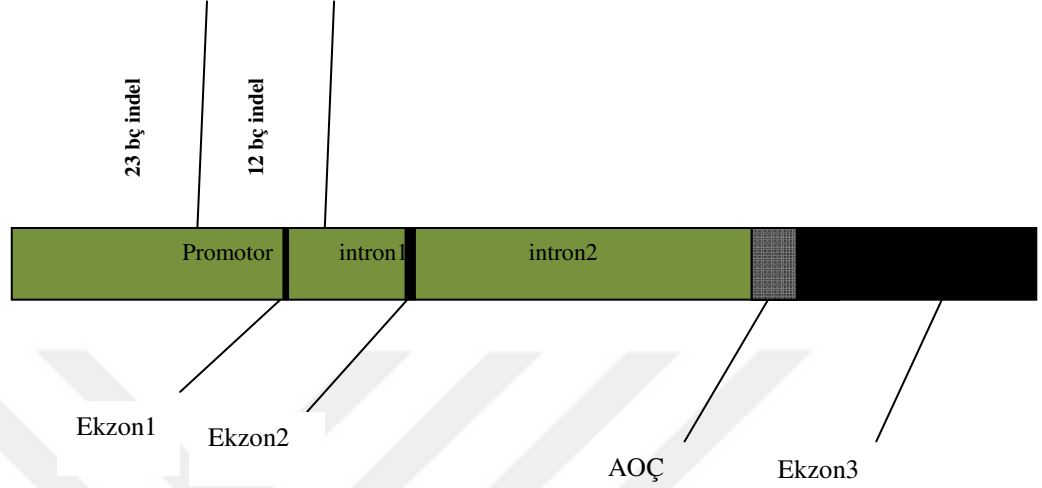
TSE'ye karşı duyarlılığın, insan ve koyun prion geninin AOC'deki polimorfizmleri ile daha sık ilişkili olmasına rağmen, sığır *PRNP*'si için aynı durum gözlemlenmemektedir. Sığır prion geni araştırmaları BSE hastalığına bağlı bölgelerin varlığını ortaya koymuştur. Bunlar, oktamer peptid tekrarları, promotor ve intron1 bölgelerindeki insersiyon/delesyon polimorfizmleridir. Ayrıca, sığır prion geni çalışmaları sonucu kromozom13'ün prion geninin yerleştiği 35kblık bir bölgede 1069 SNP içerdiğini göstermiştir (NCBI GenBank bilgisi, Erişim tarihi: 18 Şubat 2017).

BSE'ye yakınlıkla ilişkili iki sığır *PRNP* alleli var. 23bp ve 12bp Ins/Del polimorfizmleri, bu polimorfik bölgeler arasında yüksek bağlantı dengesizliği gösterirler (Muramatsu et al., 2008). Koyun *PRNP* geni 13'üncü kromozomun q kolunda bulunur ve üç ekzon, iki intron içerir. Prion geninin AOC'si yalnızca ekzon3 bölgesini içerir. Koyun prion geninin AOC'de , üç bölgenin skrapi'ye yakınlıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (koyun prion proteini 256 amino asitten oluşmaktadır): 136, 154, 171. Bu pozisyonlarda hastalığa dirençsiz bireylerde amino asitler sırasıyla Alanin Valin'e, Arjinin Histidin'e, Glutamin Arjinin'e değişmektedir. Sonraki çalışmalarda daha fazla polimorfizm bulunmuştur (M111T, G127S, G127V, H143R, G145V, N146S) (Frootan et al., 2011).

Sığır *PRNP* geninde iki önemli fonksiyonel bölge belirlenmiştir. Birinci bölge, ekzon1 ve ekzon2 ile birlikte promotor bölgesini içerir. İkinci bölge 795bp'lik ekzon3 AOC'yi oluşturmaktadır (Sakudo et al., 2011). Şekil 2.1, *Bos taurus PRNP* geninin ve indel polimorfizmlerinin basit genomik yapısını göstermektedir.

Manda prion geninin promotoru ve intron1 bölgesi polimorfizmleri son yıllarda çalışılmıştır. Öztapak (2009), Anadolu ırkı mandalarının indel polimorfizmlerinin allel, genotip ve haplotip frekanslarının sığır *PRNP*'si indel polimorfizmlerinkinden belirgin şekilde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bir başka çalışmada, Anadolu, Murrah ırkları ve Murrah×Anadolu melezlerine ait manda popülasyonlarında *PRNP*'nin promotor ve intron1 bölgesindeki indel polimorfizmleri incelenmiştir. Sonuçlar, her iki lokusta da delesyon alleli olmadığını göstermiştir (Yaman et al., 2016). Çin manda popülasyonları üzerinde yürütülen araştırmalar ise *PRNP* geninin kodlama bölgesinde SNP'lerin genotipik frekanslarını ortaya koymuştur. SNP dağılımı beş bölgede

gözlemlenmiştir (Zhao et al., 2015). Çalışılan manda ırkları populyasyonlarında *PRNP* kodlama bölgesi polimorfizmleri ile ilgili herhangi çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2.1 Sığır *PRNP* geninin basitleştirilmiş genomik yapısı. Sığır *PRNP*'sinin 23bç/12bç indel polimorfizmleri (Sander et al., 2004).

2.3 Prion Proteini

Prion proteininin başlıca fonksiyonu merkezi sinir sisteminde neröprotektif etki yapmaktır. PrP ile tanımlanan neröprotektif etkiler, antioksidan aktivite, hücre yüzeyi sinyalleme yoluyla başlatılır (Roucou et al., 2004). Normal prion proteini hücrenin yaşamını sürdürmesinde, apoptozise karşı korumada, oksidatif stresse karşı korumada ve hücre adyeyonunda rol oynamaktadır. PrP, nöronlarda yüksek miktarda eksprese olmaktadır ve bu sebepten *PRNP* geninin evrimsel açıdan korunmuşluğunu ortaya koymaktadır. Çalışmalar, insan *PRNP* geni ile sığır *PRNP* geni arasında %92,8 oranında benzerlik olduğunu göstermiştir. İnsan *PRNP* geni, 253 amino asit uzunluğunda aktifleşmemiş bir proto-protein kodlamaktadır. Proteinin olgun halinde, ilk 22 amino asit uzunluğundaki dizi translasyon sonrasında bölünür ve 23 amino asit Ser230'a GPI çapa eklenmesine yönelik parçalanır. Çizelge 2.2'de sözügeçen bölgeleri göstermektedir. Hücre dışı proteinler gibi, PrP de hücrenin dış yüzeyine bağlanır. Bu proteinlerin, Asn181 ve Asn197'de iki N-bağlı glikozilasyon bölgesi vardır (Rudd et al., 2001).

Çizelge2.2 İnsan PrP proteininin önemli bölgeleri.

PrP proteininin önemli bölgeleri (insanda)	Amino asit pozisyonu
Sinyal peptidi	1-22, 230-253
Oktamer peptit tekrar bölgesi	51-91
Hidrofobik bölge	112-127
N-bağlı glikozillenmiş bölgeler	181, 197
N-terminal domaini	22-127
C-terminal domaini	127-230

İnsan PrP^c'nin üç boyutlu yapısı Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) metodu ile tespit edilmiştir ve oldukça yapılanmış C-terminal bölgesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. İncelenen bölge, üç α -heliks, çift sarmallı antiparalel β -yaprak ve yapılanmamış bir N-terminal kuyruğu içerdiği izlenilmiştir. Yapısal ve dinamik özelliklerine göre, hücrel prion proteini-PrP^c iki kısma ayrılır. Memelilerde türlere bağlı olarak, proteinin N-terminalı değişken sayıda oktamer peptit tekrarları-*PHGGSWGQ* içerebilmektedir. Her oktamer peptit, iki değerli metalleri (Cu²⁺) bağlar. PrP C-terminalı, 3 α -heliks (H1, H2, H3) ve kısa, antiparalel, çift sarmallı β -yaprakları (S1, S2) ile küre şeklinde bir yapı oluşturmaktadır. H2 ve H3, disülfür köprüsü vasıtasıyla Cys179 ve Cys214 ile bağlanmaktadır. FTIR, CD yöntemleriyle ikincil yapının analizi, PrP^c'nin yüksek α -heliks içeriğine (%42) ve düşük β -yaprak içeriğine (%3) sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Protein yapısını anlamak amaçlı hücrel prion proteini lipozomlara dahil edilmiş ve sonuçta protein yapısında büyük değişikliklerin ortaya çıktığı görülmüştür. Lipozom ile kapsüllenmiş PrP^c %34 β -yaprak, %20 α -heliks ve %46 hem rastgele katlanma, hem de β -katlanmalara sahiptir (Sakudo et al., 2010).

Önceki araştırmalardan mandanın prion hastalıklarına karşı duyarlılığı düşük olan türlerin arasında olduğu bilinmektedir. 264 amino asit uzunluğunda olan manda prion proteini birincil yapı açısından sığırınki ile çok benzerdir. Bunun yanında, daha üst yapılarda ve protein-protein etkileşiminde özgün nitelikler göstermektedir. Zhang (2013), manda PrP'nin homoloji yapısını tanımlamış ve bu çalışmadan elde edilen manda PrP'nin nötr ve düşük pH değerlerinde çok dengeli yapıda olduğunu ortaya koymuştur.

2.4 PRNP Geni İle İlişkili Hastalıklar

Prionla ilgili hastalıklar bulaşıcı nörodejeneratif hastalıkları grubuna dahil olmaktadır. İnsan (Kuru, CDJ, GSS, Fatal familial insomnia), koyun (scrapie), sığır (BSE) bu grup hastalıklara dirençsiz türlerdir. Prion hastalıkları, astrositoz (nörodejeneratif hastalık sırasında yakındaki nöronların yıkılması ile gözlenen astrosit sayısı artışı), nöronal hücre kaybı ve prion proteininin birikimi gibi üç ana özelliği ile karakterize edilmektedir (Çizelge2.3). Bunlar aynı zamanda klinik belirtilerle ilgilidir. Semptomlar, hastalığın ileri aşamalarında ataksi ve/veya demans içerir. Beyin fonksiyonunun ilerleyici kaybı ölümle sonuçlanır (Sakuda and Ikuta, 2009).

Prion enfeksiyonlarının gelişimi temelini öncelikle PrP'nin yapı değişim mekanizmasına dayandığı ileri sürülmüştür. Konakçı sinir hücrelerinde ifade edilen PrP^c'nin hücresel izoformu prion ile enfekte olmuş hayvanlarda hücre ölümünü indükleyen izoforma-PrP^{Sc}'ye dönüşmeye sürüklenir. Bu nedenle, prion hastalıkları Alzheimer ve Parkinson hastalıklarını da içeren “proteinin yanlış katlanması sonucu oluşan hastalıklar”a aittir. Translasyon sonrası herhangi bir modifikasyona sahip olmayan, hücresel prion proteini (PrP^c) için bir model olan, bakteride ifade edilen rekombinant prion proteininin (rPrP) yüksek çözünürlüklü NMR çalışmaları, katlanmış bir C-terminal alanını ve çoğunlukla yapılandırılmamış N-terminal bölgesini ortaya çıkarmıştır (Wuthrich and Rick, 2001). Türlelere bağlı olarak, esnek N-terminalı, Zn²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺ ve Mn²⁺ gibi iki değerlikli katyonlara zayıf bağlandığı halde, Cu²⁺ya belirli bir afinite sergileyen en az dört Glisin'le zengin oktam peptid tekrarını içerir. İki kısa β-yaprak ve üç α-heliksten oluşan ve H2 ile H3'ü birbirine bağlayan bir disülfür bağı içeren PrP globüler domaini birçok memeli türünde oldukça iyi korunmuştur. Bu alan, aynı zamanda, N-bağlı glikozilasyon için iki potansiyel bölge içerir (Choi et al., 2006). “Protein-only” hipotezini ele alarak, prionların çoğalmasının, normal hücresel PrP^c'nin toplanması yoluyla bulaşıcı PrP^{Sc}'nin kendiliğinden dönüşmesi fikrini desteklemektedir. PrP^c ve PrP^{Sc} aynı kovalent yapıyı (proteinin birincil yapısı) paylaşmış görünse de, biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerde oldukça farklıdırlar. Hücresel PrP^c monomerik, proteinaz duyarlı ve iyonik olmayan çözünürlerde çözünürken, PrP^{Sc} çözünmez ve agrega niteliğindedir (Weissmann, 2004).

Bilgisayar simülasyonu ve deneysel analiz prion hastalıklarının incelenmesinde kullanılan iki olası yaklaşımdır. PrP^{Sc} izolasyonunun zor koşullar gereksinimi, deneysel olarak biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemlerin çoğunun kullanılmamasına neden olmaktadır. Prion çalışmalarını laboratuvarlarda yürütmenin zorluklarını hesaplama yöntemlerinin, çeşitli veritabanlarının ve yüksek hızlı merkezi işlem birimlerinin geliştirilmesi ve biyoloji bilimlerine uygulanması azaltmıştır. Biyoinformatik yöntemler daha az maliyet ve işçi sayısı ile kısa zamanda yüksek olası ihtimalleri belirleyip hızlı şekilde sonuçlara varmayı hedeflemektedir. Örneğin, insan ve koyun prion hastalıklarına yatkınlığın, ilgili genin açık okuma çerçevesinde meydana gelen mutasyonlar ve polimorfizmler ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Novakofski et al., 2013). Diğer raporlara (Un et al., 2008; Oztabak et al., 2009) göre, deli dana hastalığına duyarlılığı, *PRNP* geninin promotor bölgesindeki polimorfizmlerle kuvvetli bir şekilde ilişkilidir ve gen ifadesini etkilemektedir.

Prion hastalığının henüz tedavisi olmasa da bazı klinik bulgular vardır. Amerika Ulusal Prion Kliniği hastalıklı kişilerle çalışırken buldukları semptomları aşağıdaki şekilde özetlemiştir: davranışsal belirtiler, iletişim sorunları, hafıza/bilişsel açıklar, hareket problemleri, yutkunma sorunları, görsel/algısal sorunlar, nöbetler (Prion Birim Tıbbi Araştırma Konseyi, Erişim tarihi: 14 Mart 2017).

Çizelge2.3 TSE örnekleri.

TSE hastalıkları	Tür
Bovine spongiform encephalopathy	sığır
Scrapie	koyun
Creutzfeldt-Jakob (CJD), Kuru, Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (GSS)	insan
Feline spongiform encephalopathy (FSE)	kedi
Transmissible mink encephalopathy (TME)	Evcil vizon

Scrapie koyunlardaki prion hastalığıdır. 136., 154. ve 171.ci pozisyonlardaki polimorfizmler, scrapie'ye karşı farklı duyarlılığa neden olur. Ala136-Arg154-Arg171 (ARR), scrapie'ye dirençli iken, Val136-Arg154-Gln171 (VRQ) daha yüksek ve Ala136-Arg154-Gln171 (ARQ) varyantı daha düşük duyarlılığa sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1947'te ilk vakası teşhis edilen scrapie'nin daha sonra dünya çapında vakaları tespit edilmiştir. Scrapie ile enfekte olmuş hayvanlar kilo vermesi, yün çekilmesi, davranış

değişiklikleri, ses ve harekete karşı duyarlılığın artması, bacaklarda veya yanlarda ısırma gibi klinik belirtilere sahiptir (BSE Üzerine Sığır Kontrol Programı, Erişim tarihi: 29 Nisan 2017).

2.5 Mandada (*Bubalus Bubalis*) PRNP çalışmaları

Evcilleştirilmiş manda, Asya ülkelerinde tarımın önemli bir parçası olmuştur. *Bubalus bubalis* 5000 yıldan beri hayvancılıkta kaliteli süt, et ve deri üretilmesi üzerine beslenmektedir (Nanda and Nakao, 2003). Araştırmacılar iki tip yerli manda sınıflandırmışlar: nehir mandası ve bataklık mandası. Nehir tipi manda, Hindistan'dan İtalya'ya, Pakistan, Irak, Suriye, Mısır, Türkmenistan, İran, Yunanistan ve Bulgaristan'dan geçerek yayılmıştır. Nehir mandasında kromozom sayısı 50 ($2n=50$), bataklık mandasında ise 48'tir ($2n = 48$). Farklı kromozom sayılarına rağmen manda tipleri birbirleriyle çiftleşebilmekte ve doğurgan bireyler üretebilmektedir (Yavasoğlu et al., 2014).

Mandada PRNP geninin kromozomdaki konumu belirtilmemiştir. Ekzon sayısı 3 olan bu genin boyutu 17kb uzunluğundadır. AOC'si 795bç uzunluğunda olan manda prion geni sığır prion genindeki ekzon3'te yerleşen 795bç uzunluklu AOC ile yüksek benzerlik oranı göstermektedir. Manda prion geninin birçok popülasyonda promotor ve intron1 bölgesi incelenirse de AOC'nin farklı popülasyonlarda incelenmesi gerekçesi vardır (National Center for Biotechnology Information, Gene, Erişim tarihi: 13 Haziran 2017).

Sığırlarla yakın filogenetik ilişkilerine rağmen, manda BSE'ye dirençlidir ve manda (*Bubalus bubalis*) PRNP gen analizleri son yıllarda farklı ülkelerde başlatılmıştır. Manda ve sığırların karşılaştırmalı analizi, önemli SSE'ye duyarlılık faktörlerinin karşılaştırılmasıyla yürütülmektedir. Bu faktörler aşağıdakilerdir: 1) ins/del polimorfizmleri- promotor bölgede 23bç indel, intron1 bölgede 12bç indel; 2) kodlama bölgesinde bulunan oktapeptit tekrarlarının sayısı; 3) amino asit polimorfizmleri (Zhao et al., 2015).

Önceki araştırmalardan (Clawson et al., 2008; Haase et al., 2007) PRNP ifadesinin ve aynı zamanda BSE duyarlılığının 12bç ve 23bç delesyonlar ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Oktamer peptit tekrarlarının artması, prion hastalığına bağlı mutasyonlara neden olabilmektedir. Son olarak, amino asit değişiklikleri de bu bozukluğa yol açmaktadır (Harman and Silva, 2009; Moore et al., 2006).

Yürütülen *PRNP* çalışmaları, manda ve sığırlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymuştur (Çizelge 2.4). Önceki araştırma raporlarına göre, Anadolu, Pakistan, Tayland, Endonezya, Alman, Çin mandalarında iki *PRNP* indel polimorfizmleri sığırlarınki ile karşılaştırıldığında önemli frekans farkı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuçlar, incelenen manda *PRNP*'de anlamlı derecede düşük 12bç ve 23bç delesyon allel frekansları göstermiştir. Çizelge2.4 önceki çalışmalarda farklı sığır ırkları ve Anadolu ırkı mandasında *PRNP* indel polimorfizm allel frekanslarının karşılaştırmalarını göstermektedir (Öztabak et al., 2009; Yaman et al., 2016).

Çizelge2.4. *B.bubalis* ve *B.taurus*'ta *PRNP* indel polimorfizmleri.

Tür	12bç ve 23 bç indel polimorfizmlerinin allel frekansları				Kaynakça
	23bç in	23bç del	12 bç in	12 bç del	
Korean Holstein	0.30	0.70	0.39	0.61	Jeong <i>et al.</i> 2006
German Brown	0.65	0.35	0.86	0.14	Juling <i>et al.</i> 2006
USA beef cattle	0.26	0.74	0.37	0.63	Clawson <i>et al.</i> 2006
Anadolu Grey	0.62	0.38	0.80	0.20	Un <i>et al.</i> 2008
Anatolian w.buff	0.92	0.08	0.86	0.14	Oztabak <i>et al.</i> 2009
Anatolian w.buff	1.00	0.00	1.00	0.00	Yaman <i>et al.</i> 2016
Murrah	1.00	0.00	1.00	0.00	Yaman <i>et al.</i> 2016

Kobak (2014), Polonya ve Almanya bölgesindeki manda populasyonlarının bir adet 12bç ve 23bç'lik insersiyon polimorfizmi ile karakterize edilen genotipe sahip olduğunu belirtmiştir. Pakistan sığırı ve mandasından edinilmiş *PRNP* geni ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (Imran et al., 2012). Bu çalışmalar aynı zamanda önceki çalışma sonuçları ile örtüşmektedir.

Sığır PrP'nin oktamere peptid motifleri prion proteininin N-terminaline yakın bir yerinde bulunmaktadır. Sığır türlerinin üç oktamere peptid varyantı vardır: 5, 6 veya 7. Brun et al., 2007; Zhao et al., 2015, sığırlarla karşılaştırmalı analizlerinde, manda *PRNP* dizilerinde 3 SNP tespit etmişlerdir. Bir SNP birinci oktamere peptid tekrarın ilk nükleotidinde, diğer iki SNP beşinci ve altıncı oktamere tekrarların üçüncü nükleotitlerinde bulunmuştur. Birinci mutasyon, sığırdaki hidrofobik prolin (Pro) kalıntısının manda prion proteininde polar Serin'e (Ser) dönüşmesini sağlamıştır. Diğer iki sinonim polimorfizmler, amino asit değişikliklerine neden olmamaktadırlar. Zhao (2015), sağlam ve BSE hastalıklı sığırların arasındaki oktamere peptid polimorfizmlerinin genotip frekanslarının belirgin olarak farklı olduğunu, ancak allel frekanslarının önemli ölçüde farklı olmadığını belirtmiştir. Aynı

çalışmada Çin mandalarında *PRNP*'nin AOC'de 1 non-sinonim (Gly108Ser), 4 sinonim SNP olmak üzere 5 polimorfizm bulunduğunu açıklanmıştır. Kısacası, araştırma mandaların prion geninin promotor ve intron1 bölgelerinde düşük *del23* ve *del12* allel frekanslarını, altıncı oktamer peptid tekrar bölgesindeki düşük allelik frekansını ve kodlama bölgesinde çok az rastlanan amino asit değişikliklerini ortaya çıkarmıştır. Araştırmaların bir kısmı (Imran et al., 2012; Uchida et al., 2014), manda'nın filogenetik olarak yakın memeli türleriyle karşılaştırıldığında *PRNP* geninin benzersiz bir genetik zemine sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, manda *PRNP* gen analizi ile ilgili daha fazla çalışma, prion bozukluklarının genetik temellerinin aydınlatılması için faydalı olacaktır ve Anadolu, Murrah ırkları mandalarının *PRNP* geninin AOC verilerini ortaya çıkaracaktır.

2.6 Populasyon Genetiği

Türlerin genetik yapısında yer alan bütün genetik özelliklere genetik çeşitlilik adı verilir. Bu terim, populasyonun adaptasyonu ile çevresel değişiklikler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılır (Frankham, 2005). Evrimsel değişim oranı (R) öncelikle kantitatif genetik çeşitlilik ile belirlenir.

Çevresel değişiklikler, hayatta kalan türlerin benimsenmesiyle izlenen türlerin çeşitliliğine yol açmaktadır. Bir genin farklı allellere alternatif gen formu denilmektedir. Bu varyasyonun şeklidir ve farklı allellerin daha yüksek oranı, genetik çeşitliliğin sıklığını artırır. Gen havuzu, spesifik populasyona dahil olan toplam allel sayısıdır. Değişiklikler, genetik varyasyon düzeyini karakterize etmektedir. Bir genin allelleri zaman içinde bir populasyonda görünebilir ve/veya kaybolabilir. Zamanla, bir genin farklı allelleri yok olabilir ve populasyonda tekrar ortaya çıkabilir (Frankham, 2005).

Bir populasyondaki genetik çeşitliliğin esas ölçümleri, lokus hesaplamaları için polimorfik lokus ve alleldir. Genomdaki polimorfik lokusların oranı ölçülür. Nükleotit polimorfizmleri bir populasyondaki nükleotit çeşitliliğinin sonucudur ve takip eden çeşitlilik ölçümleri moleküler belirteçlerdir. Mitokondriyal DNA, tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler), mikrosatelit ve minisatelit dizileri bu tür belirteçlerdendir (Frankham, 2005).

Allel frekansı, bir populasyondaki bir gen varyantının oluşma oranını temsil eder. Bir allel frekansını hesaplamak için, işaretlenmiş alleller,

populasyondaki o bölgedeki tüm alellerin toplam kopya sayısına bölünür. Bir populasyonda allel frekansları genetik çeşitliliğe neden olur ve genetik sürüklenme oluşur, ya da populasyon içinde zamanla değişen allel frekansı sonucu yeni mutasyonlar oluşur (Scitable by Nature Education, Erişim tarihi: 31Ağustos 2016).

Bir haplotip kromozomal bölgenin belirgin bir halidir ve tek bir ebeveynden miras alır. Dahası, “haplotip” terimi SNP kümelenmesinin kalıtımına da değinmektedir. Bu kümeler, bireyler arasındaki DNA dizilerinde tek pozisyondaki varyasyonlardır (Cox and Moore, 2016). Genetik hastalıklar ve bunların özellikleri farklı araştırma araçları ile karakterize edilmektedir. En önemli araçlardan biri de genetik çeşitliliğdir. Haplotip, hastalıkla ilişkili çalışmalarda vakaları ve kontrolleri ayırır. Genetik çalışmalarda haplotipin önemi aşağıda sıralandırılmıştır:

- Hastalık ilişkilendirme çalışmalarında haplotiplerin kullanılması, yapılacak test sayısını azaltmaktadır;
- Haplotiplerle evrim çalışmaları gerçekleştirilebilmektedir;
- Linkaj analizlerinde kullanılmaktadır.

Haplotiplerin aksine, genotip, her iki kromozomdaki SNP kopyaları için baza sahiptir. Mevcut DNA dizileme tekniklerinin çoğu genotipik sonuçlar verir. Bununla birlikte, haplotip analizi hastalığın genetik çalışmalarında, özellikle de insandaki hastalıkların araştırılması daha yaygındır (Crawford and Nickerson, 2005). Haplotip frekansının tahmini için kullanılan bazı algoritmalar Beklenti Maksimizasyonunu temel alır. Bu yöntemler doğrudan olarak Hardy-Weinberg yasasına dayanılarak kendi olasılık fonksiyonunu kullanmaktadır. Bir bireyin iki haplotipinin populasyondaki haplotip dağılımından bağımsız olarak hareket etmesine neden olduğu varsayımının altını çizmektedir (Halperin and Hazan, 2004).

2.6.1 Hardy-Weinberg yasası

Hardy-Weinberg yasası matematiksel bir denklemdir. Bir populasyonun dengesindeki genetik varyasyonunu hesaplamak için kullanılmaktadır. Genetik sürüklenme, mutasyonlar, gen akışı, doğal seleksiyon ve rastgele olmayan çiftleşme populasyon dengesini bozabilen faktörlerdendir. Doğada dengenin sabitliği nadiren geçerli olabilir. Hardy-Weinberg yasası, doğada genetik varyasyonlar olarak ortaya çıkan

değişiklikleri hesaplamak için sunulan ideal bir modeldir. İlgili çalışmalarda, Hardy-Weinberg yasası, gözlenen popülasyonların genotip frekansları arasındaki farkı denge yoluyla türetmek için kullanılır (James, 1999).

Sözü geçen genetik çeşitlilik ölçümlerini analiz etmek için tezde uygun biyoinformatik yöntemler kullanılmıştır. Bölüm 3.6 ve 3.7’de yöntemler detaylı anlatılmıştır.

2.6.2 Polimorfizm

Genetik polimorfizm terimi ilk defa Ford tarafından tanımlanmıştır (1940). Aynı konumda iki veya daha fazla ayırıcı form oluşursa, bu oluşum polimorfizm olarak adlandırılır. Bu terim, tür içindeki bireyler arasındaki farklılıkları gösteren varyasyonları tanımlamak için kullanılır (Nanda and Nakao, 2003; Ford, 1965). İnsan genomu projesi, “shotgun dizileme” yöntemi ile insanın genom dizisini kodlayarak belirlenmiştir. İnsan genomu verilerinin yüksek kalitede %90 dizileri, diğer dizilerin ve genişletilen veritabanlarının karşılaştırılması için potansiyel bir veri haline gelmiştir (Venter et al., 2001). DNA dizilimi, verimli ve maliyeti az olan bir yöntemdir. Dahası, biyoinformatik araçların geliştirilmesi, DNA dizisinin ve tanımlanmış varyasyonlarının karşılaştırılması imkanını sağlamıştır (Ford, 1940; Nickerson et al., 1999).

Tek nükleotit polimorfizm (SNP), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, DNA’nın bir bölümünün insersiyon/delesyonları, minisatellitler: tekrarlanan baz çiftleri (birkaç yüz baz çift), mikrosatellitler: 2-4 nükleotit tekrarlanmaları, *Alu* segmentinin varlığı veya yokluğu polimorfizm tipleridir (NCBI, Erişim tarihi: 14 Eylül 2016). Tek Nükleotit Polimorfizmleri (SNP), DNA sekansındaki bir nükleotit pozisyonunda iki ve ya daha fazla alternatif bazın (örneğin, A/G) %1’den fazla sıklıkta ortaya çıkması halidir. SNP’ler memeli genomunda bulunan en yaygın varyasyon tiplerinden biridir.

Son zamanlarda, SNP’ler hastalıklarla ilişkili çalışmalarda ve farmakogenetikte genotiplendirilmektedir. Binlerce SNP, genom dizileme projesinin bir ürünü olarak farklı türlerde tanımlanmıştır. Werner (2004), sığır genomik DNA’sının 91kb’lık kısmını rastgele tararken her 180 bç’te ortalama bir SNP bulunduğunu tespit etmiştir.

Memeli genomlarındaki yüksek yoğunluklu dağılımı nedeniyle, SNP’ler genetik belirteçler olarak kullanılmaktadır. SNP’lerin çoğu doğrudan

protein dizilerini etkilemez, ancak gen ifadesi üzerinde etkili olurlar. SNP'lerin bir diğeri önemli yanı genetik çeşitlilik sağlamasıdır. Hedef SNP bulgusu, denatüre eden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (dHPLC) ve DNA dizileme yöntemleri ile edinilmektedir. SNP tespit teknolojileri son derece otomatiktir, verimlidir ve az maliyetlidir (Marth et al., 1999).

SNP saptama teknikleri iki amaç için kullanılmaktadır: 1) yeni polimorfizmlerin taranması; 2) bilinen polimorfizmlerin allel(ler)inin tanımlanması. Yeni SNP'lerin taranması global/rastgele yaklaşıma ve bölgesel/hedef yaklaşıma bölünebilir (Werner et al., 2004). Hedeflenmiş SNP bulgusu, araştırılan bölgede SNP'lerin saptanmasına odaklanır (Galas and McCormack, 2002). PZR ürünlerinin doğrudan dizilimi, SNP keşfi için DNA dizileme teknolojisinde önemli bir gelişmeye neden olmuştur. Heterozigot ve/veya homozigot allellerden dizileme verisinin edinilmesi de SNP tespit çalışmaları için DNA hizalama teknolojisindeki bir gelişmedir. DNA diziliminin yüksek maliyet ve yoğun emek gerekçesini göz önüne alarak, yalnızca DNA'nın SNP'lerinin ve mutasyonlarının taranacağı bölgeleri kapsayan kısmını dizileme yöntemleri geliştirilmiştir (Kwok et al., 1994).

DNA dizi analizörü yazılımı otomatik olarak DNA dizisi atamaya dayalıdır. Daha sonra sonuç dizileri homoloji arama programları ile diğeri dizilerle karşılaştırılabilir. DNA dizileme verisinin kalitesi iyi ise ve SNP'nin her iki alleli de homozigot örnekler arasında bulunursa, SNP çok etkili bir şekilde işaretlenebilir. Gözlenen homozigot numunelerde allellerden sadece bir tanesi mevcutsa, SNP tespit edilmeden önce heterozigot numuneler homozigot numunelerden ayrılmalıdır. Doğru dizileme modelinde, heterozigot bir DNA örneğindeki bir polimorfik baz, iki taban zirvesi ile temsil edilir. Yaklaşık olarak tepe yüksekliğinin yarısı dizilerin geri kalan kısmı olarak gösterilir (Kwok and Chen, 2003).

2.7 Biyoinformatik Veri Analizi

İnsan Genom Projesi'nden sonra, erişimi açık genomik bilginin çokluğu (yaklaşık üç milyar baz çifti), biyoinformatik yaklaşımlara önemli bir ihtiyaçla sonuçlanmıştır. Genetik hastalığı anlamakta, ilaç geliştirmede yeni moleküler hedefler bulmak için biyoinformatik önemli bir araçtır. Bunun gereği olarak, bir takım üniversiteler, devlet kurumları ve ilaç firmaları biyoinformatik gruplar oluşturmuştur. Çalışılan gen ve/veya protein dizilerinin

elde edilmesi için etiketlenmiş, hazırlanmış materyaller biyoinformatik araçlarda kullanılır. Diziler, daha önce araştırılan materyalden de elde edilebilir. Sekansın her iki türü de biyoinformatik araçlarla birçok yönden analiz edilebilir. Dizilim “kısa işaretler” ile gerçekleştirilir ve daha sonra hazırlanan diziler okuma kodlarına getirilir. Diziler, eşleşen bölgeleri hizalamak ve dizilere uyuşmayan “harf” aramakla karşılaştırır (Heracle Biosoft, Erişim tarihi: 24 Temmuz 2016).

Biyoinformatiğin bir dalı da dizi analizidir. Çeşitli analitik yöntemleri izleyerek DNA, RNA veya protein sırası-fonksiyon, yapı ve/veya evrimi anlamada dizi analizi önemlidir. Dizilim hizalama araştırması, biyolojik veritabanlarına karşın temel metottur. Toplanan dizi verileri, organizmaların genetik yapısını anlamaya fırsat verir. Bu nedenle, yeni eklenen dizilerin bilinen işlevlerle karşılaştırılması, yeni dizinin nereden geldiğini anlamının yoludur.

Dizilim analizi, karşılaştırılmış diziler arasındaki benzerliklerin karşılaştırılması yolu ile genlerin ve proteinlerin işlevini tanımlamakta kullanılır. Bu günlerde, birçok araç ve teknikler, sekans karşılaştırmalarını (sekans hizalaması) sağlar ve hizalama ürününün genetiğini anlamayı sağlar. Sekans analizi, moleküler biyolojideki ilgili konulara uygulanabilir: 1) karşılaştırılmış diziler arasındaki benzerliği çoğunlukla homoloji ile çıkarma; 2) dizinin doğasında bulunan özelliklerini tanımlamak; aktif siteler, translasyon sonrası modifikasyon siteleri, gen yapıları, AOÇ, intron/ekzon dağılımları ve düzenleyici unsurlar; 3) dizi farklılıklarını ve varyasyonlarını tanımlama; nokta mutasyonları ve genetik işareti elde etmek için SNP; 4) dizilerin evrimini, moleküler yapısını ve genetik çeşitliliğini ortaya çıkarma (Durbin et al., 1998).

2.8 PrP Proteininin Post-translasyonel Modifikasyonları

PTM'ler ribozomlarla translasyon tamamlandıktan sonra bir protein üzerinde katalitik enzimler tarafından oluşan modifikasyonlardır. Fonksiyonel grupların bir proteine kovalent olarak eklenmesi, düzenleyici alt birimlerin proteolitik bölünmesi veya komple proteinlerin bozulması ile proteomun fonksiyonel çeşitliliğini artırırlar. Ökaryotik organizmaların çoğunda belirli protein sırası hareketleri, aşağıdaki translasyon sonrası modifikasyonlar ile düzenlenir. PTM'lere glikozilasyon, fosforilasyon, nitrosilasyon, ubiquitinyasyon, metilasyon, asetilasyon, lipidasyon vs. dahildir.

Hastalıkların araştırılmasında proteinlerin ifadesi önemlidir. PTM'ler, ifadenin nihai ürününün değiştirilmesinde önemli rol oynar ve biyolojik süreçler ve hastalık durumlarına katkıda bulunurlar (Taylor and Drickamer, 2003).

2.8.1 Glikozilasyon

Glikanların bir başka molekülün hidroksil veya başka bir fonksiyonel grubuna bağlanması reaksiyonu glikozilasyon olarak adlanır. N-, O- ve C-bağlı glikozilasyon, glipifikasyon (GPI çapa tutunma) ve fosfoglikozilasyon olmak üzere farklı glikozidik bağlantılar ile karakterize edilen PTM türüdür (Fukuda and Hindsgaul, 2000).

Protein glikozilasyonu hücrede çoklu fonksiyonlara sahiptir. ER'de, protein katlanmasını yönetmek için protein glikozilasyonu kullanılır ve sadece doğru katlanmış proteinlerin Goljiye taşınmasını sağlamak için bir kalite kontrol mekanizması görevi görür. Oligosakkaritler, proteinlerin aynı kökenli etkileşim alanlarına bağlanmasını kolaylaştırabilir veya bağlanmanı önleyerek protein-protein etkileşimlerini etkileyebilir (Rudd et al., 1999).

N-bağlı glikozilasyon, ER içindeki Asparajin'in amino grubuna glikan bağlanmasıdır (Zuegg and Gready, 2000). Tüm ökaryotik hücreler N-glikanlar üretirler. ER'de glukoz giderimi ve yeniden ilave edilmesi gibi birçok işlemi içermektedirler. Bu tür döngü, protein katlanma mekanizmalarında bulunur. N-bağlı glikoproteinler, proteinlere bağlandıktan sonra çoklu işlev basamaklarından geçecek geniş ve sıklıkla dallanmış glikanlara sahiptir. Bunlar proteinlerin stabilitesini değiştirebilirler (Lehman and Harris, 1997).

N-glikozilasyon en yaygın glikosidik bağlantı iken, O-glikoproteinler de hücre biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu tür glikozilasyon, musinlerin biyosentezinde, musin sekresyonlarını oluşturan O-bağlı glikozillenmiş, yüksek molekül ağırlıklı protein ailelerinde daha önemli rol oynamaktadır. O-glikozilasyon, hücre dışı matris bileşenleri yapmak için kullanılan proteoglikan çekirdeği proteinlerinin oluşumu için de kritik öneme sahiptir. Ek olarak, antikorlar çoğunlukla O-glikozile uğramaktadırlar (Chen and Chang, 2002) O-GlcNAc ilavesi ve çıkartılması aynı zamanda diyabette bozulan yolların kilit düzenleyicisi gibi görünmektedir. O-glikozilasyon protein stabilitesinin tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır (Zhou and Xiao, 2013).

Biyoinformatik yaklaşımlarla proteinin N-bağlı ve O-bağlı glikozilasyon olasılığı hesaplanabilir. Bu tezde Danimarka Teknik Üniversitesi tarafından kurulan NetNGlyc ve NetGlyc çevrimiçi yazılımı PrP protein glikozilasyon olasılığını hesaplamak için kullanılmıştır.

Fosforilasyon hücre döngüsü, büyüme, apoptoz ve sinyal iletim yolları dahil birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Fosforilasyon, protein fonksiyonunu düzenleyen ve hücredeki sinyalleri ileten en yaygın mekanizmadır. Protein kinazlar, metabolizma, transkripsiyon, hücre döngüsü progresyonu, farklılaşma, hücre iskelet düzenlenmesi ve hücre hareketi, apoptoz, hücreler arası iletişim ve nöronal ve immünolojik işlevleri yönlendiren sinyal yollarını ve hücresel süreçleri düzenler (Ciesla et al., 2011). Fosforilasyon, aktivite için 5' bölgesindeki kinazlar tarafından fosforilasyona dayanan birçok protein kinaz ve glikojen fosforilazlarda gözlemlendiği gibi, allosterik konformasyonel değişiklikler yoluyla enzim aktivitesini aktive edebilir. Fosforilasyon, amino asitlerin yan zincirine yüklü ve hidrofilik bir grup getirir; muhtemelen yakındaki amino asitlerle olan etkileşimleri değiştirerek bir proteinin yapısını değiştirir. Siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler), ökaryotik hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi düzenleyen Serin-Treonin kinazlardır. CDK'ler, bir düzenleyici sikline bağlandıklarında katalitik olarak etkindirler. Hayvan hücreleri, çeşitli sikline büyük spesifiklikle bağlanan en az dokuz farklı CDK içermektedir (Cole et al., 2003).

Son çalışmalar, prion protein fosforilasyonunun (özellikle cdk5 kinaz), birçok memelide BSE duyarlılığını tetikleyebileceğini önermektedir (Bloom et al., 1999).

3.MATERYAL VE YÖNTEMLER

SNP'lerin saptanması, genotip ve allel sıklıklarının hesaplanması için kullanılan veriler programlara uygun biçimde hazırlanmıştır. Aynı DNA dizileri çeviri yazılımı aracılığıyla polipeptit dizilerine çevrilmiştir. Daha sonra elde edilen protein dizileri ile PrP proteininin (*Bubalus bubalis*, *Bos taurus*) PTM'leri hesaplanmıştır.

3.1 Manda Verileri

SNP araştırması için, manda türüne ait *PRNP* geni dizileri grupta daha önce yapılan çalışmalardan elde edilmiş ve kullanılmıştır. Bunlar Anadolu, Murrah ırkları ve Anadolu×Murrah melezleridir. Bu çalışmada, 70 manda bireyi yer almıştır (Bkz. Çizelge 3.1). Mandaların *PRNP* geni AOÇ'leri, 99bç'den 642bç'ye kadar olan uzunlukta çalışılmıştır. 1bç-99bç ve 642bç-795bç uzunluğundaki kısımları veri tabanından (GenBank: AY720689.1) alınarak varsayılmış ve bu çalışmada araştırılmamıştır.

Çizelge3.1. SNP saptanmasında kullanılan manda ırkları.

Tür	İrk	Birey sayısı
<i>Bubalus bubalis</i>	Anadolu	28
	Murrah	20
	Anadolu×Murrah	22

3.2 Dizi Karşılaştırmasında Kullanılan *Bos taurus* DNA Verileri

Karşılaştırmalı analiz amacıyla *Bos taurus* türünün 73 bireyinden DNA dizisi örneği alınıp kullanılmıştır. DNA dizileri NCBI veritabanından alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). GenBank'tan alınan nükleotit dizilerinin referans numarası ve sığır ırklarının isimleri Çizelge3.2'de verilmiştir. GenBank, Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nde (National Institution of Health) bulunan dizi veritabanıdır. GenBank'daki tüm toplanmış genetik diziler erişime açıktır (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1): D36-42). Uluslararası Nükleotit Dizisi Veritabanı İşbirliğinin bir parçası olan GenBank, (DDBJ), (EMBL) ve NCBI'nin internet sitelerinde bulunmaktadır. Bu üç organizasyon her gün veri alışverişinde bulunmaktadır. GenBank veritabanı, bilimsel topluluğa erişim sağlamaktadır ve NCBI, GenBank verilerini kullanmaya veya dağıtmaya hiçbir kısıtlama getirmemektedir.

Çizelge3.2 GenBank'tan alınan sığır ırklarının bilgileri.

Sayı	Sığır ırklarının isimleri	GenBank'ta referans numaraları	
1	Angus	AY720508.1	AY720546.1
2	Blonde D'Aquitaine	AY720497.1	AY720498.1
3	Braunvich	AY720503.1 AY720504.1 AY720505.1 AY720506.1	AY720513.1 AY720514.1 AY720541.1
4	Brown Swiss	AY720492.1 AY720571.1	AY720588.1
5	Charolais	AY720530.1	AY720531.1
6	Chianina-Chiangus	AY720478.1	AY720479.1
7	Hereford	AY720481.1	AY720482.1
8	Holstein	EF626501.1 EF626503.1 EF626506.1 EF626507.1	AY720484.1 AY720486.1
9	Limousin	AY720509.1 AY720532.1	AY720533.1
10	Maine Anjou	AY720534.1 AY720535.1	AY720549.1 AY720591.1
11	Murray Grey	AY720570.1	
12	Red and Black Angus	DQ875166.1 DQ875168.1 DQ875169.1 DQ875170.1 DQ875171.1 DQ875173.1 DQ875174.1 DQ875175.1 DQ875196.1 DQ875197.1	DQ875198.1 DQ875199.1 DQ875200.1 DQ875201.1 DQ875202.1 DQ875203.1 DQ875204.1 DQ875205.1 DQ875206.1 DQ875207.1
13	Red Angus	AY720511.1 AY720512.1 AY720551.1	AY720552.1 AY720554.1 AY720574.1
14	Red Poll	AY720489.1	
15	Scottish Highland	AY720584.1	
16	Senepol	AY720493.1	AY720494.1
17	Shorthorn	AY720544.1 AY720555.1 AY720556.1	AY720560.1 AY720581.1 AY720582.1
18	White Park	AY720475.1	AY720476.1
19	Qinchuan	AY367640.1	

3.3 MEGA Yazılımı

MEGA, dizi hizalamasını gerçekleştirmek, farklılaşma sürelerini tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan bilgisayar programı paketidir (Kumar et al., 1994). Moleküler Evrimsel Genetik Analiz (MEGA) yazılımı, DNA ve/veya protein dizilerinin karşılaştırmalı analizleri için geliştirilmiştir. MEGA6.06 sürümü, dizi veri setlerinin boyutunu önceki sürümlerden iki defa daha çok gelişmiş bir bellek yönetimi uygulamak üzere geliştirilmiştir. Bu

sürüm <http://www.megasoftware.net/> adresinden ücretsiz olarak indirilebilir. Bu çalışmada MEGA programının hizalama işlevi kullanılmıştır. Gezginin bu işlevi, hizalamaları görüntülemek ve manuel olarak düzenlemek için seçenekler sunmaktadır. Düzenlenen hizalar daha sonra ClustalW uygulaması veya MUSCLE programı kullanılarak oluşturulabilir. DNA dizisi veri programını görüntülemek için iki görüş sunulmuştur: 1) DNA dizisinin şebekesi; 2) çevrilmiş protein sekansı şebekesi. Her sıra ve sütun sırasıyla tek bir diziyi ve bir bölgeyi temsil etmektedir. Hizalama şebekesi ayarı her bir nükleotide belirli bir renk atamak için kullanılabilir. Her bir hücrenin arka plan rengi şebekede de görüntülenmektedir. Bu çalışmada, ClustalW algoritması DNA sekans hizalamasında kullanılmıştır. ClustalW, homolog nükleotit ve/veya protein sekanslarını hizalamak için en çok kullanılan algoritmadır. ClustalW çoklu dizi hizalaması için aşamalı hizalama yöntemleri kullanır ve pratikte çok iyi performans göstermektedir (Tamura et al., 2013).

3.4 Temel Yerel Hizalama Araması Aracı (BLAST)

Benzer ve/veya homolog dizileri saptamak için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, Temel Yerel Hizalama Arama Aracı'dır. BLAST'ın işlevi, nükleotit veya protein sekansları ile veritabanlarından alınan sekanslar arasındaki yerel benzerlik bölgelerini bulmaktır. Benzerlikler eşleşmelerin istatistiksel önemini hesaplayarak bulmaktadır. Araç, Amerika Ulusal Biyoteknoloji Merkezi <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>'nin (Bkz. Ek B1), Welcome Trust Sanger Enstitüsünün Avrupa'daki işbirliğinin ve Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü internet sayfasında (EBI) <http://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core> bulunmaktadır.

MegaBLAST, kısa diziler arasındaki benzerliği aramak için kullanılan BLAST modülüdür (Morgulis et al., 2008). MegaBLAST, manda ve sığır DNA dizilerini incelemek için kullanılmıştır.

3.5 Expasy Çeviri Aracı

ExpASy (Expert Protein Analysis System-Uzman Protein Analiz Sistemi), sunucusu (<http://www.expasy.org>) İsviçre Biyoinformatik Enstitüsünün (İBE) yaşam bilimleri topluluk hizmetleri multidisipliner bir ekip tarafından sağlanmaktadır. Bu, protein ve proteomik veritabanları sağlamakta ve çok çeşitli analitik araçlara erişmektedir (Gasteiger et al., 2003). ExpASy

sekans analizi araçlarından biri Translate'tir. Çeviri aracı olan Translate, bir nükleotit sekansını altı okuma çerçevesinde bir proteine çevirebilir. Açıklanan araç <http://web.expasy.org/translate> internet sitesinde mevcuttur. DNA-protein çevirisi için kullanılan program, yüksek olası sonuçlar vermektedir.

3.6 Clustal Omega Yazılımı

Clustal Omega, protein sekansları için yaygın olarak kullanılan çoklu dizi hizalama programıdır. Biyolojik olarak divergent dizilerin çoklu dizi hizalamalarını üretmektedir. Her ikisi de evrim ağaçlarının türüdür. Çevrimiçi araç aşağıdaki adımlarla uygulanabilir: 1) giriş dizilerinin elle ayarlanması, 2) uygulanan araştırma nedeniyle takım parametrelerinin değiştirilmesi, 3) adım gönderilmesi. Sonuç, e-posta bildirim için bir başlık ve e-posta adresi ile belirtilmektedir. Hizalama için kutuya en az üç dizi girilmelidir. Diziler farklı biçimlerde mevcuttur: GCG, FASTA, EMBL, GenBank, PIR, NBRF, PHYLIP veya UniProtKB/Swiss-Prot biçimleri (William et al., 2013). Çalışmada FASTA formatında diziler kullanılmıştır.

2004 yılından bu yana, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (EMBL-EBI) İnternet Hizmetleri, çoklu dizi hizalama aracı-Clustal Omega da dahil olmak üzere, arabirimler vasıtasıyla veritabanlarına ve analiz araçlarına erişim sağlamaktadır. Çoklu dizi dizilimleri homolog dizilerin karşılaştırılmasını içermekte ve biyoinformatik analizin temelini oluşturmaktadır (Sievers et al., 2011). Program Genel Kamu Lisansı altındadır. Linux, FreeBSD, Windows ve Mac için önceden derlenmiş kaynak kodu (<http://www.clustal.org>) internet sitesinde mevcuttur. Tez araştırmasında çevirisi yapılmış protein dizileri bu programla hizalanmıştır.

3.7 DnaSP (DNA Dizi Polimorfizmi) Yazılımı

Nükleotit dizi verilerinden DNA'nın birkaç özelliğini analiz etmek için DnaSP bir araç olarak kullanılmaktadır. Program ölçümleri, populasyonlar içinde ve populasyonlar arası (linkaj, rekombinasyon gibi) kodlanmayan, sinonim veya non-sinonim dizilerin yerlerini içermektedir. DnaSP programı, 32 bit Windows altında IBM uyumlu bilgisayar üzerinde hesaplama yapabilmektedir. Çevrimdışı program, <http://dnasp.software.informer.com/5.1> internet sitesinden indirilebilir. Program aşağıdaki veri dosyası formatlarını okumaktadır: FASTA, MEGA, NEXUS, PHYLIP, HapMap3. Tüm veri

formatlarında, homolog nükleotit dizileri, ASCII- bilgi alışverişinde Amerikan standart kodu olarak adlandırılan yalnızca bir dosyayı içerir. ASCII'ye göre, bu dosyadaki her bayt metin dosyası bir karakteri temsil etmektedir. Diziler hizalanmalı ve dizilerin uzunluğu aynı olmalıdır. Nükleotit sekansları A, T veya U, C ve G harfleri (küçük, büyük harf veya büyük ve küçük harf karışımı) beş harf kullanılarak girilmektedir (Felsenstein, 1989; Kumar et al., 1994; Maddison et al., 1997).

Programın önemli bir fonksiyonu veri dosyası formatının çevirisidir. Veri dosyasının kaydedilmesi ve dışa aktarılması mümkündür. Bu komut, aktif veri dosyasını bir dosya biçiminden diğerine çevirmek için hesaplanmıştır. Komut ayrıca Arlequin proje dosyası veya Roehl Veri dosyası oluşturmasına izin vermektedir. DnaSP, haplotip bilgisi olan bir Arlequin proje dosyası (*.arp) oluşturabilir. Bu dosya biçimi, Arlequin yazılımı tarafından kabul edilen formattır (Librado and Rozas, 2009). DnaSP yazılımı çalışmada *.meg dosya biçimini *.arp dosya biçimine çevirmek için kullanılmıştır. Haplotip frekansını hesaplayan Arlequin programı *.arp dosya formatı gerektirmektedir.

3.8 Arlequin Yazılımı

Haplotip ve allel frekans hesaplamaları için Arlequin yazılımı kullanılmıştır. Çevirilen *.arp dosyası, giriş dosyası olarak kullanılmıştır. Haplotip frekans tahmini için 70 manda bireyinin verileri seçilmiştir. Haplotipler hesaplama yöntemlerinin değerlendirilmesi istatistiğine göre, Arlequin'in haplotip yapımında ve haplotip sıklığı tahmini için en iyi performansa sahip yazılımlardan biridir. Populasyon örneklerinin bir koleksiyonunun genetik ve demografik özellikleri hakkında bilgi çıkarılmasına olanak tanımaktadır. Tasarlanan grafik arayüz, verilerle gerçekleştirilmek istenen farklı analizlerin daha hızlı seçilmesini sağlamaktadır. Arlequin'de yapılan istatistiksel testler, gizli varsayımları en aza indirmek için seçilmiştir (Excoffier et al., 2010).

Arlequin, her iki veri biçimini de haplotipik veya genotipik olarak işleyebilir. Ana veri tipleri DNA dizileri, mikrosatellit verileri, standart veri, allel frekans verisidir. Maksimum olasılık yöntemleriyle hesaplanan populasyondaki haplotiplerin frekansının tahmini değerlendirme parametreleri aşağıdaki gibidir:

A) Delesyon Ağırlığı = 1;

- B) Geçiş Ağırlığı= 1;
- C) Dönüşüm Ağırlığı = 1;
- D) Epsilon Değeri = 1e-07;
- E) Çıktı için önemli basamaklar= 5;
- F) Orijinal haplotip tanımını kullanma, izin verilen eksik veri düzeyi = 0.05 (Excoffier and Lischer, 2010).

Analizler için DNA dizileri verisi kullanılmıştır. Program, herhangi seçilmiş bir uzunlukta DNA dizilerini çalıştırabilir. Her nükleotit ayrı bir lokus olarak düşünülmektedir. Dört nükleotit “C”, “T”, “A”, “G”, her lokus için belirgin allel olarak kabul edilmekte ve “-” silinen bir nükleotidi belirtmek için kullanılmaktadır. Haplotiplerin frekansı ve miktarı her lokusta ayrıca hesaplanmaktadır. Bunun yanısıra, programın bu işlevi sayesinde SNP'lere bağlı allel frekansını tespit etmek mümkündür. Programın çıktı dosyası, Microsoft Visual Studio programı tarafından okunan ve XML uzantılı olan dosyadır.

3.9 PTM Tahmini Sunucuları: NetNGly1.0, NetOGly4.0, NetPhos3.1

PrP post-translasyonel modifikasyon konformasyonları (N-bağlı, O-bağlı glikozilasyon, fosforilasyon) online sunucular tarafından hesaplanmıştır.

NetNGly1.0 sunucusu tarafından PrP proteinlerinin N-bağlı glikozilasyon bölgeleri tahmin edilmiştir. Bu sunucu <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> adresinde bulunmakta ve Asn Xaa-Ser/Thr sekanslarının dizilim bağlamını inceleyerek N-glikozilasyon bölgelerini bulmaktadır. Sunucu, seçilmiş amino asit sekansı içindeki N-glikozilasyonun pozisyonunu ve olasılık değerlerini dizinin FASTA formatını ekleyerek tahmin edebilmektedir. Amino asitlerin pozitif sonucu olarak >0.5 değeri kabul edilmektedir (Gupta and Brunak, 2002). Çizelge ve grafiklerle glikozilasyonun sonuçları verilmektedir.

O-bağlı glikozilasyon bölgeleri NetOGly4.0 sunucusu tarafından tahmin edilmiştir. NetOGly4.0 sunucusu, memeli proteinlerinde musin tür GalNAc O-glikozilasyon alanlarının tahminini yürütmektedir. Sunucu <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> adresinde bulunmaktadır. Diziliş sınırlaması, gönderme başına en fazla 50 dizi ve 200.000 amino asittir. Her dizi, 4.000'den fazla amino asit içermemelidir (Steentoft et al., 2013).

NetPhos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) sunucusu tarafından manda ve sığır PrP'nin fosforilasyon imkanı tahmin edilmiştir. NetPhos3.1 programı, nöral ağlarının topluluklarını kullanarak ökaryotik proteinlerdeki Serin, Treonin, Tirozin fosforilasyon bölgelerini hesaplamaktadır. Sıralanan kinazlar için program olasılık belirlemektedir: ATM, CKI, CKII, CaM-II, DNAPK, EGFR, GSK3, INSR, PKA, PKB, PKC, PKG, RSK, SRC, cdc2, cdk5, p38MAPK (Bloom et al., 1999) .

4. BULGULAR

4.1 Manda *PRNP* Geninde SNP Saptanması

Manda bireylerinin DNA verileri, Mega6.06 yazılımında hizalandırılmıştır. Araştırılan gen dizisinin uzunluğu 544bp'tir. *PRNP* geninin tam uzunluğunun 795bp olduğunu varsayarak, 1-99bp ve 642-795bp bölgeleri, veritabanında bulunan referans DNA dizisinden (NCBI, GenBank: AY720689.1) alınmıştır. Şekil 4.1'de, hizalanmış diziler ayrıntılarıyla beraber sunulmuştur.

Şekil4.1 Mega yazılımda hizalandırılmış gen dizileri.

Gen dizisinin sayısı, referans numaraları ve ismi sırayla sol tarafta gösterilmiştir. Dört renkli harfler (nükleotit kısaltmaları Adenin-yeşil, Guanin-mor, Sitozin-mavi ve Timin-kırmızı) sağdaki nükleotitleri göstermektedir. Aynı pozisyondaki nükleotitler, biri diğerinin altında olmak şartıyla yerleştirilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, 234. pozisyonda iki nükleotit A ve G gruplandırılmıştır. Ayrıca, R tip harf (kategorize edilmemiş R (gri) = (A veya G) aşağıdaki pozisyonda yer almaktadır. R harfi, analizde heterozigot allel olarak kabul edilmiştir. Kısacası, 234.pozisyon, SNP'lerle ifade edilmektedir.

M6: Alignment Explorer (bubalus bubalis.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	Group Name
1. Murrah1	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
2. Crossbred1	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
3. Crossbred2	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
4. Anatolian1	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
5. Anatolian2	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
6. Anatolian3	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
7. Murrah2	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
8. Crossbred3	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
9. Crossbred4	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
10. Anatolian4	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
11. Crossbred5	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
12. Crossbred6	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
13. Anatolian5	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
14. Anatolian6	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
15. Crossbred7	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
16. Anatolian7	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
17. Anatolian8	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
18. Murrah3	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
19. Anatolian9	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
20. Anatolian10	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
21. Crossbred8	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT
22. Anatolian11	TGTTGCATCACCAGTACCGAGAGAAATCCAGGCTTTATACCAACGAGGGGCAAGTGTGAT

SNP'ler beş konumda tespit edilmiştir: 126., 234., 285., 322 ve 615.ci pozisyonda. 126., 234., 285., 615.ci pozisyonlarda SNP'ler sinonim, 322.ci pozisyondaki SNP ise non-sinonimdir. Araştırma sonuçları Çizelge4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Polimorfik konumlarına göre *B.bubalis* örnekleri.
Yeşil renkle sinonim SNP'ler, kırmızı renkle non-sinonim SNP'ler işaretlenmiştir.

İrk	Polimorfik pozisyonlara göre örnek sayısı														
	126			234			285			322			615		
	A	G	R	A	G	R	A	G	R	A	G	R	A	G	R
Murrah	9	11	-	15	5	-	13	4	2	4	7	9	3	16	-
Anatolian	7	21	-	21	7	-	22	3	3	4	20	4	2	27	-
Murrah×Anatolian	5	16	1	13	6	3	12	6	5	6	7	9	2	20	-

4.2 *Bos taurus* PRNP Geninde SNP Saptanması

NCBI GenBank'tan sığır bireylerinin (73 örnek) rastgele seçilmiş prion geni dizileri, AOÇ'sindeki SNP'lerin tespit edilmesi amacıyla kullanılmıştır ve üç pozisyonun tek nükleotit polimorfizmlerle ifade edildiği gözlemlenmiştir. *Bos taurus* DNA dizilerinin referans numaraları Çizelge 3.2'de materyal ve yöntemler bölümünde gösterilmiştir. Sığır ırklarında görülen SNP saptanmasının sonucu Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Polimorfik lokuslara göre sığır ırkları ve bireylerinin miktarı (yeşil renk sinonim SNP'leri göstermektedir).

İrk	Polimorfik lokuslara göre örnek sayısı								
	234			339			576		
	A	G	R	C	T	Y	C	T	Y
Angus	-	2	-	1	1	-	2	-	-
Blonde D'Aquitaine	1	1	-	2	-	-	2	2	-
Braunvich	4	3	-	7	-	-	7	-	-
Brown Swiss	1	2	-	3	-	-	3	-	-
Charolais	-	2	-	2	-	-	2	-	-
Chianina-Chiangus	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Hereford	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Holstein	3	-	3	6	-	-	6	-	-
Limousin	1	2	-	3	-	-	3	-	-
Maine Anjou	-	4	-	3	1	-	4	-	-
Murray Grey	-	1	-	-	1	-	1	-	-
Red and Black Angus	10	6	4	19	-	1	14	1	5
Red Angus	1	5	-	2	4	-	4	-	-
Red Poll	1	-	-	1	-	-	1	-	-
Scottish Highland	1	-	-	-	1	-	1	-	-
Senepol	1	1	-	2	-	-	2	-	-
Shorthorn	2	4	-	2	4	-	6	-	-
White Park	2	-	-	2	-	-	2	-	-
Qinchuan	-	1	-	1	-	-	1	-	-

4.3 DNA Dizisinin Amino Asit Dizisine Çevirisi

Çevrimiçi ExPasy çeviri aracı (<http://web.expasy.org/translate/>), prion geni incelenen manda ve sığır DNA verilerinden olası amino asit sekanslarını elde etmek için kullanılmıştır (Bkz. Ek1.1). Çalışma sonucunda, SNP varyasyonu sebebiyle, *B.bubalis* prion proteininin olası iki varyantı ve *B.taurus*

prion proteininin bir varyantı bulunmuştur. Saptanmış SNP'ler sonucu, manda için hesaplanan prion proteininin iki olası varyantı Şekil 4.2a ve 4.2b'de detaylı anlatılmıştır. Kısaca, manda prion proteininin 5 pozisyonundaki amino asitleri aşağıdaki gibi karakterize edilmiştir:

- 1) 42a.a. P-Prolin'dir (kod: CCG, 126. pozisyonda nükleotit G/A'ya değişmiştir)
- 2) 78a.a. Q-Glutamin (kod: CAA, 234. A/G)
- 3) 95a.a. P-Prolin (kod: CCA, 285. A/G)
- 4) 108a.a. G-Glisin olup S-Serine değişir (kod: GGT, 322.G/A)
- 5) 205a.a. K-Lizin (kod: AAG, 615. G/A).

RRRGR

MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTG
 GSRYPGQGSPGGNRYPSQGGGGWGQPHGGGWGQPHGG
 GWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGGTHGQ
 WNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM
 SRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDQYSN
 QNNFVHDCVNITVKEHTVTTTTKGENFTETDIKMMERV
 VEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPPVILLISLLIF
 LIVG

Şekil4.2a. *B.bubalis* PrP varyant1 RRRGR

Aşağıda gösterilen varyant, daha büyük boyut ve koyu renkli harflerle gösterilmiş 5 SNP içermektedir. Görüldüğü gibi, büyük siyah harflerle sinonim SNP'ler işaretlenmiştir. Gözlemlenen kısımda SNP'ler 126. (42a.a CCG → CCA), 234. (78a.a CAA → CAG), 285. (95a.a CCA → CCG), 615. (205a.a.AAG → AAA) pozisyonunda sinonimdir ve 322.ci pozisyonda amino asit değişimine neden olan SNP (108a.a.GGT → AGT) non-sinonimdir.

RRRAR

MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTG
 GSRYPGQGSPGGNRYPSQGGGGWGQPHGGGWGQPHGG
 GWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGGTHSQ
 WNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM
 SRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDQYSN
 QNNFVHDCVNITVKEHTVTTTTKGENFTETDIKMMERV
 VEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSSPPVILLISLLIF
 LIVG

Şekil4.2b *B.bubalis* PrP varyant2 RRRAR

B. taurus'ta, 3 SNP'e bağılı olarak prion proteini translasyon olasılığı yalnızca bir varyantla karakterize olunmuştur. Şekil 4.2c'de polimorfik bölgelerdeki amino asitler aşağıda gösterilmiştir;

- 1) 78a.a. Q-Glutamin (kod: CAA, 234. A/G)
- 2) 113a.a. P-Prolin (kod: CCC, 339.C/T)
- 3) 192a.a. N-Asparagin (kod: AAC, 576.C/T).

ACC

```
MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGG
NRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQ
PHGGGGWGQGGTHGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLG
SAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVN
ITVKEHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVIL
FSSPPVILLISFLIFLIVG
```

Şekil4.2c. *B.taurus* PrP varyantı ACC

4.4 BLAST Sonucu

DNA dizilerinin homologlarını bulmak amacıyla BLAST yöntemi kullanılmıştır. İki varyantla yürütülen BLAST sonucu (varyantlar bölüm 4.3'de açıklanmıştır), referans DNA verilerinin *B.bubalis PRNP* mRNA için AY720689.1 ve *B.taurus PRNP* geni için AY367640.1 olduğu ortaya koymuştur. Referans DNA dizileri sığır ve manda varyant1 ve varyant2 ile karşılaştırılmıştır. MegaBLAST hizalama sonucu Şekil4.3'te verilmiştir.

Manda *RRRAR* nükleotit varyantı da BLASTN edilmiştir. BLASTN sonucu referans AY720689.1 ile %99 benzerlik göstermiştir. Veriler bu şekilde özetlenmiştir: maksimum ve toplam değeri = 1456, E değeri = 0.0, nükleotit benzerliği = 792/795 (Bkz. Ek 2).

Prion geni yapısını anlamak amacıyla iki en yakın türün DNA'ları karşılaştırılmıştır: sığır ve manda prion geni (Bkz. Ek 2.2). Sığır ve manda, *PRNP* gen dizileri on adet nükleotit farklılığı göstermektedir (Bkz. Ek 2.3).

Bubalus bubalis isolate JW41_1 prion protein (PRNP) gene, exon 3 and complete cds

Sequence ID: [AY720689.1](#) Length: 795 Number of Matches: 1

[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 795 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1469 bits(795)	0.0	795/795(100%)	0/795(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTGAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGTCATGTGGAGTGAC	60		
Sbjct 1	ATGGTGAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGTCATGTGGAGTGAC	60		
Query 61	GTGGGCTCTGCAAGAAGCGACAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA	120		
Sbjct 61	GTGGGCTCTGCAAGAAGCGACAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA	120		
Query 121	TACCCAGGACAGGGCAGTCTGGAGGCAACCGTTATCCATCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG	180		
Sbjct 121	TACCCAGGACAGGGCAGTCTGGAGGCAACCGTTATCCATCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG	180		
Query 181	GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCAT	240		
Sbjct 181	GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCAT	240		
Query 241	GGAGGTGGCTGGGGTCAGCCGCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCGCATGGTGGTGGAGGC	300		
Sbjct 241	GGAGGTGGCTGGGGTCAGCCGCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCGCATGGTGGTGGAGGC	300		
Query 301	TGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGTCAATGGAAACAGCCAGTAAGCCAAAAACCAACATG	360		
Sbjct 301	TGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGTCAATGGAAACAGCCAGTAAGCCAAAAACCAACATG	360		
Query 361	AAGCATATGGCAGGAGTGTCTGACGTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATG	420		
Sbjct 361	AAGCATATGGCAGGAGTGTCTGACGTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATG	420		
Query 421	CTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGTAATGACTATGAGGACCGTTAC	480		
Sbjct 421	CTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGTAATGACTATGAGGACCGTTAC	480		
Query 481	TATCGTGAAAACATGCACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTAT	540		
Sbjct 481	TATCGTGAAAACATGCACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTAT	540		
Query 541	AGTAACCAGAAACACTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGGAAACACACAGTC	600		
Sbjct 541	AGTAACCAGAAACACTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGGAAACACACAGTC	600		
Query 601	ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTACCAGAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTG	660		
Sbjct 601	ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTACCAGAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTG	660		
Query 661	GTGGAGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAACGAGGG	720		
Sbjct 661	GTGGAGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAACGAGGG	720		
Query 721	GCAAGTGTGATCCTCTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTGCTCATTTTT	780		
Sbjct 721	GCAAGTGTGATCCTCTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTGCTCATTTTT	780		
Query 781	CTCATAGTAGGATAG 795			
Sbjct 781	CTCATAGTAGGATAG 795			

Şekil 4.3. Hizalama sonucu.

Ayrıntılara göre sıralanan en önemli hizalama dizileri aşağıdaki listelenmiştir: isim, sıra numarası, dizinin uzunluğu, eşleşme sayısı, puanların özeti ve ek olarak boşluklar ve şerit konumu (artı veya eksi). Sorgu ve konu hizalanması, her nükleotit için ayrıca gösterilmiştir.

4.5 Protein Hizalama Sonucu

Üç protein dizisi: manda v_1(*RRRGR*), manda v_2(*RRRAG*) ve sığırcı(*ACC*) hizalandırılmıştır. Sonuç dosyası “Clustal with numbers”-amino asit pozisyonları numaralarını da içermektedir. Çoklu dizi hizalaması, 3 protein dizi varyantı arasında altı amino asit değişikliğinin bulunduğunu ortaya koymuştur (Bkz. Ek 3.1; 3.2; 3.3). 4. ve 54.cü pozisyonları amino asit değişimi farklı amino gruplarına aittir. 16., 108., 123. ve 257.ci pozisyonlar, aynı gruplara ait amino asit değişimlerini içermektedir. Manda varyantları

arasında, 108. pozisyonda amino asit değişimi gözlemlenmiştir. Sonuç Şekil 4.4'te gösterilmiştir. İki türe ait prion protein dizisinin filogenetik ağacı Şekil 4.5'da gösterilmiştir.



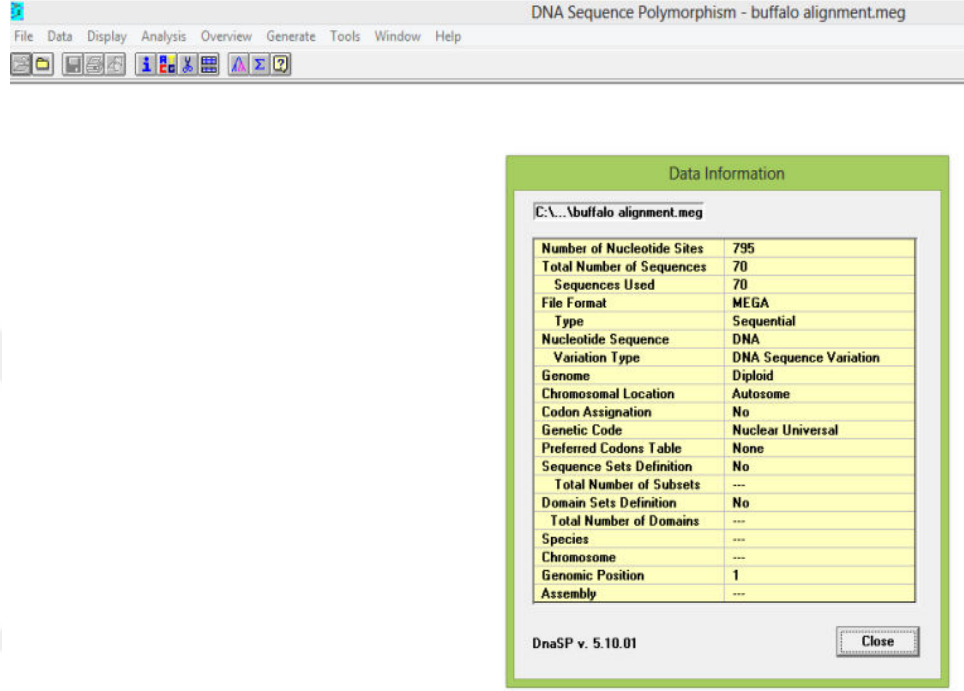
Şekil 4.4 Polipeptit dizisine çeviri sonuçları

Amino asitler renkli harflerle temsil edilmiştir. Renkler aynı amino asit gruplarını göstermektedir: kırmızı-küçük + hidrofobik + Y (aromatik), mavi-asidik, mor-bazik-H, yeşil-hidroksil + sülfhidril + amin + G, gri-nadir amino/imino asitleri. Tek, tam olarak korunan kalıntılar yıldız işareti (*) ile, çok benzer özellikleri olanlar iki nokta üst üste (:), zayıf benzer özelliklere sahip olanlar ise nokta (.) işareti ile gösterilmiştir.

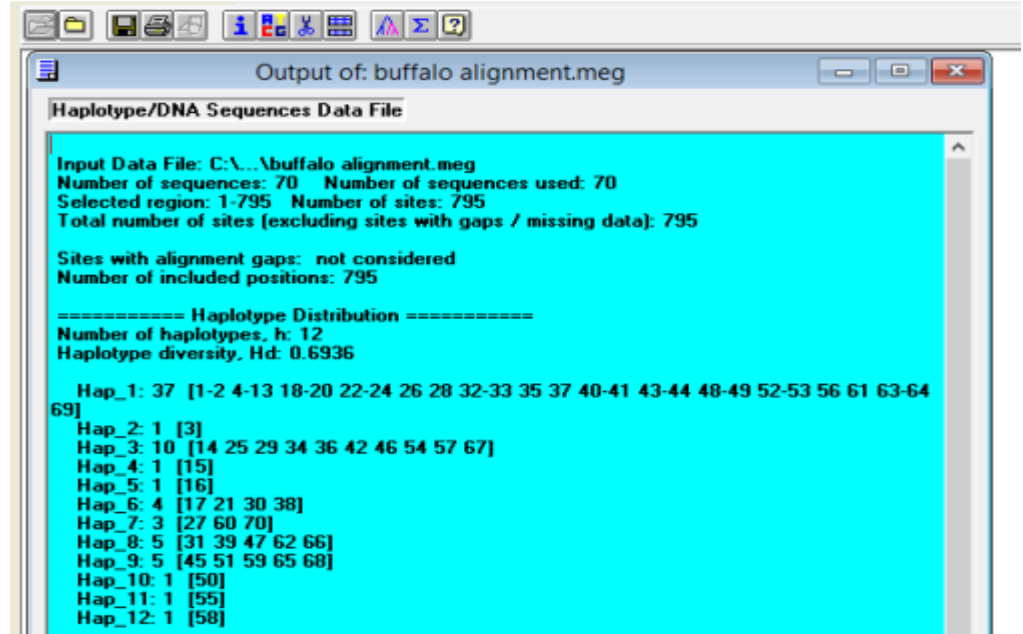
4.6 Haplotip Analizi

Öncelikle, manda DNA verileri *.mas biçiminden *.meg formatına dönüştürülmüştür (bkz.; EK 4.1). Ardından *.mas formatlı DNA dosyaları DnaSP programını başlatmak için giriş dosyası haline getirilmiştir. DnaSP yazılımı aracılığıyla, Arlequin programında haplotip hesaplaması için gerekli genetik verileri haplotip verilerine değiştirmiştir. Şekil4.6a; 4.6b'de nükleotit pozisyonlarının sayısı, dizilerin toplam sayısı, dosya biçimi, nükleotit dizisi, genom, kromozomal konum, genomik konum, haplotip grupları ve tahmin edilmiş haplotip gruplarının isimleri verilmiştir. Kaydedilen *.hap biçimli

dosya Arlequin programı için giriş dosyasını oluşturmuştur ve lokus başına haplotip ve allel sıklıkları hesaplanmıştır. Arlequin programı ile 12 manda haplotipi ve 7 sığır haplotipi (Bkz. Şekil 4.7) hesaplanmıştır. Görüntüde haplotip frekansı, birey sayısı ve haplotip dizileri verilmiştir. Çizelge 4.3a; 4.3b; 4.3c; 4.3d, her iki türün haplotipi ve allel frekansı sonucunu temsil etmektedir.



Şekil 4.5a DnaSP giriş dosyası parametreleri.



Şekil 4.5b DnaSP sonuç dosyası.
Haplotiplerin sayısını ve haplotip dizilerini.

buffalo alignmentDNASP.xml* - Microsoft Visual Studio 2005 Tools for Applications

File Edit View Debug XML Tools Window Community Help

buffalo alignmentDNASP.xml*

Haplotype database content:

No.	Freq.	s.d.	Haplotype:
1	0.528571	0.060095	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
2	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
3	0.142857	0.042126	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
4	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
5	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
6	0.057143	0.027943	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
7	0.042857	0.024382	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
8	0.071429	0.031004	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
9	0.071429	0.031004	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
10	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
11	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM
12	0.014286	0.014286	ATGGTAAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGTGGAGTACGTGGGCCCTGCAAGAAGCGACCAAAAACCTGGM

Şekil 4.6 Haplotip sonuçları

Çizelge 4.3a *B.bubalis*'in haplotip grubu.

No	Haplotip	Haplotip sıklığı	Örnek sayısı
1	GAAGG	0.528	37
2	GAAAG	0.014	1
3	AGGAG	0.143	10
4	GAGGG	0.014	1
5	GAGAG	0.014	1
6	GGAGG	0.057	4
7	AGAGG	0.042	3
8	GAAGA	0.071	5
9	AAAGG	0.071	5
10	AAAGA	0.014	1
11	AAAAG	0.014	1
12	AGGAA	0.014	1

Çizelge 4.3b *B.bubalis*'te polimorfizmlere göre allel ve genotip sıklığı

Pozisyon	Allel sıklığı		Genotip sıklığı		
	G	A	GG	AA	GA
126	0.700	0.300	0.490	0.090	0.42
234	0.257	0.743	0.066	0.552	0.382
285	0.186	0.814	0.034	0.663	0.303
322	0.800	0.200	0.640	0.040	0.32
615	0.900	0.100	0.810	0.010	0.18

Çizelge 4.3c *B.taurus*'un haplotip grubu

No	Haplotip	Haplotip frekansı	Örnek sayısı
1	ACT	0.055	4
2	ACC	0.466	34
3	GCC	0.274	20

4	GTC	0.014	1
5	GCT	0.028	2
6	CTC	0.137	10
7	ATC	0.028	2

Çizelge 4.3d *B.taurus*'ta polimorfizmlere göre allel ve genotip frekansı

Pozisyon	Allel sıklığı				Genotip sıklığı					
	G	A	C	T	GG	AA	GA	CC	TT	CT
234	0.45 2	0.548	-	-	0.204	0.300	0.496	-	-	-
339	-	-	0.822	0.178	-	-	-	0.676	0.031	0.29 3
576	-	-	0.890	0.110	-	-	-	0.792	0.012	0.19 6

4.7 PrP'nin Post-translasyonel Modifikasyonları

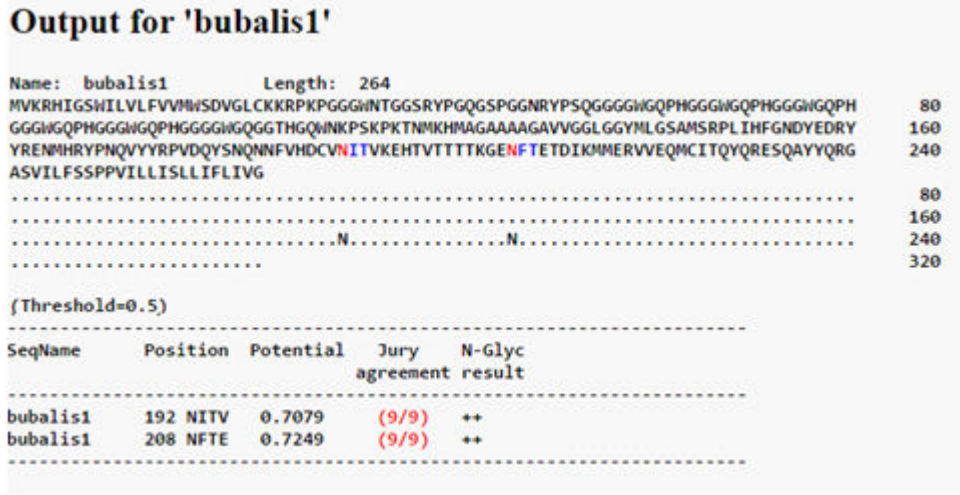
Toplam 19 haplotip (12 manda, 7 sığır) üç farklı protein dizisi varyantı tahminini vermiştir. İncelenen *B.taurus*, *B.bubalis v_1* ve *B.bubalis v_2* populasyonlarından elde edilmiş üç prion proteini dizisinin translasyon sonrası modifikasyonları (N-bağlı, O-bağlı glikozilasyon ve fosforilasyon motifleri) biyoinformatik yöntemlerle analiz edilmiştir.

4.7.1 PrP'nin N-bağlı Glikozilasyon Sonucu

Araştırılan protein dizilerinin olası N-glikozilasyon sonuçları aşağıda gösterilen şekildedir (Bkz. Şekil 4.8). Analiz sonuçları, iki türe ait N-bağlı glikozilasyonun, aynı pozisyonlarda çok yakın olasılık değerlerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. *B.bubalis v_1* ve *B.bubalis v_2* protein dizilerindeki N-bağlı glikozilasyon bölgelerinin aynı konumda olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.4). *Asn192* ve *Asn208* pozisyonları prion proteininin üç varyantında da glikozilasyona uğramıştır ve çok yakın olasılık değerleriyle farklılık göstermiştir.

Çizelge 4.4. N-bağlı glikozilasyon sonucu.

<i>N-bağlı glikozilasyonu araştırılan gruplar</i>	<i>N-bağlı glikozilasyon konumları</i>	<i>N-bağlı glikozilasyon ihtimali</i>
Bos taurus	192/ 208	0.7079/ 0.7250
Bubalus bubalis 1	192/208	0.7079/ 0.7242
Bubalus bubalis 2	192/208	0.7079/ 0.7242



Şekil 4.7 NetNGlyc1.0 Sunucusunun N-glikozilasyon Tahmini Sonuçları

4.7.2 PrP Proteininin O-bağlı Glikozilasyon Tahmini

Bu tür glikozilasyon, manda populasyonunda sığır populasyonuna kıyasla daha fazla bölgede bulunmuştur. Çizelge 4.5'ten görüldüğü gibi, *B.bubalis* v_2 varyantında sekiz O-bağlı glikozilasyon bölgesi mevcuttur ve bunlardan sadece dördü *B.taurus* PrP protein dizisinde bulunmaktadır. *B.bubalis* v_1 protein sekansının, O-glikanların bağlandığı altı pozisyonu belirlenmiştir. *Thr36*, *Ser39*, *Ser114* ve *Ser118* konumları üç proteinin her birinde glikozillenmiş pozisyonlardır. *Thr106*, *Ser108* glikozilasyon bölgeleri sadece *B.bubalis* v_2 proteinine spesifiktir. *Ser46* ve *Ser54* glikozilasyonu, *B.bubalis* v_1 ve *B.bubalis* v_2 proteinlerinin her ikisinde görülse de ihtimal farklılıklarıyla birbirinden ayrılmıştır. Aynı O-glikozilasyon pozisyonlarının olasılık değerleri *B.taurus* proteini dizisinde *B.bubalis* proteinleri dizilerinden daha düşüktür. Serin tip glikozilasyon analiz esnasında Treonin tipi glikozilasyondan daha fazla gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5.O-bağlı glikozilasyon sonucu.

O-bağlı glikozilasyon pozisyonları	Glikozillenme konumdaki a.a.	Gruplara göre O-bağlı glikozilasyon ihtimali		
		Bos taurus	Bubalus bubalis1	Bubalus bubalis2
36	Thr	0.6303	0.7225	0.7953
39	Ser	0.5377	0.5964	0.7040
46	Ser	-	0.5849	0.6416
54	Ser	-	0.5639	0.6160
106	Thr	-	-	0.5429
108	Ser	-	-	0.5233
114	Ser	0.8588	0.8099	0.8658
118	Ser	0.5395	0.5109	0.6154

4.7.3 PrP Proteini fosforilasyonu

Araştırma sonucunda, 3 protein dizisinde toplam 26 olası fosforilasyon bölgesi bulunmuştur. 26 bölgeden 24'ü *B.taurus* proteinine, 24'ü *B.bubalis v_1*'e ve 25'i *B.bubalis v_2*'ye aittir. *Ser4* pozisyonundaki fosforilasyon sadece *B.taurus* PrP proteininde gözlemlenmiştir. Manda protein varyantlarının her ikisinde *Ser54*, manda *v_2* proteininde *Ser108* pozisyonu glikolize uğramıştır. Diğer pozisyonlardaki fosforilasyon olasılıkları birbirinden çok az farklılıklarla ayrılmıştır (Bkz. Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 PrP protein varyantlarının fosforillenme olasılıkları.
Koyu sayılar, analiz edilen PrP varyantları için önemli göstericilerdir.

Bağlayıcı motif	Kinaz	Fosforillenmiş a.a.	Gruplara göre fosforillenme ihtimali		
			Bos taurus	Bubalus bubalis1	Bubalus bubalis2
-MVKSHIGS	CKI	4S	0.520	-	-
SHIGSWILV R-----	PKA	8S	0.728	0.784	---
NTGGSRYPG	cdc2, PKA	39S	0.554, 0.545	---	---
PGQGSPGGN	<i>cdk5</i> , GSK3	46S	0.926, 0.652, 0.511	---	---
GGNRYPPQG -----S----	INSR	52Y	0.537	0.560	---
NRYPSQGGG	DNAPK, ATM	54S	-	0.992, 0.572, 0.535	---
GQGGTHGQ W	PKC	106T	0.683	---	0.622
GGTHSQWNK	DNAPK, ATM	108S	-	-	0.640, 0.581
WNKPSKPKT	PKG	114S	0.562	---	---
SKPKTNMKH	PKC	118T	0.544	0.606	---
YMLGSAMSR	PKC	143S	0.617	---	---
FGNDYEDRY	INSR	156Y	0.959, 0.564	---	---
YEDRYREN	belirlenmemiş	160Y	0.965	---	---
PVDQYSNQN	belirlenmemiş	180Y	0.838	---	---
CVNITVKEH	PKC	194T	0.842	---	---
HTVTTTTKG	PKC	202T	0.651, 0.646	---	---
TVTTTTKGE	PKC	203T	0.915, 0.767	---	---
VTTTTKGEN	PKC, CKI	204T	0.892, 0.649, 0.552	---	---
GENFTETDI	CKI	210T	0.610	---	---
NFTETDIKM	PKC, CKII	212T	0.617,	---	---

			0.524	---	---
QMCITQYQR	DNAPK	227T	0.512	---	---
YQRESQAYY	DNAPK, ATM	233S	0.648, 0.518	---	---
ESQAYYQRG	belirlenmemiş	236Y	0.557	---	---
SQAYYQRGA	belirlenmemiş	237Y	0.536	---	---
QRGASVILF	PKA, PKC, RSK, ATM	242S	0.757, 0.705, 0.602, 0.519, 0.503	---	---
ILKSSPPVI	<i>cdk5</i> , GSK3	248S	0.542, 0.503	---	---

5. TARTIŞMA

5.1 SNP Saptanması Ve Analizi

Bu tez çalışmasında, Anadolu, Murrah ve melez Anadolu×Murrah olmak üzere üç popülasyonunun *PRNP* geninin AOC'si analiz edilmiştir. Dizi hizalaması yöntemi ile 5 SNP tespit edilmiştir. 126., 234., 285. ve 615.ci pozisyonlarda sinonim SNP'ler, 322.ci pozisyonda amino asit değişimine neden olan non-sinonim SNP saptanmıştır. Anadolu ırkı mandalarında *PRNP* gen çalışmaları son zamanlarda yürütülmektedir. Promotor ve intron1 bölgelerinde manda prion geninde indel polimorfizmler tespit edilmiştir (Oztabak et al., 2009). Bunun aksine, mandalarının *PRNP* geninin kodlama bölgesi ile ilgili çok az veri mevcuttur.

Prion çalışmaları, BSE'ye duyarlılığının yalnızca promotor ve intron bölgelerindeki indel polimorfizmlerle bağlı olmadığını ortaya koymuştur. *B.taurus* türünde kodlama bölgesindeki oktamer peptid tekrarlarının ve SNP'lerin de BSE'ye yatkınlıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (Clawson et al., 2008; Kwok, 1994). Başka bir taraftan, manda filogenetik açıdan sığıır türüne yakın akrabadır. Bugüne kadar manda bireylerinde prion hastalığı vakası görülmemiştir. Bu nedenle, manda türünde prion çalışmaları sığıırlarda görülen ilgili hastalığın anlaşılmasında gerekli bilgiler ortaya koyabilir. Şimdiye kadar manda *PRNP* geni üzerinde birçok sayıda araştırma yapılmış ve araştırılan örneklerde BSE'e dirençlilik tespit edilmiştir (Imran et al., 2009; Kobak et al., 2013; Zhao et al., 2015). Bu çalışmada, manda popülasyonlarından edinilmiş *PRNP* geninin kodlama bölgesini analiz edilmiştir.

Araştırılan aday genin AOC'si analizleri sonucunda kodlayıcı bölgedeki SNP'lerin çoğunlukla sinonim olduğu ve protein yapısında amino asit değişimine neden olmadığı izlenilmiştir. Sinonim SNP'lerin de protein ekspresyonunu etkileme ve hastalıkla ilişkili olabilme ihtimali gözönünde bulundurulmuştur (Giannopoulos et al., 2009). 322.ci pozisyondaki non-sinonim SNP, amino asit değişikliğine neden olur; Glisin'i Serin'e dönüştürür. Toplam 70 manda bireyindeki SNP varyasyonunun analizinde 126., 322., 615.ci pozisyondaki Guanin ve 234., 285.ci pozisyondaki Adenin yüksek frekansta görülmüştür. Çalışmada, karşılaştırmalı analiz için seçilmiş 73 sığıır

PRNP gen dizilerinde 234., 339. ve 576.cı pozisyonlarda üç SNP saptanmıştır. Saptanan polimorfizmler sinonimdir.

Analiz sonucunda, 234.cü pozisyonda her iki türe ait aynı nükleotit polimorfizmi (A/G) bulunmuştur. Diğer AOC'si SNP'leri incelenen türlerde farklı pozisyonlarda saptanmıştır. Nükleotit sekanslarının karşılaştırılması prion geninin yüksek korunmuşluğu yaklaşımını desteklemektedir. İki tür arasındaki *PRNP* geni nükleotit benzerliği oranı %99'dur. Uchida (2014), sığır ve manda üzerindeki *PRNP* çalışmalarında benzer sonuçlar almıştır. Vietnam, Endonezya ve Tayland yerli sığırlarının prion geninin 126.cı (A/G), 234.cü (A/G) pozisyonları SNP'ler içermektedir. Bu çalışmada, 234.cü pozisyondaki tek nükleotit polimorfizmi her iki türde de bulunduğu için önemli nokta olarak dikkati çekmiştir. 126.cı pozisyondaki SNP (Adenin Guanin'e değişir) yalnızca manda bireylerinin prion geninde saptanmıştır. Bu sonuçlar, *PRNP*'nin oldukça korunmuş bir gen olduğunun ve bu genin kodladığı proteinin potansiyel olarak önemli işlevlere sahip olduğunun bir kanıtı olabilmektedir.

5.2 Haplotip, Allel ve Genotip Frekansı

Populasyon seviyesindeki haplotip ve allel frekansı tahmini, incelenen *PRNP* gen bölgesi hakkında daha fazla bilgi ortaya çıkarmak ve biyoinformatik veritabanları için veri sağlamak adına daha çok sayıda manda populasyonunda prion geni incelenebilir ve verileri karşılaştırmalı analizde kullanılabilir.

Anadolu ırkı mandasında 50 kromozom olduğu bulunmuş (Yavaşoğlu et al., 2014) ve henüz kromozomda *PRNP* geninin yeri tespit edilmemiştir. BSE hastalığının genetik mekanizmasının aydınlatılması amacıyla, model organizma olarak mandada *PRNP* gen çalışmalarının yürütülmesi yardımcı olabilir. Bazı manda ırklarının *PRNP* geni promotor ve intron1 bölgesinin BSE hastalığına dirençlilik oranı araştırılmıştır (Imran et al., 2012). Manda populasyonlarının prion geni kodlayıcı bölgesi hakkında veriler ise yeterli değildir. Bu çalışmada, üç manda populasyonunun haplotipleri, allel ve genotip frekansı hesaplanmış (Bkz. Çizelge 3.3a; 4.3b), evrimsel süreçte genin yüksek oranda korunmuşluğu kanaatine varılmıştır. 126. ve 234.cü pozisyonlarda saptanmış SNP'ler farklı sığır ırklarında da sıklıkla görülmüştür. Sonuç olarak, bu veriler incelenen genin korunmuşluğu konusunu desteklemektedir.

Araştırmada, çalışılan manda *PRNP* geninin 12 haplotip içerdiği hesaplanmıştır. *GAAGG* haplotipi 0.529 değerle analiz edilen manda populasyonunda en yüksek oranda sıklık göstermiştir. *AAAGG* haplotipinin sıklığı 0.014 değerinde olmuştur. Alınan sonuçlar, manda populasyonlarında prion genindeki varyasyonların karakterizasyonunu ve karşılaştırmalı analizini yapabilmek için daha çok populasyonla çalışmaların yürütülmesi fikrini sunmaktadır.

Tahmin edilmiş manda prion proteindeki amino asit değişimi ile ilişkili beş haplotip (14 birey) tespit edilmiştir: *GAGAG* (0.014; 1 birey-Anadolu ırkına mensup), *AAAAG* (0.014; 1 birey-Anadolu), *AGGAA* (0.014; 1 birey-Murrah), *GAAAG* (0.014; 1 birey- melez) ve *AGGAG* (0.143, 10 birey-2 Anadolu, 3Murrah, 5melez). Haplotipler, 322ci pozisyonda Glisin'in Serin'e dönüşmesine neden olan bir non-sinonim polimorfizm içermektedir. Haplotip frekansı verilerine göre, iki olası prion protein varyantı tahmin edilmiştir: *PQPGK* ve *PQPSK*. Toplam olarak populasyonun %80'i *PQPGK* protein varyantına, kalan kısmı-%20'si *PQPSK* protein varyantına sahiptir. Sığır populasyonlarıyla karşılaştırmada *PQPGK* protein varyantının sığırlara spesifik olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Her iki türde 234.cü pozisyonda Adenin nükleotidi daha sık frekansta ifade edilmiştir, ama manda populasyonunda bu oran A(0.743) sığır populasyonundakinden A(0.548) daha yüksek oranda bulunmuştur. Mandada AA genotipinin (0.552) daha sık görülmesine rağmen, sığır populasyonunda GA genotipi (0.496) görülmüştür. 322.ci pozisyonda manda bireylerinde non-sinonim tek nükleotit polimorfizmi bulunmuştur ve A allelinin sıklığı 0.2 değerinde olmuştur. Sığır populasyonlarında ise bu noktada A alleli bulunmamaktadır. 126.ci pozisyonda Guanin alleli (0.7), 285.ci pozisyonda Adenin(0.814) ve 615.ci pozisyonda Guanin(0.9) alleli yüksek frekansta görülmektedir. Aynı şekilde genotipi de etkilemektedirler. Sığır populasyonunda ise 339.cü (T-0.178) ve 576.cı (T-0.110) pozisyonlarda Timin alleli görülse de, manda populasyonunda sadece Sitozin alleli görülmüştür.

Sonuç olarak, allel, genotip ve haplotip frekansları, araştırılan gen populasyonlarında nükleotitlerin yüksek bir korunmuşluk gösterdiğine ve daha az varyasyona uğradığına işaret etmektedir.

5.3 Prion Proteininde Amino Asit Değişimleri

Önceki bölümde belirtildiği gibi sadece bir non-sinonim SNP saptandığı için, *PQPGK* ve *PQPSK* varyantlarını içeren iki olası prion protein dizisi edinilmiştir.

Prion protein yapısı, iki adet antiparalel β -yaprak ve üç adet α -heliks içermektedir: β - α - β - α - α . Prion proteini, memelilerin beyinde yüksek konsantrasyonunda bulunan küçük bir glikoproteindir. Luhrs'a (2003) göre, bu proteinin ekspresyon seviyesi doğrudan bir sıra nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir.

BSE'e yatkınlığın prion proteininde bulunan oktamer peptit tekrarların sayısı ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, hem *B.bubalis*, hem de *B.taurus* türlerinde beş oktamer peptit tekrarı saptanmıştır. Asya manda ve sığırları üzerinde yapılan prion çalışmalarında altı oktamer peptit tekrarının daha yüksek frekansta bulunduğu rapor edilmiştir (Zhao et al., 2015). Dolayısıyla, beş oktamer peptit tekrarlarına sahip olmak, Türkiye yerli manda popülasyonlarına spesifik olabilir. Cu^{2+} ile birlikte oktamer peptit tekrarı-*PHGGGWGQ*, prion protein agregasyonunu modüleeden konformasyonel geçişe neden olmaktadır (Zhan, 2003). *PHGGGW*, kıvrım konformasyonuna, *GWGQ* β -döngüsü yerleşen amino asit zinciri kısmını benimsemektedir. 264 amino asitten oluşan proteinin 1-124 a.a. uzunluğu yapılandırılmamış bölge, 124-227 a.a. kısmı yapılandırılmış bölge olarak kabul edilmiştir (Zhang et al., 2015). Çalışmada 105.ci pozisyonda bulunan Glisin Serin'e değişmiştir. Serin yapılandırılmamış bölgede bulunmaktadır ve değişen amino asitler aynı amino asit grubunda yer almaktadır (Bkz. Ek C).

Glisin, yapılandırılmamış bir bölgede, 108.ci pozisyonda Serin amino asiti ile değişmektedir. Glisin basit amino asittir. Bu amino asit merkezi sinir sisteminde bir nörotransmitter rolü oynamaktadır (Zhan, 2003; Plimmer et al., 2010). Herhangi bir yan zincir grubunu içermemek, Glisin'i yüksek derecede esnek hale getirmektedir ve kıvrımlarla birlikte proteinlerin yüzeyinde bulunmaktadır. Serin polar amino asittir ve merkezi sinir sisteminin düzgün bir şekilde çalışması için gereklidir. Guaninin Adeninle değişmesi, *Gly-Ser* değişimini türetmiştir. Serinin yan zincirleri hidrojen bağlıdır: küçük motifler *ST* dönüşlerini oluşturur ve O-bağlı glikozilasyona maruz kalabilir. Serin, kinazlar tarafından fosforile edilen üç amino asit kalıntısından biridir.

Hidrofobik olması ve yüzeyde bulunması yapılandırılmamış bölgedeki konumu ile ilişkilendirilebilir. Serin'in bu pozisyonda yer alması potansiyel fosforilasyon karakteristiği nedeniyle ikincil yapı konformasyonunu etkileyebilir (Karlheinz et al., 2007).

Çalışmada 54.cü ve 123.cü pozisyondaki amino asitlerin araştırılan türlerdeki farklılıkları incelenmiştir. Prolin 54.cü pozisyonda Serin'e değişmektedir. Bu iki amino asit aynı gruba dahil değildir. Mandada, 123.cü pozisyonda bulunan Valin'in yerine Metionin gelmektedir. Her ikisi de hidrofobiktir. Bütün amino asit değişimleri, prion proteininin yapılandırılmamış bölgesinde oluşmaktadır. Karşılaştırılmış veriler türlerin yakın bir ortak atadan geldiğinin ispatı olabilir. Protein dizileri arasındaki genetik mesafe, araştırılan türlerde amino asit değişikliklerine nadir rastlanmasının nedenini açıklamaktadır (Bkz. Şekil 4.5).

5.4 PrP Proteini Post-translasyonel Modifikasyonları

Analiz sonuçları, aynı konumdaki iki türün N-bağlı glikozillenmesinin çok yakın olasılık değerleri ile ayrıldığını ortaya koymuştur. *B.bubalis v_1* ve *B.bubalis v_2* prion proteini konformasyonlarındaki N-bağlı glikozilasyonun sonuçları aynıdır. Önceki araştırmanın sonuçlarına göre *Asn202* glikozilasyonu hücrelerarası işlevde, *Asn208* pozisyonunun glikozilasyonu protein yapısının stabilize edilmesinden sorumludur (Salamat et al., 2011). N-bağlı glikozilasyonun prion ile enfekte olan bireylerde pozisyonların birinde veya her ikisinde bulunmamasına rağmen, hastalık görülmeyen bireylerde 2 pozisyonda da gerçekleşmesi söz konusudur (Lawson et al., 2005). Bu konumlara glikanların eklenmesiyle, yanlış katlanmış prion proteinlerinin normal prion proteinlerine bağlama olasılığı azalmaktadır. Prion proteininin N-bağlı glikozilasyon modifikasyonları, BSE'e dirençli (manda) ve BSE'e dirençsiz (sığır) türler arasında önemli farklılıklar göstermemiştir (Hounsell et al., 2004).

O-bağlı glikozilasyon tipi, dinamiktir ve proteine bağlanma bölgelerinin fazla olması ile farklanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, O-bağlı glikozilasyonun düzenlenmesinin nörodejeneratif hastalık grubuna ait olan Alzheimer hastalığının patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Lefebvre, 2003). Prion hastalıkları da aynı gruba ait olduğundan, çalışılan populasyonlarda bu tür glikozilasyonun olası pozisyonları tahmin edilmiştir.

Araştırmalar, O-bağlantılı glikozilasyonun α -heliks ve β -yaprak yapılarını stabil hale gelmesinde rol oynadığını söylemektedir (Yuzwa and Vocadlo, 2014). 114.cü pozisyon hariç manda prion proteininde yedi konumdaki amino asitlerin O-glikozilasyon ihtimali değerleri daha yüksektir. O-glikanların (O-GlcNAc) prion proteini ile bağlanma bölgeleri ve işlevleri araştırılmaktadır. Mandada O-glikozilasyon pozisyonlarının daha fazla varlığı hastalığa dirençlilik ile bağlantılı olabilir. O-glikanlar proteine bağlandıkları bölgelerin yapısını dengelemekte rol oynamaktadırlar. Manda türü daha çok O-glikan bağlama bölgelerine sahiptir ve proteinin yanlış katlanma oranını azaltmaktadır. Serin pozisyonları treonin pozisyonlarına göre daha fazla glikozile edilmiştir. Serin tip glikozillenmenin daha fazla bulunması önceki araştırmaların sonuçları ile desteklenmektedir (Steentoft et al., 2013).

Fosforillenme, birçok hücreyel sürecin (metabolizma, proliferasyon, apoptoz gibi) düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan geniş enzim ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Fosforillenme peptid zincirinin esnek bölgelerinde yaygındır. Proteinlerin fosforilasyonu, düşük enerji seviyesinden daha yüksek enerji seviyesine geçerek aktif hale gelmelerini sağlar ve bu da konformasyon değişikliklerine yol açar. Prion proteininin fosforilasyonu, $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ konformasyon geçidini tetikleyen bir faktördür. İnsan prion proteinindeki *Ser43* pozisyonunun fosforillenmesi (*HuPrP*), PrP^{res} konformasyonuna dönüşmesine neden olmaktadır. Bu protein dönüşümü, *in vivo*'da PrP^{Sc} için de aynı mekanizmaya sahiptir. Fosforilasyon, proteinin konformasyonel değişiminin indüksiyonu yoluyla enzimatik aktivasyonunun iyi bilinen bir mekanizmasıdır. Prion proteininin N-ucu son derece esnektir ve *Ser43*'ün fosforilasyonu, diğer amino asitlerle moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak PK direncine neden olabilir (Giannopoulos et al., 2009).

Yin-Yang hipotezine göre, O-glikozilasyon fosforilasyon mekanizmasının analogudur. Her iki PTM tipleri (glikanlar ve kinazlar) protein içindeki aynı bölgeye bağlanabilir. O-glikozilasyon, prion proteininin yapısını stabilize ettiği halde, fosforilasyon esnekliği geliştirir ve karşıt hareket ederek konformasyonel değişikliğe neden olur (Hu et al., 2010). Sığır populasyonundaki *Ser4*, *Ser46*, *Ser54*, *Thr106*, *Ser108* bölgelerinde fosforilasyonun varlığı ve glikozilasyonun yokluğu, araştırılan türlerde bu

bölgenin yüksek esnekliğini göstermektedir. *Ser46*, *Ser54*, *Thr106*, *Ser108* bölgeleri manda popülasyonlarında glikozile edilmiştir. Dahası, laboratuvar çalışmalarında kanıtlanmış *Ser43* (HuPrP) pozisyonunun cdk5 kinaz fosforilasyonu incelenen türlerde *Ser46* pozisyonuyla çakışmaktadır. *Ser46* cdk5 kinazı ile fosforilasyon ihtimali mandada 0.65'tir ve bu pozisyonda glikozilasyon sığır proteininde bulunmamaktadır. Bu özellik, manda PrP proteini ile karşılaştırıldığında sığır PrP PTM'lerinin belirgin farklılıklarından biri olarak gösterilmektedir.

Özet olarak, çalışılan manda popülasyonlarında *PRNP* geni AOÇ'deki birkaç SNP varyasyonu, incelenen manda ve sığır popülasyonu arasındaki yüksek nükleotit ve amino asit benzerliği, polimorfik lokuslardan kaynaklanan haplotip, allel ve genotip değerleri, olası protein sekanslarındaki nadir amino asit değişimleri prion geninin yüksek seviyede korunmuşluğunu destekleyebilir. PrP'nin N-bağlı glikozilasyonu, türler arasında hiçbir farklılık göstermezken, O-bağlı glikozilasyon, dirençsiz türle kıyaslamada daha çok glikozillenmiş bölge içermektedir. Fosforilasyon motifleri, proteinin yanlış katlanmasını açıklamada faydalı olabilir.

6.SONUÇLAR

Manda populasyonlarında PRNP geninde 4 sinonim ve 1 non-sinonim SNP bulunmuştur. Sığır populasyonlarında aynı bölgede 3sinonim SNP bulunmuştur. Bunlardan yalnız 234. Pozisyondaki sinonim SNP iki tür için de ortak polimorfizmdir.

Çalışılan manda populasyonlarında 12 haplotip, sığır populasyonlarında 7 haplotip hesaplanmıştır. Her iki türde allel ve genotip sıklıkları prion geninin yüksek korunmuşluğunu göstermiştir.

Manda prion proteininde sadece bir amino asit değişimi görülmüştür. 108.ci pozisyonda yan zincir grubu içermeyen Glisin polar Serine değişmiştir. Hidrofobik Serin polipeptit zincirinin esnekliğini azaltmakta ve stabiliteni yükseltmekte yardımcı olmaktadır. Sığır prion proteininde amino asit değişimine rastlanılmamıştır.

Her iki türün N-bağlı glikozillenme değerleri farklılık göstermemiştir. O-bağlı glikozillenme bölgelerine manda türünde daha sık rastlanmış ve değerlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. O-bağlı glikozillenme bölgelerinin sıklığı protein yapısının stabilenmesini sağlamaktadır.

Esnekliği yükselterek proteinin konformasyonel değişimini sağlayan fosforillenmeye sığır türünde daha sık rastlanmıştır.

7. ÖNERİLER

Bu araştırma sonuçları aşağıdakilerdir:

1. Bu çalışma, manda prion geni kodlama bölgesi ve proteinin ikincil yapısı ile ilişkin yapılacak ileri çalışmalar için bir ön veri olabilir.
2. Sunulan biyoinformatik araştırmalar laboratuvar deneyleri ile desteklenmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abrams, J., Maddox, R. and Schonberger, L.,** 2011, Travel history, hunting and venis on consumption related to prion disease exposure, 2006-2007 FoodNet population survey, *J.Am. Diet Assoc.*, 6:858-863pp.
- Baybutt, H. and Manson, J.,** 1997, Characterization of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells, *Gene*, 184:125-131pp.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S.,** 1999, Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *Journal of Molecular Biology*, 5:1351-1362pp.
- Brun, A., Gutierrez-Arran, A. and Castilla, J.,** 2007, Reduced susceptibility to bovine spongiform encephalopathy prions in transgenic mice expressing a bovine PrP with five octapeptide repeats, *J. Gen. Virol.*, 8:1842-1849pp.
- Chen, C. and Chang, Y.,** 2002, One O-linked sugar can affect the coil-to-beta-structural transition of the prion peptide, *PNAS*, 20:12633–12638pp.
- Choi, C., Kanthasamy, A. and Anatharam, V.,** 2006, Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases, *Neurotoxicology*, 27:777-787pp.
- Ciesla, J., Fraczyk, T. and Rode, W.,** 2011, Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed, *Acta Biochim Pol.*, 2:137-147pp.
- Clawson, M., Richt, M. and Baron, J.,** 2008, Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE, *Plos One*, 3:e1830pp.
- Cole, P., Shen K. and Qiao Y.,** 2003, Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tail, *Curr. Opin. Chem Biol.*, 5:580-585pp.
- Cox, B. and Moore, P.,** 2009, *Biography: an ecological and evolutionary approach*, Blackwell publishing, London, 440p.
- Crawford, D. and Nickerson, D.,** 2005, Definition and clinical importance of haplotypes, *Annu. Rev. Med.*, 56:303-320pp.
- Durbin, R., Sean, E. and Anders, K.,** 1998, *Biological Sequence Analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press., New York, 356p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Excoffier, L. and Lischer, L.**, 2010, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources*, 10:564-567pp.
- Felsenstein, J.**, 1989, PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2), *Cladistics* 5:164-166pp.
- Ford, E. B.**, 1965, Genetic Polymorphism, Faber & Faber Ltd., London, 101p.
- Frankham, R.**, 2005, Genetics and extinction, *Biological Conservation*, 2:131-140pp.
- Frootan, F., Nikbakht, G. and Ozgenturk, N.**, 2012, Prion protein coding gene (PRNP) variability in sheep from Turkey and Iran, *Biochem.Genet.*, 50:277-284pp.
- Galas, D.J. and McCormack, S.J.**, 2002, Genomic Technologies: Present and Future, Caister Academic Press, Valencia, 418p.
- Gasteiger E., Gattiker A. and Hoogland C.**, 2003, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788pp.
- Giannopoulos, P., Robertson, C. and Jodoin, J.**, 2009, Phosphorylation of prion protein at Serine43 induces prion protein conformational change, *J. Neuroscience*, 27:8743–8751pp.
- Gupta, R. and Brunak S.**, 2002, Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function, *Pacific Symposium on Biocomputing*, 7:310- 322pp.
- Haigh, C. L., Wright, J. A. And Brown, D.R.**, 2007, Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the Prnp gene, *J. Mol. Biol*, 368:915- 927pp.
- Halperin, E and Hazan, E.**, 2006, HAPLOFREQ- estimating haplotype frequencies efficiently, *J. Comput. Biol.*, 2:481-500pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harman, J. and Silva, C.**, 2009, Bovine spongiform encephalopathy, *J. American Vet. Assoc.*, 1:560-572pp.
- Heracle BioSoft**, “Manual DNA sequence assembly/analysis”, <http://www.dnabaser.com/articles/SNP> ,(Access date:24 July, 2016).
- Hounsell, E.F.**, 2004, Commentary prions in control of cell glycosylation?, *Biochem. J.*, 380:e5–
- Hu, P., Shimoji, S. and Hart, G.**, 2010, Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation, *FEBS Letters*, 584:2526-2538pp.
- Ianuzzi, L., Palomba, R. and Di Meo, G.P.**, 2010, Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes, *Cytogenetics and Genetics Research*, 81:202-204pp.
- Imran, M., Mahmood, S. and Babar, M.E.**, 2012, PRNP gene variation in Pakistani cattle and buffalo, *Gene*, 505:180-185.
- Inoue, S., Tanaka, M. And Ishiguro, N.**, 1997, Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron., *J. Vet. Med. Sci.*, 59:175-183pp.
- James, F.**, 1999, Hardy, Weinberg and language impediments, *Genetics*, 3:821-825pp.
- Karlheinz, D., Ian, G. and Axel, K.**, 2007, Amino acids, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, doi:10.1002/14356007.a02_057.pub2.
- Kim, Y., Lee, J. and Lee, C.**, 2008, In silico comparative analysis of DNA and amino acid sequences for prion protein gene, *Transbound Emerg. Dis.*, 2:105-114pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kobak, P., Sablik, P. and Zukiewicz, A.,** 2014, Analysis of indel polymorphism of the PRNP gene in water buffalo, *bubalus bubalis*, *Acta. Sci. Pol.*, 13:51-56pp.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei M.,** 1994, MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers, *Computer Applications in Biosciences*, 10:189-191pp.
- Kwok, P.Y., Carlson, C. and Yager, T.D.,** 1994, Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products, *Genomics*, 23:138-144pp.
- Kwok, P.Y. and Chen, X.,** 2003, Detection of single nucleotide variations, [*Curr. Issues Mol Biol.*](#), 2:43-60pp.
- Lawson, A., Collins, S. and Masters, L.,** 2005, Prion protein glycosylation, *Journal of Neurochemistry*, 93:793–801p.
- Lefebvre, T., Boudin, M. and Buée, L.,** 2003, O-Glcnac glycosylation and neurological disorders, *Glycobiology and Medicine*, 186-202pp.
- Lehmann, S. and Harris, A.,** 1997, Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells, *J. Biol.Chem.*, 34:21479–21487pp.
- Librado, P. and Rozas. J.,** 2009, DnaSp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25:1451-1452pp.
- Luhrs, T., Rick, R. and Guntert, P.,** 2003, NMR structure of the human doppel protein, *J. Mol. Biol.*, 326:1549-1557pp.
- Maddison, D.R., Swofford, D.L. and Maddison, W.P.,** 1997, NEXUS: an extensible file format for systematic information, *Systematic Biology*, 4:590- 621pp.
- Marth G., Korf, I. and Yandell M.,** 1999, A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery, *Nat. Genet.*, 4:452-456pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moore, R., Herzog, C. and Errett, J.,** 2006, Octapeptide repeat insertions increase the rate of protease-resistant prion protein formation, *Protein Sci.*, 3:609-619pp.
- Morgulis, A., Coulouris, G. and Raytselis, Y.,** 2008, Database indexing for production MegaBLAST searches, *Bioinformatics*, 15:1757-1764pp.
- Muramatsu, Y., Sakemi, Y. And Horiuchi, M.,** 2008, Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE., *Zoonoses Public Health*, 55: 267-273pp.
- Nanda A. and Nakao, T.,** 2003, Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus, *Anim. Sci. J.*, 74:443- 445pp.
- National Center for Biotechnology Information,** “Genetic variation (polymorphisms)”, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/variation.html> (Access date: 18February 2017).
- Nickerson, A., Philip, G. and Kavita, G.,** 1999, Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags, *Genome Res.*, 11: 1087–1092pp.
- Novakofski, J., Brewer, M.S. and Mateus-Pinilla, J.,** 2005, Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy, *J. Anim. Sci.*, 83:1455-1476pp.
- Oneill, S., Donnelly, K. and Marshall, E.,** 2003, Characterization of ovine PrP gene promoter activity in N2a neuroblastoma and ovine foetal brain cell lines, *J. Anim. Breed Genet.*, 120:114-123.
- Oztabak, K., Ozkan, E. and Soysal, I.,** 2009, Detection of prion gene promoter and intron1 indel polymorphisms in Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Anim. Breed. Genet.*, 126:463-467pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prusiner,S.**, 1982, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science*, Vol. 216:136-144 pp.
- Prusiner, S.**, 1998, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol.95:13363-13383pp.
- Roucou, X., Gains, M. And Le Blanc AC.**, 2004, Neuroprotective functions of prion protein, *Neurosci Res.*, 75(2):153-61pp.
- Rudd, M., Endo, T. and Colominas,C.**, 1999, Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms, *PNAS*, 23:13044–13049pp.
- Rudd, PM., Wormald, M.R. and Wing, DR.**, 2001, Prion glycoprotein: Structure, dynamics, and roles for the sugar, *Biochemistry*, 40:3759-66pp.
- Saeki, K., Matsumoto, Y. and Hirota, Y.**, 1996, Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues, *Virus Genes*, 12:15- 20.
- Salamat, K., Dron, M. and Chapuis, J.**, 2011, Prion propagation in cells expressing PrP glycosylation mutants, *J. Virology*, 3077–3085pp.
- Sakudo,A., Xue, G. and Kawashita, N.**, 2010, Structure of the prion protein and its gene: An analysis using bioinformatics and computer simulation, *Current Protein and Peptide Science*, 11:166-179 pp.
- Sander, P., Hamann, H. and Pfeiffer, I.**, 2004, Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene(PRNP) in German cattle breeds, *Neurogenetics*, 1:19-25pp.
- Scitable by Nature Education**, “The Variety of Genes in the Gene Pool Can Be Quantified within a Population”, <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-variety-of-genes-in-the-gene-6526291>, (Access date: 31August 2016).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sievers, F., Wilm, A. And Dineen, D.,** 2011, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst Biol.*, 7: 539pp.
- Steenfort, C., Vakhrushev, S.Y. and Joshi, H.J.,** 2013, Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology, *EMBO, J.*, 10:1478-1488pp.
- Tamura, K., Stecher G. and Peterson, D.,** 2013, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729pp.
- Taylor, M. and Drickamer, K.,** 2003, Glycobiology, Oxford University Press Inc., New York, 320p.
- The Beef Checkoff Program on bovine spongiform encephalopathy,** “BSE clinical signs/symptoms “,<http://www.bseinfo.org/default.aspx>, (Access date: 29 April 2016).
- The Medical Research Council of Prion Unit,** “Signs and symptoms of prion disease”, <http://www.prion.ucl.ac.uk/welcome>, (access date: 14March 2017).
- Uchida, L., Heriyanto, A. and Thongchai, C.,** 2014, Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffalo in Vietnam, Indonesia and Thailand, *Journal of Veterinary Medical Science*, 76:1001-1008pp.
- Un, C., Oztabak, K. and Ozdemir, N.,** 2008, Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy-related prion protein gene promoter polymorphisms in local Turkish cattle, *Biochem Gen.*, 46:820-827pp.
- Venter, J.C., Adams, M.D. and Myers, E.W.,** 2001, The sequence of the human genome, *Science*, 291:1304-1351pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weismann, C.**, 2004, The state of the prion, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:861-871pp.
- Werner, F., Durstewitz, G. and Habermann, F.**, 2004, Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds, *Animal Genetics*, 35: 44-49pp.
- William, H., Li, W. and Uludag, M.**, 2013, Analysis Tool Web Services from the EMBL-EB, *Nucleic Acids Res.*, 41:W597-600pp.
- World Organization For Animal Health**, “BSE situation in the world and annual incidence rate”, <http://oie.int/>, (Access date: 14 April 2016).
- Wuthrich, K. and Rick, R.**, 2001, Three-dimensional structures of prion proteins, *Adv. Protein Chem.*, 57:55-82pp.
- Yamada, M., Itoh, Y. And Fujigasaki, H.**, 1994, A deletion in the prion protein gene in a Japanese family, *Biomed. Res.*, 15:131-133pp.
- Yaman, Y., Karadag, O. and Un, C.**, 2016, Investigation of the prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Anatolian, Murrah, and crossbred water buffaloes (*Bubalus bubalis*), *Trop. Anim. Health Prod.*, doi10.1007/11250-016-1185-4.
- Yavasoglu, N., Koksall C. and Yaman Y.**, 2014, Karyotype of Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*), *Buffalo Bulletin*, Vol.33 No.4:437-444pp.
- Yuzwa, S. and Vocadlo, D.**, 2014, O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer’s disease and beyond, *Chem Soc Rev.*, 19:6839-6858pp.
- Zang, J. and Zang, Y.**, 2003, Molecular dynamics studies on 3D structures of the hydrophobic region PrP(109-136), *Acta Biochimicaet Biophysica Sinicals*,45:509-519pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhan, R.**, 2003, The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site, *J. Mol. Biol.*, 334:477-488pp.
- Zhang, J.**, 2015, Molecular Structures and Structural Dynamics of Prion Proteins and Prions, Springer Netherlands, 315p.
- Zhao, H., Liu, L. and Du, S.H.**, 2012, Comparative analysis of the Shadoo gene between cattle and buffalo reveals significant differences, *PloS One* 7(10):e46601.
- Zhao, H., Du, Y. and Chen, S.**, 2015, The prion protein gene polymorphisms associated with bovine spongiform encephalopathy susceptibility differ significantly between cattle and buffalo, *Infection, Genetics and Evolution*, 36:531-538pp.
- Zhou, Z. and Xiao, G.**, 2013, Conformational conversion of prion protein in prion diseases, *Acta Biochim Biophys Sin.*, 6:465-476pp.
- Zuegg, J. and Gready, J.**, 2000, Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and GPI anchor, *Glycobiology*,10: 959-974pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı ve Soyadı : Zarifa OSMANLI

Doğum Yeri : Bakü, Azerbaycan

Doğum Yılı : 31.05.1991

Eğitim Durumu:

Lise : 80 numaralı Bakü Fen lisesi

Lisans : Bakü Devlet Üniversitesi, Biyoloji

Yükseklisans: EGE Üniversitesi, Moleküler Biyoloji

Yabancı Diller ve Düzeyi:

Türkçe (İyi Derecede)

İngilizce (İyi Derecede)

Rusça (İyi Derecede)

Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

Uluslararası Öğrenciler Fen Bilimleri Kongresi, Katip Çelebi Üniversitesi,
İzmir – 2017

Ecology and Evolutionary Biology Symposium, METU, Ankara-2015

EKLER

Ek 1 Çevirme aracı

Ek1.1Çevirme araç kutusuna DNA dizisi girilmesi

Ek 1.2 Amino asit dizisi çevirme tahmini

Ek 2 MegaBLASTN sonucu

Ek 2.1 BLAST sonucu

Ek 2.2 Araştırmada önemi olan hizalanmış diziler

Ek 2.3 *B.bubalis*'in referans dizisi AY720689.1 ile *B.taurus* referans dizisinin
AY367640.1 hizalanması

Ek 3 Clustal Omega programı

Ek 3.1 Clustal Omega programında kullanılan FASTA biçimli prion proteini
dizisi

Ek 3.2 Manda v_1, manda v_2 ve sığır prion proteini dizilerinin hizalama
sonucu

Ek 3.3 Clustal Omega sonuçları

Ek 4 Arlequin programı

Ek 4.1 Arlequin yazılımı haplotip hesaplama değişenleri

Ek 2 MegaBLASTN sonucu

Ek 2.1 BLAST sonucu. Referans numarası AY367640.1 olan *B.taurus* ile *B.bubalis* örneğinin hizalanması sonucu (AY720689.1). Hizalamanın değerleri renkli çizgilerle verilmiştir. Kırmızı renkli çizgi en yüksek hizalama puanına uygun olmaktadır. Hizalanmış diziler yüksek benzerlik göstermiştir.

U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

BLAST® » blastn suite-2sequences » RID-FGPT5SF9114 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download YouTube How to read this page Blast report description

Blast 2 sequences

Job title: gb|AY720689.1| (795 letters)

RID FGPT5SF9114 (Expires on 04-21 14:54 pm)

Query ID AY720689.1
Description Bubalis bubalis isolate JW41_1 prion protein (PRNP) gene, exon 3 and complete cds
Molecule type nucleic acid
Query Length 795

Subject ID AY367640.1
Description Bos taurus HN200303 Qinchuan prion protein (PrP) gene, complete cds
Molecule type nucleic acid
Subject Length 851
Program BLASTN 2.6.0+ Citation

Other reports: Search Summary [MSA viewer]

Graphic Summary

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

Query

1 150 300 450 600 750

Dot Matrix View

Descriptions

Ek 2.2 Araştırmada önemi olan hizalanmış diziler.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bos taurus HN200303 Qinchuan prion protein (PrP) gene, complete cds	1413	1413	100%	0.0	99%	AY367640.1

Ek 2.3 *B.bubalis*'in referans dizisi AY720689.1 ile *B.taurus* referans dizisinin AY367640.1 hizalanması.

Bos taurus HN200303 Qinchuan prion protein (PrP) gene, complete cds

Sequence ID: [AY367640.1](#) Length: 851 Number of Matches: 1

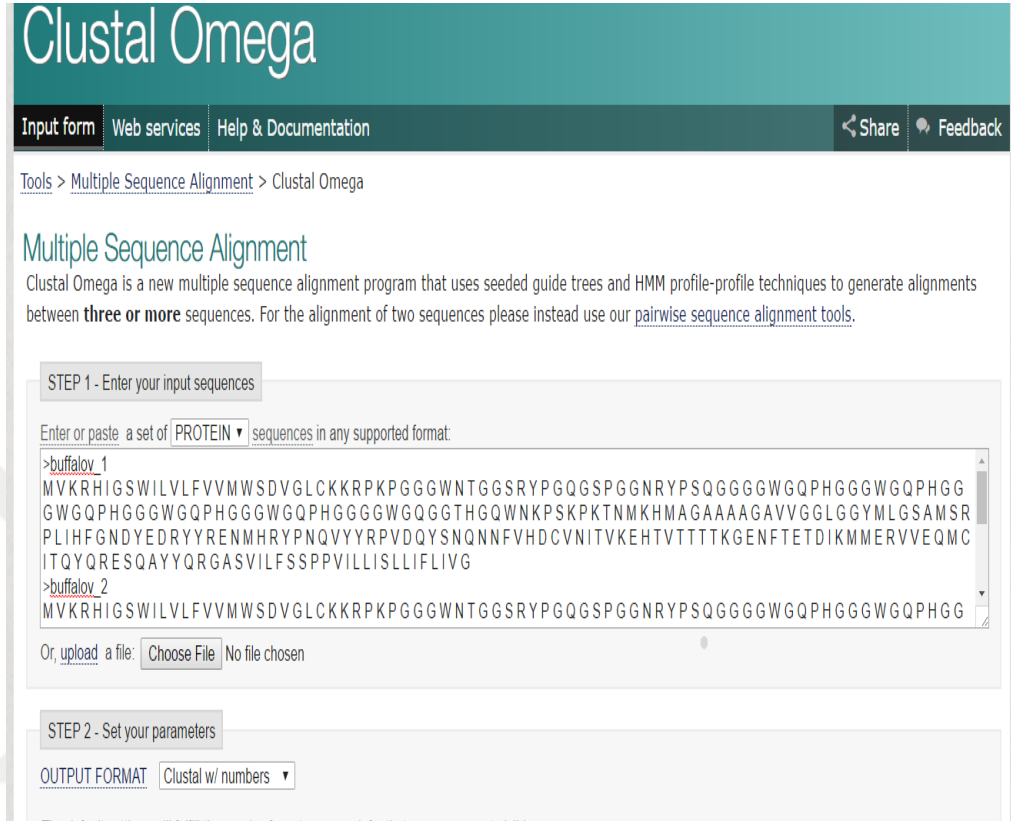
Range 1: 36 to 830 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1413 bits(765)	0.0	785/795(99%)	0/795(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTGAAAAGACACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGGAGTGAC	60		
Sbjct 36	ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGGTTCATGGAGTGAC	95		
Query 61	GTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA	120		
Sbjct 96	GTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA	155		
Query 121	TACCCAGGACAGGGCAGTCTGGAGGCAACCGTTATCCATCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG	180		
Sbjct 156	TACCCAGGACAGGGCAGTCTGGAGGCAACCGTTATCCATCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG	215		
Query 181	GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCAT	240		
Sbjct 216	GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCAT	275		
Query 241	GGAGGTGGCTGGGGTCAAGCCGATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCCATGGTGGTGGAGGC	300		
Sbjct 276	GGAGGTGGCTGGGGTCAAGCCGATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCCATGGTGGTGGAGGC	335		
Query 301	TGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGTCAATGGAAACAAGCCAGTAAGCCAAAAACCAACATG	360		
Sbjct 336	TGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGTCAATGGAAACAAGCCAGTAAGCCAAAAACCAACATG	395		
Query 361	AAGCATATGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATG	420		
Sbjct 396	AAGCATATGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATG	455		
Query 421	CTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGTAATGACTATGAGGACCGTTAC	480		
Sbjct 456	CTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGTAATGACTATGAGGACCGTTAC	515		
Query 481	TATCGTGAAAACATGCACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTAT	540		
Sbjct 516	TATCGTGAAAACATGCACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTAT	575		
Query 541	AGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGGAACACACAGTC	600		
Sbjct 576	AGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGGAACACACAGTC	635		
Query 601	ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCAACGAAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTG	660		
Sbjct 636	ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCAACGAAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTG	695		
Query 661	GTGGAGCAAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAAATCCAGGCTTATTACCAACGAGGG	720		
Sbjct 696	GTGGAGCAAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAAATCCAGGCTTATTACCAACGAGGG	755		
Query 721	GCAAGTGTGATCCTCTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTGGCTATTTTT	780		
Sbjct 756	GCAAGTGTGATCCTCTTCTTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTGGCTATTTTT	815		
Query 781	CTCATAGTAGGATAG	795		
Sbjct 816	CTCATAGTAGGATAG	830		

Ek 3 Clustal Omega programı

Ek 3.1 Clustal Omega programında kullanılan FASTA biçimli prion proteini dizisi.



The screenshot displays the Clustal Omega web interface. At the top, the logo "Clustal Omega" is visible. Below it, there are navigation links for "Input form", "Web services", and "Help & Documentation". On the right, there are "Share" and "Feedback" buttons. The main content area shows the path "Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega". The title "Multiple Sequence Alignment" is followed by a description: "Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#)." Below this, there are two steps: "STEP 1 - Enter your input sequences" and "STEP 2 - Set your parameters". In Step 1, there is a text input field with a dropdown menu set to "PROTEIN". The input field contains two sequences: ">buffalov_1" followed by "MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGGSPGGNRYPSQGGGGWGQPHGGGWGQPHGG" and ">buffalov_2" followed by "MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGGSPGGNRYPSQGGGGWGQPHGGGWGQPHGG". Below the input field, there is a file upload option: "Or, upload a file: Choose File No file chosen". In Step 2, there is a dropdown menu for "OUTPUT FORMAT" set to "Clustal w/ numbers".

Ek 3.2 Manda v_1, manda v_2 ve sığır prion proteini dizilerinin hizalama sonucu. Manda prion proteininde sığır prion proteininin 54.cü pozisyonundaki Prolin amino asitinin yerinde Serin, 123.cü konumundaki Valin'in yerinde ise Metionin durmaktadır. 108.ci pozisyonunda manda prion proteini varyantları arasında Glisin-Serin değişmesi görülmüştür.

Results for job clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg

[Alignments](#)
[Result Summary](#)
[Phylogenetic Tree](#)
[Submission Details](#)

[Download Alignment File](#)
[Hide Colors](#)
[Send to ClustalW2_Phylogeny](#)

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

cattle      MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYPQGGGGW 60
buffalov_1 MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYPQGGGGW 60
buffalov_2  MVKRHIGSWILVLFVVMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYPQGGGGW 60
***          .*****

cattle      GQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQGGTHGQWNKPSKPKTNM 120
buffalov_1  GQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQGGTHGQWNKPSKPKTNM 120
buffalov_2  GQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQPHGGWGQGGTHGQWNKPSKPKTNM 120
***          .*****

cattle      KHVAGAAAAGAVVGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYRVPDQY 180
buffalov_1  KHMAGAAAAGAVVGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYRVPDQY 180
buffalov_2  KHMAGAAAAGAVVGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYRENMHRYPNQVYRVPDQY 180
***          .*****

cattle      SNQNFVHDCVNIIVK EHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG 240
buffalov_1  SNQNFVHDCVNIIVK EHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG 240
buffalov_2  SNQNFVHDCVNIIVK EHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRG 240
***          .*****

cattle      ASVILFSSPPVILLISFLIFLIVG264
buffalov_1  ASVILFSSPPVILLISLLIFLIVG264
buffalov_2  ASVILFSSPPVILLISLLIFLIVG264
***          .*****
    
```

Ek 3.3 Clustal omega sonuçları.

[Input form](#)
[Web services](#)
[Help & Documentation](#)

Tools > [Multiple Sequence Alignment](#) > [Clustal Omega](#)

Results for job clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg

[Alignments](#)
[Result Summary](#)
[Phylogenetic Tree](#)
[Submission Details](#)

Input Sequences

[clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg.input](#)

Tool Output

[clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg.output](#)

Alignment in CLUSTAL format with base/residue numbering

[clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg.clustal_num](#)

Phylogenetic Tree

[clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg.ph](#)

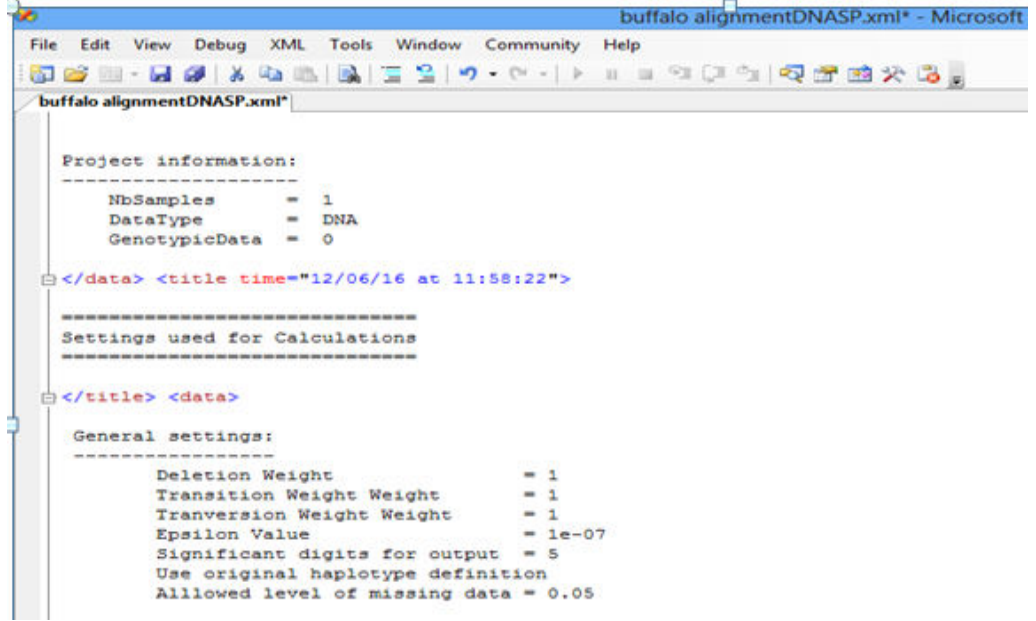
Percent Identity Matrix

[clustalo-E20161013-154517-0015-28911749-pg.pim](#)

Jalview

Ek 4 Arlequin programı

Ek 4.1 Arlequin yazılımı haplotip hesaplama değişkenleri.



```
buffalo alignmentDNASP.xml* - Microsoft
File Edit View Debug XML Tools Window Community Help
buffalo alignmentDNASP.xml*
Project information:
-----
NbSamples      = 1
DataType       = DNA
GenotypicData  = 0
</data> <title time="12/06/16 at 11:58:22">
=====
Settings used for Calculations
=====
</title> <data>
General settings:
-----
Deletion Weight           = 1
Transition Weight Weight  = 1
Tranversion Weight Weight = 1
Epsilon Value             = 1e-07
Significant digits for output = 5
Use original haplotype definition
Allowed level of missing data = 0.05
```

