

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FİLİSTİNE ÖZGÜ KOYUN IRKLARINDA *PRP* GEN
GENOTİPLEMESİ**

Osama ALSAYED

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 31.10.2016

Bornova-İZMİR

2016

Osama ALSAYED tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "Filistine Özgü Koyun Irklarında *PrP* Gengenotiplemesi" 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 31.10.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

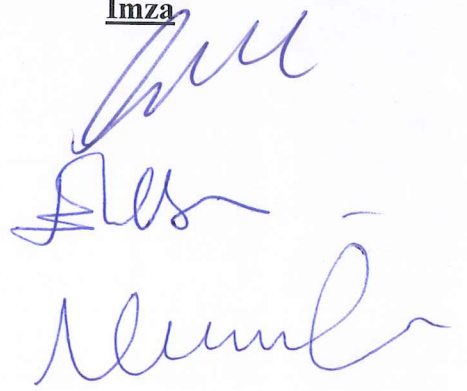
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Raportör Üye : Yrd. Doç. Evren KOBAN

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 “Filistine Özgü Koyun Irklarında PrP Gengenotiplemesi” 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/0 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.

31 / 10 / 2016

Osama ALSAYED

İmzası

ÖZET**FİLİSTİNE ÖZGÜ KOYUN IRKLARINDA *PrP* GEN
GENOTİPLEMESİ**

ALSAYED, Osama

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Ekim 2016, 53 sayfa

Scrapie koyunların merkezi sinir sistemini enfekte eden bulaşıcı bir hastalıktır. Prion protein gen *PrP* polimorfizmleri ki özellikle de kodon 136, 154 ve 171'deki aminoasit değişimleri scrapie hastalığına duyarlılıkla ilişkili bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Filistin yerli koyun ırklarındaki risk gruplarını belirlemek için *PrP* genini genotiplendirmektir. Bu çalışmada, İvesi ve Asaf ırkından 38 sağlıklı ve rastgele seçilmiş yerli Filistin koyunu çalışılmıştır. Kan örneklerinden genomik DNA izole edilmiş, çoğaltılmış ve sekanslanmıştır.

PrP geninde bulunmuş olan polimorfizmler ARQ, ARR, ARH, AHQ, ARL ve VRQ olacak şekilde 6 allelden ve ARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARQ/ARL, ARH/ARQ, ARH/ARL, AHQ/ARQ ve ARQ/VRQ olacak şekilde 7 genotipten meydana gelmektedir. ARQ alleli 0.76 frekansı ile İvesi ve Asaf ırklarında yüksek oranda bulunmuştur. ARR alleli Asaf ırkında bulunmamıştır. Az görülen ARL alleli her iki ırkta da düşük frekanslarda belirlenmiştir. Ayrıca *PrP* geninin farklı kodonlarında iki farklı polimorfizm (V12I ve L23H) tanımlanmıştır.

Sonuçlar genotiplerin çoğunluğunun 3.risk grubuna dahil olduğunu göstermektedir. Homozigot ARR/ARR koyunların dağılımı İvesi ve Asaf popülasyonlarında ARR allel frekansını artırmak için önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: Yerli Filistin koyun ırkları, *PrP* geni, Scrapie, Genotip.



ABSTRACT**GENOTYPING OF PrP GENE IN NATIVE PALESTINIAN SHEEP BREEDS**

ALSAYED, Osama

MSc in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN

October 2016, 53 pages

Scrapie is an infectious disease that infects the central nervous system of sheep. Polymorphisms of prion protein gene *PrP* especially the amino acid residue alterations at codons 136, 154 and 171 are found to be associated with susceptibility to scrapie disease.

The aim of this study was genotyping of *PrP* gene in Palestinian native sheep breeds to detect their risk groups. In this study, 38 healthy and randomly chosen local Palestinian sheep belonging to Awassi and Assaf breeds were investigated. Genomic DNA of blood samples was extracted, amplified and sequenced.

The polymorphism found out in the *PrP* gene was made up six alleles ARQ, ARR, ARH, AHQ, ARL and VRQ and 7 genotypes ARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARQ/ARL, ARH/ARQ, ARH/ARL, AHQ/ARQ and ARQ/VRQ. The ARQ allele was found to be predominant with frequency 0.76 for Awassi and Assaf. ARR allele in Assaf breed was absent. The rare ARL allele was identified at low frequencies in both breeds. In addition, two different polymorphisms were identified (V12I and L23H) at different codons of *PrP* gene.

Results have indicated that the most of the genotypes belong to risk group 3. Distribution of homozygous ARR/ARR sheep is recommended to increase ARR allele frequencies in Awassi and Assaf populations.

Keywords: Native Palestinian sheep breeds, PrP gene, Scrapie, Genotype.



Bu çalışmada bana katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cemal Ün'e teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen öncelikle aileme daha sonra arkadaşlarım Ahmet Efe Köseoğlu ve Sedef Erkunt'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 Scrapie'nin Tarihsel Gelişimi	2
1.2 Prion Proteini Kodlayan Gen (<i>PrP</i>)	3
1.2.1 PrP kodlama bölgesinin rolü	4
1.3 Hücresel Prion Protein (<i>PrP^C</i>)	4
1.3.1 Prion proteini ekspresyonu	6
1.3.2 Prion proteinin fonksiyonu	7
1.4 Prion Proteininin Neden Olduğu Hastalıklar (<i>PrP^{Sc}</i>)	8
1.4.1 <i>PrP^C</i> 'nin <i>PrP^{Sc}</i> 'e dönüşümü	9
1.5 Koyunlarda Klasik Scrapie	11

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.5.1 Klasik scrapie bulaşma yolları	12
1.5.2 Klasik scrapienin klinik belirtileri	13
1.5.3 Koyunlarda klasik scrapieye karşı genetik duyarlılık	14
1.6 Koyunlarda Atipikal Scrapie (Nor98).....	15
1.6.1 Atipikal scrapie bulaşma yolları	16
1.6.2 Atipikal scrapienin klinik belirtileri.....	17
1.6.3 koyunlarda atipikal scrapieye karşı genetik duyarlılık	17
1.7 Koyun ve keçilerde BSE.....	17
1.8 Orta Doğu ve Filistin’de TSE	18
1.9 Filistin’deki küçük ruminant popülasyonları	19
1.9.1 Asaf ve İvesi koyun ırkları.....	20
1.9.2 Filistin’deki koyun ve keçilerde scrapie hastalığı.....	21
2. MATERYAL ve METOTLAR.....	24
2.1 Hayvan ve Örnekler	24
2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	25
2.3 <i>PrP</i> Geninin Çoğaltılması.....	25
2.3.1 Primer dizaynı.....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	26
2.4 Sekanslama	28
2.5 Polimorfizmlerin Taranması.....	28
2.6 İstatistikel Analiz.....	28
3. SONUÇLAR.....	29
4. TARTIŞMA.....	33
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Koyunlarda <i>PrP</i> geni	4
1.2 PrP^C posttranslasyonel modifikasyonları.....	5
1.3 Hücresel prion proteinin (PrP^C) yapısı	6
1.4 $PrP^C \rightarrow PrP^{Sc}$ dönüşüm	11
1.5 2007 yılından itibaren scrapie uyarı dğılımı	22
1.6 2007 yılından itibaren her ülkenin scrapie alarm oranı	23
2.1 Koyun (<i>ovis aries</i>) <i>PrP</i> geninde primer bağlanma bölgesi	26
3.1 İvesi ırk koyun <i>PrP</i> genine ait elde edilen PCR ürünleri	32
3.2 Asaf ırk koyun <i>PrP</i> genine ait elde edilen PCR ürünleri.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Hücresel PrP ^C ve hastalık nedeni PrP ^{Sc} 'nin özellikleri	9
1.2 <i>PrP</i> genotipleri ve klasik scrapie risk seviyeleri	15
1.3 Filistin'deki çiftlik hayvanları popülasyonu.....	20
2.1 Bu çalışmaya ilişkin alınan örnekler hakkında bilgi	24
2.2 Dizayn edilen primere ait bilgi	25
2.3 PCR reaksiyonu aşağıdaki bileşenler ile birlikte 30 µl'lik total hacime ayarlandı	27
2.4 PCR reaksiyonu için thermo-cycling koşulları.....	27
3.1 Filistin yerli koyun ırklarında <i>PrP</i> geni allel frekansları.....	29
3.2 Filistin yerli koyun ırklarında <i>PrP</i> genotip frekansları	30
3.3 Filistin yerli koyun ırklarının <i>PrP</i> genindeki ek polimorfizmler	31

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PrP	Prion protein geni
PrP ^C	Hücresele prion proteini
PrP ^{Sc}	Scrapie hastalık nedeni protein
TSE	Bulaşıcı süngerimsi ensefalopati
BSE	Bovine spongiform ensefalopati
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
GPI	Glikozilfosfolinositol
Nor98	Atipikal scrapie

1. GİRİŞ

Scrapie, koyun ve keçilerde merkezi sinir sistemini etkileyen en eski Bulaşıcı Süngerimsi Ensefalopatidir (TSE). Normal hücresel formdaki prion proteinin (PrP^C), proteaza dirençli, kümelenmiş ve yanlış katlanmış patolojik formdaki prion proteinine (PrP^{Sc}) dönüşmesi sonucunda oluşur (Hornlimann et al., 2006). Çobanlar tarafından 200 yıldan fazla bir süredir farkına varılan bu hastalık, tanımlanan ilk prion hastalığıdır (Johnson, 2005).

Scrapie hakkındaki genetik ve bulaşıcı köken tartışmaları, genetik duyarlılığın ispatlanması ve hastalık gelişiminde *PrP* genindeki polimorfizmlerin öneminin ortaya konması ile son bulmuştur (Baylis and Goldmann, 2004). Hastalığın diğer çiftlik hayvanlarına ve insanlara bulaşmasıyla ilgili bir kanıt olmasa da, scrapie bulaşmış ruminantların sığırlar için yem olarak kullanılmasıyla hastalığın sığırlara geçtiği ve Birleşik Krallık'ta Bovin spongiform ensefalopatinin kökenlerini oluşturduğu kabul edilmektedir (Wilesmith et al., 1988).

Koyun ve keçi popülasyonlarındaki scrapie varlığı, endüstriyi ekonomik olarak etkilemekte ve üretim miktarını azaltırken, üretim bedeli ve satış bedelini artırmaktaydı. Bovin spongiform ensefalopatinin insanlara bulaşmasıyla ilgili potansiyel kamu sağlık endişeleri nedeniyle besin üretiminde kullanılan TSE'li hayvanlar imha edilmiştir. Tüketici ve hayvan sağlığını korumak amacıyla, TSE görüntüleme ve imha etme programıyla, BSE ve scrapienin Avrupa ve A.B.D'deki çiftlik hayvanları popülasyonlarında geniş yayılımı azaltılmıştır.

Scrapie hastalığına olan duyarlılığın, çiftlik hayvanlarında 13. kromozomda bulunan prion protein genindeki (*PrP*), tek nükleotid polimorfizmine (SNPs) bağlı olduğu belirlenmiştir (Goldmann et al. , 1994). Belirli *PrP* genotiplerinde scrapie hastalığına karşı yüksek duyarlılık görülürken, bazı genotiplerde de yüksek direnç görülmektedir (Baylis & Goldmann, 2004).

Bu çalışmanın amacı, yerli Filistin koyunlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve sekanslama yöntemleri ile genotiplendirilerek, Filistin koyunlarının scrapie hastalığına olan genetik duyarlılığının/direncinin belirlenmesidir.

1.1 Scrapie'nin Tarihsel Gelişimi

1732 yılında İngiltere, Almanya ve Fransa'daki veterinerlerin ilk defa yaptığı bir araştırma sonucu scrapienin küçük çiftlik hayvanlarında görülen bir hastalık olduğu ortaya konmuştur (Beringue and Anderoletti, 2014). Hastalığın bulaşıcı olduğu, 1936 yılında enfekte olmuş koyundan alınan beyin ve spinal dokunun, intraöküler inokülasyon ile sağlıklı iki koyuna aktarılmasıyla belirlenmiştir (Brown ve Bradley, 1998). Bazı araştırmacılar scrapienin daha erken zamanlarda ortaya çıktığını söylemiş ancak uygun bir kaynak verilmemiştir.

İlerleyen süreçte hastalığın bulaşma yollarıyla ilgili çeşitli tartışmalar yapılmış ve en çok cinsel yol ile bulaşabileceğinden şüphe edilmiştir. Scrapienin kökeni ve bulaşma yollarını açıklamak için birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, enfekte ve enfekte olmayan bireylerdeki temas çalışmalarını ve enfekte hayvanların farklı doku ve vücut sıvılarını kullanma çalışmalarını içermektedir. Bu çalışmaların birçoğu scrapie hastalığının inkübasyon süresinin uzun olmasından ötürü erken dönemde sonlanmış ve başarısız olmuştur (Schneider et al., 2008). Ancak 1936 yılında hastalığın bulaşıcı olduğunu ilk kez ispatlayan çalışmada, aşılanmış hayvanlar daha uzun süre inkübasyona bırakılmış ve scrapie gelişimi sağlanmıştır (Fast ve Groschup, 2008).

1930'lardan itibaren artan scrapie vakalarının, koyun endüstrisinde finansal kayıplara neden olmasıyla hastalıkla ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Ayrıca bu finansal kayıplar hastalığın bulaşıcı ajanıyla ilgili çalışmaları da teşvik etmiştir. Hastalığa neden olan ajanın parazit ve bakterilerin olabileceği düşünülmüş ancak bir virüs enfeksiyonu olabileceği en çok önerilen teori olmuştur. 1954 yılında "yavaş virüs enfeksiyonu" tanımı ilk defa ortaya konmuştur (Palmarini, 2007). Bununla birlikte 1966'da hastalığa neden olan ajanın virüse alternatif olarak polisakkaritler (Field, 1966) veya lipidler (Alper et al., 1978) olabileceği düşünülmüştür. 1967 yılında ise hastalık ajanının protein olabileceği düşünülmüş ve "sadece protein hipotezi" ilk defa ortaya atılmıştır (Laurent et al., 1996). Hemen arkasından 1970'lerde virino hipotezi düşünülmüş (Prusiner and Hadlow, 1979) ve en sonunda 1982'de patojenin dirençliliğine bağlı olarak "proteinli enfekte partikül" (akronim: prion) isimlendirmesi yapılmıştır. Kısa bir süre sonra da, TSE hastalığının sebebinin normal hücresel proteinin (PrP^C) patolojik isoforma dönüşmesi (PrP^{Sc}) olduğu düşünülmüştür (Oesch et al., 1985). Günümüzde PrP^{Sc} , TSE hastalığının biyokimyasal markeri ve hastalığa sebep olan ajan olarak kabul edilmiş (Piccardo et al., 2007).

PrP genindeki polimorfizmler ve çeşitli ırklardaki doğal scrapie gelişimi arasındaki ilişki 1991 yılında açıklanmış ve farklı deneysel çalışmalarla allellerin ve genotiplerin duyarlılık seviyesindeki rolü belirlenmiştir (Francois et al., 2003).

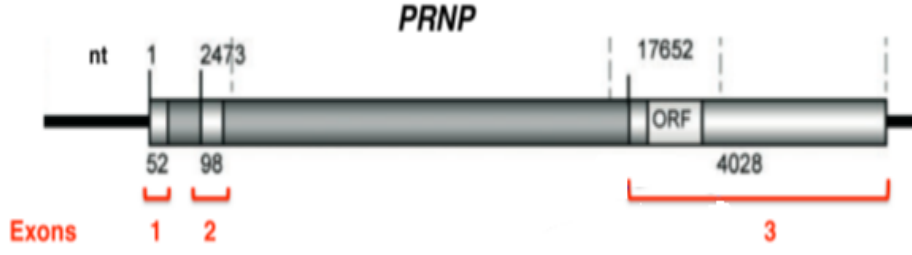
Atipikal scrapie (Nor98), ilk defa 1998 yılında Norveçli koyunda keşfedilmiştir (Benestad et al., 2008). Bununla birlikte 1987 yılında Birleşik Krallıkta toplanan koyun örnekleriyle yapılan geçmişe dönük çalışmalar atipikal scrapenin küçük çiftlik hayvanlarında saptanamadığını ama bulunuyor olabileceğini öne sürmüştür (Benestad et al., 2003; Bruce et al., 1989).

Keçilerde scrapie ilk kez 1939 yılında karakterize edilmiş (Pattison, 1972) ancak ilk doğal vaka 1942 yılında, Fransa'da (Le Dur et al., 2005; Arsac et al., 2007) hastalığın uzun yıllardır hakim olduğu bir koyun sürüsünde görülmüştür (Vaccari et al., 2009). Ayrıca keçilerde Nor98, İspanya (Vaccari et al., 2009), İsviçre (Seuberlich et al., 2007) ve İtalya'da saptanmıştır (Colussi et al., 2008). Yapılan çalışmalar keçilerin, koyun scrapiesine karşı yüksek duyarlılığını (%100) doğrulamıştır (Pattison et al., 1959).

1.2 Prion Proteini Kodlayan Gen (*PrP*)

Koyun ve keçilerdeki klasik scrapie duyarlılığı üzerindeki en büyük etkinin sorumlusu olan genetik lokus, *PrP* lokusudur (Diaz et al., 2005). *PrP*, prion proteinini kodlayan ve memelilerde güçlü bir şekilde korunmuş olan gendir (Wopfner et al., 1999). Koyun, keçi ve sığırlarda 13. Kromozomda haritalanmıştır (Castiglioni et al., 1998).

Koyunlarda *PrP*, ekzon I (52 bp), ekzon II (98bp) ve kodlama sekansını içeren ekzon III (4028) olmak üzere 3 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 1.1). Koyun ve keçilerde genin polimorfik olduğu gösterilmiş olup (Mead, 2006), koyunlarda scrapieye karşı direnç veya duyarlılıkla ilgili 40'tan fazla tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlenmiştir (Belt et al., 1995).



Şekil 1.1: koyunlarda *PrP* geni. ekzon I (52 bp), ekzon II (98bp) ve kodlama sekansını içeren ekzon III (4028bp).

1.2.1 PrP kodlama bölgesinin rolü

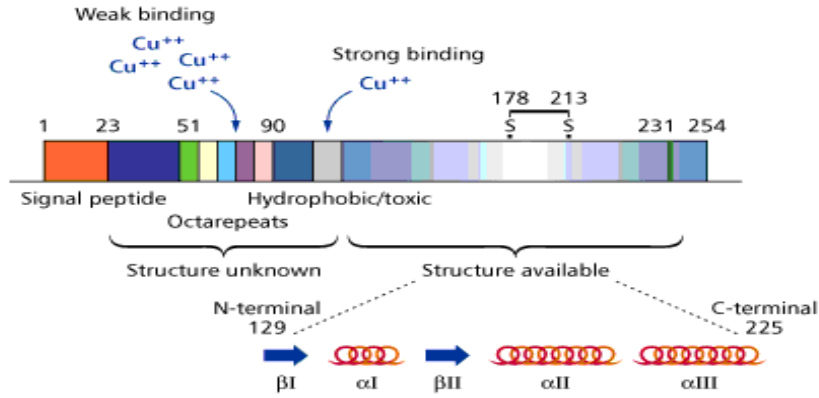
Scrapie bulaşıcı bir hastalık olarak addedilse de, koyunlardaki duyarlılık prion protein genindeki (*PrP*) polimorfizmlerden etkilenmektedir. *PrP* genindeki 136., 154., ve 171. kodonlardaki haplotiplerinden Valin/Arjinin/Glutamin (VRQ) ve Alanin/Grjinin/Glutamin (ARQ) klasik scrapieye karşı yüksek duyarlılıkla ilişkilirken, Alanin/Arjinin/Arjinin ARR haplotipinin dirençle ilişkili olduğu bilinmektedir (Belt et al., 1995). Bu nedenle 2000 yılında, scrapie hastalığından önemli derecede mağdur olan AB ülkelerinde, koyun popülasyonlarında scrapieye karşı direnci artırmak için bir çok damızlık programı geliştirilmiştir (Francois et al., 2003).

Keçilerdeki benzer scrapie ilişkilendirme çalışmaları, pasif sürveyansta az sayıdaki enfekte hayvanlar nedeniyle sınırlı olmakla birlikte (Billinis, et al., 2002), AB ülkelerindeki aktif sürveyansta PrP^{Sc}-pozitif tespitinin artması bu durumun değişebileceğini düşündürmektedir. Keçilerde dünya çapında rapor edilen 8 polimorfizm bulunmaktadır (ve bunlardan en az 5 tanesinin TSE duyarlılığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Vaccari et al., 2009).

1.3 Hücresel Prion Protein (PrP^C)

Prion proteini, 256 amino asitten oluşan bir proteindir. Proteinin, birçok özgün yapısal bölgesi belirlenmiş olup (Şekil 1.2), sinyal peptidi, amino-ucuna yakın beş oktapeptid tekrarı, 2 glikozilasyon bölgesi, disülfid köprüleri ve hücre membranına tutunmak için glikozilfosfotidilinositol (GPI) çapalarından meydana gelmektedir (Soto, 2006).

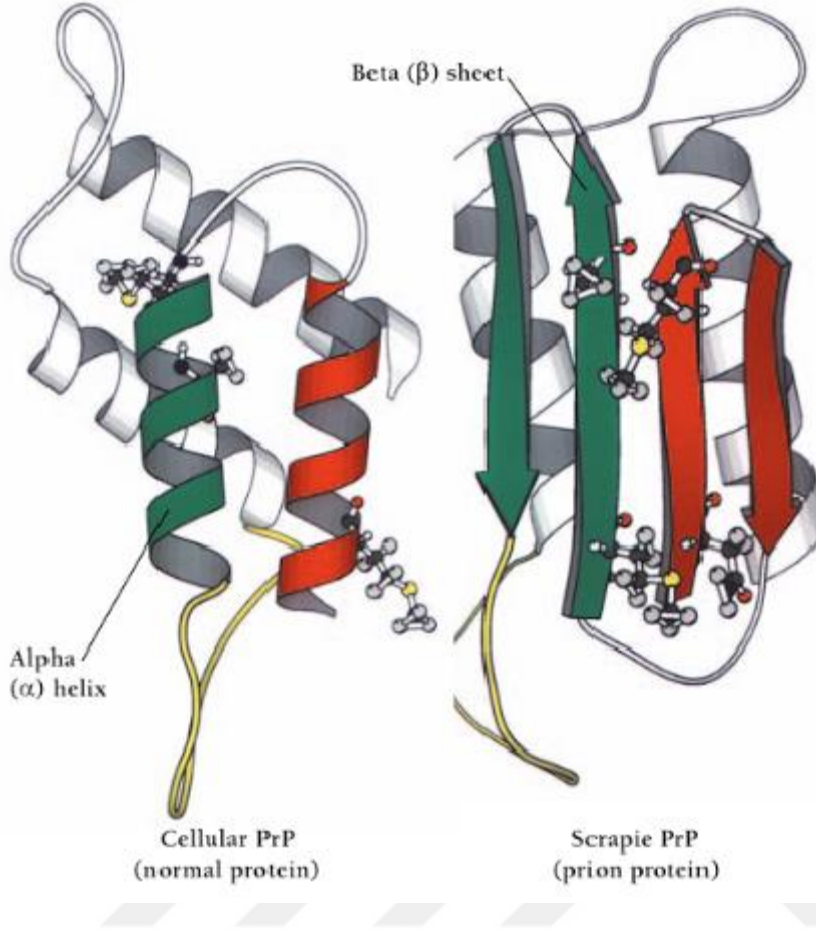
Protein, endoplasmik retikulum ve golgi aygıtına giderken, N- ve C-terminal sinyal sekanslarının uzaklaşmasından sonra olgun protein halini almaktadır (Harris, 2003). Proteinin yanlış katlanmış formunda da aynı posttranslasyonel modifikasyonların gerçekleşmesi nedeniyle, 2 izoformun kimyasal farklılıklarının belirlenmesi çalışmaları başarılı olamamıştır (Stahl et al., 1993). PrP^C ve PrP^{Sc} proteinlerinin birincil yapısı benzer olmasına rağmen, farklı biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikler göstermektedirler (Cohen, 1999).



Şekil 1.2: PrP^C posttranslasyonel modifikasyonları: PrP^C, 256 amino asitten oluşan bir proteindir. Hücre yüzeyine göndermek ve hücre membranına GPI çapalarının eklendikten sonra bağlanabilmek için 2 sinyal peptidi bulunmaktadır. Ayrıca 2 glikozilasyon bölgesi ve sistein köprüleri vardır. N-ucunda bulunan oktapeptit tekrarlar ise, PrP'nin bakır bağlamaya ilgili biyolojik aktivitesine katılımda bulunmaktadır. 2 beta yaprağı (β₁ and β₂) ve 3α alfa sarmalı (α₁, α₂ and α₃) C-terminali oluşturmaktadır.

Prion proteinin 3 boyutlu yapısı, amino asit değişimlerine rağmen memelilerde korunmuştur (Soto, 2006). Hüresel prion proteini, oktapeptit tekrarlarını içeren esnek ve sırasız N-terminal bölgesi ile 2 anti-paralel beta yaprağı (β₁ and β₂) ve 3 alfa sarmalı (α₁, α₂ and α₃) içeren C-terminal bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 1.3) (Eghiaian et al., 2004). Hüresel PrP'deki alfa sarmal yaklaşık %43'tür. Olgun PrP^C, proteinaz-K ile inkübasyonundan sonra tamamen sindirilir ve deterjan solüsyonunda çözünür (Meyer et al., 1986).

PrP^{Sc} proteini ile ilgili yeterince detaylı yapısal bilgi halen olmamasına rağmen, çalışmalarda kullanılan düşük çözünürlüklü biyofiziksel teknikler, bilişsel modelleme ve küçük peptit fragmentlerinin analizi gibi yöntemler, yapısal düzenlemenin çoğunlukla proteinin globüler C-terminal bölgesini içeren formasyonu sırasında olduğu sonucuna yol açmaktadır (Soto, 2006).



Şekil 1.3: Hüresel Prion Proteinin (PrP^{C}) Yapısı: proteinin 2 beta yaprağı ($\beta 1$ and $\beta 2$) ve 3 alfa sarmalı ($\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$).

1.3.1 Prion proteini ekspresyonu

Prion proteinin nöronlardaki ekspresyonuna ek olarak hüresel prion proteini çeşitli nöronal olmayan dokuda (Simak et al., 2002) ve enterositlerde de eksprese olmaktadır (Morel et al., 2005). Son dönemde yapılan çalışmalar da hüresel prion proteinin platelet, lökosit ve kırmızı kan hücrelerinde bulunduğunu ortaya koymuştur (Barclay et al., 1999). Prion proteinin lokalizasyonu çoğunlukla hücre tipine bağlı olmaktadır. Nöronlarda, PrP^{C} genelde hücre yüzeyinde bulunmasına rağmen yapılan çalışmalar proteinin sadece dendrit ve aksonların hücre membranında değil, protein sentezi ve endositik yolakta da bulunduğunu ortaya koymuştur (Mironov et al., 2003).

1.3.2 Prion proteinin fonksiyonu

Hücrel prion proteini (PrP^C), vücuttaki birçok dokuda eksprese olmasına rağmen, proteinin fonksiyonuna dair henüz tam bir bilgi bulunmamaktadır. Prion proteininin birincil yapısının tüm memelilerde evrimsel olarak korunmuş olması ve özelleşmiş membran bölgelerinde yerleşmiş olması, hücrel prion proteininin biyolojik fonksiyonlarda önemli bir görev aldığını düşündürmektedir. Proteinin varsayılan biyolojik aktivitesindeki değişikliklerin hastalık oluşumundaki etkisi henüz bilinmemektedir (Hetz et al., 2003). Hücrel prion proteininin fonksiyonuyla ilgili varsayımlar deneysel çalışmalar sonucu ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalar, PrP^C'nin nöronal hücrelerdeki sinaptik fonksiyonları gerçekleştirdiğini (Madore et al., 1999) ve sinaptik keseciklerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Hücrel prion proteininin etkileştiği sinapsin I proteininin küçük sinaptik keseciklerle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sinapsin I proteini ve Grb2'nin nöronal mikrozomal keseciklerde hücrel prion proteiniyle birlikte saflaştırma yaptığı belirlenmiştir (Spielhauer and Schätzl, 2001). Bu durum, proteinin, nöronal keseciklerin geri dönüşümünde veya direkt olarak sinaptik aktivitede rolü olduğunu öne sürmüştür (Herms et al., 1999). Farelerde hücrel prion proteini çıkarılarak yapılan çalışmalarda, PrP^C'nin nöronal uyarılmaya neden olduğu (Mallucci et al., 2002) ve yüksek seviyedeki PrP^C'nin sinaptik iletişimde daha dirençli olduğu ortaya konmuştur (Carleton et al., 2001).

PrP^C'nin yaşamsal sinaptik fonksiyonlarda gerekli olmadığı görüldü de, proteininin eksikliğinin nöronal fonksiyonların ince ayarında eksiklere neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum hücrel prion proteinin susturulduğu farelerde gözlenen normal olmayan uyku modelleri (Tobler et al., 1996) ve artmış lokomotor aktivitesi ile ispatlanmıştır (Roesler et al., 1999).

PrP^C'nin varsayılan fonksiyonlarıyla ilgili yapılan bir diğer çalışma, proteinin bakır metabolizması ve bağlanmasında görevli olduğunu ortaya koymuştur (Brown, 2001). Proteinin oktapeptit tekrarlarının fizyolojik konsantrasyon aralıklarında bakır bağlayabilmesi (Kramer et al., 2001), bakırın beyin metabolizmasında PrP^C'nin rolü olabileceğini önermektedir. Hücrel prion proteinin fazla ekspresyonunun, hücrelere bakır alımını ve bakırın superoksit dismutaz ile birleşmesini artırdığı gösterilmiştir. Yanı sıra, *PrP* geni susturulmuş farelerle yapılan in vivo deneylerinde beyindeki düşük bakır miktarı gözlenmiştir (Brown et al., 1997). Buna ek olarak, scrapie enfekteli, klinik semptomları

başlama aşamasında olan fare beyrinde de belirgin seviyede bakır seviyelerinde farklılık belirlenmiştir (Thackray et al., 2002). Başka bir çalışmada ise farklı miktarlarda PrP^C'nin eksprese olduğu transgenik hayvan beyrindeki bakır seviyelerinde bir değişiklik görülmemiştir (Waggoner et al., 2000).

Prion proteini beyinde yüksek miktarda eksprese olmaktadır. PrP^C'nin lipit yığınlardaki konumu, proteinin sinyal iletiminde potansiyel bir rolü olduğu önerisini sağlamıştır. Nöronal fosfoproteinsinapsin Ib, büyüme faktörü reseptör bağlı protein 2(Grb2), prion interaktör I (Pint1) ve stres indükleyici fosfoprotein I (STI1) gibi sinyal proteinlerinin PrP^C ile immünopresipitasyon yaptığı görülmüştür (Spielhauer and Schatzl, 2001). Bu proteinlerle etkileşim, nöron koruyucu bir etki sağlayabilir (Jeong et al., 2012). Hücrel prion proteinin nöron koruyucu rolünü destekleyen nöronal birincil kültür çalışmaları, prion proteini olmayan hücrelerin yabancıl tip hücrelere göre serum eksikliği gibi apoptotik uyarılara daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Kuwahara et al., 1999). PrP^C'nin nöron koruyucu sinyal rolüne dair kanıtlar olsa da GPI çapası proteinlerinin sinyalleşme basamağını nasıl başlattığı bilinmemektedir.

Yukarda proteinin varsayılan fonksiyonlarıyla ilgili açıklamalara ek olarak, PrP^C ve Bcl-2 apoptos karşıtı protein ailesi arasındaki fonksiyonel ilişkiyle ilgili yapılan çalışmalarda Bcl-2'nin fazla ekspresyonunun in vitro koşullarda PrP geni olmayan nöronların yükselmiş olan serum-ihyaç-indükleyici apoptozunu azaltabildiği öngörülmüştür (Kuwahara et al., 1999). Bcl-2'nin kritik olan apoptoz karşıtı fonksiyonu ve Bax proteiniyle ilişkisi, PrP'nin apoptoz karşıtı protein ailesi üyesi olabileceğini önermiştir. Bu hipotez, yapılan in vitro deneylerde PrP^C'nin insan nöronlarını Bax-indüklenmiş apoptoza karşı koruduğunun gözlenmesiyle desteklenmiştir (Bounhar et al., 2001). Hücrel prion proteininin Bcl-2 gibi apoptoz karşıtı protein olmasıyla ilgili hipotezin temel engeli, protein ailesindeki üyelerin aktivitelerini gerçekleştirdikleri sitoplazma, mitokondri ve endoplasmik retikulumun dış yüzeyinde bu proteinin bulunmamasıdır.

1.4 Prion Proteininin Neden Olduğu Hastalıklar PrP^{Sc}

PrP^C, prion proteininin normal hücrel formu olarak, PrP^{Sc} ise yanlış katlanmış patolojik izoformu olarak nitelendirilmektedir. PrP^C ve PrP^{Sc} arasında genetik veya posttranslasyonel farklılıklar bulunmamakla birlikte, C-terminal globüler bölgesindeki konformasyon ve proteaz direnci/çözünürlük gibi biyokimyasal özelliklerde (tablo 1.1) farklılıklar bulunmaktadır (Cohen and Prusiner, 1998).

Tablo 1.1: Hücresel PrP^C ve hastalık nedeni PrP^{Sc}'nin özellikleri

	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Deterjan	Çözülebilir	Çözülemez
Proteolitik Sindirim	Duyarlı	Dirençli
Alfa-heliks İçeriği	%43	%20
Lokasyon	Hücre Yüzeyi	Fibril Kümeleri
Moleküler Ağırlık	33-35 KDa	33-35 KDa
Proteolitik Sindirim Sonrası Moleküler Ağırlık	Degrade	27-30 KDa

PrP^{Sc}'nin yapısıyla ilgili detaylı bilgiye ulaşmak, proteinin çözülmezlik ve agregat oluşturma eğiliminden dolayı oldukça zor olmaktadır. Proteinin yapısı, PrP^{Sc}'nin fibril oluşturma eğilimi baz alınarak yapılan protein katlanması modelleriyle tahmin edilmiştir. Fibril yapıları tüm amiloidojenik proteinlerdekine benzemekte ve dik beta-iplikleri ve paralel beta-yapraklarının çapraz beta-yapılarını içermektedir (Sunde et al., 1997). C-terminal globüler bölgesi %20 alfa-heliks içerirken beta-yapraklar C-terminalin daha büyük bir oranını oluşturmaktadır (Pan et al., 1993).

1.4.1 PrP^C'nin PrP^{Sc}'e dönüşümü

Prionun scrapie hastalığına sebep olmasının yayılımı, konak PrP^C proteinin patolojik formdaki PrP^{Sc} proteinine dönüşmesi sonucu olmuştur. *PrP* geninin susturulduğu deneylerle, endojen PrP^C proteininin enfeksiyon gelişiminde yer aldığı desteklenmiştir (Bueler et al., 1993). Kullanılan hayvanlar prion hastalığına karşı dirençli ve yeni enfeksiyon oluşturabilme yeteneği olmayan canlılar olmasına ilaveten, enfekte proteinin inokulasyonu ile klinik semptomların gözlenmesi arasındaki süreçte PrP^{Sc} miktarında ciddi bir artış görülmüştür. Bu bulgular endojen hücreli prion proteinin, enfekte PrP molekülünün etkisiyle patolojik formdaki prion proteinine dönüştüğünü önermiştir.

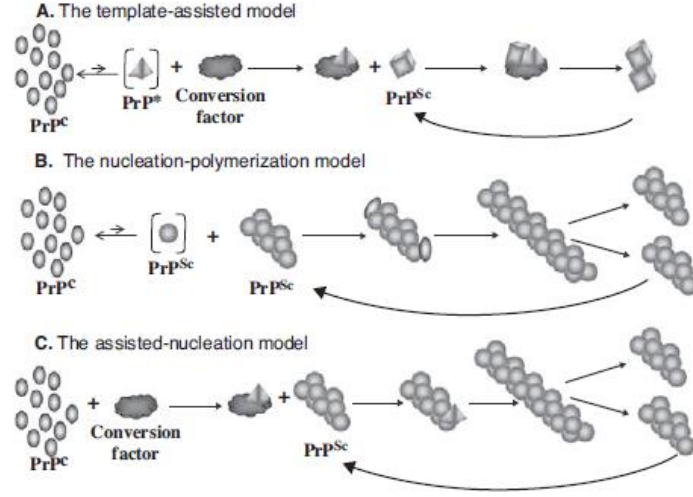
Yapılan çalışmalar, enfekte inokulumdaki patojenik prion proteinin konak PrP^C ile etkileşiminin, hücreli prion proteinini katalize ederek patojenik forma dönüştürdüğünü varsaymıştır. Enfeksiyon işlemi süresince iki izoform arasındaki fiziksel ilişki, saflaştırılmış PrP^C ve PrP^{Sc}'nin in vitro koşullarda karıştırılması ve PrP^{Sc}-benzeri moleküllerin oluşmasıyla belirlenmiştir (Caughey, 2003). Prion proteininin dönüşümüyle ilgili mekanizma halen bilinmemektedir. Moleküler

genetik çalışmalar, geçici olarak X proteini olarak isimlendirilen şaperon-benzeri bir proteinin $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ dönüşümünde (Şekil 1.4) görevli olabileceğini varsaymaktadır ancak bu faktörün doğası halen bilinmemektedir (Yuon et al., 2013).

$\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ dönüşümüyle ilgili mekanizmaya dair 3 alternatif model bulunmaktadır:

1. Kalıba bağlı dönüşüm modeli (Cohen and Prusiner, 1998) (Şekil 1.4.A), izoformlar arasındaki fiziksel etkileşimin, PrP^{C} 'nin patojenik dönüşümüne neden olan yapısal değişiklikler için gerekli olduğunu varsaymaktadır. Bu model, scrapie prion proteininin hücrel prion proteinine göre daha termodinamik olduğunu kabul etmektedir (Harrison et al., 1999). PrP^{C} , PrP^* olarak isimlendirilen geçici konformasyonel ara form ile dengede bulunmaktadır. PrP^* , hücrel şaperon (X proteini) ile etkileştikten sonra PrP^{Sc} ile heterodimer oluşturabilecek hale gelmektedir. Bu heterodimer, spontane bir şekilde eski ve yeni oluşmuş PrP^{Sc} moleküllerini içeren PrP^{Sc} homodimer yapısına dönüşür. Homodimer yapı, dönüşümü gerçekleştirebilecek iki kalıbı oluşturmak için ayrılma yeteneğine sahip olduğundan, PrP^{Sc} konsantrasyonunun artışına neden olmaktadır (Cohen and Prusiner, 1998).
2. Nükleasyon/Polimerizasyon modeli (Şekil 1.4.B), PrP^{C} ve PrP^{Sc} 'nin solüsyon içinde termodinamik dengede bulunduğunu önermektedir. PrP^{Sc} monomeri stabil olmayan bir molekül olup, diğer PrP^{Sc} molekülleri ile agregasyon sonucu stabil hale gelmektedir (Caughey, 2001). PrP^{Sc} yığınları, monomerik PrP^{Sc} ile bağlanarak ve patolojik formun oluşması yönünde dengeyi değiştirerek PrP^{C} molekülünü dönüşüme zorlamaktadır. Bu modelde enfekte ajan multimerik olan PrP^{Sc} yığınlarıdır ve en yavaş adım PrP^{Sc} 'nin stabilizasyonunda tohum gibi davranan nükleus oluşumudur (Jarrett and Lansbury, 1993). Modelin yavaş basamağının, prion hastalığının uzun inkübasyon süresi için bir açıklama olabileceği düşünülmektedir (Graham et al., 2010).
3. Yardımlı Nükleasyon modeli (Şekil 1.4.C), kalıp-bağlı dönüşüm modeli ve nükleasyon/polymerizasyon modeli arasındaki bir diğer modeldir. Bu modelde PrP^{Sc} monomer olarak bulunmamakta ancak PrP^{C} protein X ile etkileştiğinde, PrP^* ile eşdeğer yanlış katlanmış bir ara form

oluşturmaktadır. Yapısal dönüşüm PrP^* ile PrP^C polimerleri birleştikten sonra gerçekleşmektedir. Belirli bir aşamada, uzun PrP^{Sc} polimerleri mekanik güç veya bilinmeyen bir katalizleme işlemiyle daha küçük parçalara bölünmektedir. Bu parçalanma, PrP^C 'nin dönüşümünü yönlendiren etkin çekirdek sayısını artırmaktadır (Soto, 2006).



Şekil 1.4: $\text{PrP}^C \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ Dönüşüm: Prion dönüşüm mekanizmasıyla ilgili 3 model önerilmiştir. (A) Kalıba bağlı dönüşüm modelinde, PrP^C ara form (PrP^*) ile dengededir ve dönüşüm faktörüne bağlanarak, dönüşüm için kalıp görevi yapan PrP^{Sc} ile etkileşir. (B) Nükleasyon/polimerizasyon modelinde, PrP^C stabil olmayan monomerik PrP^{Sc} ile dengededir. Bu form, tohum gibi hareket eden ve PrP^C 'nin dönüşümünde ve yanlış katlanmasında etkili olan enfekte PrP^{Sc} oligomerlerin, oligomerizasyonu ile stabil hale gelmektedir. (C) yardımcı nükleasyon modelinde, PrP^* eşdeğeri ara formun oluşması, PrP^C molekülünün dönüşüm faktörüne bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu modelde PrP^{Sc} , PrP^C 'nin dönüşümünde ve yanlış katlanmasında etkili olan tohum gibi davranan bir oligomerdur.

1.5 Koyunlarda Klasik Scrapie

Daha önce de bahsedildiği gibi, klasik scrapienin koyun popülasyonlarında bir hastalık olduğu ilk kez 1732 yılında Avrupa'da ortaya konmuştur (Schneider et al., 2007). Hastalığın geniş yayılımı, ırkların kalitesini ve yerli ırkların ticaretini artırma girişiminin sonucu olarak 19. yüzyıl başlarında kendiliğinden gerçekleşmiştir (Brown and Bradley, 1998).

1.5.1 Klasik scrapie bulaşma yolları

Son zamanlarda scrapienin bulaşma yöntemiyle ilgili uzun tartışmalar yoğunlaşmış olmasına rağmen kesin bulaşma yolu tam olarak çözümlenememiştir. Bulaşma, ya direkt temasla ya da çevre kirliliğiyle gerçekleşmektedir. Klasik scrapie genel olarak sürüler arasında ya da içinde yatay yayılım göstermektedir (Pattison et al., 1972). Yatay bulaşma, kuzulama sırasında ve çevre kirliliği vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Tuo et al., 2001; McIntyre et al., 2008). Hastalığın esas bulaşma yolu oral yoldur (van Keulen et al., 2008). Klinik öncesi, koyunlar oral kaviteden PrP^{Sc} salgılamakta bu nedenle sürüdeki diğer hayvanları ve besin yalıklarını enfekte etmektedirler (Gough et al., 2012). Kuzulama sırasında plasenta ve amniyotik sıvının etrafa dökülmesinin ve bunların diğer koyunlar tarafından tüketilmesinin, sürü içindeki en önemli bulaşma yolu olduğu varsayılmaktadır (Hoinville, 1996). Plasentaya ek olarak PrP^{Sc}, rektal mukozada (Espenes et al., 2006), süt bezlerinde (Ligos et al., 2005), tükürük bezlerinde (Vascellari et al., 2007), böbreklerde (Siso et al., 2006), deride (Thomzig et al., 2007), kaslarda (Andreolletti et al., 2004), üçüncü göz kapağında (O'Rourke et al., 2000) ve dil papillerinde (Casalone et al., 2005) de bulunmaktadır.

Ayrıca scrapie ajanının bulaşıcı özelliğini koruyarak ve parçalanmaya direnç göstererek çevresel ortamda yıllarca bulunabileceği gösterilmiştir (Madisson et al., 2010; Genovesi et al., 2007; Wiggins, 2009; Smith et al., 2011). Plasenta ve amniyotik sıvının yanı sıra, elde edilen sonuçlar, genetik olarak scrapieye duyarlı koyunlara hastalığın bulaşmasıyla ilgili, dışkı, süt, tükürük, üre, ter ve deri döküntülerinin de olası rolü olduğunu belirtmektedir.

Koyunlardaki iyatrojenik klasik scrapie yayılması Birleşik Krallıktaki bir vakada rapor edilmiştir. Genç koyunların beyin, omurilik ve dalak dokuları ovin ensefalomiyelite karşı etkisiz aşırıyı yönetmek için kullanılmıştır. Bu aşının üretimi, bir grup sürüde scrapie salgınının nedeni olarak belirlenmiştir (Prusiner, 1982).

1.5.2 Klasik scrapienin klinik belirtileri

Klasik scrapiedeki klinik semptomların farklı ırk, bölge ve ülkelerde değişim göstermesinde, yıllarca birçok ülkede scrapienin belirlenememesinin açıklaması olabilecek, hayvanın genotipi ve hastalığın evresi etkili olmaktadır (Ulvund, 2008). Hastalığın vejetaryenler tarafından fark edilmemesi, belirsiz bir başlangıcının olması ve klinik evrenin yavaş ilerlemesi, hastalığın tanımlanamamasının nedenlerini oluşturmaktadır. *PrP* genotipinin yeni bilgileri ışığında yapılan scrapienin klinik semptomlarıyla ilgili çalışmalar oldukça sınırlı kalmaktadır (Parry and Oppenheimer, 1984).

Erken evrelerde, ataksi ve kaşıntı sebebiyle yün kaybı ilk göze çarpan klinik belirtilerdir (Fast and Groschup, 2008). Scrapienin klinik belirtileri, davranış değişimleri, hassaslık değişimleri ve hareket değişimleri gibi farklı kategoriler içermektedir (Ulvund, 2008). Baş dönmesi, ısırma tepkisi, aşırı duyarlılık, tükürük salgılama, kaşıntı ve kilo kaybı farklı ülkelerde ve ırklarda en çok rapor edilen klinik belirtilerdir (Copucchio, 2001; Healy, 2003; Vargas et al., 2005). Bütün belirtiler her zaman ortaya çıkmasa da, genellikle en az birden fazlası fark edilir. Hastalığın gelişim süresince, güçsüzlük artmakta ve dış etkilere karşı aşırı tepki, gönüllü bir şekilde sürüden uzaklaşma gibi davranış değişimleri gözlenmektedir. Scrapie enfekteli hayvanlarda gözlenen en önemli klinik özellikler, hayvanların mental statülerindeki, derin algılama durumlarındaki ve motor fonksiyonlarındaki değişiklikler olarak sınıflandırılabilir (Vargas et al., 2005). İlerleyen evrelerde, iştahta bir değişiklik olmamasına rağmen belirgin kilo kaybı oluşmakta ve sarsılmaktan hayvanın düşmesine sebep olabilecek çarpıntı belirgin hale gelmektedir (Hornlimann et al., 2007). Bunların sonucunda da ölüm gerçekleşmektedir.

Hastalığın azaltılmasını zorlaştıran bariyerlerden biri, scrapie enfekteli koyunların kesimden sonra beyin materyallerinin histolojik incelemesinde geniş boşluklar tespit edilmesine rağmen, koyunların klinik belirti göstermemesidir (Clark et al., 1994). Buna ek olarak, scrapie akut başlangıçlı ve kısa süreli vakalarda da onaylanmış ve etkilenen koyunlar aniden yere yatmış veya ölü bir şekilde bulunmuştur (Healy et al., 2003; Humphrey et al., 2004).

1.5.3 Koyunlarda klasik scrapieye karşı genetik duyarlılık

PrP genindeki polimorfizmlerin, koyunlarda scrapieye karşı duyarlılık ve direnç değişiminde etkili oluşu gösterilmiştir (Hunter et al., 1996). Ekzon III'deki açık okuma çerçevesi kesintisiz olup, 256 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. Koyunlarda klasik scrapie enfeksiyonuna karşı duyarlılık ve direnç seviyesine prion proteinindeki 3 polimorfik kodon (136, 154 ve 171) etki etmektedir (Cloucard et al., 1995; Thorgeirsdottir, 1999; Ikeda et al., 1995; Goldmann, 2008). Polimorfizmlerin çoğunluğu DNA'daki tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) oluşmakta ve bunlar tek amino asit değişimine neden olmaktadır. *PrP* polimorfizmleri hastalığa karşı duyarlılığa ek olarak, hastalığın inkübasyon süresini ve klinik belirtilerini de etkilemektedir (Eiden et al., 2011).

Gendeki polimorfizmlerin koyunların duyarlılık ve direnç derecesiyle ilişkili olduğu bilinmekte ve 136. kodonda Valin (V136) veya Alanin (A136), 154. kodonda Arjinin (R154) veya Histidin (H154) ve 171. kodonda Glutamin (Q171), Histidin (H171) veya Arjinin (R171) amino asitleri bulunabilmektedir (Tongue, 2004; Vaccari et al., 2001). Polimorfizmlerin neden olduğu ve tüm dünyada yayılış gösteren 5 farklı allel (ARQ, VRQ, AHQ, ARR and ARH) bulunmakta ve bunlar 15 çeşit genotip oluşumuna yol açmaktadır (Goldmann, 2008). Birçok çalışma VRQ/VRQ genotipinin, scrapie gelişiminde yüksek risk taşıdığını ve inkübasyon süresinin kısa olup hızlı ölümün gerçekleştiğini göstermiş, ek olarak homozigot ARR/ARR genotipinin yüksek dirençle ilişkili olduğunu ve inkübasyon süresinin yaşam süresinden uzun olduğunu ortaya koymuştur (Belt et al. 1995; Hunter et al., 1996; Hunter, 1997). Sadece AHQ, ARH ve ARQ allellerini içeren genotip kombinasyonların klasik scrapieye karşı genetik direnci, yine bu alleleri içeren ve VRQ alleli ile kombine olan genotiplere oranla daha azdır. Ancak adı geçen alleller ARR alleli ile kombine olduğu zaman (ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ) genetik direnç artar. Karşılaştırılacak olursa, ARR/VRQ genotipli hayvanlar klasik scrapieye karşı daha duyarlıdır.

Sonuç olarak, *PrP* genotipleri Büyük Britanya'da uygulanan Ulusal Scrapie Plan'ında (NSP) listelendiği gibi 5 risk grubunda (R) sınıflandırılmakta ve duyarlılık seviyesi arttıkça R1'den R5'e doğru gruplandırılmaktadır (tablo 1.2). Bu risk grupları sınıflandırılması, Avrupa birliği hayvancılık ve scrapie hastalığı imha programlarının temeli olarak kabul edilir (Tongue et al., 2004).

Tablo 1.2: PrP genotipleri ve klasik scrapie risk seviyeleri

En yüksek Genetik Dirençli (R1)	Genetik Dirençli (R2)	Düşük Genetik Dirençli (R3)	Genetik Duyarlı (R4)	En yüksek Genetik Duyarlı (R5)
ARR/ARR	ARR/AHQ	AHQ/AHQ	ARR/VRQ	ARQ/VRQ
	ARR/ARH	AHQ/ARH		ARH/VRQ
	ARR/ARQ	AHQ/ARQ		AHQ/VRQ
		ARH/ARH		VRQ/VRQ
		ARH/ARQ		
		ARQ/ARQ		

R1, R2, R3, R4, R5 risk gruplarıdır ve risk R1'den R5'e doğru artmaktadır.

Yapılan çalışmalar, 154. ve 171. kodonlardaki polimorfizmlerin duyarlı hayvanlarda inkübasyon süresini etkilediğini ortaya koymuş (Hunter et al., 1996), ayrıca koyunlardaki AC151RQ, AT137RQ ve ARQK176 genotiplerinin direnç ve uzun inkübasyon süresiyle ilişkili olduğunu belirtmiştir (Acin et al., 2004; Thorgeirsdottir et al., 1999). Buna ek olarak, 136., 154. ve 171. pozisyonlardaki polimorfizmlere ilaveten, 137. ve 176. pozisyonlardaki polimorfizmlerin scrapie ve bovin süngerimsi ensefalopatiye karşı koruma artışıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Vaccari et al., 2007; Vaccari et al., 2009). ARK ve TRQ allellerinin hastalık duyarlılığında etkili olduğu bilirse de (Billinis et al., 2004; Gombojav et al., 2003; Guo et al., 2003), düşük frekanslı olmaları nedeniyle TSE genotip sınıflandırılma sisteminde bulunmamaktadırlar (Dawson et al., 1998). Ovin *PrP* genindeki diğer polimorfizmler de 83, 101, 112, 116, 127, 138, 141, 172, 175, 176, 180, 189, 195, 196, 211, 231, 237 ve 241. kodonda belirtilmiştir (Thorgeirsdottir et al., 2002; Tranulis et al., 1999; Vaccari et al., 2001).

1.6 Koyunlarda Atipikal Scrapie (Nor98)

Atipikal scrapie (Nor98), 1998 yılında tespit edilen, PrP^{Sc}'nin moleküler özelliklerinin ve histopatolojik lezyonlarının klasik scrapieden farklı olması nedeniyle fark edebilen scrapie formudur (Benestad et al., 2003). Bu süre zarfında, koyunlarda benzer vakalar Belçika (De Bosschere et al., 2004), Fransa (Arsac et al., 2007), Almanya (Buschmann et al., 2004), İrlanda (Onnasch et al., 2004), Birleşik Krallık (Everest et al., 2006) ve İsveç'te (Gravier-Widen et al., 2004) de rapor edilmiştir.

Atipikal scrapie genel olarak, klasik scrapieye göre daha yaşlı hayvanlarda görülmektedir. Norveç'te görülen atipikal scrapie vakalarındaki hayvanlar yaklaşık 6-7 yaşlarında iken, klasik scrapie 2-4 yaşındaki hayvanlarda ortaya çıkmaktadır (Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 2007).

Yakın zamanda İsveç koyunlarıyla yapılan çalışmanın sonuçları, atipikal scrapienin biyo-çeşitliliğinin tahmin edilenden daha büyük olduğunu ifade etmektedir. Bu durum küçük ruminantlardaki TSE gözetiminin örnekleme ve test metotlarını etkilemektedir (Nentwig et al., 2007).

Doğal ve deneysel vakalardan alınan periferel doku örneklerinde anormal PrP tespit edilememiş fakat yakın zamanda hem doğal hem de deneysel atipikal vakalardan elde edilen bilgiler, PrP^{Sc} eksikliği olan hayvanların iskelet kaslarında, periferel sinirlerinde ve lenfoid dokularında düşük seviyede infektivite bulunabileceğini kanıtlamıştır (Adreoletti et al., 2011; Simmons et al., 2011).

1.6.1 Atipikal scrapie bulaşma yolları

Atipikal scrapienin, dışsal bir etken olmadan yaşlı hayvanlarda gerçekleşen, ara sıra ve kendiliğinden ortaya çıkan, PrP'nin katlanma ve metabolizma bozukluğu olduğu düşünülmektedir. Analitik epidemiyolojik çalışmalar, atipikal scrapienin yayılımını ve koyun sürüleri arasında her hangi bir ilişki olduğunu desteklememekte ve bu durum, atipikal scrapienin bulaşıcı olmadığını veya klasik scrapieye göre daha az bulaşıcı olduğunu önermektedir (Hopp et al., 2006). Hastalığın koyun sürüsünde doğal olarak bulaştığına dair halen bir veri bulunmamakta ve bu nedenle hastalık oluşumu spontane etiyoloji ile uygun olmaktadır (Benestad et al., 2003; Hopp et al., 2006; Nentwig et al., 2007). Atipikal scrapie vakalarının birden fazla olduğu koyun sürüleri tespit edilmiştir (Luhken et al., 2007) fakat bu sürülerde koyun sayısı 500'ün üzerindedir. Atipikal scrapeinin bulaşıcılığıyla ilgili fare (Le Dur et al., 2005) ve koyunlarda (Simmons et al., 2007) deneysel çalışmalar yapılmıştır. Koyunlardaki atipikal scrapienin oral bulaşıcılığı deneysel olarak test edilmiş ve bazı pozitif sonuçlar hastalığın oral yolla bulaşabileceğini onaylamıştır. Ancak bu hastalığın kendiliğinden mi gerçekleştiği, bulaşıcı olmayan bir hastalık mı olduğu veya küçük ruminantlarda sirküle eden TSE ajanı gibi mi davrandığı sonucuna varmak için erken olduğu düşünülmektedir (Simmons et al., 2011).

1.6.2 Atipikal scrapienin klinik belirtileri

Klasik scrapie vakaları ve Nor98 vakaları arasında, PrP^{Sc} birikimi, Western blot özellikleri, semptomlar ve vakuolleşmeyle ilgili farklılıklar bulunmaktadır (Luhken et al., 2007). Atipikal scrapienin başlıca klinik belirtilerini sarsıntı, ataksi, kilo kaybı ve huy değişikliği oluşturmaktadır. Hayvanların yürüme ritminde ve sirküle hareketlerinde bozukluklar meydana gelebilmektedir. Kaşıntıya bağlı tüy dökülmesi atipikal scrapie vakalarında gözlenmemiştir (Epstein et al., 2005; Dagleish et al., 2008).

1.6.3 Koyunlarda atipikal scrapieye karşı genetik duyarlılık

Atipikal scrapie (Nor98) vakalarında, en sık AHQ/AHQ, AHQ/ARQ ve ARR/ARR genotipleri tespit edilmektedir (Benestad et al., 2003). 141. kodondaki polimorfizmin duyarlılıkla ilişkisi ortaya konmuş ve ARQ haplotipli Fenilalanin (F) varyantının (AF141RQ) 141. kodondaki diğer varyantlardan daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Bossers et al., 1996; Moum et al., 2005). Yapılan diğer çalışmalarda AHQ/AHQ genotipli koyunların atipikal scrapieye karşı en duyarlı olduğu (Orge et al., 2004), hiçbir vakada kodlanmayan VRQ haplotipinin ise en dirençli olduğu gösterilmiştir (Moum et al., 2005).

1.7 Koyun ve Keçilerde BSE

Küçük ruminantlarda BSE'ye karşı duyarlılık, deneysel olarak (Foster et al., 1993) ve koyun sürülerindeki doğal BSE vakalarıyla belirlenmiş (Bellworthy et al., 2005) ve doğal vakalardan birinde BSE enfekteli keçi tespit edilmiştir (Eloit et al., 2005). BSE kontaminasyonlu besin kaynaklarına maruz kaldığı için koyun ve keçi popülasyonlarında BSE'nin bulaştığı düşünülmekteydi (Kao et al., 2003).

Son zamanlarda yüzlerce koyun ve keçi TSE vakalarının karakteristik testlerinde, bazı sonuçlar yetersiz olsa da pozitif BSE tespit edilememiştir (European Commission, 2012). BSE ve scrapienin küçük ruminantlarda benzer klinik semptomlar göstermesi (Gonzalez et al., 2005; Foster et al., 2001), scrapienin gerçek BSE vakalarının varlığını maskeleyesine neden olmaktadır (Houston and Gravenor, 2003). Yapılan çalışmalar, insan hücrel prion proteinini eksprese eden transgenik farenin, koyun ve keçilere geçmiş BSE enfeksiyonuna karşı bovin BSE'den daha fazla duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur (Padilla et al., 2011, Plinston et al., 2011).

1.8 Orta Doğu ve Filistin’de TSE

Orta Doğu’daki çiftlik hayvan popülasyonlarının TSE ile tanışma riskinin düşük olmasının nedeni, kesilen koyun ve keçi atıklarının yerel hayvancılıkta besin kaynağı olarak kullanılmamasıdır (Rapoport and Shimshony, 1997).

Orta Doğu ülkeleri geleneksel ticaret rotasının Sudan, Somali, Türkiye and Pakistan’dan Arap ülkelerine doğru olduğu bilgisini, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) ve Gıda ve Tarım Örgütüne (FAO) rapor etmiştir. Buna ek olarak, hayvan ve et akışı da Orta Doğu ülkeleri dışındaki, genel olarak Avustralya, Yeni Zelanda, Bulgaristan, Romanya ve Güney Amerika gibi ülkelere yapılmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütünün (FAO) raporlarına göre Filistin, Orta Doğu ülkeleri veya dışındaki ülkelere hem canlı koyun ve keçi hem de her iki türün etini ithal etmektedir. Orta Doğu’nun çoğu bölgesinde çiftlik hayvanları yetiştiriciliği, ortak meralarda koyun ve keçilerin otlatılmasına bağlı bir yönetim sistemine dayanmaktadır. Otlakların fazla otlatılması nedeniyle, depolanacak besin kanağı arayışı kilometrelerce yayılabileceğinden, iyi otlak arayışı genellikle uluslararası sınırları reddetmektedir. Bu nedenle, klinik hasta veya sadece patojen taşıyıcı hayvanlar, ülkeler arasında patojen aktarımına neden olmuştur. Hayvanların ve hayvansal ürünlerin ticareti, seyir halindeki göçebe popülasyonlarla bu riski daha da arttırmıştır. Hayvan ve hayvansal ürünlerin bu büyük ticaretinin (her zaman sağlık gözetiminde gerçekleşmeyen) Orta Doğu ülkelerindeki yayılmanın sorumlusu olabileceği düşünülmüştür.

1995 yılına kadar, Orta Doğu’da birkaç scrapie vakası bulunmaktaydı. Kıbrıs’ta 1995, Filistin’in işgal bölgelerinde ve Lübnan’da 1993, Birleşik Arap Emirliklerinde 1975 yılında scrapie rapor edilmiştir (Rapoport and Shimshony, 1997).

Golan Tepeleri’nde 10 yaşındaki bir inek, Bovin Süngerimsi Ensefalopatiye bağlı olarak 2002 yılında, süt damlamasına ek olarak ataksi, istemsiz hareket gibi sinirsel semptomlarla karakterize iki günlük bir hastalığı takiben ölmüştür (Perl et al., 2003). Mikroskopik incelemelerde vakülasyon gözlenmiş ve immünohistokimyasal test de PrP^{Sc} için pozitif sonuç vermiştir. 2002 yılında enfekte ineğin yavruladığı ikizler, sırayla ötenazi yapılmış ve BSE için test edildiklerinde testin negative olduğu görülmüştür. Bu olaydan sonra kesilen bütün büyük baş hayvanlar, insan tüketimine sunulmadan önce test edilmiştir.

Başka bir BSE vakasının bulunmaması nedeniyle bu ilk ve tek vaka sporadik olarak sınıflandırılmıştır. BSE'nin bölgeye girmesini önlemek için özellikle Veteriner Servisi ve Hayvan Sağlığı (VSAH) çeşitli önlemler almıştır (World Organization for Animal Health-OIE, 1998). Bunlar arasında, Birleşik Krallık'tan 1998'e, diğer efektif ülkelerden 1990'a kadar çiftlik hayvanları etinin ve kemik yemeklerinin girişinin yasaklanması ve 1996'ya kadar lokal memeli materyalinin geri dönüşümünün engellenmesi gibi önlemler de bulunmaktaydı. Farklı bir görüş, BSE vakasının 1986-1990 yılları arasında, o süreçte risk ülkeleri kabul edilen 5 Avrupa ülkesinden ithal edilen kemik yemeklerinin neden olacağına inanmaktaydı (Nitzan-Kaluski and Leventhal, 2003; Yakobson et al., 2004).

Yakın zamanda TSE için bir anket geliştirilmiş ve Orta Doğu'nun OIE Bölgesel Komisyonuna üye ülkelere gönderilmiştir (Economides, 2003). Anket gönderilen ülkelerde Kıbrıs'ta koyun ve keçilerde görülen dört klasik scrapie vakası dışında hiçbir ülkede BSE ve vCJD vakası rapor edilmemiştir (Gurel et al., 2013). 180 bölgenin bulunduğu Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü kayıtları, Filistin'in resmi örgüt üyesi olmaması nedeniyle Filistin bölgesindeki TSE gözlemlerini içermemektedir (OIE, 2015).

Bugünlerde Filistin, ülkelerin Veteriner Servislerini OIE standartlarına uygun biçimde ulusal, bölgesel ve uluslararası seviyede geliştirmek için dünya çapında bir program olan veteriner servisleri performansı uygulamasına geçmiştir (OIE, 2016). İnsan TSE hastalıklarıyla ilgili Orta Doğu'da herhangi bir vaka rapor edilmemiştir ancak her yıl Libya ve diğer Kuzey Afrika ülkelerinden kökenlenmiş Yahudi ailelerinde birkaç familial CJD teşhis edilmektedir (Nitzan-Kaluski and Leventhal, 2003).

1.9 Filistin'deki küçük ruminant popülasyonları

Filistin'de 2013 yılında yapılan çiftlik hayvanları araştırmasına göre Filistin bölgesinde yetiştirilen koyun ve keçi popülasyonlarının sonuçları gösterilmiştir. (Tablo 1.3) (Palstinian Central Bureau Statistics, 2013). Filistin'deki küçük ruminantların büyük çoğunluğu, klasik ve atipik scrapieye karşı y direnç gösteren Asaf ve İvesi gibi yerli ırklardır (Gootwine et al., 2008). Ülke küçük olmakla birlikte, büyük ruminant popülasyonlarının epizootik hastalıkların potansiyel rezervuarı olabilecek komşu ülkelerle doğal bariyeri bulunmamaktadır. Filistin yüksek üretim performansından dolayı, veteriner servisi ve hayvan sağlığının

üstlendiği ihtiyati önlemlere rağmen, hastalık kaynağı olarak nitelendirilmiştir (Shimshony, 1992).

Tablo 1.3: Filistin'deki çiftlik hayvanları popülasyonu

Koyun	660.335
Keçi	730,894
Sığır	17,732
Deve	1,595

1.9.1 Asaf ve İvesi koyun ırkları

Filistin'deki koyun ırklarının %52.9 unu İvesi, %35.7sini Asaf, %11ini çapraz ırk ve %0.4ünü diğer ırklar oluşturmaktadır. Yerli İvesi ırkları et, süt ve yün üretiminde kullanılmakta, %86.1i dişi olup süt üretimini için %13.9u erkek olup et üretimi için yetiştirilmektedir. İvesi koyunları sezonsal üremekte (çiftleşme yılda bir kez) ve süt üretimi yaklaşık 80-150 kg arasında olmaktadır.

Asaf ırkı ilk kez 1955 yılında işgal altındaki Filistin bölgesinde, yerli İvesi ve doğu isviçre frieslandının çaprazlanması sonucu meydana gelmiştir. Irkın %79.8i dişi olup süt üretimini için %20.2si erkek olup et üretimi için yetiştirilmektedir. Bütün hava koşullarına karşı toleranslı olması, İvesiden daha fazla süt üretimi yapması, et kalitesinin yüksek olması ve hastalıklara karşı dirençli olması Asaf ırkının en büyük avantajlarıdır. Irk sahip olduğu bu avantajlar nedeniyle, Ürdün, Portekiz ve İspanya dahil bir çok ülkeye ihraç edilmiştir. Diğer ırklar, Somali, Sudan ve İsviçre'den ithal edilmiştir ve et,süt üretiminde kullanılmaktadır (Palestinian Central Bureau of Statistics, 2013).

1.9.2 Filistin'deki koyun ve keçilerde scrapie hastalığı

Scrapie hastalığı ilk kez 1993 yılında, Filistin'in kuzeyinde (Shefa'Amr) bulunan bir sürüdeki 11 koyun ve 2 Sannen keçisinde teşhis edilmiştir. Hastalık klinik ve histopatolojik olarak 2 koyunda teşhis edilmiş ancak hastalığın kökeni belirlenmeden bütün sürü önlem amaçlı imha edilmiştir (OIE, 1994).

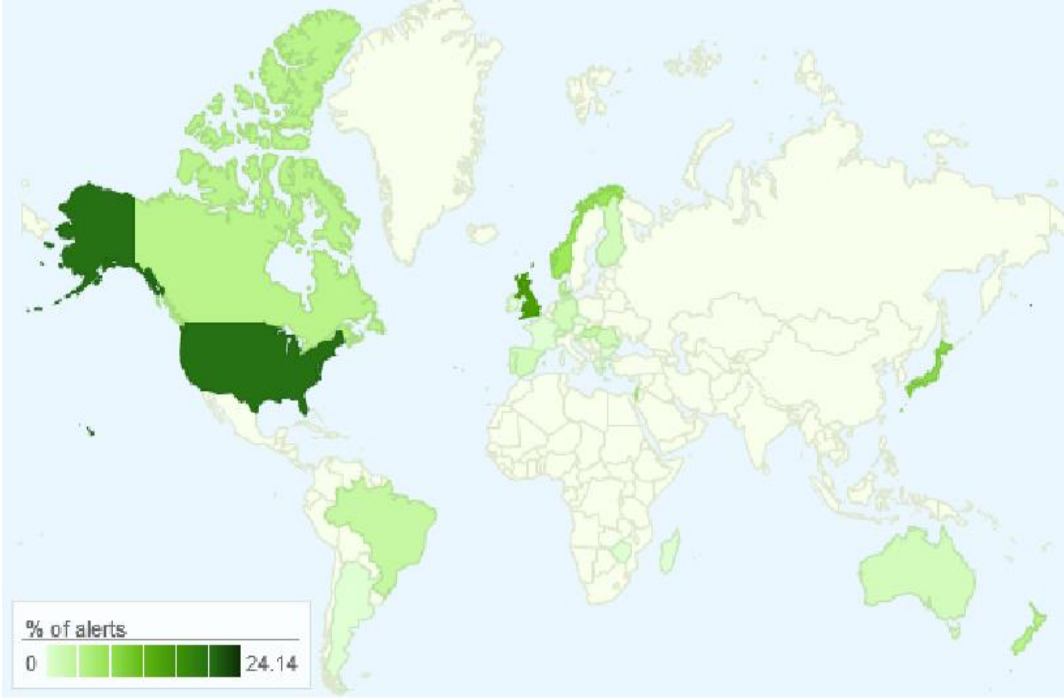
1996 yılında kuzey Filistin'de aynı kasabadaki 3 küçük sürüde klinik olarak scrapie şüpheli 5 koyun gözlenmiştir. Tek klasik scrapie vakası Asaf koyun sürüsünde belirlenmiştir ve doğrulamak için klinik ve histopatolojik uygulamalar yapılmıştır. Geriye kalan koyunlar kesilerek imha edilmiş ve otoklavlanmıştır. Bütün hayvanlarda beyin histopatolojisi için otopsi yapılmıştır (OIE, 2002).

Filistin'in kuzey bölgelerinde 2002 yılında, iki farklı bölgedeki iki koyun sürüsünde iki scrapie vakası rapor edilmiştir. Toplamda ikisi scapieli 812 hayvan imha edilmiştir. Yerli Asaf ırkındaki ilk vaka Golan Tepelerinde görülürken, ikinci vaka Akko'da Merinos ve Dorper koyunu çaprazlama sürülerinde görülmüştür. Histopatolojik ve immünohistokimyasal tanı testleri kullanılmış ancak bulaşıcı ajanın kaynağı bulunamamıştır. Her iki sürü de insanca ötenazi yapılmış ve ihtiyati önlem için yakılarak imha edilmiştir (Nir, 2002).

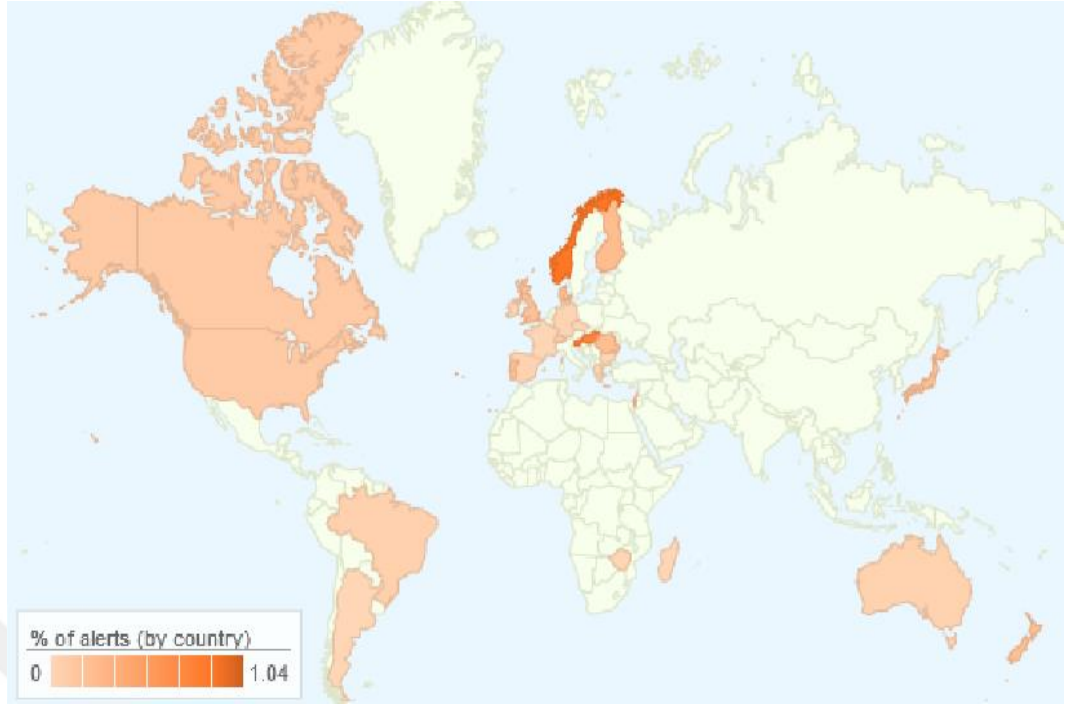
2008 yılında, işgal altındaki Filistin bölgesinin güneyinde scrapie hastalığı rapor edilmiştir. Küçük bir koyun sürüsündeki bir koyunda eşme, tükürük salgılama, zayıflama, kaşıntı ve ölüm gibi klinik belirtiler görülmüştür. Tanı için hızlı tanı testleri, optik mikroskopi ve immünohistokimyasal testler yapılmış ve hepsinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Hayvan sağlığı ve veteriner servisine göre salgınların kaynağı veya enfeksiyonun kökeni yeni canlı hayvanlar için başlangıçtı. Enfekte bir dişi koyunun iki kuzusunun itlaf edilmesi ve sürünü hareket kontrolünün sağlanmasıyla ihtiyati önlemler alınmıştır (Galon, 2012).

2009 yılında Beytullahim'deki bir çiftçi bazı hayvanlarında değişik klinik belirtiler gözlemlemiştir. Çiftlik 70 şüpheli koyundan oluşmaktaydı. 3 vaka tespit edilmiş ve bunlardan iki tanesi ölmüştür. Scrapie enfeksiyonu immünohistokimyasal testlerle doğrulanmış ancak hastalığın kökeni bulunamamış, neticesiz kalmıştır. Sonuç olarak, bütün ihtiyati önlemler alınmış ve ülke içindeki hareket, görüntüleme, dezenfeksiyon ve karantina gibi kontroller uygulanmıştır (Seyam, 2009).

Günümüze kadar Filistin'deki keçilerde herhangi bir scrapie vakası rapor edilmemiş, yanısıra ne yerli ırklarda ne de ithal ırklarda keçilere ilişkin bir gözetleme çalışması yapılmamıştır.



Şekil (1.5): 2007 yılından itibaren scrapie uyarı dağılımı: Şekil dünyadaki scrapie hastalığı uyarılarının dağılımını göstermektedir. Hastalıkla ilgili sonuçlara bağlı olarak değerler güncellenmiştir. En yüksek değer 24.14 ile Amerika Birleşik Devletleri iken, Filistin'deki uyarı yüzdesi (%) 2009 yılında yapılan son güncellemeyle 5.14e ulaşmıştır. Her ülkenin uyarı değeri ülkede hastalıkla ilgili uyarı sayısının, tüm ülkelerdeki uyarı sayısına oranı şeklinde hesaplanmıştır. (Sağlık Haritası, Scrapie Hastalığı, Filistin Bölgesi - OIE, 2009).



Şekil (1.6): 2007 yılından itibaren her ülkenin scrapie alarm oranı: Şekil her ülkedeki scrapie hastalığının oranını göstermektedir. En yüksek değer 1.04 ile Norveç iken, Filistin'deki oran 0.31e ulaşmıştır. Ülkelerdeki scrapie hastalık oranı, ülkede scrapie ile ilgili uyarı sayısının, ülkedeki tüm hastalıklarla ilgili uyarı sayısına oranı şeklinde hesaplanmıştır. (Sağlık Haritası, Scrapie Hastalığı, Filistin Bölgesi - OIE, 2009).

2. MATERYAL ve METOTLAR

2.1 Hayvanlar ve Örnekler

Bu çalışmada Filistin yerli koyun ırklarına ait dört şehirden rastgele seçilmiş, klinik açıdan sağlıklı 38 koyun çalışılmıştır: 4 sürü İvesi koyunları (n=17) ve 5 sürü Asaf koyunları (n=21). Sürülerin büyüklüğü onlarca hayvandan oluşan küçük sürülerden 500'den fazla hayvandan oluşan büyük sürülere kadar değişmekte iken beslenme şekli otlatmadan yedirmeye kadar değişmektedir. Kan örnekleri Filistin Veterinerlik Hizmetleri (Gazze, Filistin) tarafından EDTA içeren tüplere alınarak toplanmıştır (tablo 2.1).

Tablo 2.1: Bu çalışmaya ilişkin alınan örnekler hakkında bilgi

Örnek no.	İrk	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Örnek no.	İrk	Cinsiyet	Yaş (yıl)
1	İvesi	dişi	3	20	Asaf	dişi	3
2	İvesi	dişi	3	21	Asaf	dişi	3
3	İvesi	dişi	4	22	Asaf	dişi	3
4	İvesi	erkek	2.5	23	Asaf	dişi	3.5
5	İvesi	erkek	3	24	Asaf	erkek	3.5
6	İvesi	erkek	3.5	25	Asaf	dişi	4
7	İvesi	erkek	3.5	26	Asaf	dişi	2.5
8	İvesi	erkek	2.5	27	Asaf	dişi	3
9	İvesi	dişi	4	28	Asaf	erkek	4.5
10	İvesi	dişi	3	29	Asaf	erkek	3
11	İvesi	erkek	3.5	30	Asaf	erkek	3
12	İvesi	erkek	3	31	Asaf	erkek	3.5
13	İvesi	erkek	4	32	Asaf	dişi	3.5
14	İvesi	erkek	3	33	Asaf	dişi	3
15	İvesi	erkek	4	34	Asaf	erkek	2.5
16	İvesi	erkek	3	35	Asaf	erkek	4
17	İvesi	dişi	4	36	Asaf	erkek	4
18	Asaf	dişi	3.5	37	Asaf	erkek	3.5
19	Asaf	dişi	2.5	38	Asaf	erkek	3.5

2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA, kan örneklerinden Patho Gene - spin DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON) kullanılarak, manuel olarak izole edilmiştir. Elde edilen genomik DNA, ultrasaf suda çözdürülerek son hacmi 200 µl olacak şekilde -20 ° C’de saklanmıştır. DNA izolasyonu işlemi Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında (İzmir, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. İzolasyon prosedürünün doğruluğunu kontrol etmek için, elde edilen genomic DNA %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elektroforez, 1X TAE tamponda 100 V’de 30 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

2.3 *PrP* Geninin Çoğaltılması

2.3.1 Primer dizaynı

PrP geninin kodlama yapan bölgesi (GenBank aksesyon numarası M31313 olan, 24. ve 912. nükleotitler arasında bulunan), NCBI (National Center of Biotechnology Information)’daki Primer Blast Tool yardımıyla spesifik olarak dizayn edilmiş bir primer çifti ile çoğaltılmıştır (tablo 2.2) (şekil 2.1).

Tablo 2.2: dizayn edilen primere ait bilgi:

gen	primer	Sekans	Sekans uzunluğu (bp)
<i>PrP</i>	Forward primer	5'-CGTGGGCATTTGATGCTGACAC- 3'	22
	Reverse primer	5'-GCTGCAGGTAGACACTCCCTC- 3'	21

CTGCAGACTTTAAGTGATTCTTA**CGTGGGCATTTGATGCTGACAC**CCTCTTTATTTTGCAGAGAA
 GTCATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGA
 CGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAACCTGGCGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACC
 CGGGACAGGGCAGTCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCC
 CATGGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGG
 ACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGTCAGTGAACAAGCCCAGTA
 AGCCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTT
 GGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGA
 CCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGACCAGTGGATCGGT
 ATAGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACC
 ACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCA
 AATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCAAGTGTGATCC
 TCTTTTCTTCCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCTCATTCTTCTCATAGTAGGATAGGGG
 CAACCTTCTGTTTTTCATTATCTTCTTAATCTTTGCCAGGTTGGGG**GAGGGAGTGTCTACCTGCA**
GCCCTGTAGTGGTGGTGTCTCATTCTTGCTTCTCTCTTGTACCTGTATAATAATACCCTTGGC
 GCTTACAGCACTGGGAAATGACAAGCAGACATGAGATGCTATTTATTCAAGTCCCATTAGCTCAG
 TATTCTAATGTCCCATCTTAGCAGTGATTTTGTAGCAATTTTCTCATTGTGTTTCAAGAACACCTG
 ACTACATTTCCCTTTGGGAATAGCATTTCTGCCAAGTCTGGAAGGAGGCCACATAATATTCATTC
 AAAAAAACAAAACCTGGAAATCCTTAGTTCATAGACCCAGGGTCCACCCTGTTGAGAGCATGTGTC
 CTGTGTCTGCAGAGAACTATAAAGG

Şekil 2.1: Koyun (*Ovis aries*) *PrP* geninde primer bağlanma bölgesi.

Forward primer: **CGTGGGCATTTGATGCTGACAC**

Reverse primer: **GAGGGAGTGTCTACCTGCAGC**

2.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için, hedef bölgeyi içeren DNA kalıbı, gene spesifik primerler ve diğer reaksiyon bileşenleri (table 2.3) programlanmış olan PCR (thermo-cycling) cihazı koşullarına (table 2.4) aktarılmıştır.

Tablo 2.3: PCR reaksiyonu aşağıdaki bileşenler ile birlikte 30 μ l'lik total hacime ayarlandı:

Bileřen	Hacim
DNA kalıbı	5 μ l
Forward primer	0.3 μ l
Reverse primer	0.3 μ l
5X Master mix	6 μ l
PCR grade water	18.4 μ l
Total hacim	30 μ l

Tablo 2.4: PCR reaksiyonu için thermo-cycling koşulları:

Ařama	Sıcaklık	Zaman	Döngü (Cycle)
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	3 dk	1
Denatürasyon	94 °C	45 sn	35
Annealing	57 °C	45 sn	
Elongasyon	72 °C	1 dk	
Son elongasyon	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	-

PCR ürününün kalitesi %1.5'lik agaroz jel elektroforezi (1X TAE tamponu, 100 V, 30 dakika boyunca) ile 100bp'lik DNA ladder kullanılarak analiz edilmiştir. DNA ladder PCR ürünlerinin yanında bulunan boyut ve konsantrasyonu belirlemeyi sağlayan moleküler bir marker olarak kullanılmıştır.

2.4 Sekanslama

Sekanslama, Sanger ABI 3730XL sekans cihazı kullanılarak GATC BIOTECH. A.G. (Almanya) şirketinden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.5 Polimorfizmlerin Taranması

PrP sekansları elde edildikten sonra, kodon 136, 154 ve 171'deki tek nükleotit polimorfizmleri MEGA 6 programı kullanılarak incelenmiştir. Bu kodon bölgelerine ilaveten, ek polimorfizmler de taranmıştır.

2.6 İstatistiksel Analiz

Bulunan genotip frekansları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$F_{ij} = n_{ij} / N$$

N total koyun sayısını gösterirken, n_{ij} ise ij genotipine sahip koyun sayısını göstermektedir.

3. SONUÇLAR

İki yerli Filistin koyun ırkına ait 38 koyunda *PrP* geni aminoasit sekanslarının analizi sonucu, A'nın kodon 136'da (frekansı= 0.9868), Q'nun ise kodon 171'de (frekansı= 0.8157) daha sık görüldüğü bulunmuştur. Her iki koyun ırkında da ARR, ARQ, ARH, AHQ ve VRQ olan beş yaygın allelin herbiri saptanmıştır. Ayrıca kodon 12 ve 23'de olmak üzere iki farklı polimorfizm tanımlanmıştır.

6 allele ait gen frekansı (ARQ, ARR, ARH, AHQ, VRQ ve ARL), İvesi ve Asaf koyun ırklarında araştırılmış ve tablo 3.1'de gösterilen şekilde verilmiştir. Her iki ırkta da scrapie hastalığına düşük direnç ile ilişkisi bilinen ARQ allelinin 0.7647 ve 0.7619 frekansları ile sırasıyla İvesi ve Asaf ırklarında en yüksek oranlarda olduğu bulunmuştur. Dirençle ilişkili allel olan ARR, yalnızca İvesi ırkında saptanmış olup frekanslı 0.2058'dir. Scrapie hastalığına düşük direnç ile ilişkili olduğu bilinen AHQ alleli, İvesi ırkında bulunmayıp, Asaf ırkında düşük frekansta (0.0714) bulunmuştur. Düşük direnç ile ilişkili olduğu düşünülen ARH allelinin, İvesi ırkında bulunmadığı, Asaf ırkında ise düşük frekansta (0.0952) olduğu bulunmuştur. Scrapie hastalığına en yüksek duyarlılık ile ilişkili allel tipi olan VRQ alleli, İvesi ırkında saptanmamasına karşın, Asaf ırkında çok düşük frekansta (0.0238) saptanmıştır. Ayrıca ARL alleli, İvesi ve Asaf ırklarında düşük frekansta belirlenmiş olup, frekansları sırasıyla 0.0294 ve 0.0476'dır.

Tablo 3.1: Filistin yerli koyun ırklarında *PrP* geni allel frekansları

Allel	İvesi ırkı (n=17)	Asaf ırkı (n=21)
ARQ	0.7647	0.7619
ARR	0.2058	0.0000
ARH	0.0000	0.0952
AHQ	0.0000	0.0714
VRQ	0.0000	0.0238
ARL	0.0294	0.0476

PrP geninde yedi farklı genotipten oluşan (ARR/ARQ, ARQ/ARQ, ARQ/ARL, ARH/ARQ, ARH/ARL, AHQ/ARQ and ARQ/VRQ) polimorfizmler saptanmıştır (tablo 3.2). Genotipler ikinci, üçüncü ve beşinci risk gruplarına aittir

(tablo 1.2) (Tongue et al. 2004). Düşük dirençli genotip olan ARQ/ARQ hem İvesi hem de Asaf ırklarında yaygındır. Yüksek duyarlılıkla ilişkili genotip olan ARQ/VRQ sadece bir Asaf koyununda bulunmuştur.

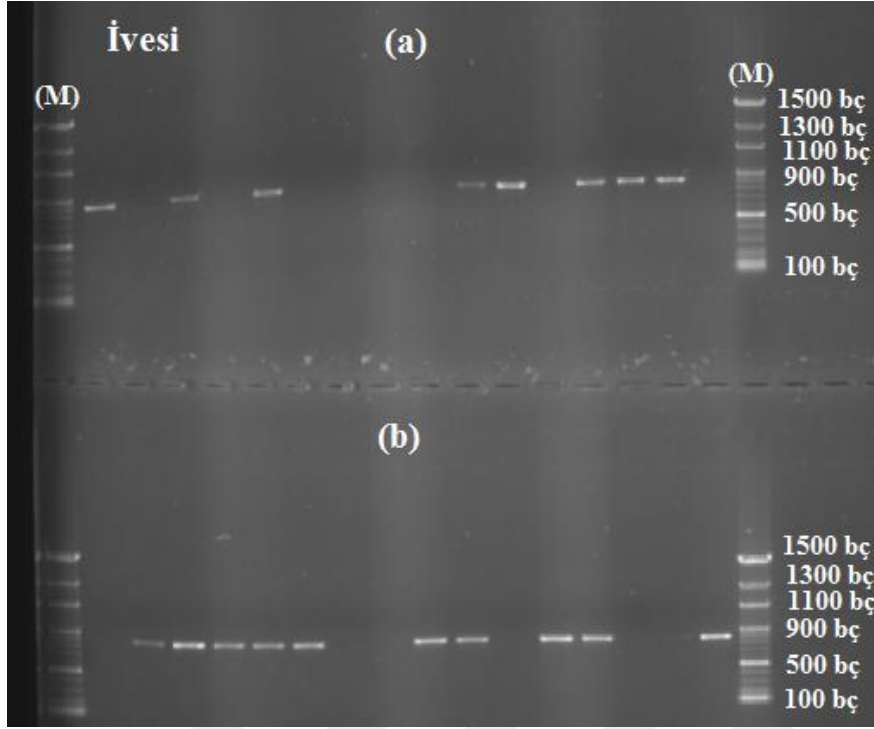
Tablo 3.2: Filistin yerli koyun ırklarında *PrP* genotip frekansları:

Risk grubu	<i>PrP</i> genotipi	İvesi ırkı (n=17)	Asaf ırkı (n=21)
2	ARR/ARQ	0.4117	0.0000
3	ARQ/ARQ	0.5294	0.5714
3	ARQ/ARL	0.0000	0.0476
3	ARH/ARQ	0.0000	0.1428
3	ARH/ARL	0.0000	0.0476
3	AHQ/ARQ	0.0000	0.1428
5	ARQ/VRQ	0.0000	0.0476

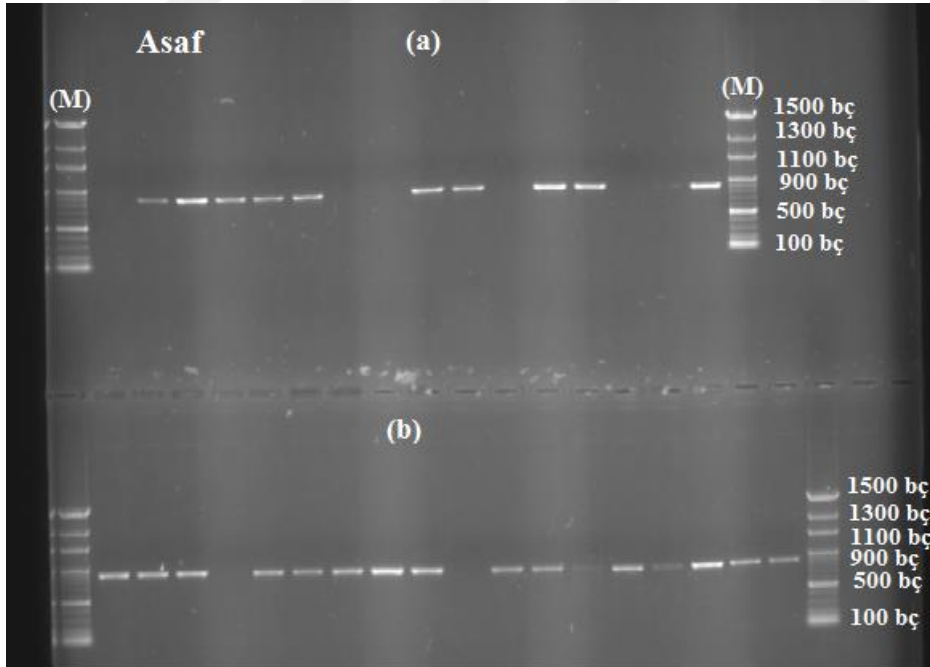
Kodon 136, 154 ve 171'deki polimorfizmlere ek olarak, iki farklı polimorfizm tespit edilmiştir (V12I ve L23H) (tablo 3.3). L23H polimorfizmi İvesi ırkından 8, Asaf ırkından ise 11 koyunda görülmüştür. Buna karşın V12I polimorfizmi ise yalnız ARQ/ARQ haplotipi ile birlikte İvesi ırkından 1, Asaf ırkından ise 2 koyunda görülmüştür. Kodon 12'de GTT yerine ATT bulunması, V (Valin)'nin I (İzolösin)'ya değişimine neden olurken, kodon 23'de CTC yerine CAC bulunması, L (Lösin)'nin H (Histidin)'ye değişimine neden olmaktadır.

Tablo 3.3: Filistin yerli koyun ırklarının *PrP* genindeki ek polimorfizmler

İrk	Örnek no.	Haplotip polimorfizm	Ek polimorfizm	Homozigot / Heterozigot
İvesi	1	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
İvesi	4	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
İvesi	9	ARR/ARQ	L23H	Heterozigot
İvesi	10	ARR/ARQ	L23H	Heterozigot
İvesi	12	ARR/ARQ	L23H	Heterozigot
İvesi	15	ARR/ARQ	L23H	Heterozigot
İvesi	16	ARQ/ARQ	V12I	Homozigot
İvesi	16	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
İvesi	17	ARR/ARQ	L23H	Heterozigot
Asaf	18	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	21	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	24	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	25	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	26	ARH/ARL	L23H	Heterozigot
Asaf	28	AHQ/ARQ	L23H	Heterozigot
Asaf	29	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	30	ARQ/ARQ	V12I	Homozigot
Asaf	30	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	31	ARQ/ARQ	V12I	Homozigot
Asaf	31	ARQ/ARQ	L23H	Homozigot
Asaf	36	AHQ/ARQ	L23H	Heterozigot
Asaf	37	ARH/ARQ	L23H	Heterozigot



Şekil 3.1: İvesi ırkı koyun *PrP* genine ait elde edilen PCR ürünleri (880 bp). (M= 100 bp, DNA marker).



Şekil 3.2: Asaf ırkı koyun *PrP* genine ait elde edilen PCR ürünleri (880 bp). (M= 100 bp, DNA marker).

4. TARTIŞMA

Türkiye (Ün, et al., 2008), İran (Frootan, et al., 2012), Yunanistan (Ekateriniadou, et al., 2007), İtalya (Vaccari, et al., 2001), Portekiz (Gama, et al., 2006), İspanya (Acin et al., 2004), Almanya (Drogemüller, et al., 2004) ve İngiltere’de (Arnold, et al., 2002) farklı koyun ırklarında önceden gerçekleştirilmiş çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında bu çalışmada ARQ allelinin İvesi ve Asaf ırklarında > 0.76 frekansla yüksek oranda olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek frekanslı ARQ alleli, Lübnan (Babar, et al., 2009) İvesi koyunları ve Potekiz (Gama, et al., 2006) Asaf koyunlarında rapor edilmiştir. ARQ allelinin *PrP* geninin yabancı tip alleli olabileceği tahmin edilmekte ve bu iki Filistin yerli koyun ırkının analizi ile bu tahmin doğrulanmaktadır.

Asaf ve İvesi ırklarında kodon 136’daki A aminoasitinin scrapie hastalığına direnç ile ilişkili olduğu (Elsen, et al., 2014 ; Wang, et al., 2008) rapor edilmiştir. Her ne kadar önemi tamamen ortaya konmamış olsa da kodon 154’deki H aminoasitinin scrapie hastalığına dirençle pozitif bir ilişkisi vardır (Elsen, et al., 2014) ve bu çalışmada ise bu kodonda çoğunlukla R aminoasiti bulunmuştur. Kodon 171’de R, Q, H ve L’yi içeren çeşitli aminoasitler belirlenmiştir. Düşük frekanslı H ve yüksek frekanslı Q, önceden rapor edilen *PrP* polimorfizmleri (DeSilva, et al., 2003 ; Gombojav, et al., 2003) ile de uyumludur.

Analiz edilen örneklerin sonucunda ARR allel frekansının Asaf ırkında 0.0000 olduğu bulunmuştur. Kısmen dirençli ırk olduğu düşünülen İvesi ırkında hiç scrapie vakası belirlenmemişken Asaf koyunlarında daha önceden belirlenen bazı klinik vakalar (Nir, 2002; OIE, 2002) için bunun iyi bir açıklama olabileceği ve bu yüzden de asıl ilgi çeken kısım olduğu düşünülmektedir. Çalışılan koyunların çoğunluğu 3.risk grubuna dahil olmaktadır (Tongue et al., 2004). En dirençli genotip olan ARR/ARR ve en duyarlı genotip olan VRQ/VRQ İvesi ve Asaf ırklarında bulunmamaktadır. İran Zandi koyunlarında belirlenen(Frootan, 2012), koyun populasyonlarında az görüldüğü bilinen ARL alleli bu çalışmada İvesi ve Asaf ırklarında saptanmıştır. L23H ve V12I polimorfizmleri ile scrapie hastalığı arasındaki ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, scrapie hastalığına genetik direnci artırmak amacıyla ARR allel frekansını artırmayı içeren uygun ıslah programları uygulamanın önemini doğrulamaktadır. ARR allel frekansının Asaf ırkında

nispeten düşük olması nedeniyle, ıslah programlarında soyiçi çiftleştirmeden kaçınılmalıdır. İvesi ve Asaf ırklarında ARR allel frekansını artırmak için yüksek ARR içeren sürülerden koyun seçilmesi tavsiye edilmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acin C., Martin-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzon M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J. and Zaragoza P.,** 2004, Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol*, 85(7):2103-2110pp.
- Adreoletti O., Orge L., Benestad S.L., Beringue V., Litaise C., Simon S., Le Dur A., Laude H., Simmons H., Lugan S., Corbiere F., Coste P., Morel N., Schelcher F. and Lacroux C.,** 2011, Atypical/Nor98 Scrapie Infectivity in Sheep Peripheral Tissues. *PloS Pathogens* 7, (2):e1001285.
- Alper T., Haig D.A. and Clarke M.C.,** 1978, The Scrapie Agent: Evidence Against its Dependence for Replication on Intrinsic Nucleic Acid. *J Gen Virol*, 41:503-516pp.
- Adreoletti O., Simon S., Lacroux C., Morel N., Tabouret G., Chabert A., Lugan S., Corbiere F., Ferre P., Foucras G., Laude H., Eychenne F., Grassi J. and Schelcher F.,** 2004, Accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat. Med.*, 10:591–593pp.
- Arnold M., Meek C., Webb C., and Hoinville L.,** 2002, Assessing the efficacy of a ram-genotyping programme to reduce susceptibility to scrapie in Great Britain. *Prev Vet Med*, 56(3):227–249pp.
- Arsac J.N., Adreoletti O., Bilheude J.M., Lacroux C., Benestad S.L. and Baron T.,** 2007, Similar Biochemical Signatures and Prion Protein Genotypes in Atypical Scrapie and Nor98 Cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*, 13:58-65pp.
- Babar M., Farid A., Benkel B., Ahmad A., Nadeem A., and Imran M.,** 2009, Frequencies of PrP genotypes and their implication for breeding against scrapie susceptibility in nine Pakistani sheep breeds. *Mol Biol Rep*, 36(3):561-565pp.
- Barclay G.R., Hope J., Birkett C.R. and Turner M.L.,** 1999, Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *British Journal of Hematology*, 107:804-814pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baylis M. and Goldmann W.**, 2004, The Genetics of Scrapie in Sheep and Goats. In *Current Molecular Medicine*. Bentham Science Publishers, 4(12):385-396pp.
- Bellworthy S.J., Dexter G., Stack M., Chaplin M., Hawkins S.H., Simmons M.M., Jeffrey M., Martin S., Gonzalez L. and Hill P.**, 2005, Natural transmission of BSE between sheep within an experimental flock. *Vet Rec*, 157(7):206pp.
- Belt P.B., Muileman I.H., Schreuder B.E., Bos-De Ruijter J., Gielkens A.L. and Smits M.A.**, 1995, Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology*, 76:509-517pp.
- Benestad S.L., Arsac J.N., Goldmann W. and Noremark, M.**, 2008, Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, Vet Res 39:19pp.
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M.A. and Bratberg B.**, 2003, Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *veterinary Record*, 153(7):202-208pp.
- Beringue V. and Andreoletti O.**, 2004, Classical and atypical TSE in small ruminants. *Animal Frontiers*, 4:33-43pp.
- Billinis C., Panagiotidis C.H., Psychas V., Argyroudis S., Nicolaou A., Leontides S., Papadopoulos O. and Sklaviadis T.**, 2002, Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *Journal of General Virology*, 83:713-721pp.
- Billinis C., Psychas V., Leontides L., Spyrou V., Argyrodidis S., Vlemmas I., Leontides S., Sklaviadis T. and Papadopoulos O.**, 2004, Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol*, 85:547-554pp.
- Bossers A., De Vries R. and Smits M.A.**, 1996, PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 77(10):2669-2673pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bounhar Y., Zhang Y., Goodyer C.G. and LeBlanc A.,** 2001, Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *Journal of Biological chemistry*, 276:39145-39149pp.
- Brown D.A. and Bradley R.,** 1998, 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *Br Med J*, 317:1688-1692pp.
- Brown D.R.,** 2001, Copper and prion disease. *Science Direct*, 55:165–173pp.
- Brown D.R., Qin K., Herms J.W., Madlung A., Manson J., Strome S., Fraser P.E., Kruck T., Bohlan B.V., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Weataway D. and Kretzschmar H.,** 1997, The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 390:684-687pp.
- Brown P. and Bradley R.,** 1998, Transmissible Spongiform Encephalopathy (Historical Beginning). *British Medical Journal*, 317:1688-92pp.
- Bruce M.E., Nonno R., Foster J., Goldman W., DiBari M., Esposito E., Benestad S., Hunter N. and Agrimi U.,** 1989, Nor98-like sheep scrapie in the United Kingdom in 1989. *Vet. Rec*, 160:665–666pp.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M. and Weissmann C.,** 1993, Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73:1339–1347pp.
- Buschmann A., Biacabe A.G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J.Y., Erhardt G., Luhken G., Baron T. and Groschup M.H.,** 2004, Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*, 117:27-36pp.
- Buschmann A., Luhken G., Schultz J., Erhardt G. and Groschup M.H.,** 2004, Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol*, 85:2727-2733pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carleton A., Tremblay P., Vincent J.D. and Liedo P.M.**, 2001, Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *European Journal of Physiology*, 442:223pp.
- Casalone C., Corona C., Cresico M.I., Martucci F., Mazza M., Ru G., Bozzetta E., Acutis P.L. and Caramelli M.**, 2005, Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *J. Virol.*, 79:5847–5849pp.
- Castiglioni B., Comincini S., Drisaldi B., Motta T. and Ferretti L.**, 1998, Comparative mapping of the prion gene (PrP) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes. *Mammalian Genome*, New York, Springer, 9(10):853-855pp.
- Caughey B.**, 2001, Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem. Sci.*, 26(4):235–242pp.
- Caughey B.**, 2003, Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br Med Bull* , 66:109-120pp.
- Clark A.M., Bawson M. and Scott A.C.**, 1994, Scrapie associated fibrils in found dead. *Vet Rec*, 134:650-651pp.
- Cloucard C., Beaudry P., Elsen J.M., Milan D., Dussaucy M., Bounneau C., Schelcher F., Chatelain J., Launay M. and Laplanche J.L.**, 1995, Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene. *J Gen Virol*, 76:2097–2101pp.
- Cohen F.E. and Prusiner B.**, 1998, Pathologic conformations of prion proteins. *PubMed*, 67:793-819pp.
- Cohen F.E.**, 1999, Protein misfolding and prion diseases. *Journal of Molecular Biology*, 293:313–320pp.
- Colussi S., Vaccari G., Maurella C., Bona C., Lorenzetti R., Troiano P., Casalnuovo F., Di-Sarno A., Maniaci M.G., Zuccon F., Nonno R., Casalone C., Mazza M., Ru G., Caramelli M., Agrimi U. and Acutis P.L.**, 2008, Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats. *J Gen Virol*, 89:3173–3176pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Copucchio M.T., Guarda F., Pozzato N., Coppolino S., Caracappa S. and Di Marco V.**, 2001, Clinical Signs and Diagnosis of Scrapie in Italy: A Comparative Study in Sheep and Goats. *J Vet Med*, 48:23–31pp.
- Dagleish M.P., Rodger S.M., Simmons M.M., Finlayson J., Buxton D. and Chianini F.**, 2008, Atypical scrapie in a sheep in Scotland. *Vet Rec*, 162:518–519pp.
- Dawson M., Hoinville L.J., Hosie B.D. and Hunter N.**, 1998, Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet Rec*, 142:623–625pp.
- De Bosschere H., Roels S., Benestad S.L. and Vanopdenbosch E.**, 2004, Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec*, 155:707–708pp.
- DeSilva U., Guo X., Kupfer D., Fernando S., Pillai A., Najjar F., So S., Fitch G.Q. and Roe B.**, 2003, Allelic variants of ovine prion protein gene (PrP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet Genome Res*, 102(1-4):89-94 pp.
- Diaz C., ViteZica Z., Rupp R., Andreoletti O., and Elsen J.**, 2005, Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol*, 86:849-857pp.
- Drogemüller C., De Vries F., Hamann H., Leeb T. and Distl O.**, 2004, Breeding German sheep for resistance to scrapie. *Vet Res.*, 154(9):257-260pp.
- Economides P.**, 2003, Transmissible Encephalopathies of animal with reference to public health and trade in the Middle East. OIE, Cyprus.
- Eghiaian F., Grosclaude J., Lesceu S., Debey P., Doublet B., Treguer E., Rezaie H. and Knossow M.**, 2004, Insight into the PrPC-->PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 10254-10259pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eiden M., Soto E.O., Mettenleiter T.C., and Groschup M.H.,** 2011, Effects of polymorphisms in ovine and caprine prion protein alleles on cell-free conversion. *Vet Res*, 42(1):30pp.
- Ekateriniadou L., Kanata E., Panagiotidis C., Nikolaou A., Koutsoukou E., Lymberopoulos A., and Sklaviadis T.,** 2007, PrP genotypes in scrapie-affected sheep in Greece—The contribution of the AHQ 1 polymorphism. *Small Rum Res*, 73(1-3):142-149pp.
- Eloit M., Adjou K., Couplier M., Fontaine J.J., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe A.G., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Vilotte J.L., Comoy E., Deslys J.P., Grassi J., Simon S., Lantier F. and Sarradin P.,** 2005, BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 156: 523-524pp.
- Elsen J., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eychenne F., Khang J.V. Poivey J.P. Lontier F. and Leplanche J.,** 2014, Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol*, 144(3):431-445 pp.
- Epstein V., Pointing S. and Halfacre S.,** 2005, Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet Rec*, 19:667–668pp.
- Espenes A., Press C., Mc L., Landsverk T., Tranulis M.A., Gunnes G., Benestad S.L., Fuglesteit R. and Ulvund M.J.,** 2006, Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Pathol.*, 134:115-125pp.
- European Comission, Directorate-General for Health and Consumers,** 2012, Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2010. Brussels, European Commission.
- Everest S.J., Thorne L., Barnide D.A., Edwards J.C., Elliott H., Jackman R. and Hope J.,** 2006, Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J Gen Virol*, 87:471–477pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fast C. and Groschup M.**, 2008, Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goat. In *Prions and diseases*, Springer, 2:15-44pp.
- Field E.J.**, 1966, Transmission experiments with multiple sclerosis. *Br Med J*, 2:564-565pp.
- Foster J.D., Hope J. and Fraser H.**, 1993, Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, 133:339-341pp.
- Foster J.D., Parnham D., Chong A., Goldmann W. and Hunter N.**, 2001, Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec*, 148:165-171pp.
- Francois D., Elsen J.M., Barillet F., Lajous D., Eychenne F. and Palhiere I.**, 2003, Breeding sheep for scrapie resistance. International Center for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Zaragoza, 29-35pp.
- Frootan F., Nikbakht G., Ögentürk N., and Ün C.**, 2012, Prion Protein Coding Gene (PrP) Variability in Sheep from Turkey and Iran. *Biochem Genet*, 50(3-4):277-284 pp.
- Galon N.**, 2012, Immediate Notification Report (Ref OIE: 11787, Israel). OIE: Paris-Madrid.
- Gama L., Carolino M., Santos-Silva M., Pimenta J., and Cosata M.**, 2006, Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. *Livest Sci*, 99(2-3):175-184pp.
- Genovesi S., Leita L., Sequi P., Andrighetto I., Sorgato M.C. and Bertoli A.**, 2007, Direct Detection of Soil-Bound Prions. *PLoS One*, 2:e1069.
- Goldmann W., Hunter N., Smith G. Foster J. and Hope J.**, 1994, PrP Genotype and Agent Effects in Scrapie: Change In Allelic Interaction With Different Isolates of Agent in Sheep, a Natural Host of Scrapie. *J Gen Viro*, 75(5):989-995pp.
- Goldmann W.**, 2008, PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res*, 39:30pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gombojav A., Ishiguro N., Horiuchi M., Serjmgadag D., Byambaa B. and Shinagawa M.**, 2003, Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J Vet Med Sci*, 65(1):75-81pp.
- Gombojav L., Ishiguro N., Horiuchi M. and Shinagawa M.**, 2003, Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J Vet Med Sci*, 66:1293–1295pp.
- Gonzalez L., Martin S., Houston F.E., Hunter N., Reid H.W., Bellworthy S.J. and Jeffrey M.**, 2005, Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol*, 86:827-838pp.
- Gootwine E., Abdulkhaliq A., Jawasreh K.I.Z. and Valle-Zarate A.**, 2008, Screening for polymorphism at the prion protein (PrP) locus (PrP) in Awassi and Assaf populations in Israel, the Palestinian Authority and Jordan. *Small Rum Res*, 77:80-83pp.
- Gough K.C., Baker C.A., Rees H.C., Terry L.A., Spiropoulos J., Thome L. and Maddison B.C.**, 2012, The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in preclinical sheep with a range of PrP genotypes. *J Virol*, 86:566-571pp.
- Graham J.F., Agarwal S., Kurian D., Kirby L., Pinheiro T.J. and Gill A.C.**, 2010, low density subcellular fractions enhance disease-specific prion protein misfolding. *J Biol Chem*, 285:9868-9880pp.
- Gravier-Widen D., Noremark H. and Benestad S.L.**, 2004, Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest*, 16:562–567pp.
- Gurel A., Gulcubuk A., Turan N., Richard C. and Yilmaz H.**, 2013, Scrapie cases in Northern Cyprus. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37: 311-315pp.
- Harris D.A.**, 2003, Trafficking, turnover and membrane topology of PrP: Protein function in prion disease. *Br Med Bul*, 66(1):71-85pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harrison P., Chan H.S., Prusiner S.B. and Cohen F.E.,** 1999, Thermodynamics of model prions and its implications for the problem of prion protein folding. *J. Mol. Biol.*, 286:593–606pp.
- Healy A.M., Weavers E., McElroy M., Gomez-Parada M., Collins J.D., O'Doherty E., Sweeney T. and Doherty M.L.,** 2003, The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*, 17:908–916pp.
- Hermes J., Tings T., Madlung A., Giese A., Siebert H., Schurmann P., Windl O. and Kretzschmar H.,** 1999, Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*, 19: 8866-8875pp.
- Hetz C., Maundrell K. and Soto C.,** 2003, Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med*, 9:237–243pp.
- Hoinville L.J.,** 1996, A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Revue Scientifique et Technique Of fice International des Epizooties. Rev Sci Tech.*, 15:827–852pp.
- Hopp P., Omer M.K., and Heier B.T.,** 2006, A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J Gen Virol*, 87:3729-3736pp.
- Hornlimann B., Keulen V.L., Ulvund M.J. and Bradley R.,** 2007, Portrait of scrapie in sheep and goats. *Prions in Humans and Animals*. 18:222-228pp. Walter De Gruyter: Berlin, Germany.
- Hornlimann B., Riesner D., and Kretzschmar H.,** 2006, *Prions in Human and Animals*. Gruyter, Berlin.
- Houston E.F. and Gravenor M.B.,** 2003, Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet Rec*, 152:333-334pp.
- Humphrey R.W., Clark A.M., Begara-Mc Gorum I. and Gunn G.J.,** 2004, Estimation of scrapie prevalence in cull and found-dead sheep on the Shetland Islands. *Vet. Rec.*, 154:303–304pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hunter N.**, 1997, PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, 5:331–334pp.
- Hunter N., Foster J.D., Goldmann W., Stear M.J., Hope J. and Bostock C.**, 1996, Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, 141:809-824pp.
- Ikeda T., Horiuchi M., Ishiguro N., Muramatru Y., Kai-Uwe G.D. and Shinagawa M.**, 1995, Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *J Gen Virol*, 76:2577–2581pp.
- Jarrett J.T. and Lansbury P.T. Jr.**, 1993, Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie?. *Cell*, 73:1055–1058pp.
- Jeong J.K., Moon M.H., Lee Y.J., Seol J.W. and Park S.Y.**, 2012, Translocation of cellular prion protein to non-lipid rafts protects human prion-mediated neuronal damage. *International Journal of Molecular Medicine*, 29:387-392pp.
- Johnson R.T.**, 2005, Prion diseases. *Lancet Neurol*, 4(10):635-642pp.
- Kao R.R., Houston F., Baylis M., Chihoto C.M., Goldmann W., Gravenor M.B., Hunter N. and McLean A.R.**, 2003, Epidemiological implications of the susceptibility to BSE of putatively resistant sheep. *J Gen Virol*, 84:3503-3512pp.
- Kramer M.L., Kratzin H.D., Schmidt B., Romer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S. and Kretzschmar H.**, 2001, Prion Protein Binds Copper within the Physiological Concentration Range. *J Biol Chem*, 276:16711-16719pp.
- Kuwahara C., Takeuchi A.M., Nishimura T., Haraguci K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Saeki K., Yokoyama T., Itohara S. and Onodera T.**, 1999, Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, 400:225-226pp.
- Laurent M.**, 1996, Prion disease and the "protein only" hypothesis: a theoretical dynamic study. *Biochem J*, 318(1):35-39pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Le Dur A., Beringue V., Andreoletti O., Reine F., Lai T.L., Baron T., Bratberg B., Vilotte J.L., Sarradin P., Besestad S.L. and Laude H.,** 2005, A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *PNAS*, 102:16031-16036pp.
- Ligios C., Sigurdson C.J., Santucci C., Carcassola G., Manco G., Basagni M., Maestrone C., Cancedda M.G., Madau L. and Aguzzi A.,** 2005, PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat. Med.*, 11:1137–1138pp.
- Luhken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M.H. and Erhardt G.,** 2007, Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Veterinary Research*, 38:65-80pp.
- Madisson B.C., Baker C.A., Terry L.A., Bellworthy S.J., Thorne L., Rees H.C. and Gough K.C.,** 2010, Environmental sources of scrapie prions. *J Virol*, 84:11560-11562pp.
- Madore N., Smith K.L., Graham C.H., Jen A., Brady K., Hall S. and Morris R.,** 1999, Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO journal*, 18: 6917–6926pp.
- Mallucci G.R., Ratté S., Asante E.A., Linehan J., Gowland I., Jefferys J.G.R. and Collinge J.,** 2002, Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J*, 21(3):202-210pp.
- McIntyre K.M., Vilas V., Gubbins S., Goldmann W., Hunter N. and Baylis M.,** 2008, Epidemiological Characteristics of Classical Scrapie Outbreaks in 30 Sheep Flocks in the United Kingdom. *PloS One*, 3:e3994.
- Mead S.,** 2006, Prion disease Genetics. *European Journal of Human Genetics*, 14:273-281pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meyer R.K., Mckinley M.P., Bowman K.A., Braunfeld M.B., Barry R.A. and Prusiner S.B.**, 1986, Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 83:2310-2314pp.
- Mironov A.Jr., Latawiec D., Wille H., Bouzamondo-Bernstein E., Legname G., Williamson R.A., Burton D., DeArmond S.J., Prusiner S.B. and Prusiner P.J.**, 2003, Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*, 23:7183-7193pp.
- Morel E., Andrieu T., Casagrande F., Gauczynski S., Weiss S., Grassi J., Rousset M., Dormont D. and Chambaz I.**, 2005, Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol*, 167(4):1033-1042pp.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M. and Benestad S.L.**, 2005, Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*, 86:231-235pp.
- Nentwig A., Oevermann A., Heim D., Botteron C., Zellweger K., Drogemuller C., Zubriggen A. and Seuberlich T.**, 2007, Diversity in Neuroanatomical Distribution of Abnormal Prion Protein in Atypical Scrapie. *PLoS Pathog*, 3:e82.
- Nir O.**, 2002, Scrapie in Israel. OIE: Beit Dagan, Israel.
- Nitzan-Kaluski D. and Leventhal A.**, 2003, Bovine spongiform encephalopathy in Israel: implications for human health. *Isr Med Assoc J*, 5(9):662-665.
- Norwegian Scientific Committee for Food Safety**, 2007, comments on: The opinion of the Agence française de sécurité sanitaire (Afssa) on changes to the control measures for sheep and goat herds in which a case of classical or atypical scrapie has been detected. *Scientific Committee for Food Safety*, Oslo: Norwegian.
- Oesch B., Westaway D., Wakhli M., Mckinley M.P., Kent B.H.S., Aebersold R., Barry R., Tempst P. and Teplow D.**, 1985, A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell Press*, 40:735-746pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- OIE**, 1994, WORLD ANIMAL HEALTH IN 1993, World Organization of Animal Health, Paris, France.
- OIE**, 1998. Israel's declaration of freedom from BSE, BSE risk Analysis, Assessment, and Management in Israel. OIE, Bet Dagan: Israel.
- OIE**, 2002, World Animal Health in 1996 - Reports. ProMED, 174-175pp.
- OIE**. (2009, 8). *Timeline of HealthMap Alerts for Scrapie In palestinian Authority*. Retrieved from HealthMap: <http://www.healthmap.org/v.php?id=270409&trto=&trfr=> (Erişim tarihi, 2016)
- OIE**. (2015). *World Oraganization For Animal Health*. Retrieved from OIE: <http://www.oie.int/index.php?L=3&id=103> (Erişim tarihi, 2016)
- OIE**. (2016). *World Organization for Animal Health*. Retrieved from OIE: <http://www.oie.int/support-to-oie-members/pvs-evaluations/status-of-missions/> (Erişim tarihi, 2016)
- Onnasch H., Gunn H.M., Bradshaw B.J., Benestad S.L. and Bassett H.F.**, 2004, Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec*, 155:636-637pp.
- Orge L., Galo A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J., Ramos M. and Simas J.P.**, 2004, Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol*, 85:3487-3491pp.
- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A.H., Ryder S.J., Parish S.M., Hamir A.N., Cockett N.E., Jenny A. and Knowles D.P.**, 2000, Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.*, 38:3254–3259pp.
- Padilla D., Beringue V., Espinosa J.C., Andreoletti O., Jaunain E., Reine F., Herzog L., Gutierrez-Adan A., Pintado B., Laude H. and Torres J.M.**, 2011, Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*, 7:e1001319.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Palestinian Central Bureau of Statistics (PCBS)**, 2013. Livestock survey 2013. PCBS, Ramallah: Palestine.
- Palmarini M.**, 2007, A Veterinary Twist on Pathogen Biology. *PLoS Pathog*, 3(2):e12.
- Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serben A., Groth D., Mehlhom I., Huang Z., Aetrick R.J. and Cohen F.E.**, 1993, Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *PNAS*, 90:10962–10966pp.
- Parry H.B. and Oppenheimer D.R.**, 1984, Scrapie Disease in Sheep: Historical, Clinical, Epidemiological, Pathological and Practical Aspects of the Natural Disease. 192pp, Academic Press: London, UK.
- Pattison I.H.**, 1972, Scrapie- a personal view, *J Clin Pathol Suppl*, 6:110-114pp.
- Pattison I.H., Gordon W.S. and Millson G.C.**, 1959, Experimental Production of Scrapie in Goats. *J Comp Pathol*, 69:300-312pp.
- Pattison I.H., Hoare M.N., Jebbett J.N. and Watson W.A.**, 1972, Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet Rec*, 90:465-468pp.
- Perl S., Edery N., Shichat N., Meirom R., Lubbashevsky G., Lahav D., Hammerschlag J., Alpert N. and Yakobson B.**, 2003, BSE- first documented case in Israel and current status in other countries. *Isr J vet med*, 58:62-67pp.
- Piccardo P., Manson J., Chetti B., King D. and Barron R.**, 2007, Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *PNAS*, 104:4712–4717pp.
- Plinston C., Hart P., Chong A., Hunter N., Foster J., Piccardo P., Manson J.C. and Barron R.M.**, 2011, Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep. *J Virol*, 85:1174-1181pp.
- Prusiner S.B.**, 1982, Novel Proteinaceous Infectious Particles Causes Scrapie. *Science*, 216:136-144pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prusiner S. and Hadlow W.** 1979, Slow transmissible disease of the nervous. 2:147pp, Academic Press:London.
- Rapoport E. and Shimshony A.,** 1997, Health hazards to the small ruminant population of the Middle East posed by the trade of sheep and goat meat. *Rev. sci. tech.*, 16(1):57-64pp.
- Roesler R., Walz R., Quevedo J., De-paris I., Zanata S., Graner E., Izquierdo I., Martins V.R. and Brentani R.,** 1999, Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPC. *Mol Brain Res*, 71(2):349–353pp.
- Schneider K., Fangerau H., Michaelsen B. and Raab W.,** 2008, The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull.*, 77(6):343-355pp.
- Seuberlich T., Botteron C., Benestad S.L., Brunisholz H., Wyss R., Kihm U., Schwermer H., Friess M., Nicolier A., Heim D. and Zurbriggen A.,** 2007, Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J. Vet. Diagn. Invest*, 19:2–8pp.
- Seyam S.,** (2009, 8). *OIE- Scrapie, Palestinian Auton. Territories.* Retrieved from OIE: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=8372&newlang=en (Erişim tarihi, 2016)
- Shimshony A.,** 1992, Veterinary Public Health in Israel. *International office of Epizootics*, 11:77-98pp.
- Simak J., Holada K., D'Agnillo F., Janota J. and Vostal, J.G.,** 2002, Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. *Transfusion*, 42(3):334-342pp.
- Simmons M.M., Konold T., Simmons H.A., Spencer Y.I., Lockey R., Spiropoulos J., Everritt S. and Cliffird D.,** 2007, Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res*, 3:20pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simmons M.M., Moore S.J., Konold T., Thruston L., Terry L.A., Thorne L., Lockey R., Vickery C., Hawkins S.A., Chaplin M.J. and Spiropoulos J.,** 2011, Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis*, 17:848-854pp.
- Siso S.L., Gonzalez L., Jeffery M., Martin S., Chianini F. and Steele P.,** 2006, Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. *Vet Rec.*, 159:327–328pp.
- Smith C.B., Booth C.J. and Pedersen J.A.,** 2011, Fate of Prions in Soil: A Review. *J Environ Qual*, 40:449-461pp.
- Soto C.,** 2006, Prions: The new Biology of Proteins. 13(6):959pp, Taylor and Francis: UK.
- Spielhauser C. and Schätzl H.M.,** 2001, PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem*, 276(48):44604-44612pp.
- Stahl N., Baldwin N.A., Teplov D.B., Hood L., Gibson W.B., Brulingman A.L. and Prusiner S.B.,** 1993, Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, 32(8):1991-2002pp.
- Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B. and Blake C.C.,** 1997, Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol*, 273(3):729–739pp.
- Thackray A.M., Knight R., Haswell S.J., Bujdoso R. and Brown D.R.,** 2002, Metal imbalance and compromised antioxidant function are early change in prion disease. *Biochem J*, 2:253-258pp.
- Thomzig A., Schultz-Schaeffer W., Wrede A., Wemheuer W., Berenig B., Kratzel C., Lemmer K. and Beekes M.,** 2007, Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog.*, 3:659–667pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thorgeirsdottir S., Georgsson G., Reynisson E., Sigurdarson S. and Palsdottir A.**, 2002, Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of sub clinical infection of sheep in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PrP genotypes. *Arch. Virol*, 147:709–722pp.
- Thorgeirsdottir S., Sigurdarson S., Thorisson H.M., Georgsson G. and Palsdottir A.**, 1999, PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J Gen Virol*, 80:2527–2534pp.
- Tobler I., Gaus S.E., Deboer T., Achermann M., Fischer P., Rüllicke T., Moser M., Oesch B., McBride P.A. and Manson J.C.**, 1996, Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380:639-642pp.
- Tongue S.C., Wilesmith J.W. and Cook, C.J.**, 2004, Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain. *Vet. Rec*, 154:9–16pp.
- Tranulis M.A., Osland A., Bratberg B. and Ulvund M.J.**, 1999, Prion protein polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J. Gen. Virol.*, 80:1073–1077pp.
- Tuo W., Zhuang D., Knowles W.P., Sy M.S. and O'Rourke K.I.**, 2001, PrP-C and PrP-Sc at the Fetal-Maternal Interface. *J Biol Chem*, 276:18229-18234pp.
- Ulvund M.**, 2008, Ovine scrapie disease: do we have to live with it?. *Small Rum Res*, 76:131-140pp.
- Ün C., Oztabak K., Ozdemir N., Akıs I., and Mengi A.**, 2008, Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds. *Small Rum Res*, 74(1):260–264 pp.
- Vaccari G., D'Agostino C., Nonno R., Rosone F., Conte M., Di Bari M.A., Chiappini B., Esposito E., De Grossi L., Giordani F., Marcon S., Morelli L., Borroni R. and Agrimi U.**, 2007, Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Virol*, 81:7306–7309pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vaccari G., Di Bari M.A., Morelli L., Nonno R., Chiappini B., Antonucci G., Marcon S., Esposito E., Fazzi P., Palazzini N., Troiano P., Petrella A., Di Guardo G. and Agrimi U., 2006,** Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol*, 87(5):1395-1402pp.
- Vaccari G., Panagiotidis C.H., Acin C., Peletto S., Barillet F., Acutis P., Bossers A., Langeveld J., Keulen L.V., Sklaviadis T., Badiola J.J., Andreoletti O., Groschup M.H., Agrimi U., Foster J. and Goldmann W., 2009,** State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PrP genetics and epidemiology. *Vet Res*, 40(5):48pp.
- Vaccari G., Petraroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti M., Di Bari M., Morelli L., Ligios C., Busani L. Nonno R. and Di Guardo G., 2001,** PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. *Arch Virol*, 46(10):2029-2037pp.
- Vaccari G., Petroroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti M.G., Di Bari M.A., Morelli L., Ligios C., Busani L., Nonno R. and Di Guardo G., 2001,** PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. *Arch. Virol.*, 146:2029–2037pp.
- Van Keulen L.J., Bossers A. and Van Zijderveld F., 2008,** TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res*, 39:24-36pp.
- Vargas F., Bolea R., Monleon E., Acin C., Vargas A., De-Blas I., Lujan L. and Badiola J.J., 2005,** Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Vet Rec*, 156:318–320pp.
- Vascellari M., Nonno R., Mutinelli F., Bigolaro M., Angelo di Bari M., Melchiotti E., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F. and Agrimi U., 2007,** PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J. Virol.*, 81:4872–4876pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Waggoner D.J., Drisaldi B., Bartnikas T.B., Casareno R.L.B., Prohaska J.R., Gitlin J.D., Harris D.A.,** 2000, Brain Copper Content and Cuproenzyme Activity Do Not Vary with Prion Protein Expression Level. *J Biol Chem*, 275:7455-7458pp.
- Wang Y., Qin Z., Qiao J. and Zhao O.,** 2008, Polymorphisms of the prion protein gene in sheep of Inner Mongolia, China. *Virus Genes*, 37(1):128-130 pp.
- Wiggins R. C.,** 2009, Prion Stability and Infectivity in the Environment. *Neurochemical Research*, 34: 158-168 pp.
- Wilesmith J., Wells G., Cranwell M. and Ryan J.,** 1988, Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, 123:638-644pp.
- Wopfner F., Weidenhofer G., Schneider R., Brunn A.V., Gilch S., Schwarz T.F., Werner T. and Schatz H.M.,** 1999, Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, 289(5):1163–1178pp.
- Yakobson B.A., Perl S., Ederly N., Shekhat N., Lubashevsky E., Yadin H., Tal M., Garazi S., Abdel EL Khaliq M., Galon N. and Shimshony A.,** 2004, recognition of israel by the Office International des Epizooties (OIE) negligible BSE status under the provisions of the Terrestrial Animal Health Code (2011). *Isr J Vet Med*, 96:172-181pp.
- Yuon J., Zhan Y.A., Abskharon R., Xiao X., Martinez M.C., Zhou X., Kneale G., Mikol J., Lehmann S., Witold K., Surewic Z., Castilla J., Staeyaert J., Zhang S., Kong Q., Petersen R.B., Wohlkonig A. and Zou W.Q.,** 2013, Recombinant Human Prion Protein Inhibits Prion Propagation in vitro. *Scientific Reports*, 8:1-8pp.