



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI YEREL KOYUN IRKLARININ
PrP GENOTİPLERİ İLE POST KARAKTERLERİ
ARASINDAKİ KORELASYONUN İNCELENMESİ**

Aşkım YOLCU

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 24.05.2012

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2012

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI YEREL KOYUN IRKLARININ
PrP GENOTİPLERİ İLE POST KARAKTERLERİ
ARASINDAKİ KORELASYONUN İNCELENMESİ**

Aşkım YOLCU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 401.02.00

Sunuş Tarihi: 24.05.2012

Bornova-İZMİR

2012

ÖZET**TÜRKİYE’DEKİ BAZI YEREL KOYUN IRKLARININ
PrP GENOTİPLERİ İLE POST KARAKTERLERİ
ARASINDAKİ KORELASYONUN İNCELENMESİ**

YOLCU, Aşkım

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cemal ÜN

Mayıs 2012, 49 sayfa

Bu tezin amacı Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan dört yerel koyun ırkının (Bandırma, Sakız, Morkaraman ve Kıvırcık) PrP genotipleri ve post rengi karakterleri arasındaki korelasyonu araştırmaktır. Bandırma koyun ırkına ait 54 ve Sakız koyun ırkına ait 32 örnek kullanılmıştır. Genotipleme için PCR-RFLP yöntemi kullanılmış ve elde edilen genotip verisi GenAlex programı kullanılarak analiz edilmiştir. Literatürden elde edilen Morkaraman (34 örnek) ve Kıvırcık (42 örnek) ırklarının allel ve genotip frekansları ile birlikte dört ırka ait genotipik veri Arlequin programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Benzer fenotipe sahip ırkların (Bandırma ve Sakız) benzer PrP genotipleri ve farklı fenotipe sahip ırkların (Morkaraman ve Kıvırcık) farklı PrP genotipleri sergilemesi, *PRNP* geni ile post rengi karakterleri arasında bir korelasyon olabileceğini göstermekle beraber, post rengi karakterleri ve PrP genotipleri arasında doğrudan ilişki kurmak zordur.

Anahtar sözcükler: Scrapie, *PRNP* geni, PrP genotipleri, PCR-RFLP analizi, Bandırma koyun ırkı, Sakız koyun ırkı, Morkaraman koyun ırkı, Kıvırcık koyun ırkı.

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF CORELATION BETWEEN PrP
GENETOYPE AND COAT COLOUR CHARACTERISTICS OF
SOME NATIVE SHEEP BREEDS IN TURKEY**

YOLCU, Aşkim

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cemal ÜN

May 2012, 49 pages

The objective of this thesis was to investigate the correlation between PrP genotype and coat colour characteristics of four native sheep breeds (Bandırma, Sakız, Morkaraman and K1vırcık) in Turkey. 54 specimens of Bandırma and 32 specimens of Sakız sheep were used. For genotyping PCR-RFLP analysis was used and the data were analysed using GenAlex software. With the allele and genotype frequencies of Morkaraman (34 specimens) and K1vırcık (42 specimens) sheep from literature, genotypic data belonging to four sheep breeds were compared using Arlequin software. Although displaying that breeds with similar phenotypes (Bandırma and Sakız) have similar PrP genotypes and that breeds with different phenotypes (Morkaraman and K1vırcık) have different PrP genotypes may show a correlation between *PRNP* gene and coat colour characteristics, it is difficult to establish a direct relationship between coat colour characteristics and PrP genotypes.

Keywords: Scrapie, *PRNP* gene, PrP genotypes, PCR-RFLP analysis, Bandırma sheep breed, Sakız sheep breed, Morkaraman sheep breed, K1vırcık sheep breed.

TEŞEKKÜR

Bu tez, E.Ü Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından 2010-FEN-064 numaralı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Bundan dolayı adı geçen kuruma teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca yardımları ve yorumlarıyla beni yönlendiren Doç. Dr. Cemal ÜN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan ve beni her zaman destekleyip kollayan anneme ne kadar teşekkür etsem az olacak biliyorum. Annecim her şey için çok teşekkür ediyorum. İyi ki varsın ve seni çok seviyorum.

Tez dönemim boyunca ve öncesinde maddi-manevi her zaman yanımda olan ablam Beril İKA ESEN'e ve eniştem Ahmet ESEN'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca her zaman yanımda olan, desteğini benden hiç esirgemeyen ve özellikle yazım aşamasında bana oldukça yardımcı olan eşim Fatih YOLCU'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca yanımda olan tüm arkadaşlarım ve hocalarıma teşekkür ediyorum. Özellikle laboratuvar çalışmalarımda beni yönlendiren ve diğer zamanlarda da desteğini benden esirgemeyen Erdoğan Pekcan ERKAN'a teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
GRAFİKLERLER DİZİNİ	xxiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1 Prion Molekülü	1
1.1.1 PrPC (Hücresele PrP) - PrPSc (PrP Scrapie) molekülleri	1
1.2 PrP Molekülünün Sentezi	2
1.3 Sadece Protein Hipotezi	3
1.4 PrPSc'lerin Çoğalma Mekanizmaları	5
2. PRİON HASTALIKLARI	7
2.1 İnsan Prion Hastalıkları	7
2.1.1 Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD)	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.2 Ölümcül ailesel uykusuzluk (FFI)	10
2.1.3 Gerstmann-Straussler hastalığı (GSS)	10
2.1.4 Kuru	10
2.2 Hayvan Prion Hastalıkları	11
2.2.1 Sığır süngerimsi ensefalopati (BSE)	11
2.2.2 Scrapie	14
3. TEZİN AMACI	19
4. MATERYAL VE METOT	20
4.1 Kullanılan Materyal	20
4.1.1 Bandırma koyunu	20
4.1.2 Sakız koyunu	20
4.1.3 Morkaraman koyunu	21
4.1.4 Kıvırcık koyunu	22
4.2 Koyun Kanından Genomik DNA Eldesi	23
4.3 PCR-RFLP Analizleri	23
4.3.1 PCR analizi	23
4.3.2 RFLP analizi	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 Polimorfizmlerin Belirlenmesi	25
4.5 Kullanılan Populasyon Genetiği Programları	25
5. BULGULAR	26
5.1 Bandırma Irkı Koyunlarının Polimorfizmleri	26
5.2 Sakız Irkı Koyunlarının Polimorfizmleri	28
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR DİZİNİ	39
ÖZGEÇMİŞ	45
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İnsan PrP yapısı	1
1.2 PrP ^c ve PrP ^{Sc} 'nin yapısı	2
1.3 PrP'nin sentezi	3
1.4 Sadece protein hipotezi	4
1.5 Heterodimer model	5
1.6 Merkez bağımlı üretim modeli	6
2.1 <i>PRNP</i> geni üzerindeki mutasyonlar ve polimorfizmler	8
2.2 Sığır <i>PRNP</i> geni.....	13
2.3 Koyun <i>PRNP</i> geni	15
2.4 Koyun <i>PRNP</i> geninin 136, 154 ve 171. kodonlarındaki alternatif aminoasitler	15
2.5 Badgerfaced Welsh Mountain ve Shetland koyunlarında post rengi karakterleri	18
4.1 Bandırma koyunu	20
4.2 Sakız koyunu	21
4.3 Morkaraman koyunu	22
4.4 Kıvırcık koyunu	22
4.5 Koyun (<i>Ovis aries</i>) <i>PRNP</i> geninin FASTA formatındaki gösterimi ..	24

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.1 Bandırma koyunu <i>PRNP</i> geni PCR-A ve PCR-B jel görüntüsü	26
5.2 Bandırma koyunu <i>PRNP</i> geni PCR-A ve PCR-B ürününün RFLP jel görüntüsü	27
5.3 Sakız koyunu <i>PRNP</i> geni PCR-A ve PCR-B jel görüntüsü	29
5.4 Sakız koyunu <i>PRNP</i> geni PCR-A ve PCR-B ürününün RFLP jel görüntüsü	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İnsan prion proteini ile ilişkili mutasyonlar	11
2.2 Scrapie risk grupları ve genotipleri	16
4.1 PCR-A ve PCR-B koşulları	24
4.2 Prp gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için kullanılan PCR-RFLP modeli	25
5.1 Bandırma koyunundaki alleller, genotipler ve risk grupları	28
5.2 Sakız koyunundaki alleller, genotipler ve risk grupları	31
6.1 Populasyonlara ait aminoasit frekansları	32
6.2 Populasyonlara ait allel ve genotip frekansları	33
6.3 Populasyonlara ait Ki-Kare testi P değerleri	34
6.4 Allelik F_{ST} P değerleri ve standart sapma matrisi	36
6.5 Genotipik F_{ST} P değerleri ve standart sapma matrisi	36

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
6.1 Bandırma ve Sakız ırkına ait Hardy-Weinberg dengesi grafiği	35

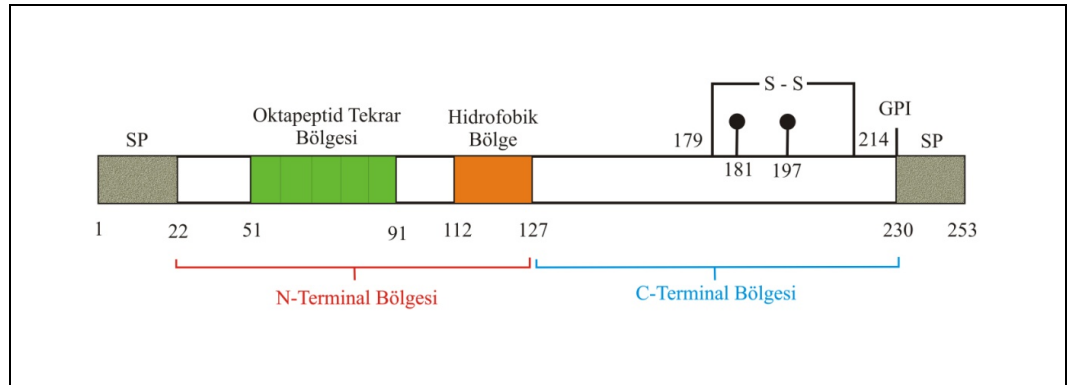
KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Asn	Asparajin.
BSE	Sığır süngerimsi ensefalopati.
CJD	Creutzfeld-Jakob hastalığı.
Cys	Sistein.
fCJD	Ailesel Creutzfeld-Jakob hastalığı.
FFI	Ölümcül ailesel uykusuzluk.
gCJD	Genetik Creutzfeld-Jakob hastalığı.
GPI	Glikofosfatidil inositol.
GSS	Gerstman-Straussler hastalığı.
iCJD	İatronic Creutzfeld-Jakob hastalığı.
ORF	Açık okuma bölgesi.
PrP	Prion proteini.
<i>PRNP</i>	Prion protein geni.
PrP ^C	Hücrel prion proteini.
PrP ^{Sc}	Scrapie prion proteini.
sCJD	Sporadik Creutzfeld-Jakob hastalığı.
vCJD	Variant Creutzfeld-Jakob hastalığı.

1. GİRİŞ

1.1. Prion Molekülü

Prion proteini (PrP) molekülü memelilerde türden türe değişmekle beraber ortalama 250 aminoasitten oluşmaktadır (Cappai and Collins, 2004) (Şekil 1.1). Yapısında bakır bağlama yeteneğinde bir N-terminal sinyal peptidi (Watts et al., 2006) ve zar yüzeyine glikofosfatidil inositol (GPI) ile bağlanmada rol alan C-terminal bölgeleri yer alır (Harris, 1999; Cappai and Collins, 2004). PrP yapısı üzerine yapılan çalışmalarda N-terminal bölgenin değişken, C-terminal bölgenin ise yüksek derecede korunmuş küresel bir yapıda olduğu gösterilmiştir (Pastore and Zagari, 2007). N-terminal bölgesinde bir oktapeptid tekrarının dört kopyası ve bu kopyalar ile çok yakın benzerlik gösteren bir nonapeptid dizisi bulunmaktadır (Cappai and Collins, 2004). Bu tekrar dizileri, prion proteini üzerinde dört adet bakır bağlama bölgesi oluşturdukları için önemlidirler (Watts and Westaway, 2007). Bunun yanı sıra sisteinler arasında bir adet disülfid bağı ve asparajinler arasında iki N-glikozilasyon bölgesi yer alır (Cappai and Collins, 2004) (Şekil 1.1).

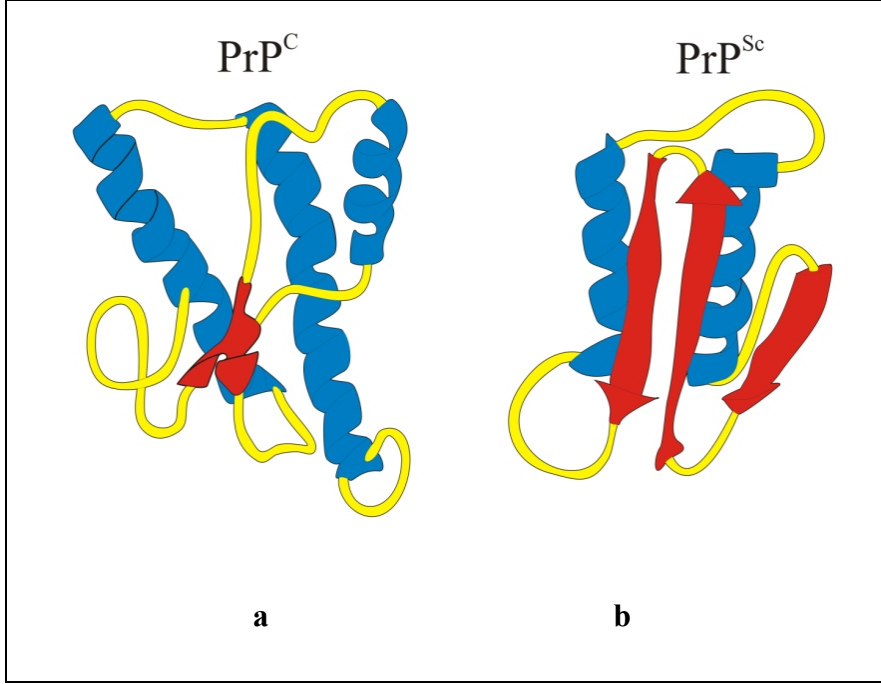


Şekil 1.1. İnsan PrP (huPrP) yapısı. Glikozilasyon bölgeleri Asn181 ve Asn197 üzerinde yer alır. Cys179 Cys214'e kovalent bağ ile bağlıdır. Oktapeptid tekrar bölgeleri türler arasında değişmektedir (Pastore and Zagari, 2007'den değiştirilerek).

1.1.1. PrP^C (Hücrel PrP) - PrP^{Sc} (PrP Scrapie)molekülleri

PrP^C (hücrel prion proteini), GPI kancası ile hücre yüzeyine tutunmuş bir hücre yüzey proteinidir (Harris, 2003). Başta nöral hücreler olmak üzere diğer birçok hücre tipinde de sentezlenir (McKintosh et al., 2003).

PrP^C molekülü yüksek oranda α -heliks yapısı içerirken (proteinin yaklaşık %40'ı) daha düşük oranda β -yaprak (proteinin yaklaşık %3'ü) içermektedir (Aguzzi and Calella, 2009) (Şekil 1.2a). Bundan farklı olarak PrP^{Sc} (PrP scrapie) molekülünde ise, proteinin yaklaşık %40'ını β -yapraklar ve %30'unu ise α -heliks yapısı oluşturmaktadır (Aguzzi and Calella, 2009) (Şekil 1.2b).



Şekil 1.2. a) PrP^C ve b) PrP^{Sc}'nin yapısı [Mavi renkteki yapılar: α -heliks yapıları, kırmızı renkteki yapılar: β -yapraklar (Riesner, 2002'den değiştirilerek)].

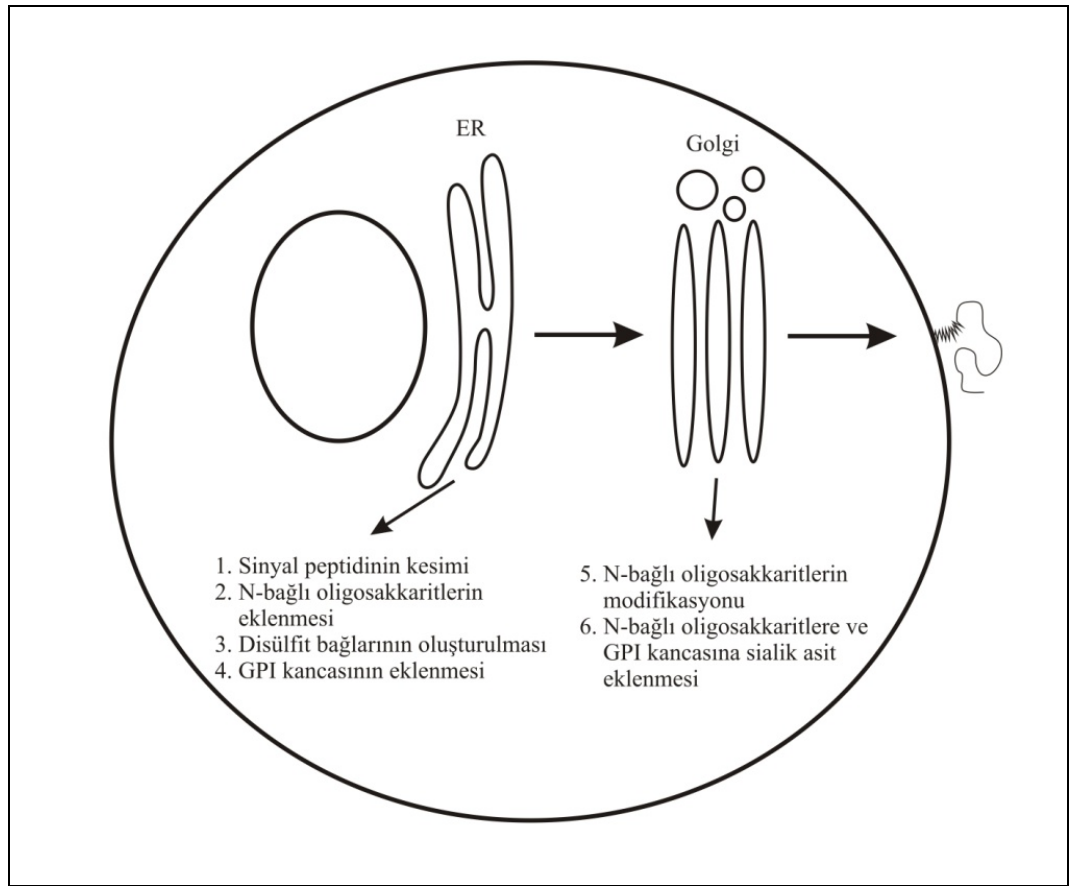
Bu yapısal farklara bağlı olarak PrP^C molekülünün sekonder yapısı proteazlar ile muamele edildiğinde kolay sindirilebilen ve deterjanlar ile çözünebilen bir yapıya sahiptir (Haltia, 2000; McKintosh et al., 2003). PrP^{Sc} molekülü ise proteazlara karşı dayanıklı, iyonik deterjanlarla çözünmeyen ve patojenik etkiye sahip bir yapıdadır (Prusiner, 1998; Prusiner et al., 1998; Haltia, 2000; McKintosh et al., 2003; Tatzelt and Winklhofer, 2004; Gilch and Schätzl, 2009).

1.2. PrP Molekülünün Sentezi

Diğer zar proteinleri gibi PrP^C'ler de endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenip bir takım modifikasyonlar geçirdikten sonra golgi aparatında geçirecekleri değişimler ile son halini alırlar ve sonrasında hücre yüzeyine aktarılırlar (Harris, 1999; Gilch and Schätzl, 2009). Bu modifikasyonlar sırasında N-terminal sinyal peptidinin kesimi, iki farklı bölgeye N-bağlı oligosakkarit

zincirinin eklenmesi, bir disülfid bağının oluşması, GPI kancasının bağlanması ER’de ve oligosakkarit zincir ile GPI kancasına sialik asit eklenmesi işlemleri ise golgi aparatında sırası ile gerçekleştirilir (Harris, 1999) (Şekil 1.3).

Tavuklarda yapılan araştırmalarda tüm modifikasyonları tamamlanmış PrP^C’nin, hücre yüzeyine aktarıldıktan sonra belirli zaman aralıkları ile (60 dk.) düzenli olarak zar yüzeyi ve hücre içi bölümler arasında yer değiştirdiği gösterilmiştir (Shyng et al., 1993). PrP^C’ye bakır iyonlarının bağlanması ve bu iyonların hücre içi-dışı arasında taşınımı ise bu olayı destekler niteliktedir (Viles et al., 1999; 2008).

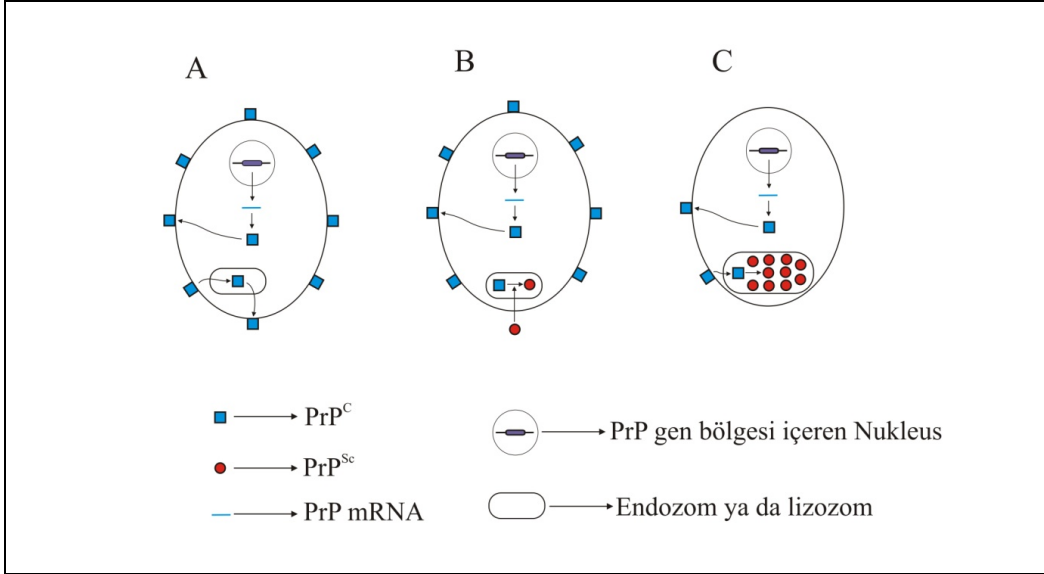


Şekil 1.3. PrP’nin sentezi ve bu olay sırasında meydana gelen değişimler ile bunların gerçekleştiği bölgeler (Harris, 1999’den değiştirilerek).

1.3. Sadece Protein Hipotezi

Prionlar bakteri, mantar, parazit ve virüsler ile kıyaslandıklarında, hem etki mekanizmaları hem de yapısal formları bakımından farklı ve neurodejeneratif etkiye sahip olabilen proteinlerdir (Prusiner, 1982, 1998). Yapılarında nükleik asit bulundurmamaları (Kellings et al., 1994) ve kendi kopyalarını oluşturabilmeleri

(McKintosh et al., 2003; Pezza and Serio, 2007) nedeniyle prionlar için “sadece protein hipotezi” Griffith (1967) tarafından ortaya atılmış ve Prusiner tarafından bu görüş geliştirilmiştir (Wiessmann, 1999; McKintosh et al., 2003; Pezza and Serio, 2007) (Şekil 1.4).



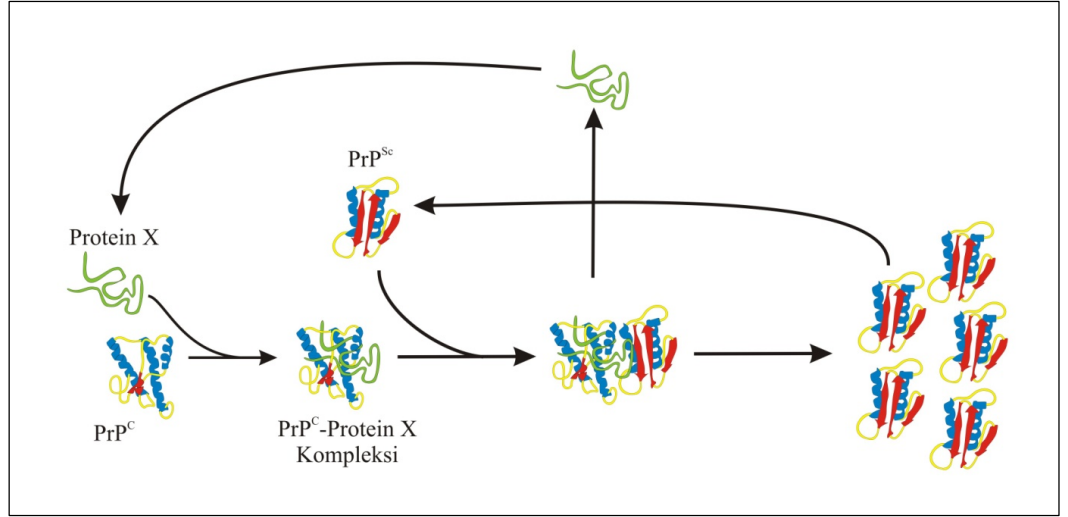
Şekil 1.4. Sadece Protein Hipotezi. A) Normal hücrelerde PrP^C sentezi, hücre yüzeyine taşınımı ve döngüsü. B) PrP^{Sc}'lerin PrP^C'leri hastalıklı forma dönüştürmesi. C) Endozom ya da lizozomlarda birikmiş PrP^{Sc} molekülleri. (Wiessmann, 1999'dan değiştirilerek).

Griffith tarafından ortaya konan bu hipoteze göre, prion proteinlerinin farklı fizikokimyasal özelliklere sahip en az iki farklı izoformu bulunmaktadır (McKintosh et al., 2003; Pezza and Serio, 2007). Bunlardan ilki birçok hücrede, özellikle sinir hücrelerinde sentezlenen normal (hücrel) prion proteinidir (PrP^C) (Prusiner, 1998; Haltia, 2000; Wechselberger et al., 2002; McKintosh et al., 2003). Bu proteinin α -heliks içeriği yüksek ve β -yaprak içeriği ise azdır. (Prusiner et al., 1998; Harris and True, 2006). İkincisi β -yaprak içeriği fazla ve α -heliks içeriği ise az olan ve patojenik etkiye sahip bir PrP izoformudur (Prusiner, 1998; Prusiner et al., 1998; Tatzelt and Winklhofer, 2004; Gilch and Schätzl, 2009). Hastalık yapıcı bu prion formuna PrP scrapie (PrP^{Sc}) adı verilmiştir (Prusiner, 1998; Prusiner et al., 1998; Tatzelt and Winklhofer, 2004; Gilch and Schätzl, 2009).

Sadece protein hipotezine göre, PrP^{Sc} molekülleri PrP^C molekülleri ile temas geçerek, PrP^C'leri hastalıklı izoforma dönüştürürler (Haltia, 2000; McKintosh et al., 2003; Pastore and Zagari, 2007).

1.4. PrP^{Sc}'lerin Çoğalma Mekanizmaları

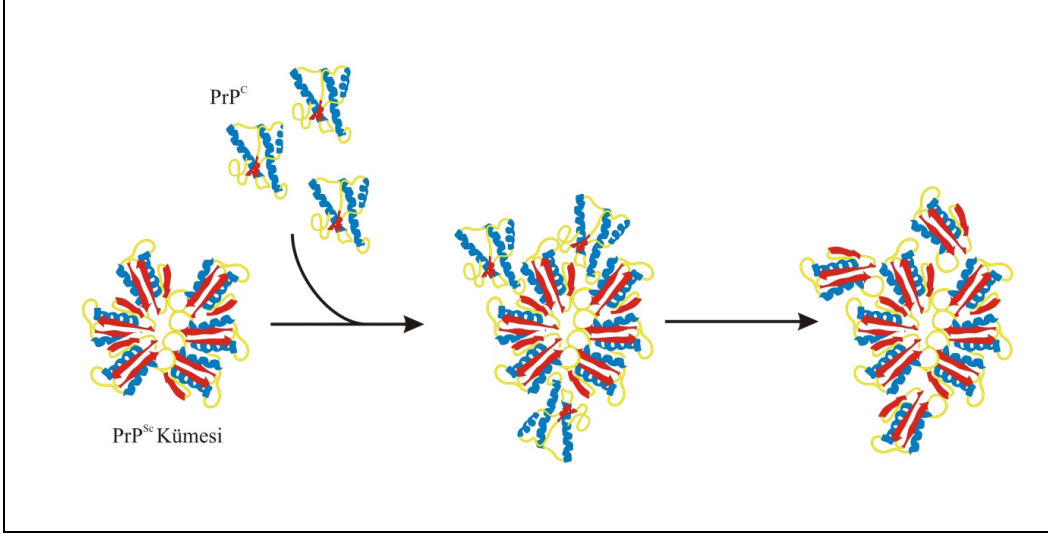
Detayları tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşümü için iki ana model geliştirilmiştir (Haltia, 2000; Aguzzi and Calella, 2009). Bunlardan ilki Şekil 1.5'te gösterildiği üzere yardımcı faktör olarak bilinmeyen bir proteini (protein X) kullanan heterodimer modeldir (Haltia, 2000). Bu modele göre PrP molekülü protein X'e bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur (Prusiner et al., 1998; Haltia, 2000). PrP^{Sc} ise bu kompleksle bağlantıya geçer ve PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşümünü indükler (Prusiner et al., 1998; Haltia, 2000). Sonuç olarak PrP^C'ler PrP^{Sc}'ye dönüşür ve protein X bu yapıdan ayrılır (Prusiner et al., 1998). Ayrılan protein X'ler enzim gibi işlev göstererek tekrar diğer PrP^C'ler ile kompleks oluşturabilirler (Prusiner et al., 1998).



Şekil 1.5. Heterodimer model (Prusiner et al., 1998'den değiştirilerek).

Diğer model ise “merkez bağımlı üretim” modelidir (Haltia, 2000). Bu modelde, ancak kümeleşmiş PrP^{Sc} varlığında PrP^C'lerin dönüştürülme işlemi başlatılır (Haltia, 2000). Bu işlem sırasında PrP^{Sc} kümesi PrP^C'lere bağlanarak onları stabil hale getirir ve PrP^{Sc} kümeleri birikmeye başlayarak PrP^{Sc} çoğalımı gerçekleşmiş olur (Haltia, 2000) (Şekil 1.6).

Bu iki çoğalma mekanizması da aslında temelde aynı mantık ile çalışmaktadır. Her ikisinde de PrP^{Sc}'lerin varlığı gerekmektedir. Sadece ilk modelde diğerinden farklı olarak bir protein X'in varlığı söz konusudur. Ama sonuçta bu iki çoğalma mekanizmasındaki asıl temel nokta, bulaşıcı izoform PrP^{Sc}'lerin hücrel izoform olan PrP^C'leri enfekte etmesidir.



Şekil 1.6. Merkez bağımlı üretim modeli (Gilch and Schätzl, 2009'den değiştirilerek).

2. PRİON HASTALIKLARI

Prion hastalıkları, insan ve hayvan prion hastalıkları olarak iki ana başlık altında incelenecektir. Öncelikle insan prion hastalıkları ve genetiğine sonrasında ise hayvan prion hastalıkları ve genetiğine değinilecektir. Bu tezin konusunda yer alan hayvan prion hastalıklarından scrapie ise daha detaylı anlatılacaktır.

2.1. İnsan Prion Hastalıkları

İnsan prion hastalıkları Creutzfeldt-Jakob hastalığı (Creutzfeldt-Jakob disease; CJD), Gerstmann-Straussler sendromu (Gerstmann-Straussler syndrome; GSS), ölümcül ailesel uykusuzluk (fatal familial insomnia; FFI) ve kuru olarak sınıflandırılırlar (Choi et al., 2009; Prusiner, 1991).

İnsan *PRNP* (prion protein geni) geni 20. kromozom üzerinde yer alır ve iki ekzondan oluşur (Mead, 2006) (Şekil 2.1). Açık okuma bölgesi (open reading frame, ORF) büyük olan ikinci ekzon üzerinde yer alır (Mead, 2006). N-terminal bölgede dört tane octapeptid ve bir tane nonapeptiden oluşan beş tekrar bölgesi içerir (Mead, 2006). Bu tekrarlardaki farklılıklar polimorfizmler ya da patolojik mutasyonlar şeklinde ortaya çıkarlar (Mead, 2006). Fakat bu tekrar bölgelerinde nokta mutasyonları veya SNP (single nucleotide polymorphism; tek nükleotit değişimleri)'ler bulunmamaktadır (Mead, 2006). Nokta mutasyonları ve SNP'ler C-terminal bölgede yer almaktadır (Mead, 2006).

2.1.1. Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD)

İnsan prion hastalıklarından en çok bilineni CJD'dir. CJD sporadik (sCJD) iatrogenik (iCJD), genetik ya da ailesel (gCJD veya fCJD) ve variant (vCJD) olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Ye et al., 2008).

2.1.1.1. Sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığı (sCJD)

CJD vakalarının %85'ini kapsayan nörodejeneratif bir hastalıktır (Aguzzi and Calella, 2009) ve milyonda bir olasılıkla görülür (Haltia, 2000). Genellikle orta yaşın sonlarında ortaya çıkar ve ardından ölümlerle sonlanır (Haltia, 2000). 50 yaşın altındaki yaş gruplarında görülme sıklığı çok az, 30 yaş altında ise oldukça nadirdir. Buna rağmen çok nadir de olsa gençlerde görüldüğü de rapor edilmiştir (Haltia, 2000).

Bu hastalıkta gözlenen ortalama ölüm yaşı 65-69 arasında değişmektedir (Haltia, 2000). Belirtiler ortaya çıktıktan sonra dört buçuk ay içinde hastalık ölüm ile sonlanır (Haltia, 2000). Hastalığın en belirgin semptomları bunamaya (dementia) yol açan hafıza problemleri ve yürüme ya da davranışlardaki bozukluklardır (Aguzzi et al., 2008).

2.1.1.2. İatrojenik Creutzfeldt-Jakob hastalığı (iCJD)

İlk iCJD vakası 1974 yılında bildirilmiştir. Bu vakanın CJD'li bir hastadan alınan kornea nakli ile oluştuğu belirtilmiştir (Aguzzi and Calella, 2009). iCJD'nin, beyin ameliyatları sonrasında iyi steril edilmemiş malzemeler ile ya da kontamine dura mater (beyin ve omuriliğin dış zarı) nakli ile de gerçekleştiği düşünülmektedir (Aguzzi et al., 2008). iCJD'nin kuluçka süresi 1-16 yıl arasında değişmektedir (Haltia, 2000). 1985'ten beri Amerika, İngiltere ve Fransa'da en fazla sayıda gözlemlenen iCJD vakası, hipofiz bezinden elde edilen büyüme hormonu aşısı enjekte edilen çocuklarda gözlemlenmiştir (Haltia, 2000). Bunun nedeninin de CJD'li hastaların hipofiz bezleri ile hazırlanan aşılarından kaynaklandığı düşünülmüştür (Haltia, 2000).

2.1.1.3. Genetik ya da ailesel Creutzfeldt-Jakob hastalığı (gCJD ya da fCJD)

CJD vakalarının % 5-15'ini oluşturur (Haltia, 2000). Klinik ve patolojik semptomları aynı sCJD'deki gibi bunamaya (dementia) yol açan hafıza problemleri ve yürüme ya da davranış bozuklukları şeklindedir (Haltia, 2000). Bu iki CJD arasındaki tek fark fCJD'de hastalık belirtilerinin ortaya çıkma süresi daha erkendir (Haltia, 2000). Bu hastalık ile ilişkili mutasyonlar Çizelge 2.1a'da gösterilmiştir.

2.1.1.4. Variant Creutzfeldt-Jakob hastalığı (vCJD)

Hayvan prion hastalıklarından sığırlarda gözlenen sığır süngerimsi ensefalopatisi (bovine spongiform encephalopathy; BSE) ya da diğer adıyla deli dana hastalığının insanlara geçerek kazanılmış yeni bir variant Creutzfeldt-Jakob hastalığının oluşması prion hastalıklarının üzerine dikkat çekmiştir (Mead, 2006). Bu hastalık ilk olarak 1996 yılında tanımlanmıştır (Aguzzi and Calella, 2009).

Bu hastalıkta dikkat çekici nokta hastalığın genç yaşlarda ortaya çıkmasıdır (Aguzzi and Calella, 2009). sCJD’de 66 olan ortalama yaş vCJD’de 29’dur. Hastalık süresi ise sCJD’ye kıyasla daha uzundur (4,5 aya kıyasla 14 ay) (Haltia, 2000). Hastalarda bacak bölgelerinde ataksia (kas koordinasyon bozukluğu), acı ve parestezi (duyarlılık) gibi nörolojik semptomların görülmesinden aylar önce psikiyatrik semptomlar (depresyon, içe kapanıklık) başlar (Haltia, 2000). Tüm vCJD hastalarının *PRNP* geninin 129. kodonunda metionun homozigotluğu gözlemlenir (Haltia, 2000).

2.1.2. Ölümcül ailesel uykusuzluk (FFI)

FFI nadir görülen otozomal dominant bir hastalıktır (Haltia, 2000). Bu hastalık 1986 yılında bir İtalyan ailenin beş üyesinde görülmüştür (Aguzzi et al., 2008). FFI’lı hastalarda istem dışı uyku düzensizlikleri, bunama ve dysautonomia (istemli hareketlerde düzensizlikler) gibi anormallikler gözlemlenmiştir (Haltia, 2000; Aguzzi and Calella, 2009). Bu hastalık *PRNP* geni üzerindeki D178N nokta mutasyonu ile birlikte 129. kodonda metionin bulunması ile gerçekleşir (Watts et al., 2006) (Çizelge 2.1b).

2.1.3. Gerstmann-Straussler hastalığı (GSS)

GSS’de nadir görülen otozomal dominant bir hastalıktır (Haltia, 2000). Bu hastalık ile ilgili ilk kayıtlara 1928-1936 yılları arasında Avustralya’da rastlanılmıştır (Aguzzi et al., 2008). Hastalığın süresi 2-10 yıl arasında değişir ve temel semptomları ataksia ile bunamadır (Aguzzi and Calella, 2009). Bu hastalık Çizelge 2.1c’de belirtilen *PRNP* geni üzerindeki mutasyonlardan özellikle 102 ve 198. kodonlardaki mutasyonlar ile ilişkilidir (Aguzzi and Calella, 2009).

2.1.4. Kuru

Kuru, Papua Yeni Gine’nin bazı aborjin kabilelerinde özellikle Fore ve buna komşu kabilelerde görülmüş endemik bir hastalıktır (Aguzzi et al., 2008). Fore dilinde “kuru” kelimesi “titreme” anlamına gelmektedir (Aguzzi et al., 2008). Titreme ise diğer prion hastalıklarında da gözlenen kas koordinasyon bozukluğunun en belirgin semptomlarından (Aguzzi et al., 2008).

Fore kabilesi üyeleri ölü akrabalarına saygılarını göstermek ve onların yasını tutmak için ölüm sonrasında onları tüketme (cannibalism: yamyamlık)

ritüelini geliştirmişlerdir (Aguzzi et al., 2008). Hastalık bu ritüeller sonucunda daha fazla bireye aktarılmıştır (Aguzzi and Calella, 2009). Bu ritüellere son verilmesi ile de hastalığın görülme sıklığı azalmıştır (Aguzzi et al., 2008).

Çizelge 2.1. İnsan prion proteini ile ilişkili mutasyonlar (Aguzzi et al., 2008'den değiştirilerek).

a)	gCJD'ye neden olan mutasyonlar	Octarepeat insersiyonu, D178N-129V, E208H, E200K, V180I, T188K, V210I, T188R-129V, E196K, E211Q, V203I, M232R
b)	FFI'ya neden olan mutasyonlar	D178N-129M
c)	GSS'ye neden olan mutasyonlar	Octarepeat insersiyonu, P102L-129M, P105L-129V, A117V-129V, G131V-129M, Y145-129M, H187R-129V, F189S-129V, D202N-129V, Q212P, Q217R-129M

2.2. Hayvan Prion Hastalıkları

Hayvan prion hastalıklarından en çok gözlenenler koyunlarda görülen scrapie hastalığı ve sığırlarda görülen sığır süngerimsi ensefalopatileridir.

2.2.1. Sığır süngerimsi ensefalopati (BSE)

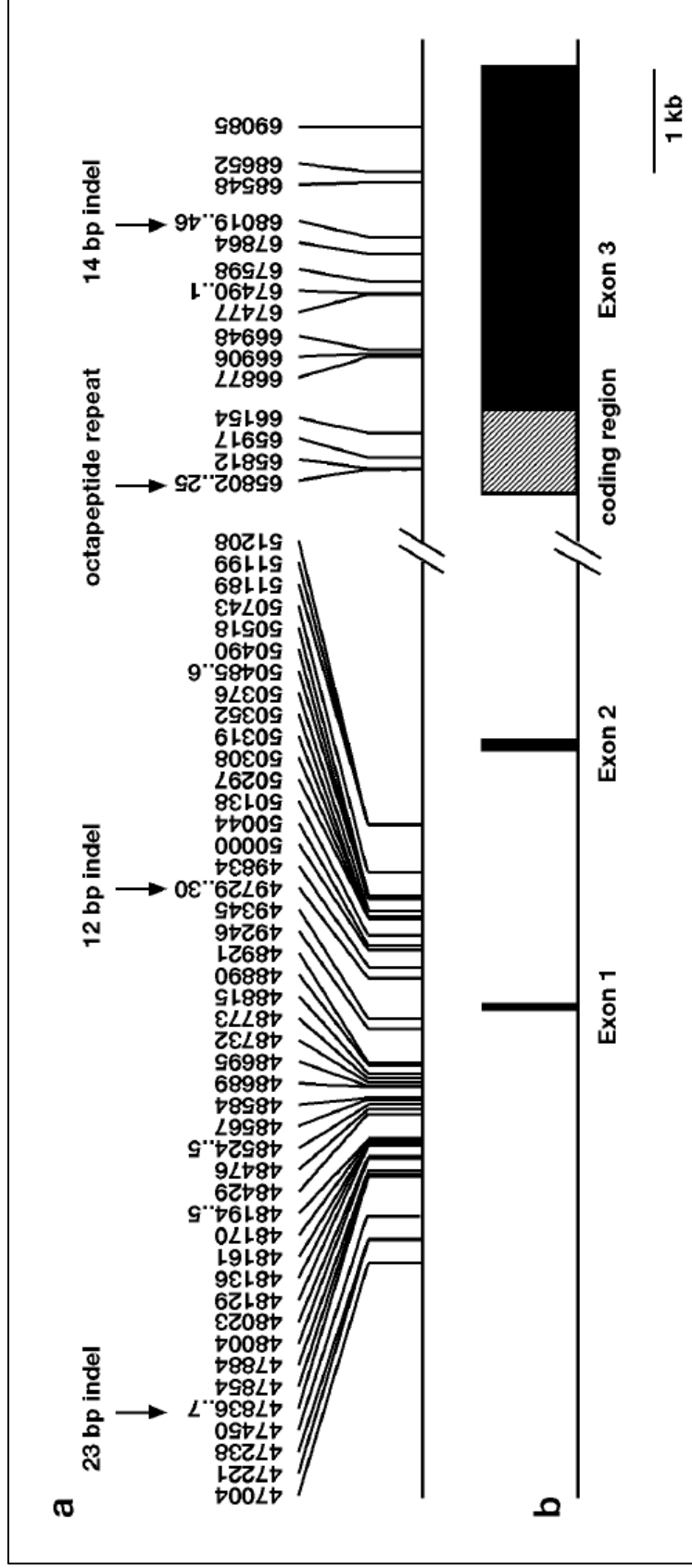
Sığır süngerimsi ensefalopatileri (bovine spongiform encephalopathy: BSE) deli dana hastalığı (mad cow disease) olarak da bilinmektedir (Yılmaz, 2002). Sığırlarda gözlenen bu hastalık beyinde süngerimsi bozukluklara neden olur ve diğer prion hastalıkları gibi ölümle sonlanır (Yılmaz, 2002).

BSE'ye ilk olarak İngiltere'de 1986 yılında rastlanılmıştır (Richt and Hall, 2008; Taşkın vd., 2010). Bu hastalığın ilk olarak nasıl ortaya çıktığı hala bilinmemekle birlikte bunun için öne atılan birkaç teori mevcuttur (Richt and Hall, 2008). Teorilerden ilki, scrapie'li koyunlar ile hazırlanan yemlerle beslenen sığırlara bu hastalığın geçmesi şeklindedir (Richt and Hall, 2008). İkincisi ise tanımlanmamış bir sporadik ya da genetik sığır süngerimsi ensefalopatileridir (Richt and Hall, 2008). Bir diğeri ise insanlardan orijinlenen bulaşıcı süngerimsi

ensefalopatilerin (transmissible spongiform encephalopathies; TSEs) sığırlara geçmesi şeklindedir (Richt and Hall, 2008).

Hastalığın inkübasyon süresi 2-8 yıl arasında değişmektedir ve genellikle 4-5 yaşındaki sığırlarda görülmektedir (CFSPH, 2007a). Hastalığın belirtileri arasında yürüyüşte anormallikler (genellikle arka bacaklarda ataksia), uyarılara karşı aşırı duyarlılık, titreme, agresiflik, sinirlilik, huy değişiklikleri, korku ya da öfke gibi davranış bozuklukları yer alır (CFSPH, 2007a). Bunlara ek olarak daha nadir görülen bazı değişiklikler ise yön ile kilo kaybı, diş gıcırdatma ve süt üretiminde azalma şeklindedir (CFSPH, 2007a). Hastalık koma ve ardından ölüm ile sonlanır (CFSPH, 2007a).

Yapılan çalışmalarda sığır *PRNP* genini kodlayan bölgeler üzerinde gözlenen polimorfizmlerin BSE üzerine ya çok az ya da hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Sander et al., 2004; 2005). Sander ve ark. (2004) sığır *PRNP* geni üzerinde 60 polimorfizm saptamışlardır. Ancak bunların çoğunun BSE ile hiçbir ilgisinin olmadığını gözlemlemişler. Yaptıkları çalışmalar sonucunda dört insersiyon/delesyon (indel) içerisinde promotör bölgesinde yer alan 23-bç (baz çifti) indel'in ve birinci intronunda yer alan 12-bç indel'in bu hastalık ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (Sander et al., 2004; 2005) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sığır *PRNP* geni. a) Alman sığırlarında gözlenen 60 polimorfizm prion geni referans numaraları ile belirtilmiştir. BSE ile ilişkisi olduğu düşünülen dört indel polimorfizmleri oklar ile gösterilmiştir. b) Siyah kutular ekzon bölgeleridir (Sander et al., 2004).

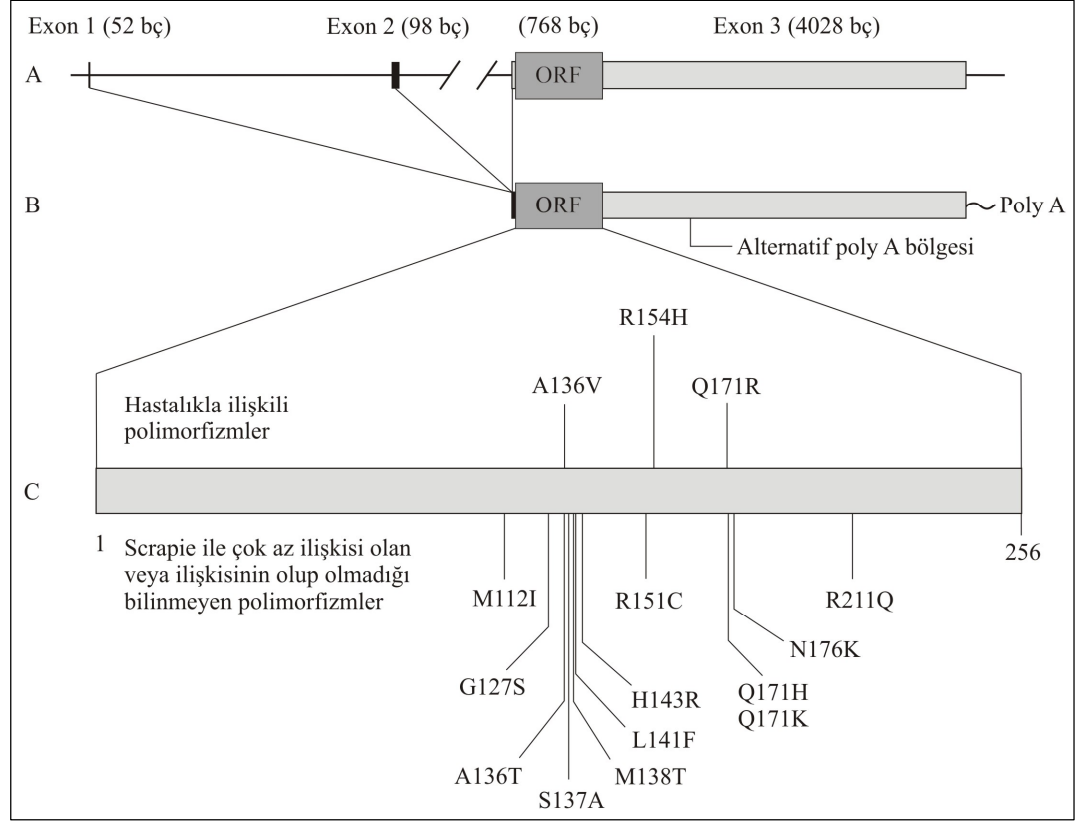
2.2.2. Scrapie

TSE hastalıklarından bir diğeri olan scrapie, koyun ve keçileri etkilemektedir (Hunter et al., 1994; Tranulis et al., 1999; Harrington et al., 2010). İlk kez 1732 yılında İngiltere’de koyun sürülerinde saptanmış bir hastalıktır (Detwiler and Baylis, 2003). 1960lı yılların başında hastalığa otozomal çekinik bir genin neden olduğu düşünüldüyse de sonrasında bunun maternal (anne kaynaklı) ve bulaşıcı bir hastalık olduğu rapor edilmiştir (Belt et al., 1995). Son görüşler ise genetik faktörlerin rol oynadığı bulaşıcı bir hastalık olduğudur (Belt et al., 1995; Tranulis, 2002).

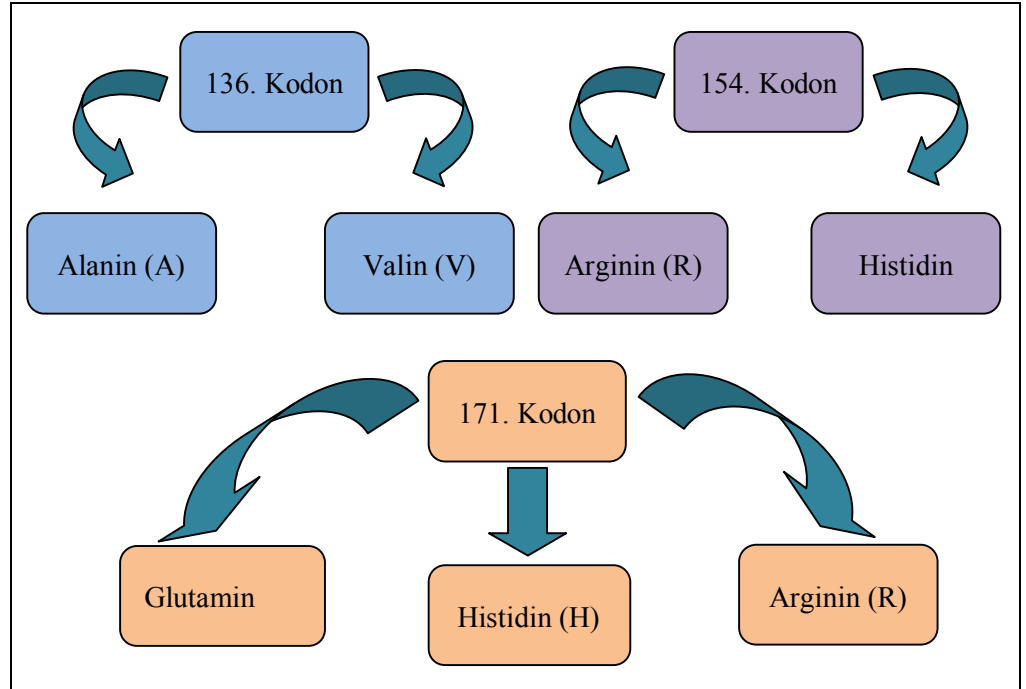
Hastalığın belirtileri koyundan koyuna değişmesine rağmen ilk semptomlar genelde davranışta gözlenir ve bu semptomlar içerisinde ortak olanı kaşıntıdır (CFSPH, 2007b). Kaşıntı nedeni ile hayvan sürtünür ve kendi kendini ısırır (CFSPH, 2007b). Hastalık ilerledikçe aşırı heyecan ve yürüyüş bozuklukları gözlenir (CFSPH, 2007b). Diğer semptomlar arasında kas koordinasyon bozukluğu, körlük, titreme ve sonrasında ise kilo kaybı gözlenir (CFSPH, 2007b). Çoğu hayvanda semptomların başlangıcından itibaren 2-6 hafta içerisinde hastalık ölüm ile sonlanırken bu süre altı aya kadar da uzayabilmektedir (CFSPH, 2007b)

Koyun *PRNP* geni 13. kromozom üzerinde yer alır ve 52, 98 ve 4028 bç’lik üç ekzondan oluşur (Tranulis, 2002). 768 bç’lik açık okuma bölgesi üçüncü ekzon üzerinde yer alır ve 256 aminoasitlik bir protein kodlar (Tranulis, 2002) (Şekil 2.3).

Scrapie ile ilişkili olan en önemli polimorfizmler ORF’de yer alan 136, 154 ve 171. kodonlarda gerçekleşen polimorfizmlerdir (Hunter, 1997; Thorgeirsdottir et al., 1999; Arnold et al., 2002). Saptanmış diğer polimorfizmler ise nadiren görülmüş ve ayrıca scrapie ile ilişkileri bulunamamıştır (Billinis et al., 2004). 136. kodona ya alanin (A) ya da valin (V) aminoasitlerinden biri gelebilir (Hunter et al., 1993). 154. kodona ise ya arginin (R) ya da histidin (H) aminoasitlerinden biri gelebilir (Tranulis et al., 1999). 171. kodona ise glutamin (Q), histidin (H) veya arginin (R) aminoasitlerinden biri gelebilir (Hunter et al., 1994; Baylis et al., 2004) (Şekil 2.4). 136. kodondaki valin scrapie’ye duyarlılıkla ilişkili iken alanin ise dayanıklılıkla ilişkilidir (Detwiler and Baylis, 2003; Baylis et al., 2004; CFSPH, 2007b). 154. kodondaki arginin scrapie’ye karşı duyarlılıkla ilişkili iken histidin dayanıklılıkla ilişkilidir (Detwiler and Baylis, 2003; Baylis et al., 2004; CFSPH, 2007b). 171. kodondaki glutamin ile histidin scrapie’ye duyarlılıkla ilişkili iken



Şekil 2.3. A) Koyun *PRNP* geni. ORF: Açık okuma bölgesi B) Alternatif poly A bölgesi. C) Scrapie hastalığı ile ilişkili polimorfizmler üst kısımda, hastalıkla ilişkisi tam olarak bilinmeyen polimorfizmler alt kısımdadır (Tranulis, 2002'den değiştirilerek).



Şekil 2.4. Koyun *PRNP* geninin 136, 154 ve 171. kodonlarındaki alternatif aminoasitler.

arginin ise dayanıklılıkla ilişkilidir (Detwiler and Baylis, 2003; Baylis et al., 2004; CFSPH, 2007b).

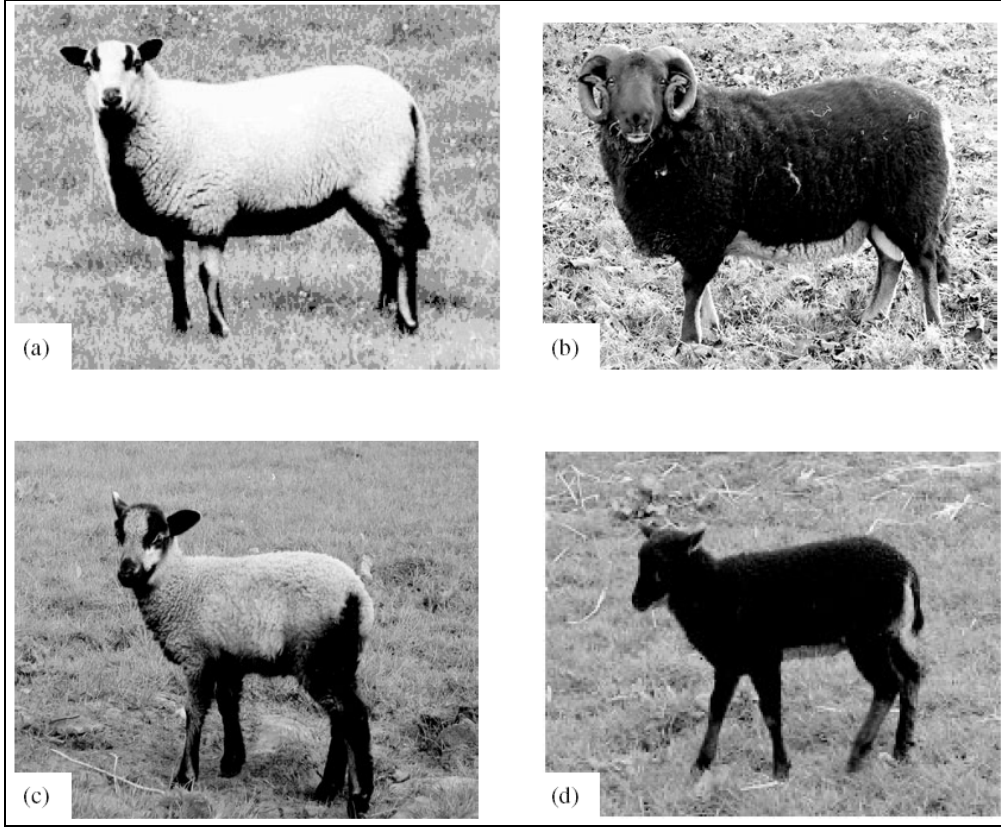
136, 154 ve 171. kodonlardaki değişen bu amino asitler ile toplamda 12 allel oluşturulabilirken bunlardan sadece beş tanesi anlamlı bir değerde görülmüştür (Baylis et al., 2004). Bu beş allel ARR ($A_{136}R_{154}R_{171}$), ARQ, AHQ, ARH ve VRQ şeklindedir. Bu beş allel baz alınarak oluşturulan kombinasyonlardan ise en çok gözlenen 15 PrP genotipi elde edilerek scrapie risk grupları oluşturulmuştur (Arnold et al., 2002; Garcia-Crespo et al., 2004) (Çizelge 2.2). R1-R5 arasında oluşturulan bu risk grupları içerisinde yer alan farklı genotipler, scrapie hastalığına karşı duyarlılıkta değişkenlik göstermektedirler (Baylis et al., 2004). R1 grubunda yer alan ARR/ARR genotipi scrapie'ye karşı en dayanıklı genotipten VRQ/VRQ genotipi ise en duyarlı olan genotiptir (Arnold et al., 2002) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Scrapie risk grupları ve genotipleri (Garcia-Crespo et al., 2004'den değiştirilerek).

Risk Grupları	Genotip
R1	ARR/ARR
R2	ARR/AHQ
	AHQ/AHQ
R3	ARR/ARQ
	ARR/ARH
	ARQ/AHQ
	AHQ/ARH
R4	ARH/ARH
	ARQ/ARH
	ARQ/ARQ
	ARR/VRQ
	AHQ/VRQ
R5	ARH/VRQ
	ARQ/VRQ
	VRQ/VRQ

Bu hastalık ile mücadele etmek için yapılan scrapie kontrol çalışmaları birçok ülkede uygulanmaktadır. Bu programların temel amacı hastalığa dayanıklı ARR frekansını arttırmak ve duyarlı olan VRQ allelinin frekansını ise azaltmaktır. Fakat bu allel seçiliminin, diğer koyun karakteristiklerini etkileyen genlere negatif bir etkisi olabilir mi? Post rengi geni haritalama çalışmaları *PRNP* geni ile post karakterleri arasında bir ilişki olduğunu desteklemektedir (Sawalha et al., 2009). Koyunlardaki post rengi karakterleri 14. kromozom üzerinde yer alan *Extension* geni ve 13. kromozom üzerinde yer alan *Agouti* geni tarafından kontrol edilmektedir (Våge et al., 2003; Sawalha et al., 2009). Buradan anlayacağımız gibi post karakterlerini kontrol eden major genlerden biri olan *Agouti* geni de *PRNP* geni ile aynı kromozom üzerinde yer almaktadır. Bu veriler de *PRNP* ve *Agouti* genleri arasında bir ilişki (linkage disequilibrium) olabileceğini göstermektedir (Sawalha et al., 2009). Bunu destekler nitelikte olan bir çalışmada da *PRNP* geni ve post karakterleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Sawalha et al., 2009).

Sawalha ve ark. (2009) göre post karakterleri ve *PRNP* geni arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Yaptıkları çalışmada Badgerfaced Welsh Mountain ve Shetland koyun ırklarını kullanmışlardır (Şekil 2.5). Badgerfaced Welsh Mountain ırkını Torddu ve Torwen, Shetland ırkını ise Katgomet ve Gulgomet olarak iki farklı alt kategori içinde toplamışlardır. Torddu ve Katgomet alt kategorileri ırk bazında farklı olmalarına rağmen fenotipik olarak benzerdir: açık renkli dorsal yüzey ve koyu renkli abdominal yüzey. Aynı şekilde Torwen ve Gulgomet alt kategorileri de ırk bazında farklı olmalarına rağmen fenotipik olarak benzerdir: koyu renkli dorsal yüzey ve açık renkli abdominal yüzey. Fenotipik olarak benzer alt kategoriler genotipik olarak da benzer çıkmıştır (Torddu-Katmoget: çoğunlukla VRQ/VRQ genotipli ve Torwen-Gulgomet: çoğunlukla ARR/ARR genotipli).



Şekil 2.5. Badgerfaced Welsh Mountain ve Shetland koyunlarında post rengi karakterleri. Torddu Welsh Mountain (a) ve Katmoget Shetland (c) koyunlarının dorsali açık, abdominali koyu renklidir. Torwen Welsh Mountain (b) ve Gulgomet Shetland (d) koyunlarının dorsali koyu, abdominali açık renklidir (Sawalha et al., 2009).

3. TEZİN AMACI

Bu tezin amacı, Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan Bandırma, Sakız, Morkaraman ve Kıvırcık koyun ırklarının PrP genotipleri ile post rengi karakterlerinin karşılaştırılarak aralarında bir korelasyon oluşturulmasıdır.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Kullanılan Materyal

4.1.1. Bandırma koyunu

Siyah başlı Alman et koçları ile Kıvırcık koyunlarının çiftleşmesi ile oluşmuş melez bir ırktır (Yeniyurt, 2012a). Güney Marmara bölgesinde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yeniyurt, 2012a). Bu ırkın baş ve ayak bölgeleri siyah olup vücudun diğer kısımları beyaz renktedir. Et üretimi bakımından ise oldukça verimli bir ırktır (Yeniyurt, 2012a). Yeni doğan kuzuların ise hayatta kalma oranı %95 gibi oldukça yüksek bir değerdedir (Yeniyurt, 2012a).



Şekil 4.1. Bandırma koyunu (Yeniyurt, 2012a'dan değiştirilerek).

4.1.2. Sakız koyunu

Anavatanı Türkiye olan bu ırk koyunları adını Ege Denizi'ndeki Sakız Adası'ndan almıştır (Yeniyurt, 2012b). Bu ırk Çeşme koyunu olarak da bilinmektedir. Çeşme, Karaburun, İzmir, Aydın, Söke ile Marmara ve Ege sahillerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yeniyurt, 2012b).

Göz, ağız, burun ucu, kulak ve ayaklarda siyah lekeler bulunmaktadır. Bu lekeler dışında kalan vücut bölgeleri ise beyaz renktedir (Yeniyurt, 2012b). Özellikle süt ve döl verimi yüksek olduğu için yetiştiriciliği yapılan bir ırktır

(Yeniyurt, 2012b). Yeni doğan kuzuların ise hayatta kalma oranı Bandırma koyununa benzer olarak %93 gibi oldukça yüksek bir değerdedir (Yeniyurt, 2012b).



Şekil 4.2. Sakız koyunu (Yeniyurt, 2012b'den değiştirilerek).

4.1.3. Morkaraman koyunu

Morkaraman ırkının anavatanı Türkiye'dir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b). Doğu Anadolu bölgesinde (Sivas ve Malatya'nın doğusundan başlayarak Erzurum, Ağrı, Van, Kars ve Muş illerinde) nadiren de Orta Anadolu bölgesinde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b).

Bu ırkın post rengi kıızıdan mora kadar değişen birçok renk tonundan oluşmaktadır (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b). Göz, ağız ve burun etrafı daha açık, baş ve ayaklar vücuda nazaran daha koyu renklidir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b). Süt verimi yüksektir ancak öncelikle et verimi için yetiştiriciliği yapılan bir ırktır (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b). Yeni doğan kuzuların hayatta kalma oranı Bandırma ve Sakız ırkına benzer olarak %91,3 gibi oldukça yüksek bir değerdedir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b).



Şekil 4.3. Morkaraman koyunu (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012b'den değiştirilerek).

4.1.4. Kıvırcık koyunu

Anavatanı Türkiye'dir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a). Ülkemizde başta Trakya bölgesi olmak üzere Marmara bölgesi ve kuzey Ege bölgesinde yetiştirilmektedir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a). Öncelik sırasına göre et, süt, yapağı'dır (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a).

Vücut genellikle beyaz olup siyah ve alacalara rastlanmaktadır (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a). Eti lezzetli bir ırktır ve çok tercih edilir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a). Mor karaman ırkında olduğu gibi et verimini süt verimi takip etmektedir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a). Yeni doğan kuzuların hayatta kalma oranı diğer üç ırka benzer olarak %96,4 gibi oldukça yüksek bir değerdedir (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a).



Şekil 4.4. Kıvırcık koyunu (Yeniyurt ve Demirtaş, 2012a'dan değiştirilerek).

4.2. Koyun Kanından Genomik DNA Eldesi

Analizler için Bandırma (54 adet) ve Sakız (32 adet) ırklarından toplam 84 adet koçun genomik DNA'sı kullanılmıştır. Bunun için koç kanları 2 ml'lik EDTA'lı tüplere alınmıştır. DNA izolasyonu QIAamp Mini DNA Isolation Kit (QIAGEN) kullanılarak yapılmıştır. Kitin manüeline uygun olarak yapılan izolasyon işlemi sonucunda, son hacim 200 µl olacak şekilde ultra saf su içerisinde çözülmüş genomik DNA elde edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır. İzolasyon işleminin doğruluğunu kanıtlamak üzere elde edilen genomik DNA'lar % 0,8'lik agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Elektroforez işlemi 1X LB (10 mM lithium borate, pH 8,5) tampon çözeltisinde, 200 V'da, 30 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

4.3. PCR-RFLP Analizleri

Scrapie hastalığına ilişkin 136., 154. ve 171. kodonlardaki polimorfizimlerin belirlenmesinde PCR (Polimerase Chain Reaction) ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizleri kullanılmıştır.

4.3.1. PCR analizi

PCR işlemi ikiye ayrılarak gerçekleştirilmiştir (PCR-A ve PCR-B olarak anılacaktır). PCR-A ve PCR-B tepkimesine ilişkin koşullar Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. PCR mastermix solüsyonu hazırlanarak 0,2 µl'lik tüplere dağıtılmıştır. Her bir tepkime için 1 U DreamTaq Green Polymerase (Fermentas), 1X Reaction Buffer (Fermentas), 0,2 mM dNTP karışımı (Fermentas), 0,2 µM forward-reverse primer (IONTEK) ve yaklaşık 100 ng DNA kullanılmıştır. Bu karışım üzerine toplam hacim 25 µl olacak şekilde ultra saf su eklenmiştir. Her iki PCR işlemi için aynı karışım kullanılmıştır. PCR-A için F1 5'-GTGTACTACAGACCCGTGGA-3', R1 5'-CATTTGCTCCACCACTCGCT-3' ve PCR-B için F2 5'-GGCCTTGGTGGCTACATGCT-3', R2 5'-TGCACAAAGTTGTTCTGGTTAGTA-3' primerleri (Gracia-Crespo et al., 2004) kullanılarak sırası ile 159 ve 161 bp uzunluklarında PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 4.5). PCR ürünlerinin doğru şekilde çoğaltıldığını saptamak için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır [% 3'lük agaroz jel, 1X LB (10 mM lithium borate, pH 8.5) tampon çözeltisi, 180 V, 45 dakika].

Çizelge 4.1. A) PCR-A koşulları B) PCR-B koşulları.

A)	B)
94 °C – 4 dk	94 °C – 4 dk
94 °C – 30 sn	94 °C – 30 sn
55 °C – 30 sn	57 °C – 30 sn
72 °C – 30 sn	72 °C – 30 sn
72 °C – 10 dk	72 °C – 10 dk
4 °C – ∞	4 °C – ∞

```

ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATG
TGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAACCTGGCGGAGGATG
GAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAACC
GCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGGC
TGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGG
GGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGTCA
GTGGAACAAGCCCAGTAAGCCAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAG
CTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAA
GTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTT
ACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGACCAG
TGGATCAGTATAGTAACCAGAAAACTTTGTGCAATGACTGTGTCAACATCA
CAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACC
GAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATCAC
CCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCAAGTGTGA
TCCTCTTTCTTCCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTTTCTCATTTTTCTCA
TAGTAGGATAG

```

Şekil 4.5. National Center for Biotechnology Information'a (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ait veritabanından alınmış koyun (*Ovis aries*) PRNP gen dizisinin FASTA formatındaki gösterimi (Erişim Numarası: AF195247.1). Gri – F1 primer, kırmızı – R1 primer, yeşil – F2 primer ve sarı – R2 primer, turuncu renkle işaretli kodonlar sırasıyla 136., 154. ve 171. kodonları göstermektedir.

4.3.2. RFLP analizi

Öncelikle RFLP işlemi için master mix solüsyonu hazırlanmış ve 0,5 ml'lik tüplere dağıtılmıştır. Her bir tepkime için 0,5 µl kesim enzimi, 2 µl Reaction Buffer (Fermentas), 5 µl PCR ürünü kullanılmıştır. Bu karışım üzerine toplam hacim 20 µl olacak şekilde ultra saf su eklenmiştir.

171. kodon üzerinde yer alan PrP polimorfizmlerini belirlemek için PCR-A ürünü *Bs*II (Fermentas) fast digest enzimi ile (57 °C'de 10 dk.) ve PCR-B ürünü *Acc*I (Fermentas) fast digest enzimi ile (57 °C'de 90 dk.) muamele edilmiştir. 136

ve 154. kodonlarda yer alan PrP polimorfizimlerini belirlemek için ise PCR-B ürünü *Bsp*HI (Fermentas) fast digest enzimi ile (57 °C’de 10 dk.) muamele edilmiştir. RFLP yöntemi ile elde edilen bu kesim ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir [% 3’lük agaroz jel, 1X LB (10 mM lithium borate, pH 8.5) tampon çözeltisi, 150 V, 90 dakika].

4.4. Polimorfizmlerin Belirlenmesi

*Acc*I (GT↓MKAC) enzimi 171. kodondaki hem arjinin (R) hem de glutamin (Q) aminoasidini kodlayan diziyi keserken histidin (H) aminoasidini kodlayan diziyi kesmez. *Bs*II (CCNNNN↓NNGG) enzimi 171. kodondaki R aminoasidini kodlayan diziyi keserken Q ve H aminoasidini kodlayan diziyi kesmez. *Bsp*HI (T↓CATAG) enzimi ise 136 ve 154. kodondaki valin (V) aminoasidini kodlayan diziyi keserken alanin (A) aminoasidini kodlayan diziyi kesmez. Bu bilgiler doğrultusunda farklı uzunluklardaki RFLP ürünü fragmanlarına ilişkin jel görüntüleri Çizelge 4.2 kullanılarak yorumlanmış ve bireysel polimorfizmler belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. PrP gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için kullanılan PCR-RFLP modeli (Garcia-Crespo et al., 2004).

136. ve 154. Kodonlar	PCR-B <i>Bsp</i> HI	171. Kodon	PCR-A <i>Bs</i> II	PCR-B <i>Acc</i> I
AR / AR	162	RR	81, 58, 20*	136, 28*
AH / AH	80, 82	QQ	101, 58	136, 25*
VR / VR	132, 30	HH	101, 58	161
AR / AH	162, 80, 82	RQ	101, 81, 58, 20*	136, 25*
VR / AR	162, 132, 30	RH	101, 81, 58, 20*	161, 136, 25*
VR / AH	132, 80, 82, 30	QH	101, 58	161, 136, 25*

* Bu bantlar, % 3’lük agaroz jelde her zaman görülmezler.

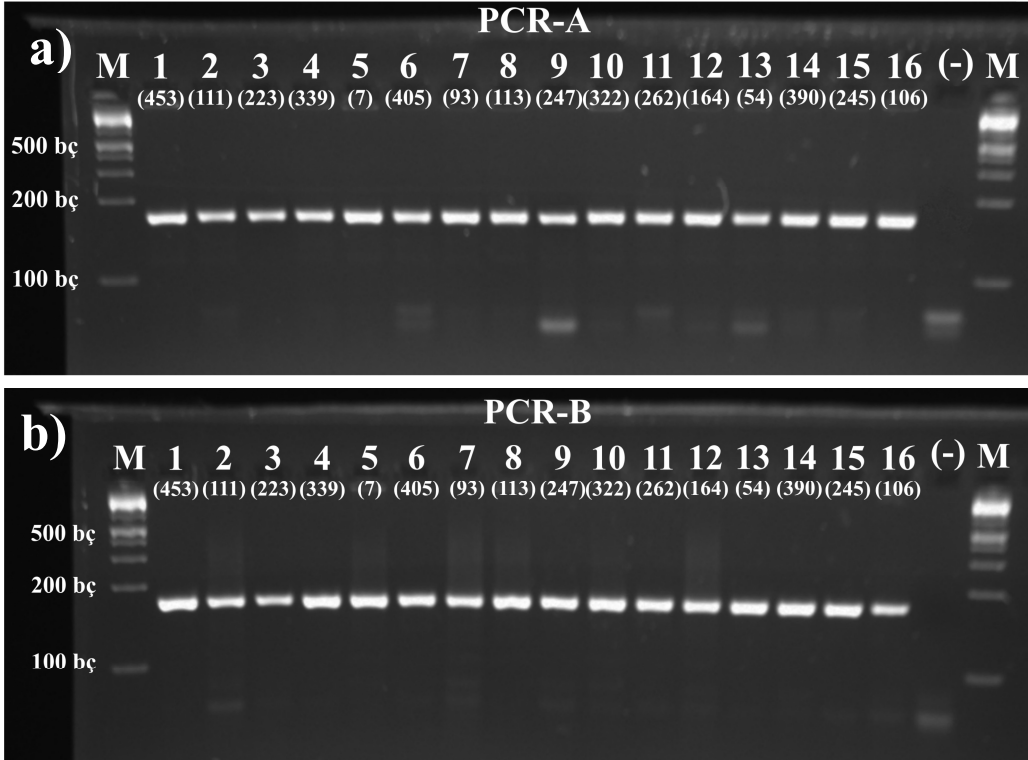
4.5. Kullanılan Populasyon Genetiği Programları

Bandırma ve Sakız ırklarından elde edilen RFLP verileri GenAlex v6.3 (Peakell and Smouse, 2006) programı kullanılarak yorumlanmıştır. Örneklenemeyen Morkaraman ve Kıvırcık ırklarına ait allel ve genotip frekansları için literatür verisi kullanılmıştır. Dört ırk arasındaki allelik ve genotipik karşılaştırmalar için ise Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) programı kullanılmıştır.

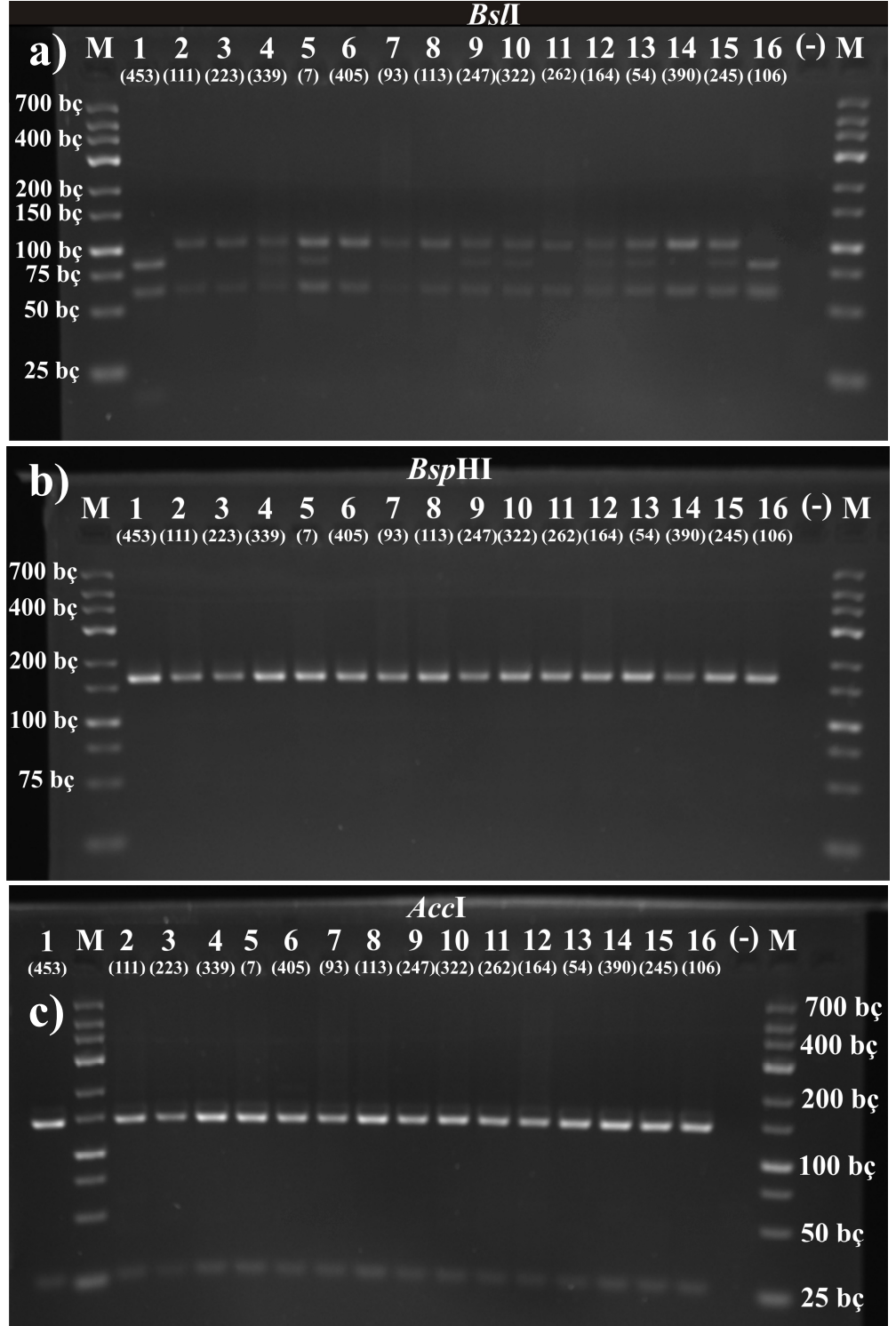
5. BULGULAR

5.1. Bandırma Irkı Koyunlarının Polimorfizmleri

Şekil 5.1a ve Şekil 5.1b, sırasıyla PCR-A ve PCR-B analizleri sonrasında Bandırma koyun ırkına ait *PRNP* geninin 159 ve 161 bç'lik bölgelerini göstermektedir. PCR-RFLP analizleri sonrasında gözlenen polimorfizimler Çizelge 4.2 kullanılarak belirlenmiştir. PCR-A ürününün BslI (Şekil 5.2a), PCR-B ürününün BspHI (Şekil 5.2b) ve AccI (Şekil 5.2c) enzimleri ile kesilmesi sonrasında elde edilen gel görüntüleri ARQ, ARR ve VRQ allellerinin bu koyun ırkında mevcut olduğunu göstermektedir (Çizelge 5.1a). Bandırma koyun ırkının genotipleri ise ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR ve ARQ/VRQ şeklindedir (Çizelge 5.1b).



Şekil 5.1. Koyun *PRNP* geninin **a)** 159 bç'lik (PCR-A) bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen gel görüntüsü **b)** 161 bç'lik (PCR-B) bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen gel görüntüsü [M: Marker, (-): Negatif kontrol] (Örnek numaralarının ayrıntılı bilgisi için Ek 1'e bakınız).



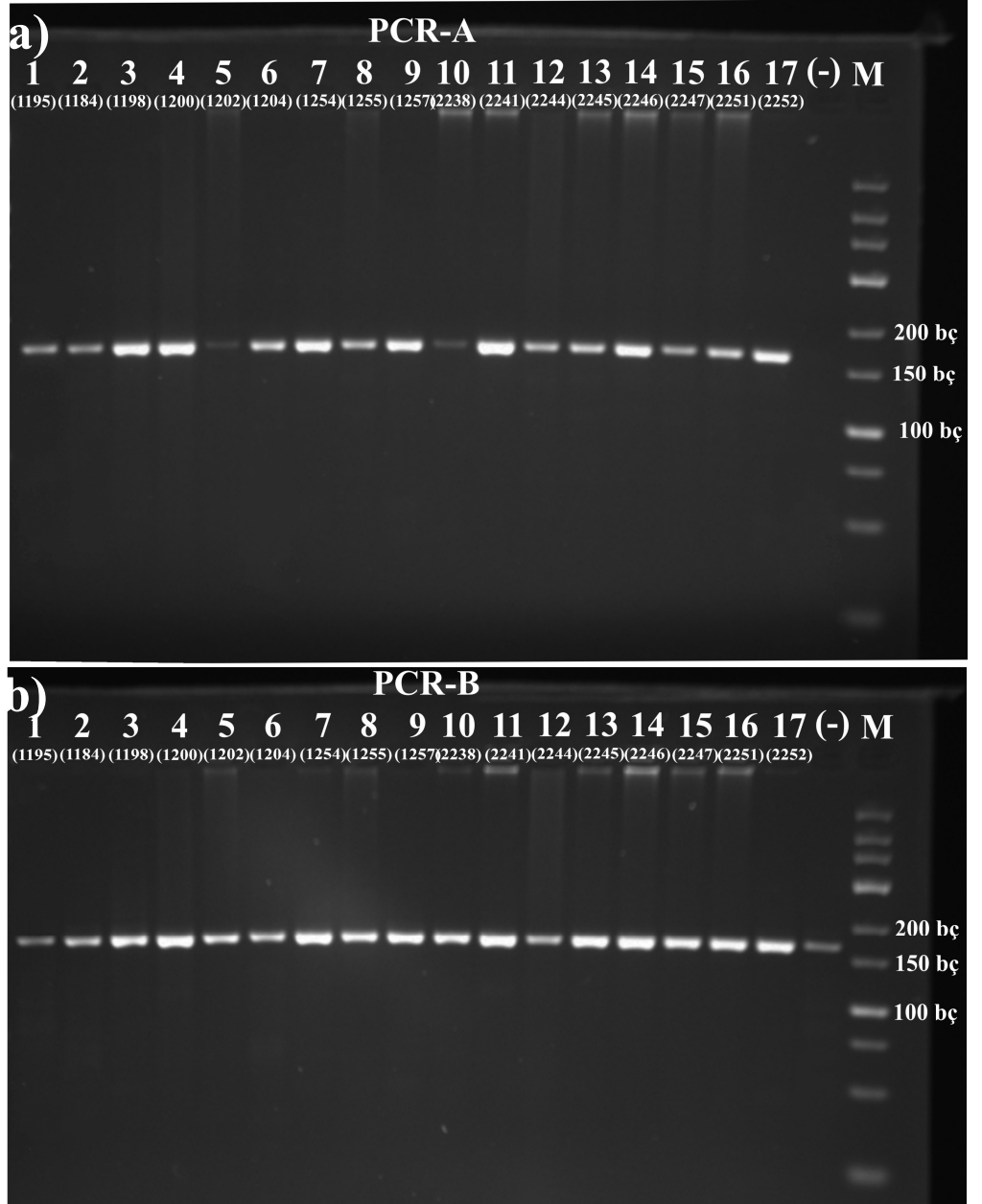
Şekil 5.2. a) PCR-A ürününün RFLP (*BspI* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü b) PCR-B ürününün RFLP (*BspHI* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü c) PCR-B ürününün RFLP (*AccI* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü [M: Marker, (-): Negatif kontrol] (Örnek numaralarının ayrıntılı bilgisi için Ek 1'e bakınız).

Çizelge 5.1. Bandırma koyunlarındaki a) alleller b) genotipler ve risk grupları.

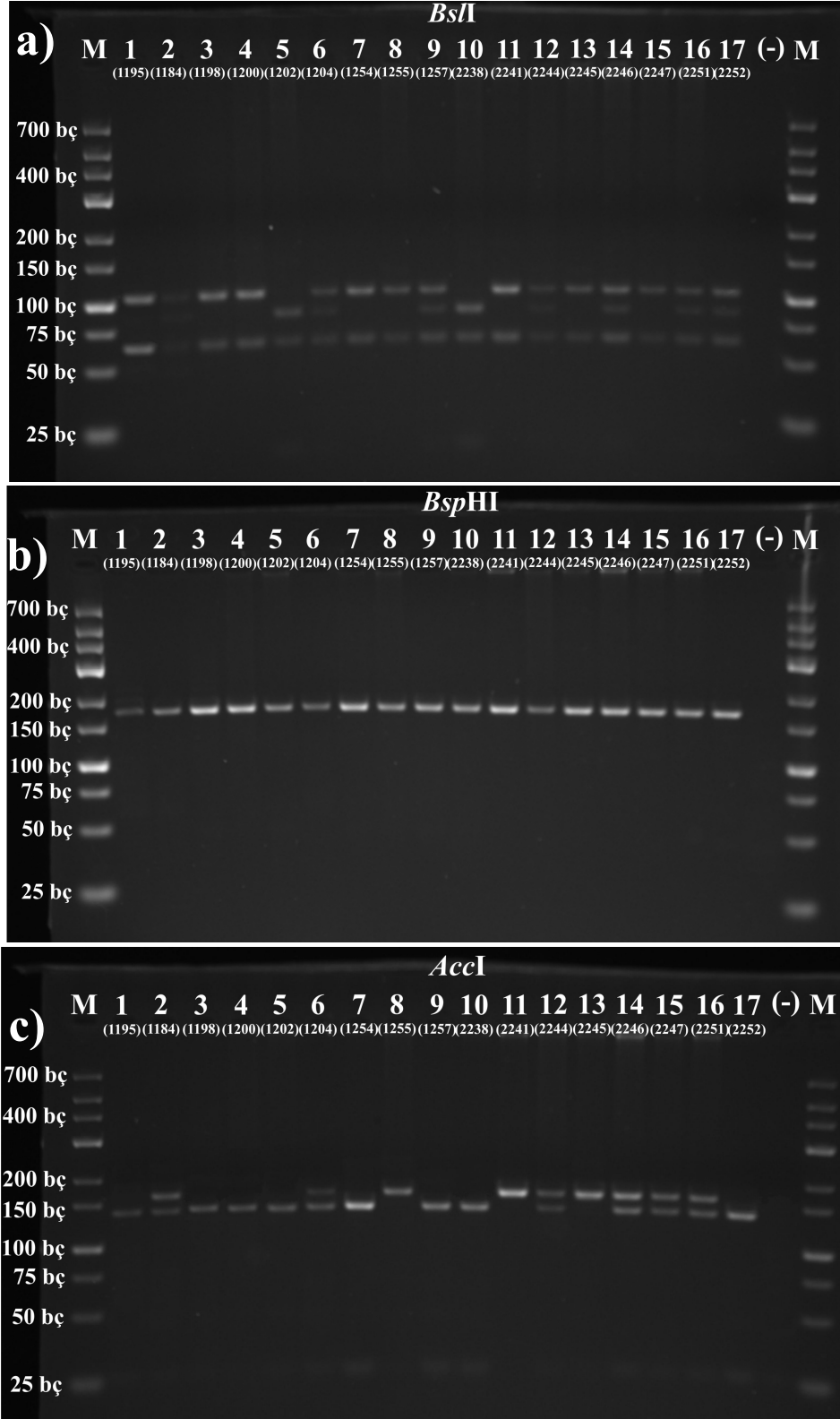
a)		ALLEL	ALLEL SAYISI
		ARR	31
		ARQ	76
		VRQ	1
		TOPLAM	108
b)			
GENOTİP	GENOTİP SAYISI	RİSK GRUBU	
ARR/ARR	5	R1	
ARR/ARQ	21	R3	
ARQ/ARQ	27	R4	
ARQ/VRQ	1	R5	
TOPLAM	54		

5.2. Sakız Irkı Koyunlarının Polimorfizmleri

Şekil 5.3a ve Şekil 5.3b, sırasıyla PCR-A ve PCR-B analizleri sonrasında Sakız koyun ırkına ait *PRNP* geninin 159 ve 161 bç'lik bölgelerini göstermektedir. PCR-RFLP analizleri sonrasında gözlenen polimorfizimler Çizelge 4.2 kullanılarak belirlenmiştir. PCR-A ürününün *BsI* (Şekil 5.4a), PCR-B ürününün *BspHI* (Şekil 5.4b) ve *AccI* (Şekil 5.4c) enzimleri ile kesilmesi sonrasında elde edilen gel görüntüleri ARR, ARQ, ARH, AHQ ve VRQ allellerinin bu koyun ırkında mevcut olduğunu göstermektedir (Çizelge 5.2a). Sakız koyun ırkında en fazla gözlenen genotipler ise ARR/ARR, ARR/ARQ, ARQ/ARQ ve ARH/ARR şeklindedir (Çizelge 5.2b).



Şekil 5.3. Koyun *PRNP* geninin **a)** 159 bç'lik (PCR-A) bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen jel görüntüsü **b)** 161 bç'lik (PCR-B) bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen jel görüntüsü [M: Marker, (-): Negatif kontrol] (Örnek numaralarının ayrıntılı bilgisi için Ek 1'e bakınız).



Şekil 5.4. a) PCR-A ürününün RFLP (*BsII* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü b) PCR-B ürününün RFLP (*BspHI* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü c) PCR-B ürününün RFLP (*AccI* enzimi ile) işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü [M: Marker, (-): Negatif kontrol] (Örnek numaralarının ayrıntılı bilgisi için Ek 1'e bakınız).

Çizelge 5.2. Sakız koyunlarındaki a) alleller b) genotipler ve risk grupları.

a)		
ALLEL	ALLEL SAYISI	
ARR	21	
ARQ	21	
ARH	18	
AHQ	3	
VRQ	1	
TOPLAM	64	
b)		
GENOTİP	GENOTİP SAYISI	RİSK GRUBU
ARR/ARH	8	R3
ARR/ARQ	7	R3
ARQ/ARQ	6	R4
ARH/ARH	5	R4
ARR/ARR	3	R1
ARQ/AHQ	2	R3
AHQ/VRQ	1	R4
TOPLAM	32	

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

GenAlex programı kullanılarak beş farklı istatistiksel analiz yapılmıştır. Bunlardan ilki aminoasit, allel ve genotip frekansı hesaplamalarıdır. İkincisi, populasyonlar içi rastgele üremenin olup olmadığını gösteren null-hipotezi testidir (Hardy-Weinberg dengesi). Üçüncüsü, frekanslar üzerinden hesaplaması yapılan ve populasyonlar arası genetik çeşitliliği veya heterozigotluğu gösteren F_{ST} hesaplamasıdır. Bir diğeri, populasyonlar arası genetik benzerliği veren Nei Genetik Benzerlik analizidir. Sonuncusu ise populasyonlar arası moleküler varyansı gösteren AMOVA testidir. Tüm istatistiksel hesaplamalar % 99 güven aralığı kullanılarak elde edilmiştir.

Bandırma ve Sakız ırklarının aminoasit frekansları Çizelge 6.1’de, allel ve genotip frekansları ise Çizelge 6.2’de gösterilmiştir. Görüldüğü üzere Bandırma ırkının 154 ve 171. kodonlarında histidin aminoasidi gözlenmezken Sakız ırkının 154 ve 171. kodonlarında histidin aminoasidi gözlenmektedir. Ayrıca Bandırma ırkı 154. kodonda arginin aminoasidi için monomorfiktir. Bandırma ırkında en çok gözlenen allel ARQ iken Sakız ırkında en çok gözlenen alleller ARQ ve ARR olmuştur. ARQ/ARQ ve ARR/ARQ Bandırma ırkında, ARR/ARH ve ARR/ARQ ise Sakız ırkında en çok gözlenen genotiplerdir.

Çizelge 6.1. Populasyonlara ait aminoasit frekansları.

Kodon	Aminoasit	Bandırma	Sakız
136	Alanin	0,991	0,984
	Valin	0,009	0,016
154	Arginin	1,000	0,953
	Histidin	0,000	0,047
171	Arginin	0,278	0,328
	Histidin	0,000	0,281
	Glutamin	0,713	0,391

Çizelge 6.2. Populasyonlara ait allel (a) ve genotip (b) frekansları [Morkaraman (Frootan et al., 2012) ve Kıvırcık (Ün et al., 2008a)].

a)		b)							
Allel	Bandırma (n=54)	Sakız (n=32)	Morkaraman (n=34)	Kıvırcık (n=42)	Genotip	Bandırma (n=54)	Sakız (n=32)	Morkaraman (n=34)	Kıvırcık (n=42)
ARR	0,2780	0,3280	0,1756	0,4205	ARR/ARR	0,0930	0,0940	0,0000	0,1360
					ARR/ARQ	0,3890	0,2190	0,2972	0,4540
ARQ	0,7130	0,3280	0,6216	0,5114	ARQ/ARQ	0,5000	0,1880	0,3783	0,2720
					ARQ/VRQ	0,0190	0,0000	0,0000	0,0220
ARH	0,0000	0,2810	0,1216	0,0000	ARR/ARH	0,0000	0,2500	0,0270	0,0000
					ARH/ARH	0,0000	0,1560	0,0000	0,0000
AHQ	0,0000	0,0470	0,0000	0,0000	ARQ/AHQ	0,0000	0,0630	0,0000	0,0000
					AHQ/VRQ	0,0000	0,0310	0,0000	0,0000
VRQ	0,0090	0,0160	0,0405	0,0341	ARQ/ARH	0,0000	0,0000	0,1891	0,0000
					ARR/VRQ	0,0000	0,0000	0,0270	0,0450

PrP genotiplerine ait null-hipotezi analizi Ki-Kare (Chi-Squared) testi kullanılarak hesaplanmıştır. Bandırma ırkının hem her bir kodonu hem de genotipi için Ki-Kare testi istatistiksel anlamda önemsizdir ($P>0,01$) (Çizelge 6.3). Bu durumda null-hipotezi (H_0) kabul edilir ve Bandırma ırkı rastgele üreme eğilimi göstermektedir. Sakız ırkının hem genotip P değeri hem de 171. kodon P değeri istatistiksel anlamda önemli ($P<0,01$) iken 136 ve 154. kodon P değerleri istatistiksel anlamda önemsizdir ($P>0,01$) (Çizelge 6.3). Kendi içinde çelişen bu durumun örneklem yetersizliği nedeni ile oluştuğu düşünülmektedir. Diğer istatistiksel analizler popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu görüldükten sonra yapılmıştır.

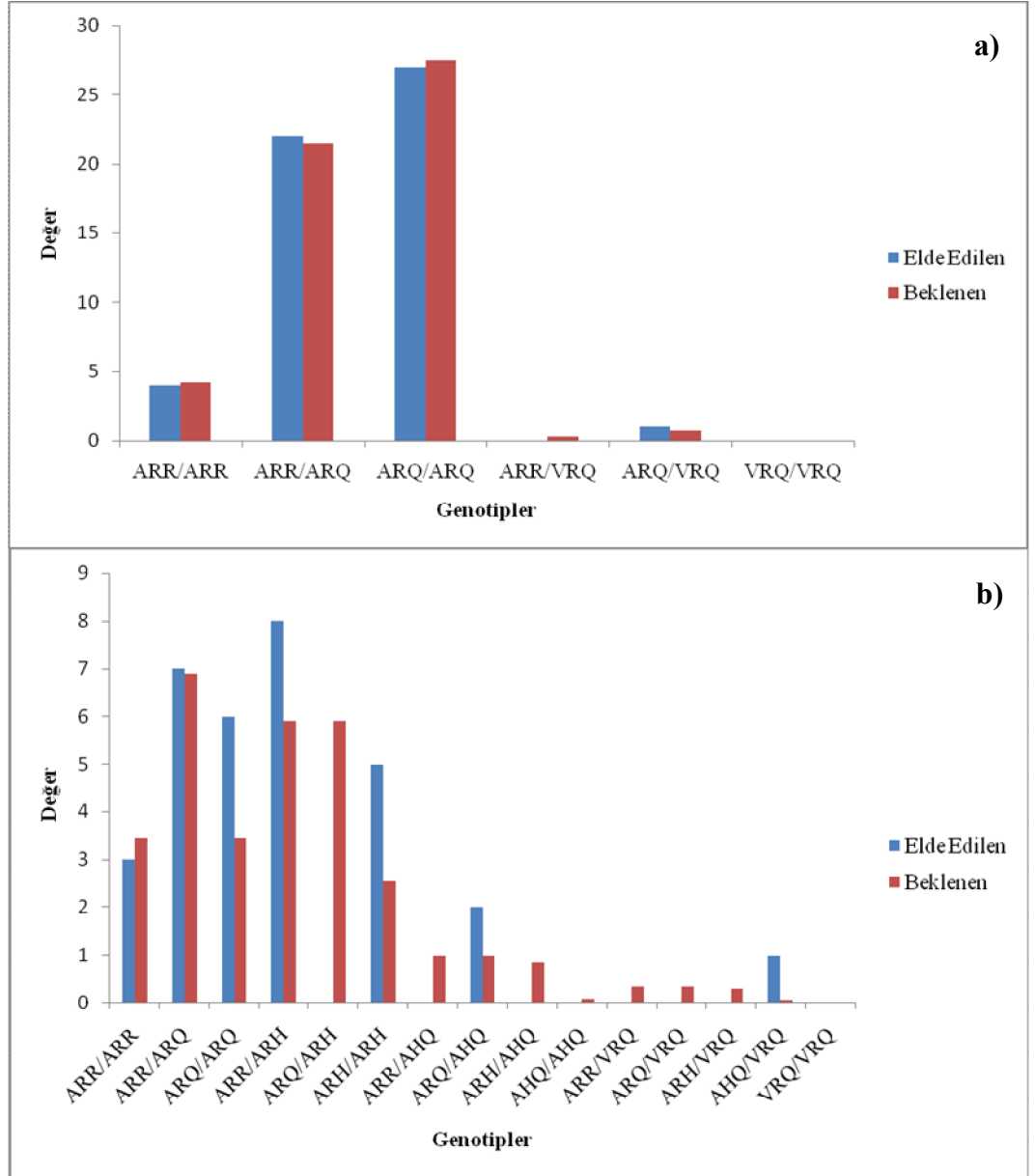
Hardy-Weinberg dengesi sonuçlarına göre Bandırma ve Sakız ırkı bireylerinde beklenen ve elde edilen genotip değerleri Grafik 6.1’de gösterilmiştir.

Allel frekansları kullanılarak hesaplanan Bandırma ve Sakız ırkları arası total genetik çeşitlilik (F_{ST}) değeri 0.035 ve genotip frekansları kullanılarak hesaplanan F_{ST} değeri ise 0.094 olarak bulunmuştur. Alleller ve genotipler ile hesaplanmış Nei Genetik Benzerlik analizi değerleri ise sırasıyla 0.963 ve 0.798 olarak hesaplanmıştır. Her iki F_{ST} değerinin sıfıra ve yine her iki Nei Genetik Benzerlik analizinin bire yakın olması iki ırk arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığını, diğer bir deyişle iki ırkın genetik açıdan oldukça benzer olduklarını ifade etmektedir.

Popülasyonlar arası genetik varyansı veren AMOVA sonuçları ise istatistiksel anlamda önemsizdir ($P\geq 0,01$). Her iki ırkın bireyleri genetik açıdan oldukça benzerdir ve sadece % 27’lik bir farklılık gösterir.

Çizelge 6.3. Popülasyonlara ait Ki-Kare testi P değerleri.

Popülasyon	Kodon	P Değeri	Genotip P Değeri
Bandırma	136	0,945	0,934
	154	Monomorfik	
	171	0,714	
Sakız	136	0,928	0,000
	154	0,781	
	171	0,003	



Grafik 6.1. Bandırma (a) ve Sakız (b) ırklarına ait elde edilen ve beklenen genotip değerleri.

Benzer fenotipe sahip Bandırma ve Sakız ırkları arasında yapılan bu çalışmaya farklı fenotipe sahip Morkaraman ve Kıvırcık ırklarının da dahil edilmesi PrP genotipleri ile post rengi karakterleri arasındaki korelasyonun daha iyi saptanabilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla, bu çalışmadan ve literatürden (Frootan et al., 2012; Ün et al., 2008a) elde edilen veri (Bkz. Çizelge 6.2) Arlequin programına girilerek dört ırk arasındaki genetik farklılık/benzerlik hesaplanmış ve ulaşılan sonuçlara göre PrP genotipleri ile post rengi karakterleri arasında ne gibi bir korelasyon olduğu saptanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen allelik F_{ST} P değerlerine (Çizelge 6.4) göre sadece benzer post karakterlerine sahip Bandırma ve Sakız ırkları benzerken ($0,0036 \pm 0,0001$), farklı post karakterlerine sahip ırklar arasında allelik açıdan benzerlik saptanmamıştır.

Genotipik F_{ST} P değerlerine (Çizelge 6.5) göre Bandırma ve Sakız ırkları arasında ($0,00082 \pm 0,0001$; $P < 0,01$) yine benzerlik saptanmakla beraber Çizelge 6.5'in tamamı incelendiğinde ise genotipik F_{ST} P değerleri arasında bir çelişki olduğu ortaya çıkmaktadır: Bandırma ırkının, Morkaraman ve Kıvırcık ırkına genotipik olarak benzer olmadığı, Sakız ırkının ise Morkaraman ve Kıvırcık ırkına genotipik olarak benzer olduğu gözlemlenmektedir. Fakat Bandırma ve Sakız ırkı arasındaki benzerlik nedeni ile Sakız ırkının da Morkaraman ve Kıvırcık ırkına genotipik açıdan benzer olması beklenmemektedir. Bu çelişkinin nedeni, Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gibi yetersiz örneklemeden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 6.4. Allelik F_{ST} P değerleri ve standart sapma matrisi, güven aralığı 0,01.

	Bandırma	Sakız	Morkaraman	Kıvırcık
Bandırma	*			
Sakız	0,00036±0,0001	*		
Morkaraman	0,23307±0,0012	0,01605±0,0004	*	
Kıvırcık	0,06223±0,0008	0,01817±0,0004	0,05606±0,0007	*

Çizelge 6.5. Genotipik F_{ST} P değerleri ve standart sapma matrisi, güven aralığı 0,01.

	Bandırma	Sakız	Morkaraman	Kıvırcık
Bandırma	*			
Sakız	0,00082±0,0001	*		
Morkaraman	0,10870±0,0010	0,00346±0,0002	*	
Kıvırcık	0,11557±0,00010	0,00308±0,0002	0,03991±0,0007	*

Bu çalışmada post rengi karakterleri açısından benzerlik sergileyen Bandırma ve Sakız ırkları arasında istatistiksel anlamda önemli derecede genetik benzerlik olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde Bandırma ırkı ile post rengi karakterleri açısından farklılık sergileyen Morkaraman ve Kıvırcık ırkları arasında

istatistiksel anlamda genetik farklılık olduğu saptanmıştır. Benzer fenotipe sahip ırkların benzer PrP genotipleri ve farklı fenotipe sahip ırkların farklı PrP genotipleri sergilemesi, *PRNP* geni ile post rengi karakterleri arasında bir korelasyon olabileceğini göstermekle beraber, post rengi karakterleri ve PrP genotipleri arasında doğrudan ilişki kurmak zordur. Bu tür bir ilişki için daha fazla renk varyasyonu içeren çok sayıda materyalde benzer çalışmalar yapılmalıdır.

Sawalha ve ark. (2009) bulguları ile bu tezde elde edilen sonuçlar doğrultusunda koyun *PRNP* geni ve post rengi karakterleri arasında bir korelasyonun olabileceği, *PRNP* geni ile ne gibi başka kantitatif karakterler arasında bir ilişki olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Örneğin İskoç Siyah Yüz (Scottish Blackface) koyunlarında PrP genotipleri ve vücut ağırlığı arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (Sawalha et al., 2008). Buna ek olarak ARQ alleleline sahip kuzuların hayatta kalma şanslarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Sawalha et al., 2007). Bandırma ve Sakız koyunlarında en çok gözlenen allelin ARQ oluşu Sawalha ve ark. (2007) desteklemektedir çünkü bu iki koyun ırkının en önemli özelliklerinden birisi yeni doğan kuzuların hayatta kalma yüzdesinin oldukça yüksek olmasıdır. Buna ek olarak yeni doğan kuzuların hayatta kalma yüzdesi yüksek olan Kıvırcık, Sakız ve İmroz gibi koyun ırklarının materyal olarak kullanıldığı başka bir çalışmada yine en fazla gözlenen ARQ alleli olmuştur (Ün et al., 2008a). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda (Hoekstra and Nachman, 2003; Gratten et al., 2008) vahşi memeli populasyonlarında post karakterleri ile fiziksel sağlık arasında da bir ilişki bulunmuştur. Bu örnekler doğrultusunda söyleyebiliriz ki PrP genotiplerindeki değişim post rengi karakterlerini etkileyebilirken, post karakterlerindeki değişiklikler de diğer bazı kantitatif karakterleri etkileyebilmektedir.

Avrupa Birliği 2003 yılında scrapie hastalığına karşı dayanıklı koyun yetiştirme programları kurulmasına karar verilmiştir (EU, 2003). Bu karar doğrultusunda koyun ırklarında scrapie hastalığına karşı daha dirençli olan ARR allelinin arttırılması hedef alınmıştır. Fakat yukarıda verilen örnekler doğrultusunda söyleyebiliriz ki ARR allelinde yapılan bu gibi bir değişiklik ile diğer birçok kantitatif karakter etkilenebilmektedir. Kısacası Avrupa Birliği (2003) tarafından alınan bu karar, birçok açıdan değerlendirildikten sonra uygulanması gerekli olan bir durum gibi gözükmektedir. Çünkü allel bazında bir değişim, hayvanların sağlığından (Hoekstra and Nachman, 2003; Gratten et al., 2008) yeni doğan kuzuların hayatta kalma şanslarına (Sawalha et al., 2007) kadar

birçok farklı konuda etki gösterebilmektedir. Ayrıca Sawalha ve ark. (2009) bulguları ile bu tezde elde edilen sonuçlar doğrultusunda allel bazındaki değişiklikler post rengi karakterlerini etkileyebilmektedir. Buna bağlı olarak allel bazındaki farklılıklar hayvanların sağlıklarını etkileyebilir, yeni doğan kuzularda hayatta kalma şanslarını değiştirebilir ve post karakterlerdeki değişimle beraber fenotipik kayıplara bile neden olabilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus, her bir detayın ve tüm olası etkileşimlerin dikkate alınarak en uygun yetiştirme programlarının bulunmasıdır.

Avrupa Birliği'nin 2003 yılında aldığı kararın Türkiye'de uygulanabilmesi için öncelikle koyun ırklarının scrapie hastalığına karşı direnç düzeylerinin belirlenmesi ve sonrasında ise bu düzeylere uygun yetiştirme programlarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca Türkiye'de uygulanacak yetiştirme programlarına destek olabilecek ve prion genetiği için veri oluşturacak çalışmalar yetersiz sayıdadır. Bu nedenle, Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan koyun ırklarında PrP genotiplerinin belirlenmesi (Ün et al., 2008a), sığır ırklarında *PRNP* genine ait promotor bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesi (Ün et al., 2008b) ve Anadolu montofununda *PRNP* genine ait promotor ve intron bölgelerindeki indel polimorfizmlerin belirlenmesi (Oztabak et al., 2009) gibi prion hastalıkları ile ilişkili çalışmaların da arttırılması gerekmektedir.

Sawalha ve ark. (2009) bahsettiği gibi genotip-fenotip arası korelasyon çalışmalarında daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için örneklem genişliğinin oldukça fazla olması gerekmektedir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda daha iyi bir korelasyonun kurulabilmesi için örneklem genişliğinin arttırılması gerekmektedir. Ayrıca Türkiye'deki tüm koyun ırklarının bu çalışmaya dahil edilmesi ile hem geniş çapta bir korelasyon çalışması yapılabileceği hem de yetiştirme programlarına veri sağlanacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguzzi, A. and Calella, A.M.**, 2009, Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, *Physiol Rev.*, 89:1105–1152pp.
- Aguzzi, A., Bauman, F. and Bremer, J.**, 2008, The Prion's Elusive Reason For Being, *The Annual Review of Neuroscience*, 31:439-77pp.
- Arnold, M., Meek, C., Webb, C.R. and Hoinville, L.J.**, 2002, Assessing the efficacy of a ram-genotyping programme to reduce susceptibility to scrapie in Great Britain, *Preventive Veterinary Medicine*, 56:227-249pp.
- Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E., Goldmann, W., Smith, A., Sivam, K., Tongue, S. and Gravenor, M.B.**, 2004, Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype, *Journal of General Virology*, 85:2735-2740pp.
- Belt, P.B.G.M., Muileman, I.H., Schreuder, B.E.C., Ruijter, J.B., Gielkens, A.L.J. 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.
- Billinis, C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyroudis, S., Vlemmas, I., Leontides, S., Sklaviadis, T. and Papadopoulos, O.**, 2004, Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece, *Journal of General Virology*, 85:547-554pp.
- Cappai, R. and Collins, S.J.**, 2004, Structural biology of prions, *Contrib Microb. Basel*, 11:4-32pp.
- CFSPH**, 2007a, Bovine Spongiform Encephalopathy, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 1-9pp.
- CFSPH**, 2007b, Scrapie, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 1-6pp.
- Choi, B., Kim, S.Y., Seo, S.Y., An, S.S.A., Kim, S.Y., Park, S., Lee, S., Choi, Y., Kim, S.J., Kim, C., Park, J. and Ju, Y.**, 2009, Mutations at codons 178, 200-129 and 232 contributed to the inherited prion diseases in Korean patients, *BMC Infectious Diseases*, 9:132.
- Detwiler, L.A. and Baylis, M.**, 2003, The epidemiology of scrapie, *Rev. sci. tech. Off. Epiz.*, 22(1):121-143pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- EU, 2003, Commission Decision of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep. Official Journal of the European Union, 41:41-45pp.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E. L.**, 2010, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567pp.
- Frootan, F., Nikbakht, G., Özdemir, N. Ö. and Ün, C.**, 2012, Prion Protein Coding Gene (PRNP) Variability in Sheep from Turkey and Iran, *Biochemical Genetics*, 50:277-284pp.
- Garcia-Crespo, D., Oporto, B., Gomes, N., Nagore, D., Benedicto, L., Juste, R.A. and Hurtado, A.**, 2004, PrP polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR, *Veterinary Record*, 154:717-722pp.
- Gilch, S. and Schätzl H.M.**, 2009, Aptamers against prion proteins and prions, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:2445-2455pp.
- Gratten, J., Wilson, A.J., McRae, A.F., Beraldi, D., Visscher, P.M., Pemberton, J.M. and Slate, J.**, 2008, A Localized Negative Genetic Correlation Constrains Microevolution of Coat Color in Wild Sheep, *Science*, 319:318-320pp.
- Haltia, M.**, 2000, Human prion diseases, *Ann. Med.*, 32:493-500pp.
- Harrington, N.P., O'Rourke, K.I., Feng, Y., Rendulich, J., DiFruscio, C. and Balachandran, A.**, 2010, Prion genotypes of scrapie-infected Canadian sheep 1998–2008, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74:228–232pp.
- Harris, D.A.**, 1999, Cellular Biology of Prion Diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3):429-444pp.
- Harris, D.A.**, 2003, Trafficking, turnover and membrane topology of PrP, *British Medical Bulletin*, 66:71–85pp.
- Harris, D.A. and True, H.L.**, 2006, New Insights into Prion Structure and Toxicity, *Neuron*, 50:353-357pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hoekstra, H.E. and Nachman, M.W.**, 2003, Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice, *Molecular Ecology*, 12:1185-1194pp.
- Hunter, N., Goldmann, W., Benson, G., Foster, J.D. and Hope, J.**, 1993, Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie, *Journal of General Virology*, 74:1025-1031pp.
- Hunter, N., Goldmann, W., Smith, G. and Hope, J.**, 1994, The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie, *Archives of Virology*, 137:171-177pp.
- Hunter, N.**, 1997, PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE, *Trends in Microbiology*, 5(8):331-334pp.
- Kellings, K., Prusiner, S.B. and Riesner, D.**, 1994, Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 343:425-430pp.
- McKintosh, E., Tabrizi, S. and Collinge, J.**, 2003, Prion diseases, *Journal of NeuroVirology*, 9:183-193pp.
- Mead, S.**, 2006, Prion disease genetics, *European Journal of Human Genetics*, 14:273-281pp.
- Oztabak, K., Ozkan, E., Sosyal, I., Paya, I. and Ün, C.**, 2009, Detection of prion gene promoter and intron1 indel polymorphisms in Anatolian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Anim. Breed. Genet.*, 126:463-467pp.
- Pastore, A. and Zagari, A.**, 2007, A Structural Overview of the Vertebrate Prion Proteins, *Prion*, 1(3):185-197pp.
- Peakall, R. and Smouse, P.E.**, 2006, GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes* 6:288-295pp.
- Pezza, J.A. and Serio, T.R.**, 2007, Prion Propagation, *Prion*, 1(1):36-43pp.
- Prusiner, S.B.**, 1982, Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie, *Science*, 216:136-144pp.
- Prusiner, S.B.**, 1991, Molecular Biology of Prion Diseases, *Science*, 252:1515-1522pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prusiner, S.B.**, 1998, Prions, Proc. Natl. Acad. Sci., 95:13363-13383pp.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. and Cohen, F.E.**, 1998, Prion Protein Biology, Cell, 93:337,348pp.
- Riesner, D.**, 2002, Molecular Basis of Prion Diseases, Journal of Neurovirology, 8(suppl. 2):8-20pp.
- Richt, J.A. and Hall, S.M.**, 2008, BSE Case Associated With Prion Protein Gene Mutation, Plos Pathogens, 4(9):e1000156.
- Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M.H., Ziegler, U., Distl, O. and Leeb, T.**, 2004, Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds, Neurogenetics, 5:19-25pp.
- Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K. and Leeb, T.**, 2005, Bovine Prion Protein Gene (*PRNP*) Promoter Polymorphisms Modulate *PRNP* Expression and May Be Responsible for Differences in Bovine Spongiform Encephalopathy Susceptibility, Journal of Biological Chemistry, 280(45):37408-37414pp.
- Sawalha, R.M., Brotherstone, S., Conington, J. and Villanueva, B.**, 2007, Lambs with Scrapie Susceptible Genotypes have higher Postnatal Survival, Plos ONE, 2(11):e1236.
- Sawalha, R.M., Brotherstone, S., Lambe, N.R. and Villanueva, B.**, 2008, Association of the prion protein gene with individual tissue weights in Scottish Blackface sheep, Journal of Animal Science, 86:1737-1746pp.
- Sawalha, R.M., Bell, L., Brotherstone, S., White, I., Wilson, A.J. and Villanueva, B.**, 2009, Scrapie-resistant sheep show certain coat colour characteristics, Genet. Res., Camb., 91:39-46pp.
- Shyng, S., Huber, M.T. and Harris, D.A.**, 1993, A Prion Protein Cycles between the Cell Surface and an endocytic Compartment in Cultured Neuroblastoma Cells, The Journal of Biological Chemistry, 268(21):15922-15928pp.
- Tatzelt, J. and Winklhofer, K.F.**, 2004, Folding and misfolding of the prion protein in the secretory pathway, 11:162-171pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taşkın, T., Kaymakçı, M., Bilgen, G., Gücel, M. ve Ün, C.**, 2010, Kıl Keçi Sürülerinde Scrapie Risk Faktörlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma: “Manisa ve İzmir Örneği”, *Hayvansal Üretim*, 51(2):7-15ss.
- Thorgeirsdottir, S., Sigurdarson, S., Thorisson, H.M., Georgsson, G. and Palsdottir, A.**, 1999, PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep, *Journal of General Virology*, 80:2527-2534pp.
- Tranulis, M.A., Osland, A., Bratberg, B. and Ulvund, M.J.**, 1999, Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway, *Journal of General Virology*, 80:1073-1077pp.
- Tranulis, M.A.**, 2002, Influence of the prion protein gene, *Prnp*, on scrapie susceptibility in sheep, *Apmis*, 110:33-43pp.
- Ün, C., Oztabak, K., Ozdemir, N., Akis, I. and Mengi, A.**, 2008a, Genotyping of *PrP* gene in native Turkish sheep breeds, *Small Ruminant Research*, 74:260-264pp.
- Ün, C., Oztabak, K., Ozdemir, N., Tesfaye, D., Mengi, A. and Schellander, K.**, 2008b, Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy-Related Prion Protein Gene Polymorphisms in Local Turkish Cattle, *Biochem. Genet.*, 46:820-827pp.
- Våge, D.I., Fleet, M.R., Ponz, R., Olsen, R.T., Monteagudo, L.V., Tejedor, M.T., Arruga, M.V., Gagliardi, R., Postiglioni, A., Natrass, G.S. and Klungland, H.**, 2003, Mapping and Characterization of the Dominant Black Colour Locus in Sheep, *Pigment Cell Res.*, 16:693-697pp.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J.**, 1999, Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:2042-2047pp.
- Viles, J.H., Klewpatinond, M. and Nadal, R.C.**, 2008, Copper and the structural biology of the prion protein, *Biochemical Society Transactions*, 36(6):1288-1292pp.
- Watts, J.C., Balachandran, A. and Westaway, D.**, 2006, The Expanding Universe of Prion Diseases, *Plos Pathogens*, 2(3):e26.
- Watts, J.C. and Westaway, D.**, 2007, The prion protein family: Diversity, rivalry, and dysfunction, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772:654-672pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wechselberger, C., Wurm, S., Pfarr, W. and Höglinger, O.**, 2002, The Physiological Functions of Prion Protein, *Experimental Cell Research*, 281:1-8pp.
- Wiessmann, C.**, 1999, Molecular Genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1):3-6pp.
- Ye, J., Han, J., Shi, Q., Zhang, B., Wang, G., Tian, C., Gao, C., Chen, J., Li, C., Liu, Z., Li, X., Zhang, L. and Dong, X.**, 2008, Human prion disease with a G114V mutation and epidemiological studies in Chinese family: a case series, *Journal of Medical Case Reports*, 2:331.
- Yılmaz, H.**, 2002, Prion Hastalıkları – Bulaşabilen Süngerimsi Ensefalopatileri, *Ankem Derg.*, 16(3):161-166ss.
- Yeniyurt, H.**, “Bandırma Koyunu”, <http://www.veteriner.cc/koyun/bandirma.asp> (Erişim tarihi: 24.04.2012a).
- Yeniyurt, H.**, “Sakız Koyunu”, <http://www.veteriner.cc/koyun/sakiz.asp> (Erişim tarihi: 24.04.2012b).
- Yeniyurt, H. ve Demirtaş, H.**, “Kıvırcık Koyunu”, <http://www.veteriner.cc/koyun/kivircik.asp> (Erişim tarihi: 24.04.2012a).
- Yeniyurt, H. ve Demirtaş, H.**, “Morkaraman Koyunu”, <http://www.veteriner.cc/koyun/morkaraman.asp> (Erişim tarihi: 24.04.2012b).

ÖZGEÇMİŞ

06.08.1985 tarihinde Aliğa-İZMİR’de doğdu. İlköğretimini Mehmet Saka İlkokulu’nda (Aliğa-İZMİR), orta öğretimini ve liseyi Alp Oğuz Anadolu Lisesi’nde (Aliğa-İZMİR) tamamlamıştır. 2009 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü’nde lisans eğitimini tamamladı.

EKLER

Ek 1 Materyal Olarak Kullanılan Koyunlara Ait DNA Numaraları ile Laboratuar Örnek Numaraları, Genotipleri, Risk Grupları ve Toplam Örnek Sayıları

Ek 1(a) Bandırma Koyunu

Ek 1(b) Sakız Koyunu

a) Bandırma			
ÖRNEK NO (DNA NO)	GENOTİP	RİSK GRUPLARI	TOPLAM ÖRNEK SAYISI
1(453), 16(106), 19(236), 30(225), 53(976-8)	ARR/ARR	R1	5
4(339), 5(7), 9(247), 10(322), 12(164), 13(54), 15(245), 17(70), 20(180-7), 21(320), 23(47), 27(149), 31(264), 35(449), 38(100), 40(259-7), 44(359), 45(545-7), 47(813- 8), 48(818-8), 51(892-8)	ARR/ARQ	R3	21
2(111), 3(223), 6(405), 7(93), 8(113), 11(262), 14(390), 18(360), 22(31), 24(48), 25(87), 26(117), 28(157), 29(174), 32(266), 33(273), 34(372), 36(485), 37(495), 39(217-6), 41(278), 42(294), 43(308), 46(753-8), 49(821- 8), 50(866-8), 52(910-8)	ARQ/ARQ	R4	27
54(449)	ARQ/VRQ	R5	1
TOPLAM			54
b) Sakız			
ÖRNEK NO (DNA NO)	GENOTİP	RİSK GRUPLARI	TOPLAM ÖRNEK SAYISI
5(1202), 10(2238), 31(2249)	ARR/ARR	R1	3
9(1257), 17(2252), 19(1196), 20(1197), 25(1212), 29(2243), 30(2248)	ARR/ARQ	R3	7
1(1195), 3(1198), 4(1200), 7(1254), 23(1208), 24(1209)	ARQ/ARQ	R4	6
2(1184), 6(1204), 12(2244), 14(2246), 16(2251), 18(1194), 26(2232), 28(2242)	ARR/ARH	R3	8
8(1255), 11(2241), 13(2245), 21(1201), 22(1205)	ARH/ARH	R4	5
15(2247), 32(2250)	ARQ/AHQ	R3	2
27(2239)	AHQ/VRQ	R4	1
TOPLAM			32