

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Trachemys scripta* TÜRÜ SU KAPLUMBAĞASINDA PRİON PROTEİN GEN  
(*Prnp*) POLİMORFİZMİNİN VE APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Tuğçe BİRKAN**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. Erdal BALCAN**

**Manisa 2012**

*Trachemys scripta* TÜRÜ SU KAPLUMBAĞASINDA PRİON PROTEİN  
GEN (*Prnp*) POLİMORFİZMİNİN VE APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİNİN  
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Tuğçe BİRKAN

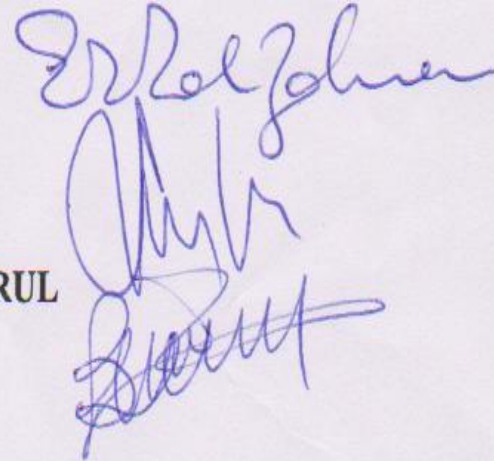
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 Nisan 2012

Tezin Savunulduğu Tarih : 14 Mayıs 2012

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Erdal BALCAN

Diğer Jüri Üyeleri : Doç.Dr. F. Sırrı ÇAM

Yrd.Doç.Dr. Berrin TUĞRUL



## ÖNSÖZ

S. Prusiner'in 1997 yılında "infeksiyonun yeni bir biyolojik etkeni olarak Prionları keşfettiği için Nobel ödülü almasından bu yana prion üzerine yapılan çalışmalar büyük ilgi uyandırmaktadır. Bugün prionlar ile ilgili yaklaşık 13.000 makale bulunmaktadır. Prionlar, kısaca, orijinal bir mekanizmayla bir grup nörodejeneratif hastalığa neden olan eşî görülmemiş infeksiyöz patojenlerdir. Prion hastalıkları genetik, infeksiyöz ya da sporadik bozukluklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm prion hastalıklarında prion proteininin yapısal değişikliği söz konusu olmaktadır. Koyunlarda Bovine spongiform encephalopathy (BSE) ve scrapie, insanlarda Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) en çok görülen prion hastalıklarıdır. Prion proteinlerinin fizyolojik rolleri ve hastalık etkeni olan infeksiyöz forma dönüşüm mekanizmaları günümüzde belirsizliğini korumaktadır. Bu Yüksek Lisans Tez Projesinde, *Trachemys scripta* türü su kaplumbağalarında prion proteinini kodlayan gen bölgesindeki polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin apoptozis ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların, prion biyolojisini anlama açısından yararlı olacağı inancını taşımaktayız.

**Mayıs 2012**

**Tuğçe Birkan**

## TEŞEKKÜR

Tez dönemim boyunca yararlı yorumları ile beni yönlendiren tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Erdal BALCAN'a;

Çalışmamıza destek veren, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Cemal ÜN'e;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını veren, değerli bilgilerini paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Doç.Dr. Sırrı ÇAM'a;

Deneyisel çalışmalarımda bilgisi, desteği ve tavsiyeleri ile yanımda olan arkadaşım Araş. Gör. Mesut ŞAHİN'e;

İlgi ve desteklerini yanımda hissettiğim ve bu süreci sayelerinde zevkle hatırlayacağım arkadaşlarıma;

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini gördüğüm canım ailem, annem Fatmagül BİRKAN, babam Tanju BİRKAN ve kardeşim Tuğba BİRKAN'a;

Bu çalışma (FBE 2009–087), Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir, bu nedenle ilgili kuruma;

Saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

**Tuğçe BİRKAN**

## İÇİNDEKİLER

|                                                               | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------|-------|
| ÖNSÖZ                                                         | II    |
| TEŞEKKÜR                                                      | III   |
| İÇİNDEKİLER                                                   | IV    |
| ŞEKİL DİZİNİ                                                  | VI    |
| ÇİZELGE DİZİNİ                                                | VIII  |
| KISALTMA DİZİNİ                                               | IX    |
| ÖZET                                                          | XI    |
| ABSTRACT                                                      | XII   |
| 1. GİRİŞ                                                      | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER                                             | 2     |
| 2.1. Yeni Tip İnfeksiyöz Ajanlar Olarak Prionlar              | 3     |
| 2.2. PrP <sup>C</sup> Paralog Proteinleri, Doppel ve Shadoo   | 4     |
| 2.3. Hücrede PrP <sup>C</sup> 'nin Rolü ve Fonksiyonu         | 6     |
| 2.3.1. Hücresel Lokalizasyon ve Trafik                        | 6     |
| 2.3.2. PrP <sup>C</sup> 'nin Hücresel Proteinlerle Etkileşimi | 7     |
| 2.3.3. PrP <sup>C</sup> 'nin Fizyolojik Rolü                  | 7     |
| 2.3.4. Prion Proteinleri ve Sinyal Transdüksiyonu             | 10    |
| 2.4. PrP <sup>C</sup> ve Apoptozis                            | 12    |
| 2.4.1. Ekstrinsik Ölüm Reseptörleri Yolağı                    | 12    |
| 2.4.2. İntrinsik Mitokondriyal Yolak                          | 13    |
| 2.5. Prion Hastalıklarının Mekanizması ve PrP <sup>Sc</sup>   | 16    |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Prion Hipotezi                                                                         | 17 |
| 2.6.1. PrP <sup>C</sup> 'nin PrP <sup>Sc</sup> 'ye Dönüşüm Modelleri                        | 18 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM                                                                          | 20 |
| 3.1. Hayvan Materyali                                                                       | 20 |
| 3.1.1. <i>Trachemys scripta elegans</i> Wied 1839'un Sistematığı ve Özellikleri             | 20 |
| 3.2. Dokuların Eldesi                                                                       | 21 |
| 3.3. Parafine Gömme ve Kesit Alma                                                           | 21 |
| 3.4. Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Uygulaması | 22 |
| 3.5. DNA İzolasyonu                                                                         | 23 |
| 3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)                                                      | 24 |
| 3.7. DNA Dizileme                                                                           | 25 |
| 4. BULGULAR                                                                                 | 27 |
| 4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları                                            | 27 |
| 4.2. Kaplumbağa PrP Geninde Görülen Polimorfizmler                                          | 28 |
| 4.3. Histolojik Bulgular                                                                    | 34 |
| 4.3.1. Hematoksilen-Eozin Uygulaması                                                        | 34 |
| 4.3.2. TUNEL Uygulaması                                                                     | 36 |
| 5. TARTIŞMA                                                                                 | 39 |
| 5.1. Prion Polimorfizmleri ve Apoptozis Arasındaki İlişki                                   | 42 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER                                                                        | 44 |
| 7. KAYNAKLAR                                                                                | 46 |
| 8. EKLER                                                                                    | 60 |
| 8.1. EK-1 : Deney Hayvanları Kullanım İzni                                                  | 60 |
| 8.2. EK-2: Deney Hayvanlarının İthal Olduğuna Dair Belge                                    | 61 |
| 8.3. EK-3: Amino Asit Çizelgesi                                                             | 62 |

## ÖZGEÇMİŞ

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                              | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1 Prion protein ailesi üyelerinin domain yapılarının şematik gösterimi                                                                                                               | 5     |
| Şekil 2.2 Fare PrP, Doppel ve Shadoo proteinlerini kodlayan genlerin şematik Gösterimi                                                                                                       | 6     |
| Şekil 2.3 PrP'nin hücre içi sinyal iletimindeki olası yeri                                                                                                                                   | 10    |
| Şekil 2.4 Hücrede görülen apoptotik yollar                                                                                                                                                   | 13    |
| Şekil 2.5 BCL-2 protein ailesi üyeleri ve domain yapıları                                                                                                                                    | 14    |
| Şekil 2.6 Prion proteininin self replikasyonunda önerilen nukleasyon bağımlı model                                                                                                           | 18    |
| Şekil 2.7 PrP <sup>C</sup> 'nin PrP <sup>Sc</sup> 'ye dönüşümünde kalıp destekli model                                                                                                       | 19    |
| Şekil 3.1 Kaplumbağa beyin dokularında TUNEL uygulaması                                                                                                                                      | 23    |
| Şekil 3.2 <i>Trachemys scripta</i> <i>Prnp</i> geninin FASTA formatında gösterimi ve primerlerin <i>Prnp</i> gen dizisi üzerinde bağlandığı yerler                                           | 25    |
| Şekil 4.1 1.primere çifti ile gerçekleştirilen <i>Trachemys scripta</i> <i>PRNP</i> geninin ilk ~400 bp'lik kısmının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü  | 27    |
| Şekil 4.2 2. primere çifti ile gerçekleştirilen <i>Trachemys scripta</i> <i>PRNP</i> geninin son ~500 bp'lik kısmının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü | 27    |
| Şekil 4.3 Kaplumbağa prion protein gen dizisine ait DNA sekans kromatogramları                                                                                                               | 28    |

|            |                                                                                                                                                              |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.4  | Elde edilen sekans sonuçlarının blastn programı ile doğrulanması                                                                                             | 30 |
| Şekil 4.5  | Kaplumbağa prion proteinin aminoasit dizilimiyle, dört polimorfik bölgenin bulunduğu kaplumbağanın geninin kodladığı aminoasit diziliminin karşılaştırılması | 32 |
| Şekil 4.6  | İnsanlarda kalıtsal prion hastalıklarına neden olan PrP mutasyonları ve olası PrP polimorfizmlerinin fare, koyun, geyik ve çalışmamız ile karşılaştırılması  | 33 |
| Şekil 4.7  | İnsan ve kaplumbağa prion proteinlerinin aminoasit dizilerinin blastp ile karşılaştırılması                                                                  | 34 |
| Şekil 4.8  | Kaplumbağalarda beynin dorsalden görünümü                                                                                                                    | 35 |
| Şekil 4.9. | Kaplumbağalarda optic tectum ve kısımları                                                                                                                    | 36 |
| Şekil 4.10 | Dört polimorfik dizinin (L203V, N205I, V225A, M237V) belirlendiği 3 farklı örneğin optic tectumlarındaki apoptotik hücreler                                  | 37 |
| Şekil 4.11 | İki polimorfik dizinin (L203V, N205I) belirlendiği 3 farklı örneğin optic tectumlarındaki apoptotik hücreler                                                 | 38 |



## ÇİZELGE DİZİNİ

|                                                                                                                                | <b>Sayfa</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Çizelge 2.1 Prion proteinlerinin rolleri                                                                                       | 9            |
| Çizelge 4.1 Kaplumbağa prion protein geni üzerinde bulunan tek nükleotid değişimleri ve bu değişimlerin kodonlarının gösterimi | 31           |
| Çizelge 4.2 Polimorfik 203, 205, 225, 237 aminoasit pozisyonları için 3 farklı allelin görünümü                                | 32           |
| Çizelge 4.3 Polimorfik L203V, N205I, V225A, M237V kodonları için saptanan 5 farklı genotip                                     | 32           |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|           |                                          |
|-----------|------------------------------------------|
| AD        | Alzheimer's Disease                      |
| ALS       | Amiotropik Lateral Skleroz               |
| APAF      | Apoptotic Protease Activating Factor-1   |
| Bcl-2     | B-cell Lymphoma 2                        |
| BH (1-4)  | Bcl-2 Homology (1-4)                     |
| BSE       | Bovine Spongiform Ensefalopati           |
| DISC      | Death-inducing Signalling Complex        |
| Dpl       | Doppel Protein Paraloğu                  |
| DR        | Death Receptor                           |
| EDTA      | Etilen Diamin Tetra Asetik Asit          |
| ERK       | Extracellular Signal Regulated Kinaz     |
| FADD      | Fas-associated Death Domain              |
| FasL      | Fas Ligandı                              |
| GAG       | Glikozaminoglikan                        |
| gCJD      | Genetic Creutzfeldt_Jakob Disease        |
| GPI       | Glikosilfosfatidilinozitol               |
| GSS       | Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease   |
| Htt       | Huntingtin                               |
| JNK       | c-Jun N-terminal Kinaz                   |
| MAP-kinaz | Mitogen-activated Protein Kinaz          |
| NBP       | Nukleasyon-bağımlı Polimerizasyon Modeli |
| N-CAM     | Neural Cell Adhesion Molecule            |
| ORF       | Open Readin Frame (Açık Okuma Çerçevesi) |

|                    |                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|
| PCR                | Polimeraz Zinci Reaksiyonu                                   |
| PI3                | Fosfatidilinozitol-3                                         |
| PKA                | Protein Kinaz A                                              |
| PKC                | Protein Kinaz C                                              |
| <i>Prn</i>         | Prion Gen Kompleksi                                          |
| <i>Prnd</i>        | Doppel Geni                                                  |
| <i>Prnp</i>        | PrP geni                                                     |
| PrP                | Prion Proteini                                               |
| PrP <sup>C</sup>   | PrP'nin hücreyel formu                                       |
| PrP <sup>RES</sup> | Proteaza Dirençli PrP                                        |
| PrP <sup>Sc</sup>  | PrP'nin patojenik formu                                      |
| ROS                | Reaktif Oksijen Türleri                                      |
| SAA                | Serum Amiloid A                                              |
| SDS                | Sodyum Dodesil Sülfat                                        |
| Sho                | Shadoo Protein Paraloğu                                      |
| SOD                | Superoksit Dsimutaz-1                                        |
| <i>Sprn</i>        | Shadoo Geni                                                  |
| STI1               | Stress-inducible Protein-1                                   |
| TDP-43             | TAR DNA-binding Protein                                      |
| TNF $\alpha$       | Tümör Nekrozis Faktör $\alpha$                               |
| TRADD              | TNF Receptor-associated Death Domain                         |
| TRAIL              | TNF-related Apoptosis-inducing Ligand                        |
| TSE                | Transmissible Spongiform Ensefalopati                        |
| TUNEL              | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling |

## ÖZET

### ***Trachemys scripta* Türü Su Kaplumbağasında Prion Protein Gen (*Prnp*) Polimorfizminin ve Apoptozis ile İlişkisinin Belirlenmesi**

Tuğçe Birkan, Mayıs 2012, 62 syf.

Prion proteini beyin, kas ve lenfoid sistem gibi birçok farklı dokuda yerleşim gösteren hücresel bir glikoproteindir. Bu protein normal hücresel form ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) ve patolojik izoformu ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) olmak üzere iki konformasyonda bulunabilir. Prion hastalıklarında hücresel formdaki prion proteinleri yapısal değişiklik göstererek anormal forma dönüşür. Günümüzde prion proteinlerinin fizyolojik rolleri belirsizliğini koruyor olsa da memelilerde  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin yaygın olarak bulunuyor olması, bu proteinin sinyal transdüksiyonu, sinaptik ileti ve programlanmış hücre ölümü gibi önemli biyolojik olaylarda rol aldığını düşündürmüştür. Öte yandan, memelilerde prion proteinini kodlayan genlerdeki tek nukleotid polimorfizmlerinin prion hastalıklarına olan duyarlılığı büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmada, *Trachemis scripta* türü kaplumbağalarda prion proteini kodlayan gen bölgesi (*Prnp*) polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra dizi analizine gönderilmiş ve polimorfizmler belirlenmiştir. Ayrıca, polimorfik örnekler için apoptotik hücre yoğunluğu TUNEL yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda L203V, N205I, V225A, M237V polimorfizmleri saptanmıştır. Bununla beraber incelenen 30 örneğin 15'inde söz konusu dört polimorfizm (L203V, N205I, V225A, M237V) birlikte gözlenmiştir. Bir örnekte, L203V, N205I, M237V olmak üzere üç polimorfizm, geri kalan 14 örnekte ise L203V, N205I olmak üzere iki polimorfizm birlikte izlenmiştir. Polimorfik örneklerin TUNEL analizleri sonucunda, belirlenen dört polimorfizmi de içeren örnekler için beyin dokularında apoptotik hücre sayısının diğer polimorfik örnekler göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Prnp* polimorfizmlerinin programlanmış hücre ölümünü arttırabileceğini ve bu artışın prion hastalıklara yatkınlık ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

**Anahtar Sözcükler: Prion, polimorfizm, apoptozis**

## ABSTRACT

### **Determination of Prion Protein Gene (*Prnp*) Polymorphism and its Relationship with Apoptosis in Turtle, *Trachemys scripta*.**

Tuğçe Birkan, May 2012, 62 p.

Prion protein is a glycoprotein which is widely expressed in most tissues, including brain, muscle and lymphoid system. It can display two conformations: normal cellular form (PrP<sup>C</sup>) and its pathological isoform (PrP<sup>Sc</sup>). During the prion diseases, cellular proteins undergo conformational change to abnormal form. Although the physiological roles of prion protein still remain unknown, the ubiquitous expression of PrP<sup>C</sup> in mammals suggests its roles in important biological events such as signal transduction, synaptic transmission and programmed cell death. On the other hand, it is known that, in mammals, single nucleotide polymorphisms in prion protein coding genes are greatly affect susceptibility to prion diseases. In the present work, prion protein coding gene (*Prnp*) was amplified with polymerase chain reaction, sequenced and polymorphisms were determined. Also, apoptotic cell number of polymorphic samples was measured with TUNEL assay. In our work, L203V, N205I, V225A and M237V polymorphisms were determined. In 15 samples, these four polymorphisms (L203V, N205I, V225A and M237V) were seen together. In one sample, three polymorphisms (L203V, N205I and M237V) and in remaining 14 samples L203V, N205I polymorphisms were seen. TUNEL analyses of polymorphic samples were seen that the apoptotic cell number was increased in brain tissues of samples that contain four polymorphisms. These results indicate that *Prnp* polymorphisms can increase the programmed cell death and this raising may be related with the susceptibility to prion diseases.

**Keywords: Prion, polymorphism, apoptosis**

## 1.GİRİŞ

Prion proteini, memeli dokularında özellikle de nöronlarda yoğun olarak bulunan bir hücre yüzey glikoproteindir. İnsan ve hayvan prion hastalıkları hücre fonksiyonları etkileyecek proteinlerin üç boyutlu yapılarının değişmesi sonucunda ortaya çıkan “yapısal değişiklik gösteren” bozukluklar olarak değerlendirilmektedir. Bazı koşullarda prion proteininin zararsız formu ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) hastalık etkeni izoforma ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) dönüşebilir. Prion proteinlerinin bu yapısal dönüşüm sırasında kullandığı stratejiler ve prion hastalıklarındaki patojenik mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın normal ve anormal formdaki prion proteininin prion hastalıkların etyolojisinde ve patolojisinde merkezi bir rol oynadığı ve prion proteinlerini kodlayan genlerin (*Prnp*) mutasyonları ve polimorfizmlerinin hastalığa duyarlılık açısından önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Günümüzde insanlarda 30’dan fazla *Prnp* mutasyonu saptanmıştır. Dolayısıyla prion hastalıklarının patogenezinin anlaşılması açısından çeşitli organizmalarda *Prnp* lokusunun genomik yapısının ortaya konması önemlidir. İnsanların yanında, sığır, fare, sıçan, koyun, geyik, keçi ve zebra balıklarında *Prnp* ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Öte yandan, prion proteinleri programlanmış hücre ölümleri ile yakından ilişkili gözükmektedir. Özellikle, anti-apoptotik etkileri ile nöronları koruduğu ileri sürülmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların yanlış ya da eksik katlanmış proteinlerin sinaptik fonksiyonsuzluk, nöronapoptozisi ve beyin hasarı gibi etkilerinden dolayı gerçekleştiği düşünüldüğünde, apoptozis ile prion proteini ekspresyonları ve *Prnp* polimorfizmleri arasındaki ilişki önem kazanmaktadır. Bu Yüksek Lisans Tez Projesinde *Trachemys scripta* türü su kaplumbağalarında prion proteinini kodlayan gen dizisi belirlenmiş ve polimorfizmleri çıkartılmıştır. Ayrıca polimorfik örnekler apoptotik indeks açısından incelenmiş ve elde edilen bulgular mevcut literatür ile tartışılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Proteinler, farklı enzimatik ve yapısal özellikleri ile yaşamın her alanında ön plana çıkmaktadır. Aynı zamanda proteinler yaşayan hücrelerin fizyolojik ortamlarında savunmasız kalabilen makromoleküllerdir. Örneğin proteinlerin biyosentezi, hataya son derece açık bir süreçtir (1). Protein sentezinin hatalı ürünleri (eksik translasyonel polipeptidler, hatalı katlanmalar ya da oligomerik protein komplekslerinin bir araya gelememesi) nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi birçok bozukluğun ortaya çıkmasında rol alan protein agregatlarının oluşumuna neden olmaktadır (2, 3).

Alzheimer, Parkinson, Huntington, spinocerebellar ataksi ve bulaşıcı sponjiyöz (süngerimsi) ensefalopatiler gibi çok sayıdaki nörodejeneratif hastalık düşünme ve hareket yeteneğinde, algı, bilinç ve hafızadaki zayıflamalar ile karakterizedir (4). Nörodejeneratif hastalıkların klinik gidişleri farklı olsa da, beyin vakuolasyonu, nöron kaybı, sinaptik anormallikler ve yanlış katlanma gösteren protein kümelerinin (4) serebral olarak depolanması gibi ortak özellikleri vardır (4, 5).

Seyrek görülen ancak ölümcül olan bu hastalıklar sadece insanları değil aynı zamanda çeşitli hayvan türlerini de etkilemektedir. İnsanlarda kuru, Creutzfeldt-Jakob (CJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) ve fatal ailesel insomnia (FFI) gibi bulaşıcı sponjiyöz ensefalopatiler, hayvanlarda scrapie, bovine spongiform ensefalopati (BSE) gibi bozukluklarda prion proteinleri (PrP) nedensel ajan olarak gözükmemektedir (6). Prion proteinleri ile ilişkili hastalıklar kendiliğinden ortaya çıkabilir, kalıtılabilir ya da bir enfeksiyon ile edinilebilir (5). Özellikle infektif olanlar, bulaşıcı sponjiyöz ensefalopatiler (transmissible spongiform encephalopathies-TSE) olarak adlandırılan prion hastalıklarıdır (5, 7, 8).

## 2.1. Yeni Tip İnfeksiyöz Ajanlar Olarak Prionlar

Prion hastalıklarına neden olan infeksiyöz ajanın yapısı hakkında uzun süre bilgi edinilememiştir. 1966'da scrapie patojeninin iyonize radyasyona ve 250 ila 280 nm'lik ultraviyoleye direnç gösterdiği belirlenmiştir (9, 10). Genel olarak proteinlerin 280 nm'de UV radyasyonuna 250 nm'den daha fazla hassas olması nedeniyle scrapie ajanının bir protein olmadığı düşünülmüştür (9). 1967 yılında Griffith infeksiyöz ajanın genetik materyal içermediğini fakat otokatalitik bir mekanizma ile kendini yenileyen (self-replikatif) hücrel bir proteinin değişime uğramış bir modelinden söz etmiştir (9, 10). 1970'lerin sonunda S. Prusiner ve ekibi, hasta hayvanların beyininden scrapie'ye neden olan ajanı izole etmiştir (11). Bu ajanın ısıya dirençli olduğu, proteinaz K, üre, kaotropik<sup>1</sup> tuzlar, sodyum dodesil sülfat (SDS), nukleaz ya da psoralen gibi DNA'yı bozan etkenlerle muamele edildikten sonra aktivitesinin değişmediği görülmüştür (11). Aynı zamanda bu infeksiyöz ajanın oksijen varlığında iyonize radyasyona duyarlı olduğu belirlenmiştir. Özetle bu ajanın lipid içeren hidrofobik protein özelliği gösterdiği öne sürülmüştür (11). Prusiner, virus olamayan bu scrapie ajanını '**prion**' (proteinimsi infeksiyöz ajan-partikül) olarak isimlendirmiştir (12). Aslında bu ajan PrP (Prion Protein) olarak adlandırılan bir proteindir. Primer yapısı belirlendikten sonra PrP kodlayan gen belirlenmiş ve *Prnp* olarak isimlendirilmiştir (13-15). PrP geni (*Prnp*) tüm memeli genomlarında, kuşlarda (16, 17) ve balıklarda (18) belirlenmiştir. Farklı türlerde bilinen tüm PrP genlerinde PrP açık okuma çerçevesi (ORF) tek bir ekzonda kodlanır ancak gen 2 ya da 3 ekzon içerebilir (15, 16, 19, 20). İnsan ve hamsterde *Prnp* iki ekzon içerir. Buna karşın, fare, koyun ve sıçan *Prnp*'si 3 ekzonludur ve 3. ekzon insan ve hamster *Prnp*'sindeki ekzon 2 ile analogtur. Protein kodlayan dizi tüm memelilerde ikinci ekzonda yer alır (21, 22). Diğer ekzonlar promotor ve sonlandırma bölgelerini kapsayan ürüne dönüşmeyen (untranslated) diziler içerir.

İnsan ve farede *Prnp* sırasıyla 20 ve 2. kromozomlarda yerleşmiştir (21). *Prnp* büyük ölçüde beyinde, kısmen nöronlarda ve az oranlarda dalak, böbrek, akciğer ve kalpte eksprese edilir (14). Fare *Prnp* 254 amino asitlik prion proteini (PrP) kodlamaktadır (21). PrP özellikle merkezi sinir sistemi ve lenforetiküler sistem hücrelerin membranlarında bulunmaktadır (10, 23) ve genel olarak iki yapısal izoformu (PrP<sup>C</sup> ve yanlış katlanmış patojenik izoformu olan PrP<sup>Sc</sup>) vardır (24). Normal hücrel form (PrP<sup>C</sup>), konak tarafından kodlanan kompleks tip iki N-bağlı oligosakkarit dizisi içeren bir sialoglikoproteindir (23).

---

<sup>1</sup> Protein ve nukleik asit gibi yapıları bozan bütanol, etanol, fenol, MgCl<sub>2</sub> gibi bileşikler.



İnsan PrP<sup>C</sup>’inde bir  $\alpha$ -heliks yapısını oluşturan üç peptid dizisi ( $\alpha$ A- $\alpha$ B- $\alpha$ C) ve bir  $\beta$ -heliks yapısı oluşturan iki peptid dizisi ile glikozilfosfatidilinozitol (GPI) için bir sinyal dizisi yer alır (Şekil 2.1) (25).

PrP<sup>C</sup> ‘nin amino terminal kısmı Cu<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup> ve Mn<sup>++</sup> gibi metal iyonlarına bağlanacak korunmuş 5 tekrarlayan oktapeptid domaini (Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Glu) içerir (26). Bu oktapeptid yapısı bazı nedenlerden dolayı önemlidir. Örneğin, yapı içerisinde yer alan His- amino asidi bakır bağlama yeteneğine sahiptir (27, 28). Bakır, PrP<sup>C</sup>’nin endositozu için gereklidir (29, 30). Öte yandan, oktapeptid domaininin tekrarlar oluşturarak büyümesi gCJD ya da GSS (Gerstmann-Sträussler-Scheinker) olarak sınıflandırılan genetik bir prion hastalığına neden olmaktadır (31).

PrP<sup>C</sup> ‘nin biyosentetik yolu diğer salgı ya da membran proteinlerine benzerdir: Bu protein, granüllü endoplazmik retikulum ribozomlarına bağlanarak sentezlenir, Golgi’ye aktarılır ve hücre yüzeyine çıkar (32). Birçok hücre yüzey PrP<sup>C</sup> lipid yığınlarında bulunsada bazı proteinler klatrin kaplı membran oyuklarına transfer edilerek endositoza gider (33-35).

## 2.2. PrP<sup>C</sup> Paralog Proteinleri, Doppel ve Shadoo

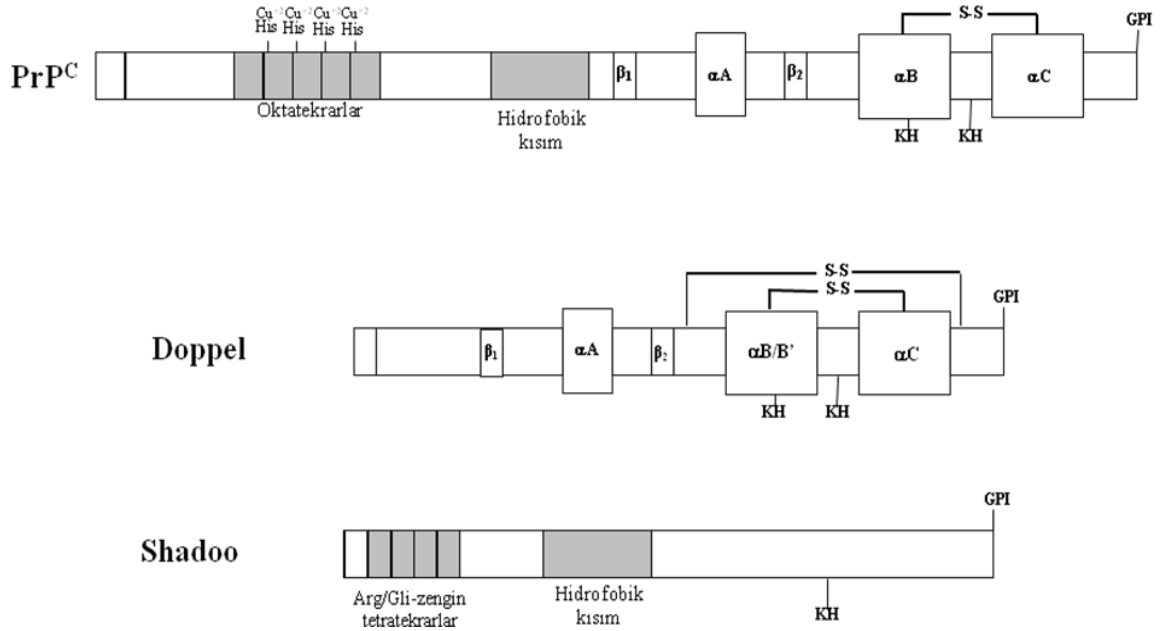
PrP<sup>C</sup> biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda iki protein paralogu keşfedilmiştir. Bunlardan birincisi erkek üreme sisteminin düzgün çalışmasında önemli bir rolü olan ve testiste bulunan Doppel’dir<sup>2</sup> (downstream PrP-like-Dpl) (36, 37). İkincisi merkezi sinir sisteminde bulunan ve PrP<sup>C</sup> ile benzer birçok aktiviteye sahip Shadoo (‘shadow of the prion protein<sup>3</sup>’-Sho) proteinidir (38, 39). Doppel proteinin üçüncül yapısı PrP<sup>C</sup>’nin C-terminal bölgesine çok benzer ancak N-terminal hidrofobik ve oktapeptid tekrarları içermez (39). Her iki protein yaklaşık %25’lik bir amino asit homolojisi gösterir (40).

Memeli prion protein ailesinin üçüncü üyesi olan Sho, bir nöronal glikoproteindir ve GPI çapası, bir ya da iki yerde N-glikozilasyon gibi PrP<sup>C</sup>’nin gösterdiği bazı özelliklere sahiptir (41). PrP<sup>C</sup> ve Sho farklı N-terminal bölgeler içerseler de merkezi kısımları nöro-protetik sağlayacak fonksiyonel olarak oldukça korunmuş bir aktivite domainine sahiptirler (41). Sho PrP<sup>C</sup>’de bulunan oktatekrarlardan yoksun olsa da glisin, serin, alanin ve arginin zengin bir dizi N-terminal tetratekrallar içerir (39) (Şekil 2.1).

---

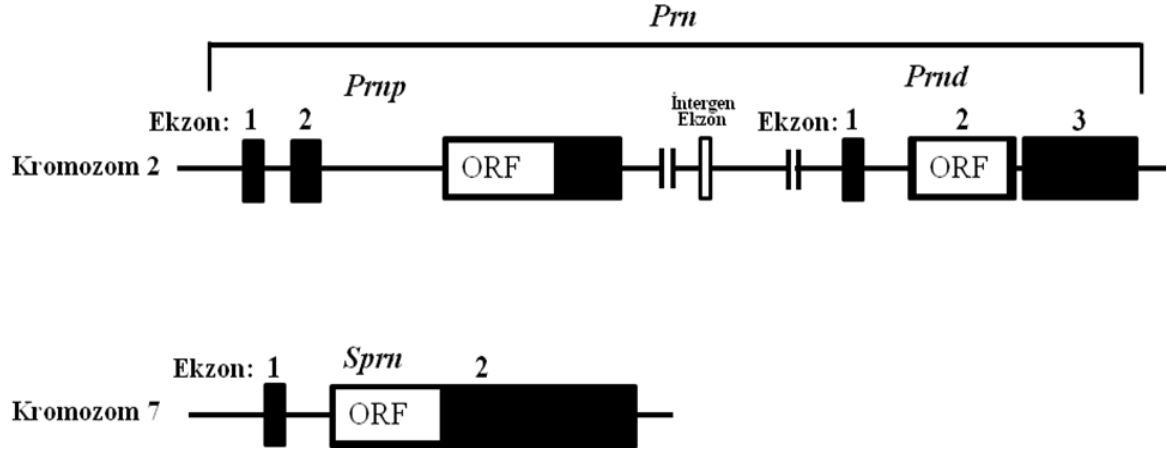
<sup>2</sup> Almanca suret ya da çift.

<sup>3</sup> Japonca gölge



Şekil 2.1. Prion protein ailesi üyelerinin domain yapılarının şematik gösterimi, Doppel ve PrP<sup>C</sup>'nin C-terminal domainleri 3  $\alpha$ -heliks ve 2 kısa  $\beta$ -sheet yapıları oluşturur. Disülfid köprüleri (-S-S-) N-glikozilasyon bölgeleri KH şeklinde gösterilmiştir. PrP<sup>C</sup> ve Shadoo'da tekrarlayan diziler bulunur. PrP<sup>C</sup>'deki oktatekrarlar Cu<sup>+2</sup> bağlama yeteneğine sahipken Shadoo'daki tetratekrarlar arginin ve glisince zengindir. Ayrıca oldukça iyi korunmuş hidrofofik kısımlar PrP<sup>C</sup> ve Shadoo'da gösterilmiştir. GPI, glikozilfosfatidilinozitol'ü betimlemektedir [Watts ve Westaway'dan (39) değiştirilerek alınmıştır].

Doppel geni balıklarda, farelerde, sığır, koyun ve insanlarda belirlenmiştir (42). İnsanlarda, Doppel proteini kodlayan genin (*Prnd*) *Prnp*'nin 27 kb downstreamında yer aldığı, farede ise *Prnd*'nin, *Prnp*'nin yaklaşık 16 kb downstreamında olduğu belirlenmiştir. (42-44). Her iki gen (*Prnp* ve *Prnd*), bir prion gen kompleksini (*Prn*) oluşturur. Yüksek nukleik asit homolojisi göstermeseler de bu genlerin tek bir atasal genin duplikasyonu ile ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (45, 46). Prion gen ailesinin üçüncü üyesi olan ve Sho'yu kodlayan *Sprn* geni oldukça iyi korunmuştur (38). *Sprn* geni, *Prnp* ve *Prnd* içeren *Prn* genomik lokusun içerisinde yer almaz. Bu gen, farelerde 7., insanlarda 10. kromozom üzerinde lokalize olmuştur. *Prnp* ve *Prnd* gibi *Sprn* geninin açık okuma çerçevesi tek bir ekzon içerisinde bulunur (Şekil 2.2). Yapılan çalışmalarda *Sprn* ekspresyonlarının beyine sınırlı olduğu, dolayısıyla Sho proteinin Doppel'den farklı olarak merkezi sinir sistemi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (39). Farklı organizmalarda *Sprn* ve *Prnp* sekans analizleri ilkel prion protein geninin *Sprn* ile ilgili olduğu, *Prnp* ve *Prnd* genlerinin daha sonra evrildiği ileri sürülmüştür (47).



Şekil 2.2. Fare PrP, Doppel ve Shadoo proteinlerini kodlayan genlerin şematik gösterimi. 2. kromozomda bulunan *Prn* lokusu PrP ve Doppel kodlayan *Prnp* ve *Prnd* genlerini içerir. Shadoo proteinini kodlayan *Sprn* geni farede 7. kromozomda yer alır [Watts ve Westaway'dan (39) değiştirilerek alınmıştır].

İnsan *Prnp* ve *Prnd* ile aynı genomik kümede (*Prnd*'nin yaklaşık 3 kb downstreamında) yerleşim gösteren hipotetik dördüncü bir prion geni (*Prnt*) betimlenmiştir (48). *Prnt*'nin kemirgenlerde bulunmadığı, sadece primatlara özgü bir gen olduğu belirlenmiş ve transpoze olabilen bir gen olarak değerlendirilmiştir (47, 49, 50). İnsanda genin 3 alternatif splicing izoformu bulunmaktadır (48) ve memelilerde oldukça iyi korunduğu ileri sürülmüştür(50).

### 2.3.Hücrede PrP<sup>C</sup>'nin Rolü ve Fonksiyonu

#### 2.3.1.Hücresel Lokalizasyon ve Trafik

PrP<sup>C</sup>'nin farklı hücresel kısımlarda fonksiyon gösteren çok sayıda membran bileşenleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (51). PrP<sup>C</sup> hücre zarı ve endositik kısımlar arasında sürekli olarak döngüsel biçimde yer değiştirir. PrP<sup>C</sup> trafiği olarak tanımlanabilen bu döngüsel süreç, proteinin fizyolojik fonksiyonları için önemli olabilecek internalizasyon yollarını içeren kompleks bir olaydır (52). PrP<sup>C</sup> trafiği Golgi kompleksi, hücre zarı ve erken endozomlar arasında gerçekleşmektedir ve endositik veziküllerin ayrılmasını sağlayan bir GTPaz olan dynamin I PrP<sup>C</sup> trafiğinin ilk adımlarında rol alır (51). Üzerinde tartışmaların sürdüğü bu kompleks olayın mekanizmaları konusunda kaveol/raft ve klatrin-bağımlı internalizasyon süreçleri ön plana çıkmaktadır (25). PrP<sup>C</sup>'nin internalizasyonunda klatrin-ve non-klatrin veziküllerin rolleri ile ilgili tartışmaların (53) kaynağında GPI-çapalı proteinlerin internalizasyon için lipit yığınlarını kullanması (54) ve bu proteinlerin internalizasyon sırasında transmembran domainlerini kaybederek klatrinler ile etkileşmesi yer almaktadır. Öte yandan, PrP<sup>C</sup>'nin lipit yığınları üzerinden internalizasyonu ile birlikte bu membran yapılarının dışında da hücre içerisine alındığı gösterilmiştir (35). Ayrıca, PrP<sup>C</sup>

deterjanlara direnç gösteren lipid raftlarından lateral olarak hücre zarının deterjanda çözölen kısmına göç ederler ve buralarda klatrin kaplı çukurlardan internalize olurlar (55).

Yapılan çalışmalarda PrP<sup>C</sup>'nin, kaveol benzeri lipit yığınlarda, trans-golgi şebekesinde ve sitoplazmik endositik kaveol benzeri yapılarda yoğun olarak bulunduğu kaveol benzeri yığınlara aracılığı ile hücrenin perisentriolar bölgesine, kaveol içeren erken endositik yapılar ile geç endozom/lizozomlara aktarıldığı gösterilmiştir (56, 57). Özetle, hücre yüzeyi PrP<sup>C</sup> temel olarak klatrin bağımlı bir mekanizma ile hücre zarı ve erken endozom arasında dönüşüm içerisinde. Bu yolla bakır iyonlarının da rolü vardır (58) ancak PrP<sup>C</sup>'nin kaveol ve kaveol içeren endositik yapılarda bulunması proteinlerin kaveol aracılığı ile de internalize edildiğini ortaya koymuştur (56).

### **2.3.2.PrP<sup>C</sup>'nin Hücresel Proteinlerle Etkileşimi**

PrP<sup>C</sup> hücre yüzeyinde, endositik kısımlarda ve sekreteruar yolla birçok makromolekül ile etkileşmektedir. PrP<sup>C</sup> laminin reseptör proteini (37-kDa/67-kDa) ile etkileşerek internalizasyonunu sağlamaktadır (59). Ayrıca, bazı glikozaminoglikanların (örneğin sülfatlanmış GAG'lar) ve nükleik asitlerin PrP<sup>C</sup> bağıldığı gösterilmiştir (60-63). Bu glikozaminoglikanların laminin reseptörü ve laminin gibi ekstrasellüler matriks molekülleri ile ilişkili olduğu dolayısıyla PrP<sup>C</sup>'nin laminin için yüksek afiniteli bir reseptör de olabileceğı ve PrP<sup>C</sup> -laminin etkileşimlerinin nöritogenezde rol aldığı ileri sürölmüştür (64). Ayrıca PrP<sup>C</sup>'nin mikrotübüller ile özellikle de tubulin ile ilişkili olduğu ve mikrotüböl oluşumunu engellediğı belirlenmiştir (65). Bu proteinlerin dışında PrP<sup>C</sup> ile etkileşen  $\alpha\beta$ -kristalin, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz  $\alpha 3$  altünitesi, CNPaz,  $\beta$ -aktin,  $\alpha$ -spektrin, kreatin kinaz- $\beta$ , sinapsin Ib, Grb2 adaptör proteini ve prion interactor Pint1 gibi çok sayıda molekül bulunmaktadır (25, 66). Bu örnekler, nükleik asitlerin (67) hücre zarında ya da ekstrasellüler matrikste bulunan protein komplekslerin (68) ve bazı glikozaminoglikanların (69) PrP<sup>C</sup> dönüşümü ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

### **2.3.3.PrP<sup>C</sup>'nin Fizyolojik Rolü**

Başta sinir sistemi ve bağışıklık sistemi olmak üzere birçok organda, kanser hücrelerinde ve embriyonik gelişim sürecinde çok sayıda hücresel ve fizyolojik roller üstlenmesine karşın PrP<sup>C</sup>'nin fizyolojik rolü günümüzde tam olarak anlaşılamamıştır. Hücresel düzeyde PrP<sup>C</sup>, adezyon, farklılaşma, çoğalma, hücre içi sinyal iletimi, bakır ve

redoks dengesi, oksidatif stres, anjiyogenez ve hücre ölümü ve yaşamı gibi birçok olayda rol aldığı düşünülmektedir (32, 70-72) (Çizelge 2.1).

PrP<sup>C</sup> bakır iyonlarına bağlanabilme yeteneğine sahip bir proteindir (73, 74) ve bakır metabolizmasında rol aldığı ileri sürülmektedir. Bakır iyonlarının bağlanması PrP<sup>C</sup> molekülünde yapısal değişikliklere neden olduğu ve PrP<sup>C</sup>'deki yanlış katlanmaların ve fibrilasyonun bakır iyonları varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir. Bunun yanında bakır iyonlarının, PrP<sup>C</sup> agregasyonu üzerine dual bir etkisinin olduğu, fizyolojik sıcaklıklarda (37°C'de) bakır iyonlarının agregasyonu üzerine bir etkisi olmazken daha düşük sıcaklıklarda agregasyona neden olduğu gösterilmiştir (75). Ek olarak, bakır iyonu bağlanmasının PrP<sup>C</sup>'nin endositozunu arttırdığı ortaya konmuştur. PrP<sup>C</sup>'nin bakır toksisitesine ve oksidatif strese karşı antioksidan bir etki gösterebileceği ileri sürülmüştür (76).

Oktapeptid tekrar bölgeleri özel glikozaminoglikan bağlama bölgeleri oluşturur (77). Alternatif olarak, PrP<sup>C</sup>, histidin bağlayan bakır aracılığı ile GAG'lara bağlanabilir ve PrP<sup>C</sup> metabolizmasında önemli olacak PrP-Cu<sup>+2</sup>-GAG kompleksini oluşturur (78). Diğer taraftan bakır iyonu bağlanmasının PrP<sup>C</sup>'nin endositozunu uyardığı ve PrP<sup>C</sup>'nin bakır iyonlarının hücre içine alınımı için gerekli bir reseptör olabileceği ileri sürülmüştür (29). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda PrP<sup>C</sup>'nin bakır iyonlarını hücre yüzeyine bağlanmasını artırmasına karşın hücre içi bakır iyonu konsantrasyonunda bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (79).

Çizelge 2.1. Prion proteinlerinin rolleri

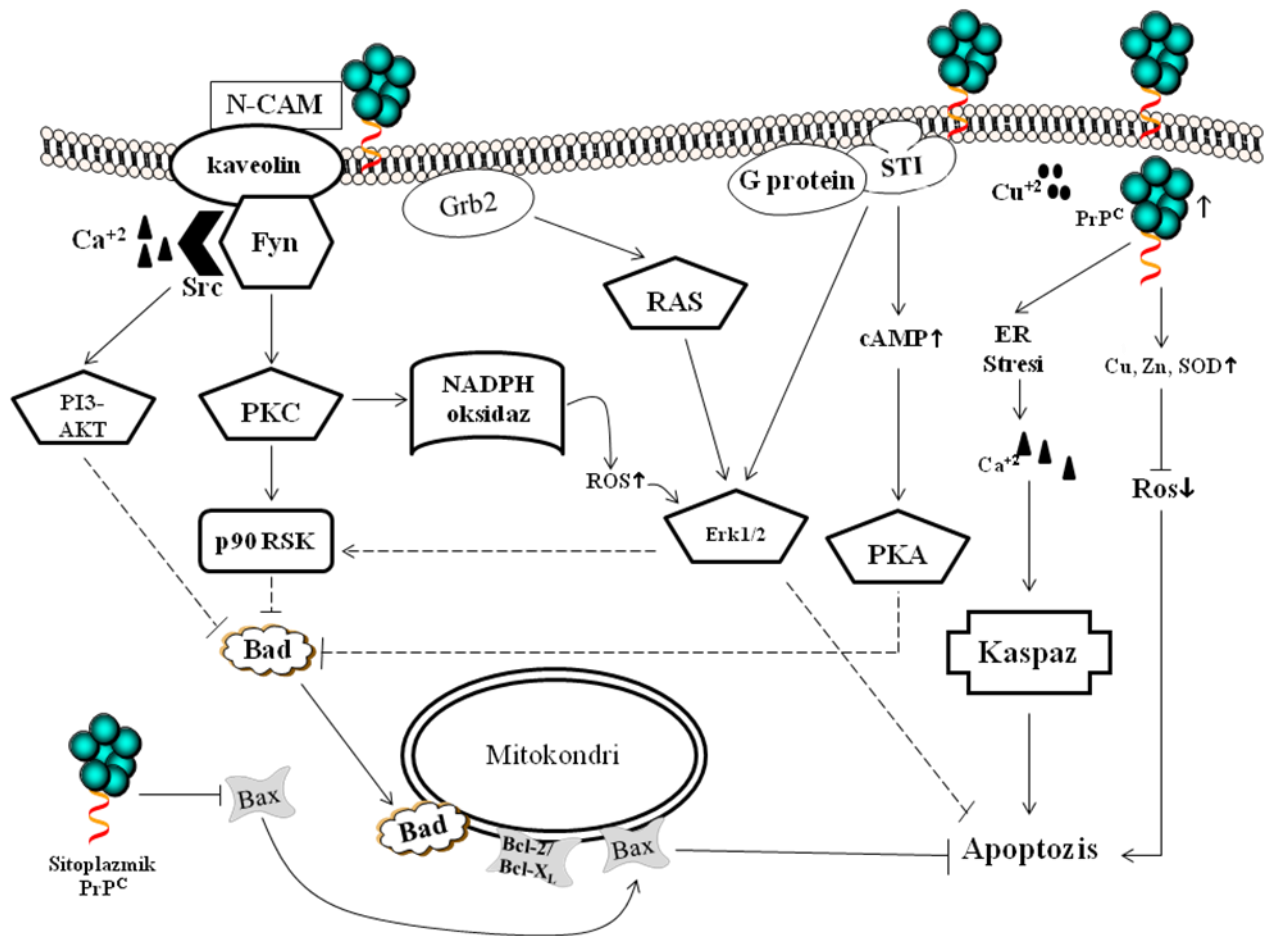
| GÖREV                                                                                                                | REFERANS       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Oksidatif strese direnç/ Nöroprotektif etki                                                                          | (80-87)        |
| Nörit gelişimi                                                                                                       | (88-91)        |
| Akson gelişimi <sup>1</sup>                                                                                          | (92, 93)       |
| N-CAM üzerinden sinir sistemi gelişimi                                                                               | (94)           |
| Hücre adezyonu                                                                                                       | (88, 95)       |
| HIV-1 ile ilişkili MSS hastalıkların patogenezi                                                                      | (96)           |
| Monosit migrasyonu <sup>2</sup>                                                                                      | (97)           |
| T hücreleri üzerine sinyalleme/ T hücresi aktivasyonu                                                                | (84, 98, 99)   |
| Anti-apoptotik etki                                                                                                  | (86, 100-102)  |
| PrP (106-126) peptidi ER stresi, mitokondrial sitokrom c salınımı, kaspaz 3 aktivasyonu ve hücre ölümüne neden olur. | (103)          |
| Fagositozun modülasyonu                                                                                              | (104)          |
| Histon H3 ile etkileşimi ve transkripsiyonel düzenleme                                                               | (105)          |
| Metastaz ve invazivlik, kanser terapilerine direnç <sup>3</sup>                                                      | (72, 106, 107) |
| Glikolizin düzenlenmesi <sup>4</sup>                                                                                 | (108)          |
| Embriyogeneizde pleiotropik etki <sup>5</sup>                                                                        | (109)          |
| Hematopoetik kök hücre self-renewal                                                                                  | (110, 111)     |

1. Sinir rejenerasyonunda sinirlerde artan PrP<sup>C</sup> aksonal olarak transport edilen PrP<sup>C</sup> miktarını artırır (92)
2. PrP<sup>C</sup> kan-beyin bariyerini oluşturan beyin endotelinde bağlantı proteini olarak bulunur ve monositlerin transendotelyal göçünü düzenler (97).
3. Prion proteinleri aracılığı ile ortaya çıkan olaylar, kendi kendine yetebilme, anti-büyüme sinyallerine duyarsız kalma, doku invazyonu ve metastaz, sınırsız replikatif potansiyel ve apoptosizin inhibisyonu (112) gibi kanser belirteçlerini ortaya çıkartacak olayları desteklemektedir. Çeşitli tip kanserlerde PrP'nin aşırı ekspresyonu hızlı hücre proliferasyonu ve/veya survival artışı ile ilişkilidir (72). Örneğin, aşırı PrP ekspresyonu gastrik kanser hücre hatlarında Akt yolunun aktivasyonuna ve hücrelerin adesif, invaziv ve metastatik bir fenotip kazanmasına neden olur (106). Ayrıca, Akt aktivasyonu ile MAP-kinaz ERK1/2 fosforilasyonu üzerinden tümör invazyonu ve metastazı için önemli bir adım olan ekstrasellüler matriks yıkımından sorumlu bir proteaz olan matriksmetaloproteinaz 11'in ekspresyonunu artırır (106, 113, 114). Öte yandan, metastatik sürecin gelişiminde PrP<sup>C</sup> integrin $\alpha$ (v) $\beta$ 3 ekspresyonunu ve aktivasyonunu negatif olarak modüle eder (107).
4. Glikolizin düzenlenmesi sırasında PrP<sup>C</sup>, glukoz transporter1 ekspresyonunu Fyn-HIF-2 $\alpha$  yolu üzerinden modüle eder (108).
5. Ca<sup>+2</sup> bağımsız homofilik hücre adezyonunu ve sinyallemesini, hücre zarına E-kaderin salınımını düzenleyerek Ca<sup>+2</sup> bağımlı hücre adezyonunu kontrol eder (95).

### 2.3.4. Prion Proteinleri ve Sinyal Transdüksiyonu

GPI-çapalı proteinlerin hücre içi sinyal iletimi yollarında yer alabilmeleri için, bir transmembran adaptör protein ile etkileşmesi gerekmektedir. Bu nedenle polipeptid zincirleri tamamen ekstrasellüler kısımda yer alan  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , hücre içi sinyal iletimi yollarında etki göstermek için transmembran adaptör proteinlere ya da protein komplekslerine bağlanırlar (25, 32). Ayrıca,  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'lerin çoğunlukla hücre yüzeylerinde, özellikle de sinyal transdüksiyonu açısından önemli bir hücre bölge olan lipid raflarında yerleşmiş olması hücre içi sinyal iletiminde rol alabileceklerini düşündürmüştür (115, 116).

PI3-kinaz/AKT, cAMP/PKA, PKC, Fyn ve ERK1/2 gibi sinyalleme yolları ya da sinyalleme bileşenleri  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ekspresyonları, çapraz bağlanmaları ya da bir başka proteinle etkileşimleri sonucunda modüle edilmektedir (25) (Şekil 2.3). Yapılan çalışmalar, endojen olarak eksprese edilen  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin hücrenin kaderini belirleyen hücre adezyonu, trafiği, proliferasyonu, farklılaşması gibi çeşitli hücre içi sinyalleme yollarına katıldığını ortaya koymuştur.



Şekil 2.3. PrP'nin hücre içi sinyal iletimindeki olası yeri. Nöronal farklılaşan hücrelerde Fyn, kaveolin-1'e aracılığı ile  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'ye bağımlı olarak aktive olur. Bu aktivasyon ERK1/2 yolunu aktive eder. ERK1/2, NADPH oksidaza bağımlı bir mekanizma ile ROS üzerinden kontrol edildiği için  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin hücre içi redoks

homeostazını sürdürmekte bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (117). Fyn kinaz aktivitesi genel olarak nörit gelişiminde gerçekleşmesine karşın, PI3-kinaz/AKT yoluyla Bcl-2 ve Bax ekspresyonlarının Fyn kinaz üzerinden düzenlenmesi PrP'nin survival etkisi olarak değerlendirilebilir. Nöron yüzeyinde N-CAM ve PrP<sup>C</sup> etkileşimleri Fyn kinaz aktivitesine ve nörit gelişimine neden olur. Öte yandan, stres-inducible protein-1 (STI1) ile bağlantısı cAMP/PKA ve ERK yoluyla hücreleri apoptozisten korur (nöroprotektif etki). PrP<sup>C</sup> aynı zamanda laminin ile de bağlanarak MAP-kinaz/ERK yolunda rol alabilir. Endositik hücre içi PrP<sup>C</sup>, bir adaptör protein olan Grb2 (growth factor receptor binding protein) bağlanarak RAS aktivitesine neden olabilir. Öte yandan, PrP<sup>C</sup> hücre ölüm mekanizmaları üzerine farklı roller üstlenebilir. Örneğin, endoplazmik retikulum stresi durumunda proapoptotik bir role sahipken oksidatif stres-indüklü hücre ölümünde anti-apoptotik bir faktör olarak davranır (ayrıntılar için metine bakınız). Oklar aktivasyon, çekiçler inhibisyon, kesik çizgiler yolunun hipotetik kısmını göstermektedir [Mehrpour ve Codogno'dan (25) değiştirilerek alınmıştır].

Nöronal yaşam, nörit büyümesi ve nörotoksisite gibi birçok süreçte PrP<sup>C</sup>'nin sinyalleme yollarını aktive ettiği ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (32). Örneğin, bir nöroektodermal hücre hattında (1C11) PrP<sup>C</sup>'nin antikor aracılığı ile bir non-reseptör tirozin kinaz olan fyn'yi uyardığı (88, 118), bu uyarının NADPH oksidaz ve ERK'lerin (extracellular-regulated kinazların) aktivasyonlarını ve reaktif oksijen türlerinin sentezini arttırdığı gösterilmiştir (117, 119). Bu hücrelerin yüzeylerinde bulunan G protein kenetli serotonin reseptörlerinin aktivitesi de PrP'nin antikor ile etkileşimi sonucu değişmektedir (120). Hücre yüzey PrP<sup>C</sup>, N-CAM ile etkileşerek aksonal gelişimi kolaylaştırmaktadır. PrP<sup>C</sup>'nin N-CAM ile etkileşimi bu molekülleri lipid yığınlarına çeker ve fyn kinaz aktivitesine neden olur (94). Kültüre nöronların rekombinant PrP ile muamelesinin de fyn, PKC, cAMP/PKA, PI-3 kinaz/AKT ve ERK gibi çeşitli kinazların aktivasyonu ile beraber nörit gelişimi ve nöron yaşamını arttırdığı belirlenmiştir (121, 122). Bir başka örnek PrP<sup>C</sup>'nin ısı şoku proteinleri ile kompleksler oluşturabilen bir protein olan stres-inducible protein-1 (STI1) ile etkileşimidir (123). Bu etkileşimin retinal eksplantlarda anisomycin aracılığı ile hücre ölümünden PrP<sup>C</sup>'ye bağımlı korunmayı düzenlediği (124), bu etkinin cAMP/PKA yoluyla aktivasyonu ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür. (125). Bunlardan başka, PrP<sup>C</sup>'nin nöroprotektif etkisinde PI3 kinaz/AKT sinyalleme yolunun önemli bir rol oynadığı, özellikle AKT'nin farmakolojik olarak inhibisyonunun PrP<sup>C</sup>'nin hücreleri oksidatif strese karşı koruma yeteneğini azalttığı belirlenmiştir (126, 127).

PrP<sup>C</sup> sinyal transdüksiyonundaki bu pozitif etkilerinin yanı sıra özel sinyalleme kaskadlarının aktivasyonları üzerinden nörotoksik etkiler de gösterebilir. Örneğin, PrP<sup>Sc</sup> ile benzer biyokimyasal özellikler gösteren sentetik bir peptid olan PrP106-126'nın sadece PrP<sup>C</sup> içeren kültüre nöronlarda ve nöronal hücre hatlarında toksik olduğu (128) ve bu toksik etkinin PrP<sup>C</sup> -bağımlı bir sinyalleme yoluyla düzenlendiği ileri sürülmüştür (129, 130). Bu iddia üzerine PrP106-126'nın p38, ERK1/2 ve JNK1/2 gibi çok sayıda kinaz kaskadını aktive ettiği belirlenmiştir (131-133). PrP<sup>C</sup> aracılığı ile gerçekleşen



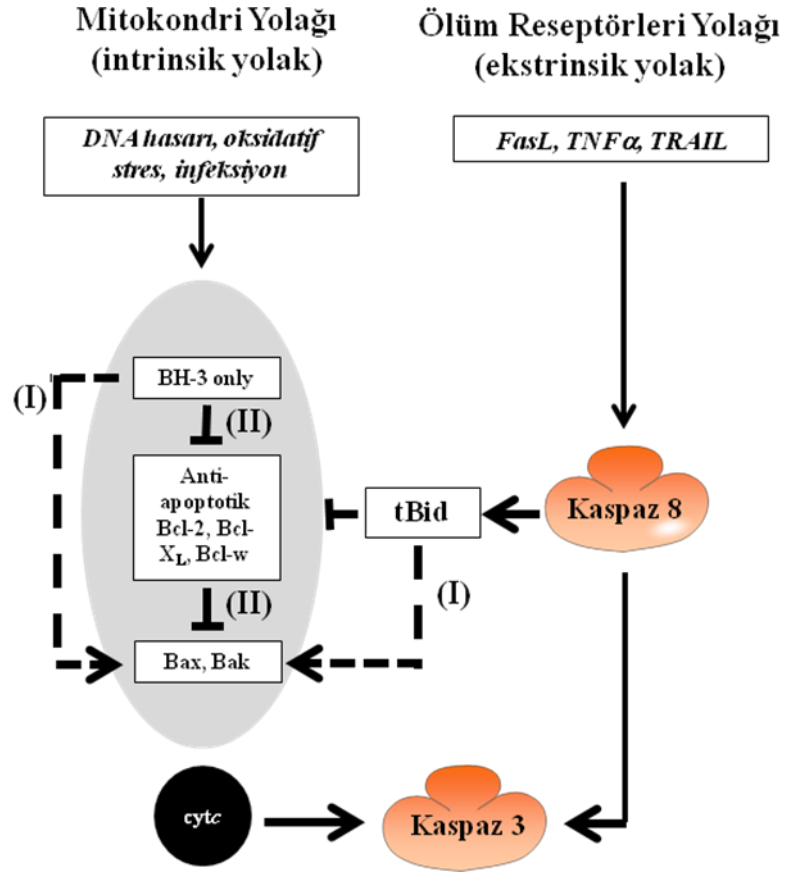
nörotoksositeye bir başka örnek, PrP<sup>C</sup> ekspresyonunun nöronları ve nöron hücre hatlarını bir kinaz inhibitörü olan staurosporine'in apoptotik etkilerine duyarlı hale getirmesidir (134-136). Bu etkilerin gerçekleşmesi için PrP<sup>C</sup>'nin endositozu gereklidir (32).

## 2.4.PrP<sup>C</sup> ve Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda homeostazis, hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanır (137-139). **Apoptozis**, hasar görmüş, potansiyel olarak zararlı olabilecek, organizmanın ihtiyacı olmayan ya da istenmeyen hücrelerin kendi genetik yapısındaki kodlanmış bir program ile kontrol edilen fizyolojik bir hücre ölümü tipidir (140). Apoptotik hücre ölümü bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişimi içerir ve hücre büzülmesi, nuklear kondensasyon ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (141, 142). Bu süreçte, sitoplazmada kaspaz aktivasyonu ve mitokondriden sitokrom c salınımı (143-145), mitokondride Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyelerinin görülmesi (146, 147) ve plazma membranında fosfatidilserin eksternalizasyonu da söz konusudur (148). Apoptotik süreç, ölüm reseptörleri (TNF $\alpha$  ve reseptörü, FAS/FAS ligandı ve TRAIL/TRAIL reseptörü) aracılığı ile olan ekstrinsik ve mitokondriye bağımlı intrinsik yol (BCL2 ailesi, BAX, sitokrom C/APAF kompleksi) olmak üzere iki temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Her iki yolda da farklı moleküler mekanizmalar sonucu **kaspazlar** (cysteinyil aspartate specific proteinases) aktive olmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (149, 150). Bununla birlikte, üçüncü olarak hakkında bilgilerin sınırlı olduğu, kaspaz 12'ye bağımlı olan intrinsik endoplazmik retikulum yolundan söz edilmektedir (151).

### 2.4.1.Ekstrinsik Ölüm Reseptörleri Yolağı

Ölüm ligandlarının (TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL) ölüm reseptörlerine [Tip-1 TNF reseptörü-TNFR1, Fas (APO-1,CD95), DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2)] bağlanması ile başlayan bir süreçtir (152, 153). Ölüm reseptörleri TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini (TNF receptor-associated death domain-TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (Fas-associated death domain-FADD) gibi bazı adaptör proteinlerin ve kaspaz 8'in tutulmasını sağlayacak ölüm domainlerini içerir (154). Oluşan ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi "ölümü uyaran sinyalleme kompleksi" (death-inducing signalling complex-DISC) adını alır. DISC "başlatıcı" kaspaz olan kaspaz 8'in aktivasyonunu sağlar (155). Aktive kaspaz sonraki kaspazların aktivasyonuna neden olarak apoptozisi başlatır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hücrede görülen apoptotik yollar. Mitokondriyal yolda BH3-only proteinler Bax ve Bak'a bağlanarak direkt aktivasyonuna neden olur (I, kesikli çizgiler) ya da Bcl-2 benzeri prosurvival proteinlere bağlanarak Bax ve Bak'ı indirekt olarak aktive eder (II) [ Westphal ve arkadaşlarından (159) değiştirilerek alınmıştır].

#### 2.4.2.İntrinsik Mitokondriyal Yolak

Onarılamayan genetik hasarlar, hipoksi, sitosolik Ca<sup>+2</sup> iyonunda aşırı artış ve yoğun oksidatif stres intrinsik mitokondriyal yolağı tetikleyen bazı faktörlerdir (156). Bu yolak mitokondriyal geçirgenliğin artması ve sitokrom-c gibi bazı pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya çıkışı ile ilişkilidir (157). Bcl-2 ailesine ait bir grup protein bu süreç içerisinde yer almaktadır. Bcl-2 ailesi mitokondri dış zarında por oluşturan Bax ve Bak proteinlerini, pro-apoptotik BH3-only proteinleri (Bad, Bid, Bik, Bim, Puma, Noxa ve Bik) ve Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinleri içerir (158, 159) (Şekil 2.5). Bu protein ailesi dört Bcl-2 homoloji domaini (BH1-BH4) ile karakterizedir (160).

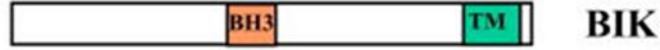
### 1. Anti-apoptotik proteinler, BH1-4-Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, MCL-1, A1, Bcl-w



### 2. Pro-apoptotik proteinler, BH1-3-BAX, BAK, BOK



### 3. Pro-apoptotik proteinler, BH3-only- BIK, BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK



Şekil 2.5. BCL-2 protein ailesi üyeleri ve domain yapıları [Lomonosova ve Chinnadurai'den (160) alınmıştır].

Anti-apoptotik proteinler sitokrom c salınımını bloke ederek apoptozisi düzenlerken pro-apoptotik olanlar sitokrom c salınımını artırırlar. Pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge durumu apoptozisin gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini belirler. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1) ve kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Apoptozom, kaspaz 3'ün aktivasyonuna neden olur (161). İntrinsik ve ekstrinsik yollar kaspaz 3'te birleşir ve apoptozisten sorumlu kaspaz aracılığı ile aktive olmuş deoksiribonukleaz inhibitörlerin aktivitelerini bozar (156). Bunun yanında diğer kaspazlar, protein kinazların, sitoskelet proteinlerinin, DNA tamir proteinlerinin ve endonukleaz inhibitörlerinin bozulmasına neden olur (156).

PrP<sup>C</sup>'nin hücreleri oksidatif strese koruduğu ve apoptozisi engellediği ifade edilmektedir (71). PrP<sup>C</sup>'nin STI1 ile etkileşimi hücreleri apoptozisten koruyacak nöroprotektif sinyaller oluşturur (71, 124). Bu nöroprotektif sinyaller cAMP/PKA yoluyla

üzerinden gerçekleşmektedir (124). Üstelik endojen PrP, kültüre nöronları oksidatif strese, beyin dokularını iskemiye, hipoksiye veya travmaya karşı korur (37, 71, 162).

PrP'nin N terminalindeki oktapeptid bölge hem anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinde hem de Bcl-2 ailesinin proapoptotik Bax ve Bak üyelerinde bulunan Bcl-2 homoloji domain-2 (BH2) ile büyük ölçüde amino asit dizi benzerliği gösterir. Bu benzerliğin PrP'nin hücre ölümü ya da yaşamında bir rol oynadığı düşünülmüştür (51). Bax nöronlarda önemli bir pro-apoptotik proteindir. Aktive olduğunda yapısal değişikliğe giderek oligomerize olur ve mitokondri dış zarını sitokrom c ve diğer apoptojenik faktörler için geçirgen hale getirir (163, 164). Aşırı miktarda eksprese edildiğinde Bax insan nöronlarında hücre ölümüne neden olmaktadır. BH2 domaini ise Bcl-2'nin Bax ile etkileşimini düzenleyerek anti-apoptotik bir etki yaratır (51). PrP'ler direkt olarak Bax ile etkileşir ve Bax'ın yapısal değişiklik geçirerek pro-apoptotik bir proteine dönüşümünü, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek Bax-aracılığıyla gerçekleşen apoptozise engel olur (165-168). Aşırı miktarda PrP içeren hücrelerin TRAIL-R/DR4/DR5 (TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand reseptörü) ve TNF aracılı apoptozise dirençli oldukları bildirilmiştir (169).

İntrinsik yolağın anahtar molekülleriyle etkileşimler ekstrinsik (TNF, TRAIL) yolağının pro apoptotik sinyallere PrP aracılığı ile direnç göstermesini hala açıklayamamaktadır (170). Bununla birlikte, hücrel prion proteinleri ekspresyonlarının otofajiye bağımlı hücre ölümünü modüle ettiği yönünde bilgiler de mevcuttur (171).

PrP'nin anti-apoptotik (pro-survival) etkilerine karşın apoptotik mekanizmalarda rol aldığına dair çalışmalar da vardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada CD95/Fas etkileşimi ile PrP<sup>C</sup>'nin T lenfoblastoid CEM hücrelerinin mitokondrilerinde raft-benzeri mikrobölgelere yerleştiği ve apoptozis ile ilişkili sinyalleme olaylarında rol oynayabileceği ortaya konmuştur (172). Öte yandan, PrP'nin tubulin proteinlerine bağlanarak mikrotubul oluşumuna engel olduğu ve sitosolik PrP'nin neden olduğu mikrotubul yıkımı ile apoptozis arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (173).

Sitoplazmik PrP'nin kümelenmesinin veya PrP<sup>Sc</sup> replikasyonunun endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal transmembran potansiyelin kaybı ve kaspaz 3'ün aktivasyonu ile ilişkili olarak apoptozise neden olduğu belirlenmiştir (174-176). Öte yandan, prion proteininin glikozilasyonu ile apoptozis arasında bir korelasyon olduğu, non-glikolize PrP formların hücre içinde ekspresyonlarının mitokondri membran potansiyelini

düşürdükleri, ROS üretimini arttırdıkları, Bcl-xL düzeyini düşürerek ve kaspaz 9 aktivitesini arttırarak apoptozise neden oldukları belirlenmiştir (177, 178).

## **2.5.Prion Hastalıklarının Mekanizması ve PrP<sup>Sc</sup>**

Konformasyonel hastalıklar olarak da adlandırılan protein yanlış katlanma bozukluklarının temel nedeni proteinlerin  $\beta$ -sheet agregatları oluşturacak şekilde yanlış katlanmasıdır (179). Proteinlerin yanlış katlanması bulaşıcı sponjiyofom (süngerimsi) ensefalopatiler (transmissible spongiform encephalopathies-TSE) olarak adlandırılan prion hastalıklarında yoğun olarak görülen bir durumdur (180). TSE'ler insan ve hayvanları etkileyebilen bir grup infeksiyöz nörodejeneratif hastalıktır. Özellikle, beyin vakoulizasyonu, astrogliosis, nöron apoptozisi ve merkezi sinir sisteminde yanlış katlanmış, proteazlara dirençli prion proteinlerinin (PrP<sup>Sc</sup>) yığılması ile karakterizedir (181, 182).

Prion hastalıklarındaki prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) agregatları Alzheimer's hastalığında (AD) amiloid-beta (A $\beta$ ), tip 2 diyabette islet amiloid polipeptid (IAPP), sekonder amiloidozda serum amiloid A (SAA) ekstrasellüler olarak yığılma gösterirken, Parkinson hastalığında alfa-sinuklein ( $\alpha$ -syn), amiotropik lateral sklerozisde (ALS) süperoksit dismutaz-1 (SOD) ve TAR DNA-binding protein (TDP-43), taupatilerde ya da AD'de tau ve Huntington hastalığında huntingtin (Htt) intrasellüler olarak görülen diğer yanlış katlanmış agregatlardır (183, 184).

Proteinler çeşitli nedenlerden dolayı yanlış katlanabilir (179):

1. Doğru katlanma yapamayan bir proteinin üretimini başlatacak gen dizisindeki somatik mutasyonlar;
2. Doğru katlanma yeteneği olmayan modifiye proteinlerin üretimini, transkripsiyonunu ya da translasyonunu başlatacak süreçlerdeki hatalar;
3. Katlanma ve şaperon proteinlerinde bozukluklar;
4. Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarında veya trafiğinde hatalar;
5. Çevresel değişikliklerden kaynaklanan yapısal modifikasyonlar;
6. "Tohumlama" (seeding) ve karşılıklı tohumlama (cross-seeding) mekanizmaları ile protein yanlış katlanmasının indüksiyonu.

PrP<sup>Sc</sup> prion enfekte hücrelerde, özellikle nöronlarda üretilir. Yapılan çalışmalar PrP<sup>C</sup>'nin PrP<sup>Sc</sup> üretimi için gerekli olduğunu göstermiştir (185-188). Bununla birlikte, PrP<sup>Sc</sup>'nin PrP<sup>C</sup>'den mi, immatür katlanmamış PrP'den mi yoksa her ikisinden mi üretildiği

ve başka moleküllerin yeni prionların üretiminde rol alıp almadığı bilinmemektedir (21, 189). PrP<sup>C</sup> ile PrP<sup>Sc</sup>'nin amino asit sayıları aynıdır ancak, her iki proteinin yapısında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, PrP<sup>C</sup> daha az  $\beta$ -sheet yapı içerirken (PrP<sup>C</sup> %3, PrP<sup>Sc</sup> %43), daha fazla oranda  $\alpha$ -heliks yapısı içerir (PrP<sup>C</sup> %42, PrP<sup>Sc</sup> %30) (190). Öte yandan, oldukça kolay çözülebilen ve proteinaz K'ya duyarlı olan PrP<sup>C</sup>'ye karşılık PrP<sup>Sc</sup> göreceli olarak proteinaz K'ya dirençlidir ve hızlı bir şekilde amiloid fibrilleri oluşturmak için kümelenir (21, 181). İnfeksiyöz PrP<sup>Sc</sup> proteinlerinin konak PrP<sup>C</sup> moleküllerini yeni PrP<sup>Sc</sup> molekülleri oluşturmak için yapısal değişikliğe indüklemesindeki mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. PrP'deki  $\alpha$ -helikslerin  $\beta$ -sheet dizilere dönüşmesinin PrP<sup>Sc</sup> üretiminde anahtar bir adım olduğu düşünülmektedir (21). Öte yandan, bu değişim sürecindeki yapısal ve kimyasal dinamikler hala belirsizliğini korumaktadır. Örneğin, PrP<sup>C</sup>'deki molekül içi disülfid köprülerinin PrP<sup>Sc</sup>'ye dönüşüm sırasında sağlam mı kaldığı yoksa proteinin yeniden düzenlenmesine olanak sağlamak için kırılması mı gerektiği konusunda bir bilgi yoktur (189).

İnsan prion hastalıklarında en çok PrP<sup>Sc</sup> tip1 (21 kDa) ve PrP<sup>Sc</sup> tip 2 (19 kDa) içeren PrP27-30 görülür. Bunun yanında PrP11, PrP7-8, PrP14, PrP-CTF12/13, PrP16-17 ve PrP17.5-18 gibi proteinaz K'ya dirençli türler de belirlenmiştir (191-197).

## 2.6.Prion Hipotezi

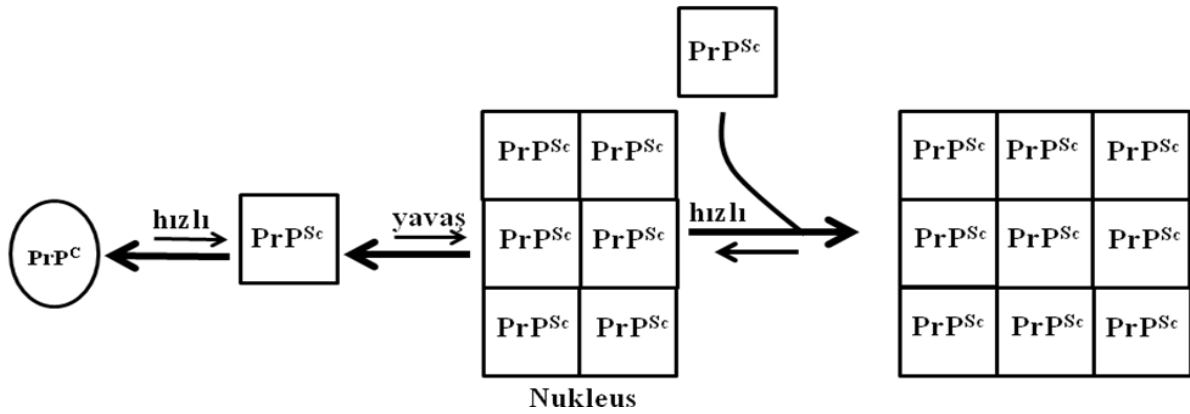
Prion hipotezi ya da “protein-only” hipotezi viruslar ya da nükleik asitler yerine proteinlerin infeksiyöz olduğunu ve kalıtsal bilgi taşıyabileceğini ileri sürmektedir (198). Bir proteinin kendini çeşitli şekillerde çoğaltabilen konformasyonlara yanlış olarak katlanmasının maya, mantar ve son yıllarda insanlarda prion kalıtımının orijini olabileceği düşünülmüştür (199, 200).

Protein-only hipoteze göre, infeksiyöz patojen, asıl proteinde (PrP<sup>C</sup>'de) görülmeyen özellikler içeren, proteinaz K'ya direnç ve toksisite gibi yeni özellikler kazanmış farklı TSE'lerde serebral kümelenmeler oluşturan, yanlış katlanmış PrP<sup>Sc</sup>'dir (201, 202). Prion çoğalması, normal hücrel prion proteinin (PrP<sup>C</sup>) infeksiyöz izoformuna (PrP<sup>Sc</sup>) dönüşümünü içerir (203, 204). Anormal PrP<sup>Sc</sup>'nin diğer PrP<sup>C</sup>'leri de patolojik forma sokacak bir değişime sürükleyecek yapısal bir kalıp olarak görev yaptığına ve böylelikle otokatalitik bir mekanizmayla kendini çoğalttığına inanılmaktadır (5, 8, 204). Viruslar ya da nükleik asitlerden çok proteinlerin infeksiyöz özellikte olduğunu ve kalıtsal bilgi taşıdığını ileri sürmesi nedeniyle protein only model moleküler biyolojide yeni açılımlar

ortaya koymuştur (5, 205). Günümüzde protein-only hipotezini destekleyen çok sayıda çalışma ortaya konmuştur (5).

### 2.6.1. $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye Dönüşüm Modelleri

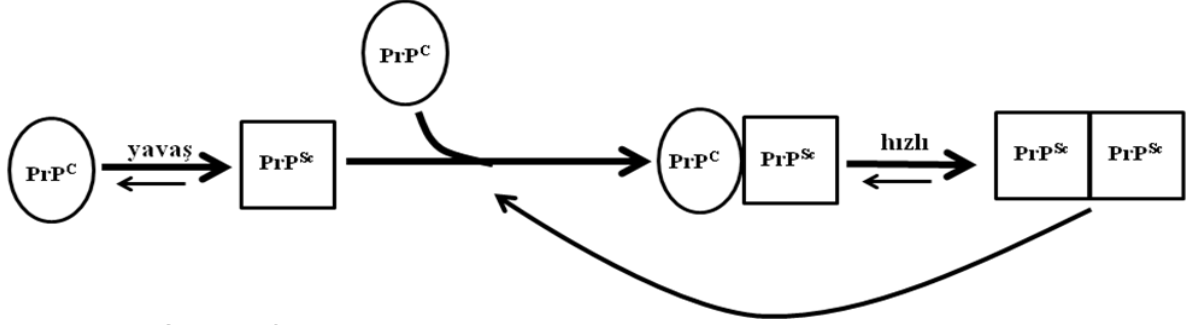
Prion çoğalmasını açıklayan iki yaygın hipotez model bulunmaktadır: Bunlardan birincisi, **Nukleasyon-bağımlı polimerizasyon modeli (NBP)**,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ile  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  arasında termodinamik bir eşitlik olduğunu ileri sürmektedir (206).  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin dönüşümü sonrasında monomerik  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  öncülerinin ekleneceği, bir nükleus olarak görev yapacak kritik büyüklükte bir  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  oligomeri oluşumu görülür. Termodinamik dengenin bu şekilde bozulması sonucunda monomerik  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  konsantrasyonu kritik düzeyin üzerine çıkarsa nukleasyon mekanizması devreye girer. Oligomerler nükleus olarak görev yapar ve monomerik  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'leri çağırarak  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'nin hızlı bir şekilde çoğalmasını sağlar (206) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Prion proteininin self replikasyonunda önerilen nukleasyon bağımlı model (NBP).  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümü sırasındaki hız kısıtlayan adım oligomerik bir  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nükleusun oluşumudur. Bu nükleus daha sonra monomerik  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  molekülleri oligomere ekleyecek reaksiyonu hızlandırır.

Tüm prion hastalıklarındaki prion protein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) agregatları nukleasyon ile ilişkili bir mekanizma ile oluşmaktadır.  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümü sırasında  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  oligomerlerinin oluşumu hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur. Bu nükleus oluşumu aşaması, termodinamik olarak uygun olmayan uzun bir lag fazına (gecikme evresine) neden olur. Agregasyon sürecindeki gecikme evresi daha önce oluşmuş agregatlar ya da nükleuslar-("kaynak"lar) aracılığı ile ortadan kaldırılabilir. Nükleus oluşumunun ardından agregat gelişimi soluble protein monomerlerinin eklenmesiyle katlanarak artar. Soluble proteinlerin toplanarak agregatlar haline dönüşmesi sürecine "seeding" (tohumlama) adı verilir (184).

**Kalıp-destekli (template-assisted) ya da heterodimer model** olarak adlandırılan ikinci model, bir  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  homodimeri şeklinde yeniden katlanma gösterecek  $\text{PrP}^{\text{C}}$  -  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  heterodimerleri oluşumunu içeren ve  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümün kinetik olarak kontrol edildiği bir süreçtir (181, 204, 207). Monomerik  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  molekülü oluşumu yüksek bir kinetik bariyer nedeniyle (aktivasyon enerjisinin yüksek olması nedeniyle) engellenir.



Şekil 2.7.  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümünde kalıp destekli model.

Bu modelde bir kez  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  molekülü oluştuğu zaman bir  $\text{PrP}^{\text{C}}$  molekülü ile etkileşir ve bir heterodimer yapı oluşur. Bu heterodimer, daha sonra iki  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  molekülüne dönüşür.  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  oluşumu sırasında yüksek aktivasyon enerjisi bariyeri şaperon proteinleri yardımıyla ya da kalıtsal TSE'lerde görülen mutasyonlar ile aşılr (208). Bu modelde dönüşüm reaksiyonu için hız kısıtlayıcı adım, sonradan  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'ye bağlanarak heterodimer oluşturacak  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  monomerinin oluşumudur. Ardından,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ,  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümünü hızlandırır ve böylece daha sonra iki  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  monomer molekülüne ayrılacak bir homodimer oluşumunu başlatır (Şekil 2.7) (181, 204).

Bu bilgilerin ışığı altında planladığımız bu Yüksek Lisans Tez Projesinde ilgili literatürün çok az olduğu *Trachemis scripta* türü su kaplumbağalarında prion proteini kodlayan genin analizini yapmak ve polimorfizmlerini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca, bu polimorfizmler ile apoptozis arasında bir ilişkinin olup olmadığını ortaya koymak, projenin diğer bir amacını oluşturmaktadır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Materyali

Yapılan yüksek lisans tez projesinde materyal olarak Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni (Sayı: 2009-102) çerçevesinde ithal olarak temin edilen su kaplumbağaları kullanıldı.

*Trachemys scripta* türü kaplumbağalarda prion proteinini kodlayan genin dizisi bilinmekle (209) beraber bu genlerin polimorfik analizleri ile ilgili literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklar açısından önemli olan prion proteinlerinin polimorfik analizi için bu tür seçildi ve çalışmada kullanılacak hayvan sayısı **otuz** olarak belirlendi.

##### 3.1.1. *Trachemys scripta elegans* Wied 1839'un Sistematığı ve Özellikleri

**Alem:** Animalia

**Şube:** Chordata

**Sınıf:** Reptilia

**Takım:** Testudines

**Familya:** Emydidae

**Cins:** *Trachemys*

**Tür:** *Trachemys scripta*

**Altür:** *Trachemys scripta elegans*

Semiakvatik canlılar olan bu türün ayırıcı özelliği, kafalarının yan tarafındaki kırmızı şeritler olmasıdır. Anavatanları Kuzey Amerika'nın güney bölgeleri olan, Florida ve Meksika'dır. Hem hayvansal hem bitkisel besinleri tüketebilirler. Dişileri 25-33 cm, erkekleri ise 20-25 cm kadar büyüyebilirler.

Çalışmada kullanılması için temin edilen ithal su kaplumbağaları, diseksiyonları gerçekleştirilene kadar 100 x 30 cm'lik 2 adet akvaryuma her biri 15 adet olacak şekilde

yerleştirildi. Akvaryumdaki ortam, doğal ortamlarına uygun olarak hazırlanıp zeminine küçük taşlar konuldu. Kaplumbağaların tırmanmaları ve kuru alan ihtiyaçları için kayalar eklendi. Ayrıca akvaryumlar gün ışığı alacak şekilde konumlandırıldı. Akvaryumdaki suyun oksijen düzeyinin yüksek tutulması için hava kompresörü kullanıldı ve su sıcaklığını tür için uygun olan 26-28°C’de tutabilmek amacıyla ısıtıcılar takıldı. Beslenmelerinde ise türe uygun hazır yemler kullanıldı.

### **3.2. Dokuların Eldesi**

Kaplumbağaların disekte edilmesinde kullanılan anestezik madde ketamin-xylasine kombinasyonu olup intramuskuler olarak 5/2 mg/kg dozda verildi (210). Sonrasında kaplumbağalar dekapite edilerek DNA izolasyonunda kullanılmak üzere akciğer ve karaciğer dokusu, TUNEL işleminde kullanılmak üzere de beyin dokusu çıkarıldı. DNA izolasyonunda kullanılacağı için akciğer ve karaciğer dokusu kısa süreliğine +4 °C’de saklandı. TUNEL işleminde kullanılacak olan beyin dokuları ise tespit edildi. Fiksasyon için %10’luk nötral formalin<sup>4</sup> kullanıldı. Dokular 1 gün fiksatifte bekletildi. Daha sonra %70’lik alkole alındı ve parafine gömülünceye kadar +4 °C’de muhafaza edildi.

### **3.3. Parafine Gömme ve Kesit Alma**

+4 °C’de %70’lik alkolde saklanan beyin dokuları, artan alkol serisinden (2 x 30 dk %75’lik etil alkol, 2x30 dk %80’lik etil alkol, 2x1 saat %90’lik etil alkol, 2x1 saat %96’lik etil alkol, 2x1 saat %100’lük etil alkol) geçirilerek dehidratasyonu yapıldı. Daha sonra dokular ksilenden geçirilerek şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Elde edilen bloklardan mikrotom (Leica RM 2125RT) kullanılarak 5 µm kalındığında kesitler alındı. Kesitler lamalar üzerine su içinde açılarak yerleştirildi ve 45 °C ye ayarlanmış ısıtıcı tabla üzerinde kurutuldu. Bu aşamada polizinli lamalar kullanıldı. Ardışık kesitler 7 farklı lam üzerine gruplar halinde (1. kesit 1. lama, 2. kesit 2. lama, 8. kesit 1. lama, 9. kesit 2. lama şeklinde) alınarak aynı bölgelerin farklı lamalar üzerinde yakalanması amaçlandı. Hazırlanan lamlardan seçilen bir grup, ksilol ile deparafinize edildi ve azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Genel histolojik yapıyı görmek ve apoptotik hücreleri belirlemek için kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı.

---

<sup>4</sup> %10 nötral formalin: 10 ml formol, 90 ml phosphate buffered saline (PBS 10X pH 7.4 için: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,725 gr, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 gr, NaCl 22,5 gr, 250 ml distile su. 1M NaOH ile pH 7.4 ayarlanır.

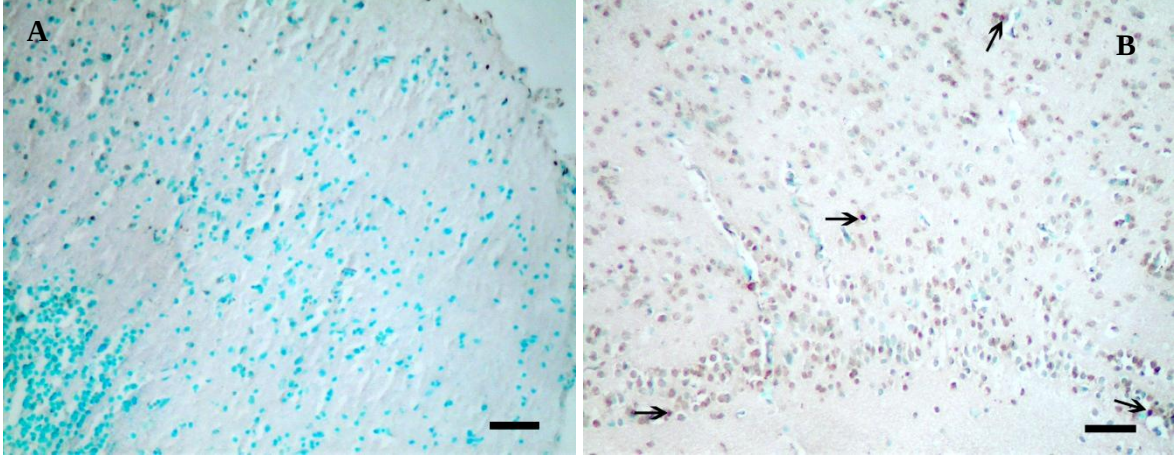
### 3.4. Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Uygulaması

Apoptotik hücrelerin beyin dokusundaki yerleşimlerinin ve yoğunluklarının belirlenmesi için TUNEL yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, apoptotik süreçte oluşan DNA kırıklarını saptamak için uygulanmaktadır. TUNEL işlemi için, *In situ* Cell Detection Kit, POD (Roche, Cat. No. 11 684 817 910) kullanıldı. Polilizinli lamlara alınan beyin dokusu kesitleri TUNEL uygulanması için bir gece süresince 60° C sıcaklıkta etüvde bekletildi. Ardından şeffaştırma (2x30 dk ksilol) yapıldı. Azalan alkol serisinden geçirilerek rehidratasyon sağlandı. Kesitler distile suda 5 dk bekletilip, PBS (pH 7.4) ile yıkandı (2x5 dk). Kesitlere oda sıcaklığında proteinaz K<sup>5</sup> ile 20 dk muamele edilerek DNA'ya bağlı olan protein molekülleri uzaklaştırıldı ve ardından PBS ile yıkandı. Negatif kontrol olarak kullanılacak olan kesitler belirlendi. Bütün kesitler hidrofobik pap pen ile yuvarlak içine alındı. Her bir kesit için 50 µl olacak şekilde TUNEL reaksiyon karışımı (45µl işaretleme (label) solüsyonu + 5µl TdT enzim solüsyonu) hazırlanıp kesitlerin üzerine konuldu. Negatif kontrol için ayrılan kesitlerin üzerine ise yine her bir kesit için 50 µl olacak şekilde TdT enzim solüsyonu içermeyen işaretleme solüsyonu eklendi (Şekil 3.1), 37 °C'lik etüvde nem odası içerisinde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı. Kesitlerin tamamına bundan sonra basamakta, her bir kesit için 50 µl olacak şekilde Converter-POD konuldu ve 37 °C'lik etüvde yarım saat inkübe edildi. PBS ile 2 kez yıkandı. Bu işlemin ardından kesitlere DAB substrattan<sup>6</sup> (Roche, Cat. No. 11 718 096 001) kesit başına 50 µl eklenerek reaksiyon gerçekleşene kadar oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Reaksiyon görüldükten (kahverengi renk oluşumu) hemen sonra PBS ile 2 kez yıkama yapıldı. Karşıt boyama için, hazırlanan %0.5'lik metil yeşili<sup>7</sup> boyası kullanıldı. Kesitler metil yeşilinde 7-10 dk bekletilip, distile su ile yıkandı. 30 saniye n-butanol ile muamele edilip ksilolden geçirildi. Lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelemeye hazır hale getirildi. İncelenen kesitlerin Nikon® E4500 fotoğraf makinesi ile fotoğrafları alındı ve Adobe® Photoshop CS5 yazılımı ile düzenlemeleri gerçekleştirildi.

<sup>5</sup> Proteinaz K: PBS içinde 20µg/ml olacak şekilde hazırlandı, pH 7.4

<sup>6</sup> DAB substrat: %10 DAB/metal konsantresi, %90 peroksit tampon olacak şekilde hazırlandı.

<sup>7</sup> %0.5'lik metil yeşili: 0.1 M sodyum asetat tamponu içinde pH 4.0 olacak şekilde hazırlandı. Filtre kağıdı ile süzülerek kullanıldı.



Şekil 3.1. Kaplumbağa beyin dokularında TUNEL uygulaması. Pozitif kontrolde (B) çok sayıda apoptotik hücreye rastlanırken, negatif kontrolde (A) apoptotik hücreye rastlanmamıştır. Oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. 10X büyütme. Barlar 50 µm.

### 3.5. DNA İzolasyonu

Genomik DNA, kaplumbağaların akciğer ve karaciğer dokularından High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Cat. No. 11 796 828 001) ile elde edildi. Eppendorf tüpü içerisine akciğer/karaciğer dokusundan 25-50 mg alınarak üzerine dokuyu parçalayarak genetik materyalin serbest kalmasını sağlayacak olan Lysis Bufferdan 200 µl ve üzerine 40 µl proteinaz K eklenerek 1 saat süresince 55°C’de inkübe edildi (Doku bu süre içinde parçalanmamışsa inkübasyon süresi uzatıldı.). Lizis olan dokunun üzerine 200 µl binding buffer ilave edilip 70°C’de 10 dk inkübe edildi. 10 dk’nın sonunda 100 µl isopropanol ilave edilerek hızlıca karıştırıldı. Karışım buradan kit içeriğinde yer alan ve toplama tüpleri içine yerleştirilmiş filtre tüplerine aktarılıp, 8000g’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası filtrenin altındaki toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı ve yeni toplama tüpü yerleştirildi. Bu işlem sonrasında ekstraksiyonu yapılmış olan DNA’nın yıkanması için gerekli basamaklara geçildi. Üzerine 500 µl removal buffer eklenip 8000g’de 1 dk santrifüjlendi. Toplama tüpü yenisiyle değiştirilip filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu ilave edilip ve 8000g’de 1 dk santrifüj edilip, bu işlem 2 kere tekrarlandı. Bununla birlikte DNA’nın yıkanması gerçekleştirilmiş oldu. Yıkama tamponu sonrasında toplama tüpü değiştirildi ve yüksek hızda 10 sn kadar kalan tamponun uzaklaştırılması için filtre+toplama tüpü santrifüjlendi. Daha sonra toplama tüpü atılarak filtrenin altına eppendorf tüpü yerleştirildi ve 70°C’de tutulan elution bufferdan 200 µl ilave edilerek 8000g’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası filtredeki DNA, elution buffer ile beraber eppendorf içine aktarılmış olduğu için filtre atıldı. Eppendorf içinde kalan DNA, PCR’da

kullanılmak üzere saklanmak için -20°C’de tutuldu. Elde edilen DNA’ların miktarı ve saflığı spektrofotometre (Nanodrop 2000c) yardımıyla ölçüldü ve uygun olduğu görüldü.

### 3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyon işlemi ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından bulunan, DNA’daki özgül bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan bir yöntemdir. PCR yönteminin uygulanması için; kalıp DNA molekülü, mevcut DNA’ya uygun dizayn edilmiş primer çifti, deoksinekütidler, DNA polimeraz enzimi ve magnezyumlu reaksiyon tamponu gerekmektedir. İşlem temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır:

- Denatürasyon: Çoğaltılacak olan DNA’nın yüksek sıcaklıkta denatüre olması,
- Annealing: Primerlerin DNA’daki hedef bölgeye hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıkta bağlanması,
- Extension: Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C ‘de primerlerin uzaması ile tamamlayıcı zincir sentezi.

Çalışmamızda PCR işlemi ile çoğaltılacak olan *PrP* kodlama bölgesini (GenBank ulaşım numarası AJ245488.1) çoğaltmak için kullanılan 2 çift primer aşağıdaki gibi tasarlandı ve Genartek firmasından temin edildi (Şekil 3.2).

- 1- nükleotid 96-459’den için kullanılan primer dizileri aşağıdaki şekilde dizayn edildi:

Forward primer: 5’-TTGTGATGTGGAGCGACGTTTCCT-3’

Reverse primer: 5’-CCTGCCATGGCTTTCATGTTGGTT-3’

- 2- nükleotid 436-908’den için kullanılan primer dizileri ise aşağıdaki şekilde dizayn edildi:

Forward primer: 5’-AACCAACATGAAAGCCATGGCAGG-3’

Reverse primer: 5’-GTTTGCACAGATCAGCAGCACAGT-3’

```

GGGTAAAGGTGGAGGCGGTGGGGCGCGCAGCGCAGTGCCAGACTTATCATCATGGGAAGGTACCGGTTA
ACCTGCTGGATAGTCGTCCTTTTGGTGTGATGTGGAGCGGACGTTTCCCTTTCACAAAAAGGAAAGGGTA
AAGGTGGAGGCGGTGGGAACACAGGAAGCAACCGCAATCCCAACTATCCAGCAACCCCGGCTACCCCA
AAATCCTGGCTATCCAGAAACCCTAGCTACCCCCATAATCCTGCCTACCCCCCAATCCCGCCTATCCC
CCTAATCCCGGCTACCCCAACAATCCAGTTACCCAGGAACCCTAGCTACCCCCAGAATCCTGGCTACC
CTGGTGGTGGTGGGACGACTACAACCCAGCTGGTGGCGGAACAACTTCAAAAAACAGAGCCCTGGAA
GCGTGATAAACCCAAACCAACATGAAAGCCATGCGCAGGAGCAGCAGCGGCAGGCGCCGTGGTGGGTGGC
CTAGGTGGCTATGCCCTGGGAAGTGCAATGTCAGGAATGCGCATGAATTTTGACCGTCCTGAAGAGCGCC
AGTGGTGGAACGAAAACTCCAATCGCTATCCCAACCAAGTGTACTACAAGGAATACAATGACCGCTCCGT
TCCAGAGGGAAGGTTTGTGCGGGACTGCGCTCAACAACACCGTGACCGAATACAAAATTGATCCCAATGAA
AATCAAAATGTGACCCAGGTAGAAGTCAGAGTCATGAAGCAAGTGATCCAGGAGATGTGCATGCAGCAAT
ATCAGCAATACAGCTGGCCTCTGGTGTCAAACCTACTCTGACCCCTCGCTCATGCTGATTATCATGCT
TGTCAATTTTTTTGTAATGCATTAAGAAAGCAGTCTCAGCCTGAACCTGTGCTGCTGATCTGTGCAACCT
TCAGAGGGAATAATCTATATAAAACAGCCTCTCTGTTGGAGGTCTCTCA

```

Şekil 3.2. *Trachemys scripta* *PRNP* geninin FASTA formatında gösterimi (GenBank AJ245488.1) ve primerlerin *PRNP* gen dizisi üzerinde bağlandığı yerler (Yeşil renk; 1.Primer çifti. Kırmızı renk; 2. Primer çifti).

PCR işlemi, 0,2 ml'lik pcr tüplerinde; 50-100 ng genomik DNA, 1 Unite Taq polimeraz, 200mM dNTP mix'i, 5'er µM forward ve reverse primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve üzerine 25 µl'ye tamamlayacak kadar ultra pure su eklenerek gerçekleştirildi.

PCR çoğaltım işleminin koşulları 2 dakika 94 °C'de denatürasyon aşaması, 35 siklus boyunca 94 °C'de 1 dakika, 56 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika DNA uzaması aşaması ve son siklus sonunda 10 dakika 72 °C'de bekleme şeklindedir. PCR ürünleri daha sonra %2'lik agaroz jelde<sup>8</sup> TBE Buffer içinde, 110 V'da 20 ile 40 dk. yürütülerek etidyum bromür yardımıyla görüntülendi. PCR ürünleri DNA dizileme işlemi için hizmet alımı yapılan firmalara gönderilmeden önce saflaştırıldı. Saflaştırma GF-1 PCR Clean-Up Kit (Vivantis, Cat. No. GF-PC-050) kullanılarak, kit ile beraber verilen yonteme uygun şekilde yapıldı. Saflaştırılan örnekler daha sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jelde yürütülüp görüntülendi. Örnekler dizi analizine gönderilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

### 3.7. DNA Dizileme

DNA dizileme işlemi, DNA dizilerinin baz (adenin, guanin, sitozin ve timin) sıralarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir. PCR reaksiyonu yardımıyla istenilen gen bölgesi uygun primerler kullanılarak çoğaltılır. Dizileme cihazında anot ve katot kutuplar arasında uzanan kapiller, polimerle doldurulduktan sonra negatif yüklü saflaştırılmış PCR ürünü örneğini elektrokinetik yöntemle çekerek pozitif yüklü anoda doğru yürütür. Kapillerin

<sup>8</sup> 100 ml agaroz jel hazırlamak için; 2 gr agaroz 100 ml TBE Buffer içinde hafifçe çalkalayarak mikrodalga fırına koyulur. Tamamen eriyene kadar çalkalayarak ısıtılır. Etidyum bromür eklenip çalkayarak çözeltiye dağılması sağlanır. Biraz soğuduktan sonra traye dökülüp, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için 15-20 dk beklenir. Daha sonra taraklar çıkarılır. Boy marker'ı ve örnekler yükleme tamponu (Loading dye) ile karıştırılarak kuyulara yüklenir.

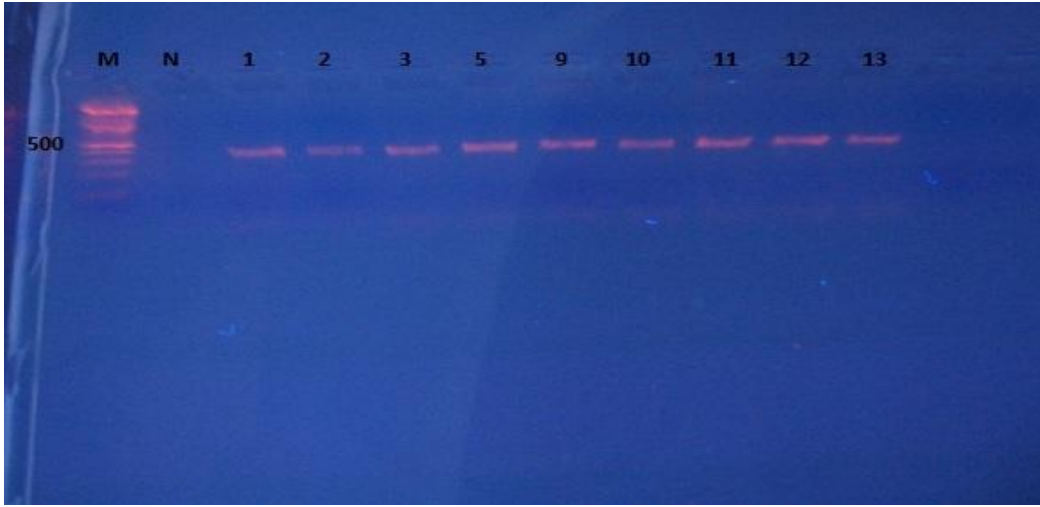
anot ucuna yakın bir bölgesinde bulunan lazer lambasından gelen ışııkla uyarılan floresan boyaların geri yansıttığı ışıık detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler dizileme cihazının yazılımı ile değeriendirilerek bir grafikte görüntülenir. Dizileme sonucunun okunabildiğı grafik, gözle ya da çeşitli yazılımlarla incelenebilir.

Çalışmada sekanslama işlemi 1. Primer ifti kullanılarak çalışılan 30 örnek için Genartek Firması (İzmir) ve geri kalan 30 örnek için İontek Firması (İstanbul) tarafından hizmet alımı şeklinde yapıldı. Saflaştırılıp firmalara gönderilen PCR rnleri forward primer kullanılarak sekanslandı. Prion protein gen dizilerinin karşılaştırılması “ChromasPro®” yazılımı kullanılarak yapıldı.

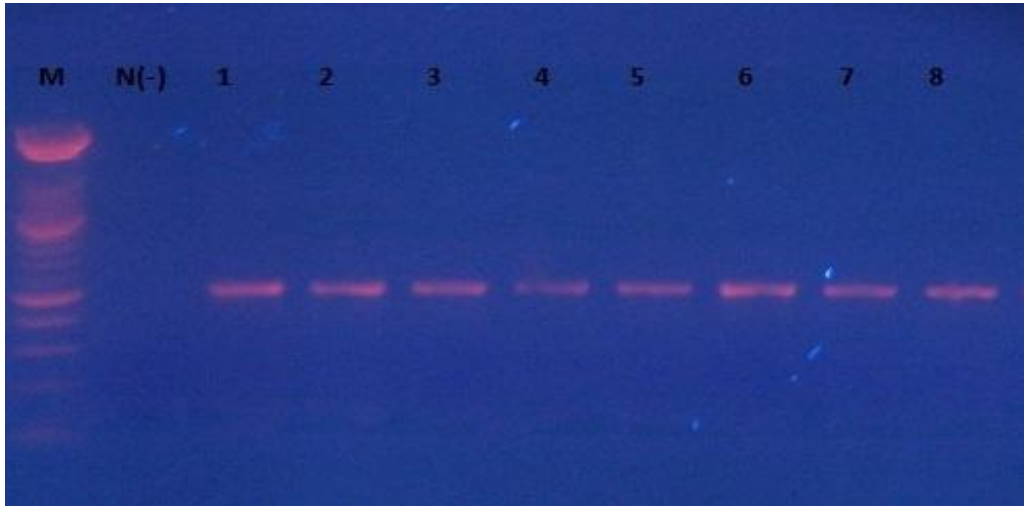
## 4.BULGULAR

### 4.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları

İki farklı primer çifti kullanılarak yapılan PCR uygulamalarında çoğaltılması beklenen bölgelerin büyüklüklerine uygun agaroz jel görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2)



Şekil 4.1. 1.primer çifti ile gerçekleştirilen *Trachemys scripta* PRNP geninin ilk ~400 bp'lik kısmının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp DNA Marker, N(-): Negatif Kontrol.



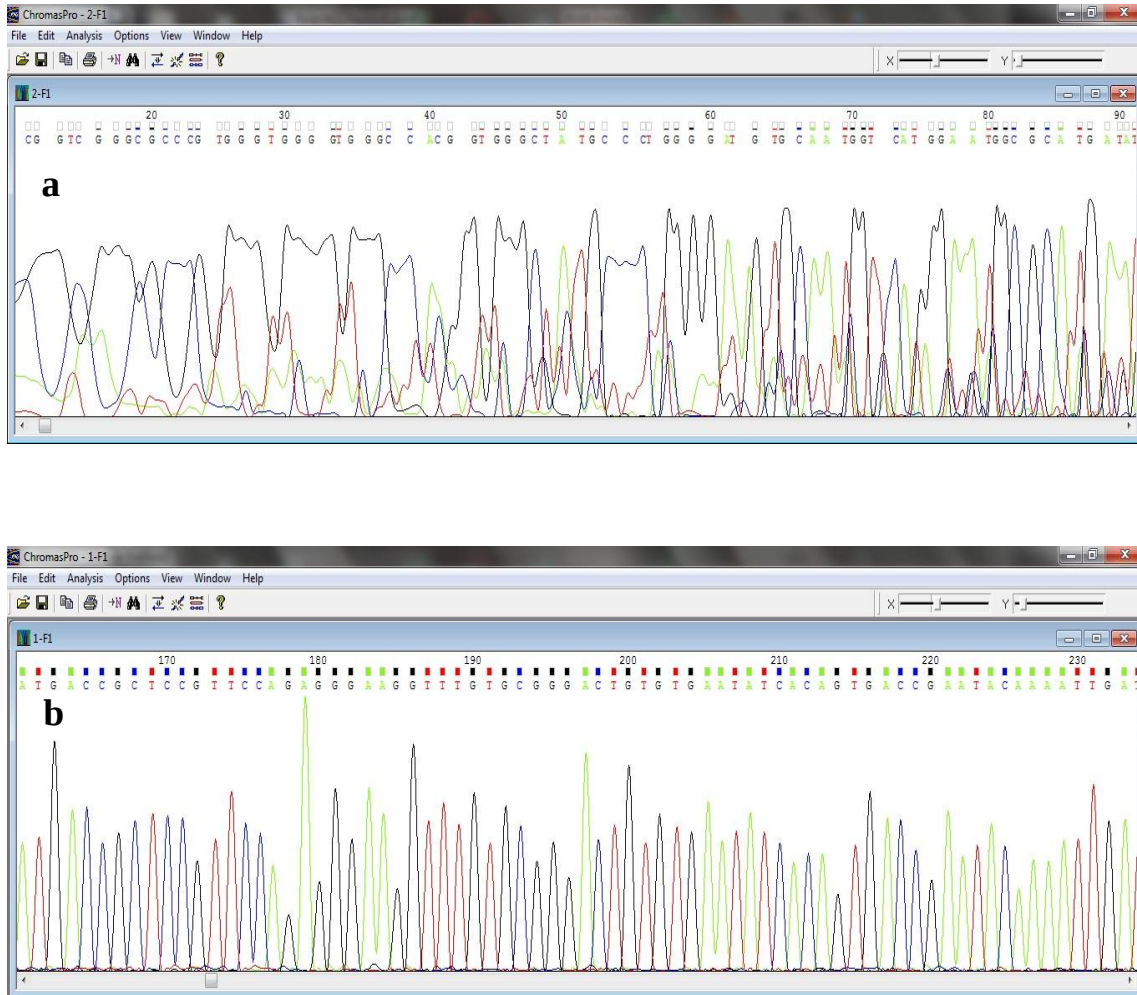
Şekil 4.2. 2. primer çifti ile gerçekleştirilen *Trachemys scripta* PRNP geninin son ~500 bp'lik kısmının PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp DNA Marker, N(-): Negatif Kontrol



#### 4.2.Kaplumbağa PrP Geninde Görülen Polimorfizmler

Kaplumbağa prion protein gen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra, dizi analizine gönderilerek olası polimorfizmler için incelenmiştir. Daha önce kaplumbağa prion protein geninde yapılmış herhangi bir polimorfizm çalışması olmaması nedeniyle PCR ürünleri direkt olarak dizi analizi yöntemiyle incelenmiş ve mevcut tek nükleotid değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

DNA dizi analizi için kullanılan **Sanger** metodu ile elde edilen sekansların ilk ve son kısımlarında yer alan nükleotit dizilerinin analiz sonuçlarının kalitesi düşük olduğundan bu sekanslar değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 4.3). Kullanılan primer çiftleri, kaplumbağa prion protein gen bölgesinin mümkün olan en geniş nükleotit dizisini analiz edebilmek için çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 4.3. Kaplumbağa prion protein gen dizisine ait DNA sekans kromatogramları. a) Düşük kalitede olan ve değerlendirmeye alınmayan sekans görüntüsü. b) Yüksek kalitede olan ve değerlendirmeye alınan sekans görüntüsü.

Kullanılan yöntem ile kaplumbağa prion genine ait DNA dizilerinin çoğaltıldığını doğrulamak için PCR ürünlerinin dizi analizlerinden elde edilen sonuçlar, NCBI'ye ait varolan tüm nükleotit dizilerini içeren **Blastn** (nükleotid blast algoritması) yazılımı kullanılarak veritabanları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, çoğaltılan DNA dizilerinin kaplumbağa prion genine ait olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.4).

>|gi|7271425|emb|AJ245488.1| Trachemys scripta mRNA for prion protein (prnp gene)  
Length=959

Sort alignments for this subject sequence by:  
E value Score Percent identity  
Query start position Subject start position

Score = 1328 bits (1472), Expect = 0.0  
Identities = 761/774 (98%), Gaps = 3/774 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 2   GGTAAAGGTGGAGGCGGTGGGAACACAGGAAGCAACCGCAATCCCACTATCCCAGCAAC 61
          |||
Sbjct 137 GGTAAAGGTGGAGGCGGTGGGAACACAGGAAGCAACCGCAATCCCACTATCCCAGCAAC 196

Query 62   CCCGGCTACCCCCAAAATCCTGGCTATCCCAGAAACCTAGctacccccataatcctgccc 121
          |||
Sbjct 197 CCCGGCTACCCCCAAAATCCTGGCTATCCCAGAAACCTAGCTACCCCCATAATCCTGCC 256

Query 122   tcccccccccaatcccgctatcccccaatcccggtacccccacaatccagttacccc 181
          |||
Sbjct 257 TACCCCCCAATCCCGCTATCCCCCTAATCCCGGCTACCCCCACAATCCAGTTACCCC 316

Query 182   aggaacccctagctacccccGAATCCTGGCTACCCCTGGTGGTGGTGGGCAGCACTACAAC 241
          |||
Sbjct 317 AGGAACCCCTAGCTACCCCCAGAATCCTGGCTACCCCTGGTGGTGGTGGGCAGCACTACAAC 376

Query 242   CCAGCTGGTGGCGGAACAACTTCAAAAACAGAGCCCTGGAAGCCTGATAAACCCAAA 301
          |||
Sbjct 377 CCAGCTGGTGGCGGAACAACTTCAAAAACAGAGCCCTGGAAGCCTGATAAACCCAAA 436

Query 302   ACCAACATGAAAGCCATGGCANGAAAAGC-GCGGCGAGGGCGCGGTGGTGGGTGGCCTAGG 360
          |||
Sbjct 437 ACCAACATGAAAGCCATGGCAGGAGCAGCAGCGGCA-GGCGCGGTGGTGGGTGGCCTAGG 495

Query 361   TGGCTATGCCCTGGGAAGTGCAATGTCAGGAATGCCCATGAATTTTGACCGTCCTGAAGA 420
          |||
Sbjct 496 TGGCTATGCCCTGGGAAGTGCAATGTCAGGAATGCCCATGAATTTTGACCGTCCTGAAGA 555

Query 421   GCGCCAGTGGTGGAAACGAAACTCCAATCGCTATCCCAACCAAGTGTACTACAAGGAATA 480
          |||
Sbjct 556 GCGCCAGTGGTGGAAACGAAACTCCAATCGCTATCCCAACCAAGTGTACTACAAGGAATA 615

Query 481   CAATGACCGCTCCGTTCCAGAGGGAAGGTTTGTGCGGGACTGTGTGAATATCACAGTGAC 540
          |||
Sbjct 616 CAATGACCGCTCCGTTCCAGAGGGAAGGTTTGTGCGGGACTGCCTCAACAACACCGTGAC 675

Query 541   CGAATACAAAATTGATCCCAATGAAAATCAAAATGTGACCCAGGTAGAAGTCAGAGTCAT 600
          |||
Sbjct 676 CGAATACAAAATTGATCCCAATGAAAATCAAAATGTGACCCAGGTAGAAGTCAGAGTCAT 735

Query 601   GAAGCAAGTGATCCAGGAGATGTGCATGCAGCAATATCAGCAATACCAGCTGGCCTCTGG 660
          |||
Sbjct 736 GAAGCAAGTGATCCAGGAGATGTGCATGCAGCAATATCAGCAATACCAGCTGGCCTCTGG 795

Query 661   TGTCAAATACTCTCTGACCCCTCGCTCATGCTGATTATCATGCTTTGTCAttttttttGT 720
          |||
Sbjct 796 TGTCAAATACTCTCTGACCCCTCGCTCATGCTGATTATCATGCTTTGTCATTTTTTTGT 855

Query 721   AATGCATTAAAGAAAGCAGTCTCAGCCTGAACTGTGCTGCTGATGGTGTGCAAAC 774
          |||
Sbjct 856 AATGCATTAAAGAAAGCAGTCTCAGCCTGAACTGTGCTGCTGAT-CTGTGCAAAC 908

```

Şekil 4.4. Elde edilen sekans sonuçlarının blastn programı ile doğrulanması. Sonuçların *Trachemys scripta* prion protein gen dizisi ile uyumu görülmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçlarına göre, hiçbir bireyde insersiyon ve/veya delesyon şeklindeki mutasyonlar görülmemiştir. İzlenilen değişiklikler tek nükleotid değişimi adıyla da bilinen SNP'lerdir.

Prion protein gen sekanslarını elde ettiğimiz 30 adet kaplumbağanın dizi analizi sonuçları incelendiğinde; C658T, C664T, C670A, C823A sessiz mutasyonları; 203.

kodonda Lösiniden Valine (L203V) , 205. kodonda Asparajinden İzolösine (N205I), 225. kodonda Valinden Alanine (V225A) ve 237. kodonda Metiyoninden Valine (M237V) amino asit dönüşümleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çalışmada en yaygın görülen polimorfizm olan L203V ve N205I, 30 örneğin tamamında da izlenmiştir. Bunu takiben M237V polimorfizmi 16 örnekte; V225A polimorfizmi ise 15 örnekte görülmüştür.

Bu verilerle beraber sekansları incelenen 30 örneğin 15'inde söz konusu dört polimorfizm (L203V, N205I, V225A, M237V) birlikte gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bir örnekte, L203V, N205I, M237V olmak üzere üç polimorfizm, geri kalan 14 örnekte ise L203V, N205I olmak üzere iki polimorfizm birlikte izlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kaplumbağa prion protein geni üzerinde bulunan tek nükleotid değişimleri ve bu değişimlerin kodonlarının gösterimi.

| Bölge | Nükleotid Konumu | Değişim      | Kodon Konumu | Kodon Gösterimi | Değişim Türü |
|-------|------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| ORF   | 658              | C > T        | 202          | TGC → TGT       | Eş anlamlı   |
| ORF   | 659, 661         | C > G, C > G | 203          | CTC → GTG       | L > V        |
| ORF   | 664              | C > T        | 204          | AAC → AAT       | Eş anlamlı   |
| ORF   | 666              | A > T        | 205          | AAC → ATC       | N > I        |
| ORF   | 670              | C > A        | 206          | ACC → ACA       | Eş anlamlı   |
| ORF   | 726              | T > C        | 225          | GTC → GCC       | V > A        |
| ORF   | 761              | A > G        | 237          | ATG → GTG       | M > V        |
| ORF   | 823              | C > A        | 257          | CTC → CTA       | Eş anlamlı   |

Score = 544 bits (1401), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 266/270 (99%), Positives = 268/270 (99%), Gaps = 0/270 (0%)

```
Query 1  MGRYRLTCWIVLLVVMWSDVSFSKKGKGGGGGNTGSRNPNYPSPNPGYPQNPNGYPRN 60
Sbjct 1  MGRYRLTCWIVLLVVMWSDVSFSKKGKGGGGGNTGSRNPNYPSPNPGYPQNPNGYPRN 60

Query 61  PSYPHNPAYPPNPAYPPNPGYPHNPSPYPRNPSYPQNPNGYPGGGGQHYNPAGGGTNFKNQK 120
Sbjct 61  PSYPHNPAYPPNPAYPPNPGYPHNPSPYPRNPSYPQNPNGYPGGGGQHYNPAGGGTNFKNQK 120

Query 121  PWKPDKPKTNMKAMAGAAAAGAVVGGLGGYALGSAMSGMRMNFDRPEERQWWNENSNRYP 180
Sbjct 121  PWKPDKPKTNMKAMAGAAAAGAVVGGLGGYALGSAMSGMRMNFDRPEERQWWNENSNRYP 180

Query 181  NQVYYKEYNDRSVPEGRFVRDCLNNTVTIEYKIDPNENQNVITQVEVRVMKQVIQEMCQQY 240
Sbjct 181  NQVYYKEYNDRSVPEGRFVRDC+N TVTEYKIDPNENQNVITQVE RVMKQVIQEMC+QQY 240
NQVYYKEYNDRSVPEGRFVRDCVNITVTIEYKIDPNENQNVITQVEARVMKQVIQEMCQQY 240

Query 241  QQYQLASGVKLLSDPSIMLIIMLVIFFVMH 270
Sbjct 241  QQYQLASGVKLLSDPSIMLIIMLVIFFVMH 270
```

Şekil 4.5. Kaplumbağa prion proteinin amino asit dizilimiyle, 4 polimorfik bölgenin bulunduğu kaplumbağanın geninin kodladığı amino asit diziliminin karşılaştırılması.

Söz konusu dört amino asit pozisyonunda görülen tek nükleotid değişimleri için; 3 allel ve 5 genotip belirlenmiştir. Bu allellerin frekansları Çizelge 4.2’de, genotiplerin frekansları ise Çizelge 4.3’de verilmektedir.

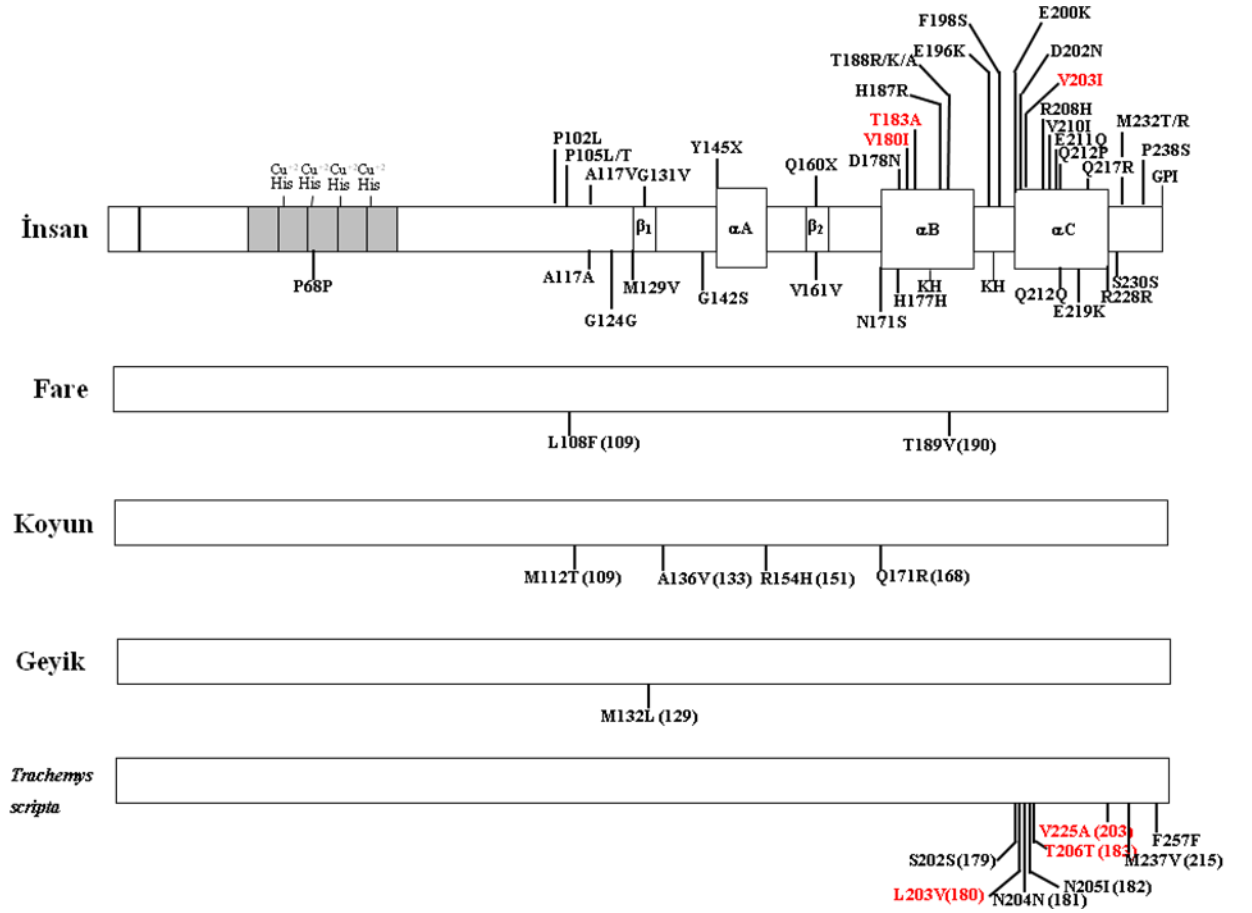
Çizelge 4.2. Çalışmamızda polimorfik 203, 205, 225, 237 amino asit pozisyonları için 3 farklı allel görülmüştür.

| Allel | Frekans |
|-------|---------|
| VIAV  | 0,350   |
| VIVM  | 0,616   |
| VIVV  | 0,033   |

Çizelge 4.3. Çalışmamızda polimorfik L203V, N205I, V225A, M237V kodonları için 5 farklı genotip saptanmıştır.

| Genotip   | Frekans |
|-----------|---------|
| VIAV/VIAV | 0,200   |
| VIVM/VIVM | 0,466   |
| VIVV/VIVM | 0,033   |
| VIVV/VIAV | 0,033   |
| VIVM/VIAV | 0,266   |

Kaplumbağa prion proteini, memeli prion proteinlerine %40, kuş prion proteinlerine ise %58 oranında homoloji göstermektedir (212). Memeli prion protein genindeki çok sayıda polimorfizm, memelilerde çeşitli prion hastalıklarına neden olabilmektedir (Şekil 4.6)



Şekil 4.6. İnsanlarda kalıtsal prion hastalıklarına neden olan PrP mutasyonları (üst kısım) ve olası PrP polimorfizmlerinin (alt kısım) fare, koyun, geyik ve çalışmamız ile karşılaştırılması. Parantezlerdeki numaralar insan kodonları ile uyumlu amino asitleri göstermektedir. İnsan, fare, koyun ve geyik polimorfizmleri Colby ve Prusiner (214) ve Mead'dan (215) alınmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz polimorfik bölgelerin (Çizelge 4.1), insan prion proteininde homolojilerinin bulunması amacıyla Blastp (protein blast algoritması) yazılımı kullanılarak insan ve kaplumbağa prion proteinlerinin amino asit dizileri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.7). Bu karşılaştırmaya istinaden, belirlediğimiz tek nokta değişikliklerinden 3 tanesi, insanlarda hastalığa neden olabileceği düşünülen prion proteinindeki polimorfik amino asit dizileriyle homoloji gösteren korunmuş bölgelerdedir. Bu polimorfik bölgeler aşağıdaki gibidir (Şekil 4.6'da kırmızı ile gösterilmiştir):

- Kaplumbağadaki polimorfik 203.kodon (L>V), insanda 180. kodona denk gelmektedir. İnsanda 180. kodondaki V>I değişimi ailesel Creutzfeldt-Jakob hastalığıyla ilişkili polimorfizmlerdendir (211-213).

- b) Kaplumbağadaki polimorfik 225.kodon (V>A), insanda 203. kodona denk gelmektedir. İnsanda 203. kodondaki V>I değişimi Creutzfeldt-Jakob hastalığıyla ilişkili polimorfizmlerdendir (214, 215).
- c) Kaplumbağadaki polimorfik 206.kodon (sessiz mutasyon), insanda 183. kodona denk gelmektedir. İnsanda 183. kodondaki T>A değişiminin prion hastalıklarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (216, 217).

```
>|emb|CAB81568.1| prion protein [Trachemys scripta]
Length=270

Score = 113 bits (282), Expect = 5e-34, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 105/273 (38%), Positives = 150/273 (55%), Gaps = 33/273 (12%)

Query 4   LGCWMLVLFVATWSDLGLC--KKRKPGGWNTGGSRYP-----GQSPGGNRYPP 51
          L CW++VL V WSD+ K GG NTG +R P G P YP
Sbjct 6   LTCWIVVLLVVMNSDVSFSKKGKGGGGGNTGSNRPNPNYPSNPGYPQNPGYPRNPSYPH 65

Query 52  QGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHG--GGWGQ-----GGGTHSQ-----WN 100
          + G PH + P + Q G GG GQ GGGT+ + W
Sbjct 66  NPAYPPNPAYPPNPYPHNPYSY--PRNPSYPQNPGYPGGGGQHYNPAGGGTINFKNQKPW- 122

Query 101 KPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYVLGSAMSRIIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQ 160
          KP KPKTNMK MAGAAAAGAVVGGLGGY LGSAMS ++F E +++ EN +RYPNQ
Sbjct 123 KPDKPKTNMKAMAGAAAAGAVVGGLGGYALGSAMSGMRMNFDRPEERQWNNENSNRYPNQ 182

Query 161 VYYRPMDEYS-NQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYE 219
          VYY+ ++ S + FV DC+N T+ ++ + + +N T+ +V++M++V+++MC+ QY+
Sbjct 183 VYYKEYNDRSVPEGRFVRDCLNNTVTEYKI-DPENQNVITQVEVRVMKQVIQEMCMQYQ 241

Query 220 RESQAYYKRGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIV 252
          + A S + L S P ++L+I +IF ++
Sbjct 242 QYQLA-----SGVKLLSDPSMLIIMLVIFFVM 269
```

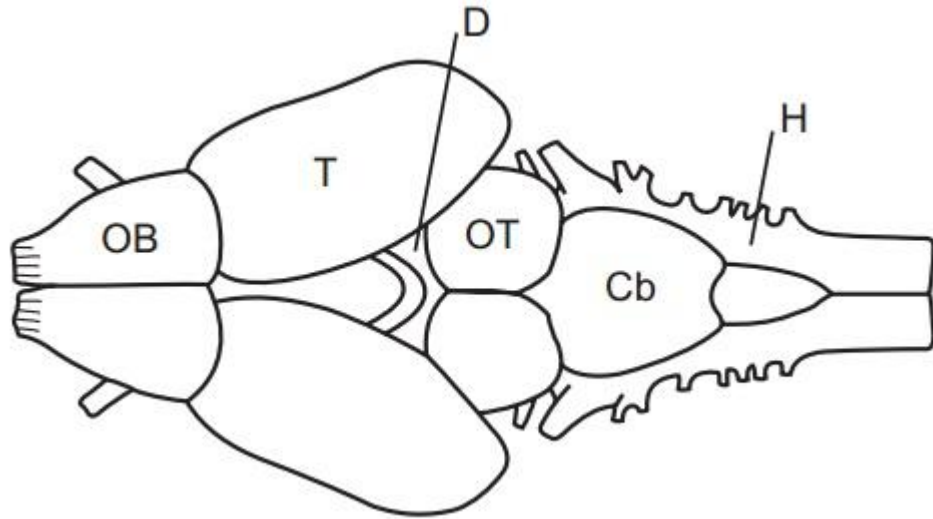
Şekil 4.7. İnsan ve kaplumbağa prion proteinlerinin amino asit dizilerinin blastp ile karşılaştırılması. Query: İnsan amino asit dizisi, Sbjct: Kaplumbağa amino asit dizisi.

### 4.3.Histolojik Bulgular

#### 4.3.1.Hematoksilen-Eozin Uygulaması

Omurgalılarda beyin, ön beyin (prosencephalon), orta beyin (mesencephalon), arka beyin (rhombencephalon) olmak üzere 3 ana bölümden oluşur (Şekil 4.8). Ön beyin telencephalon ve diencephalon olarak iki parçaya ayrılırken, orta beyin tek parçadan meydana gelir. Arka beyin ise, metencephalon ve myelencephalon olarak iki parçadan meydana gelir. Tüm omurgalılarda, orta beyin (mesencephalon), ön beyin ile arka beyin arasında, duyuşal, motor ve bütünleyici parçaları bağlar.

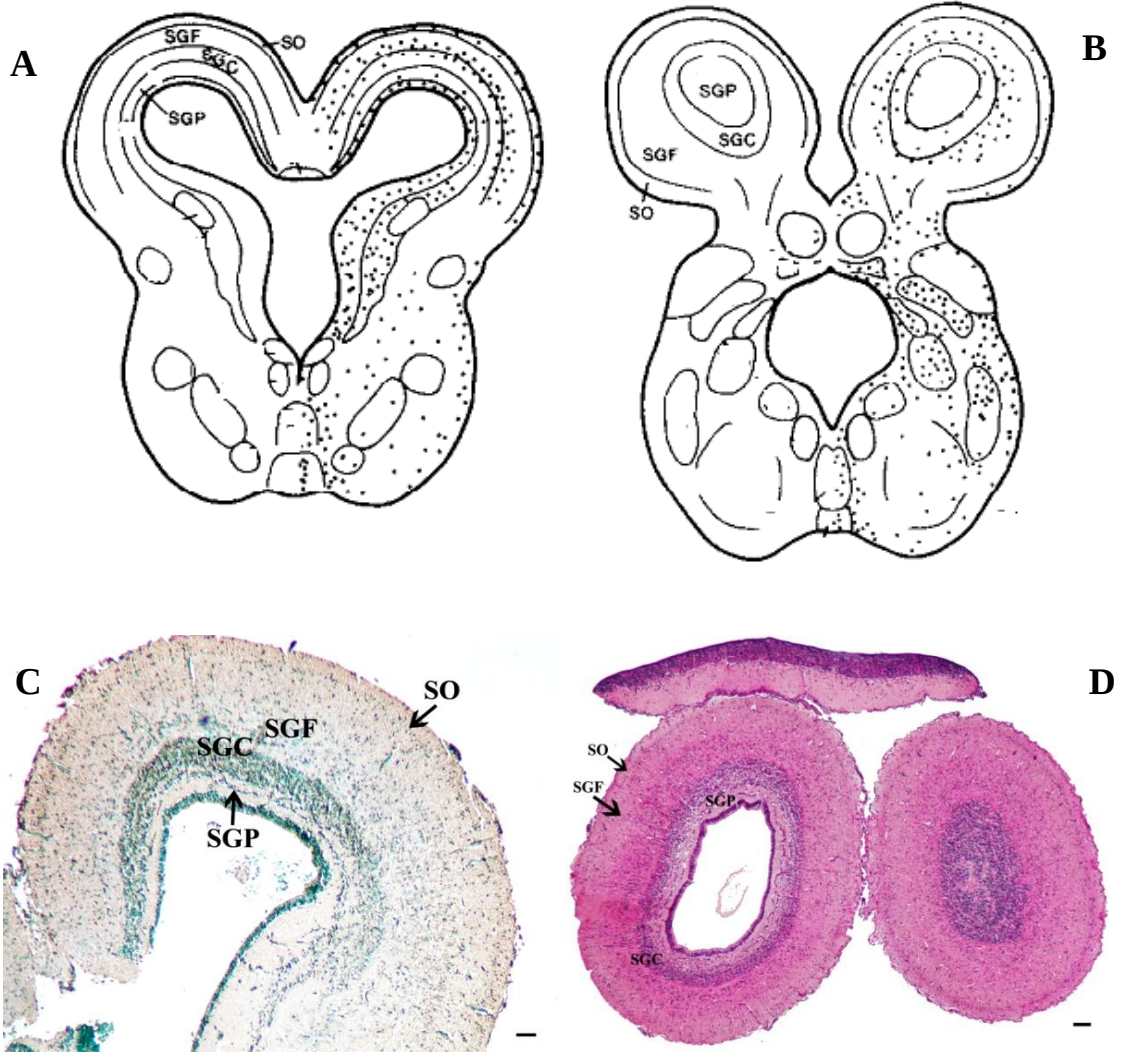




Şekil 4.8. Kaplumbağalarda beynin dorsalden görünümü. OB:Olfactory bulb, T:Telencephalon, D:Diencephalon, OT:Optic tectum, Cb:Cerebellum, H:Hindbrain veya Rhombencephalon) Butler ve Hodos'dan (218) alınmıştır.

Bu Yüksek Lisans Tez Projesi için kaplumbağa beyin dokusundan alınan kesitler, orta beyne ait optic tectum bölgesinden geçmektedir. Sürüngenlerde optic tectum; superficial (yüzeysel), central (merkezi) ve periventriküler olmak üzere 3 bölge olarak ele alınır. Memelilerle aradaki tek fark ise stratum opticum memelilerin aksine en yüzeyde yer almasıdır (Şekil 4.9).





Şekil 4.9. Kaplumbağalarda optic tectum ve kısımları. A ve B; Optic tectum kısımları, Reiner ve Beinfeld'tan (219) alınmıştır. C; Optic tectum kısımlarının TUNEL uygulamasında gösterimi, D; Optic tectum kısımlarının H-E boyasında gösterimi. SO; Stratum opticum, SGF; Stratum griseum et fibrosum superficiale, SGC; Stratum griseum centrale, SGP; Stratum griseum profundum, 4X büyütme. Barlar 50µm

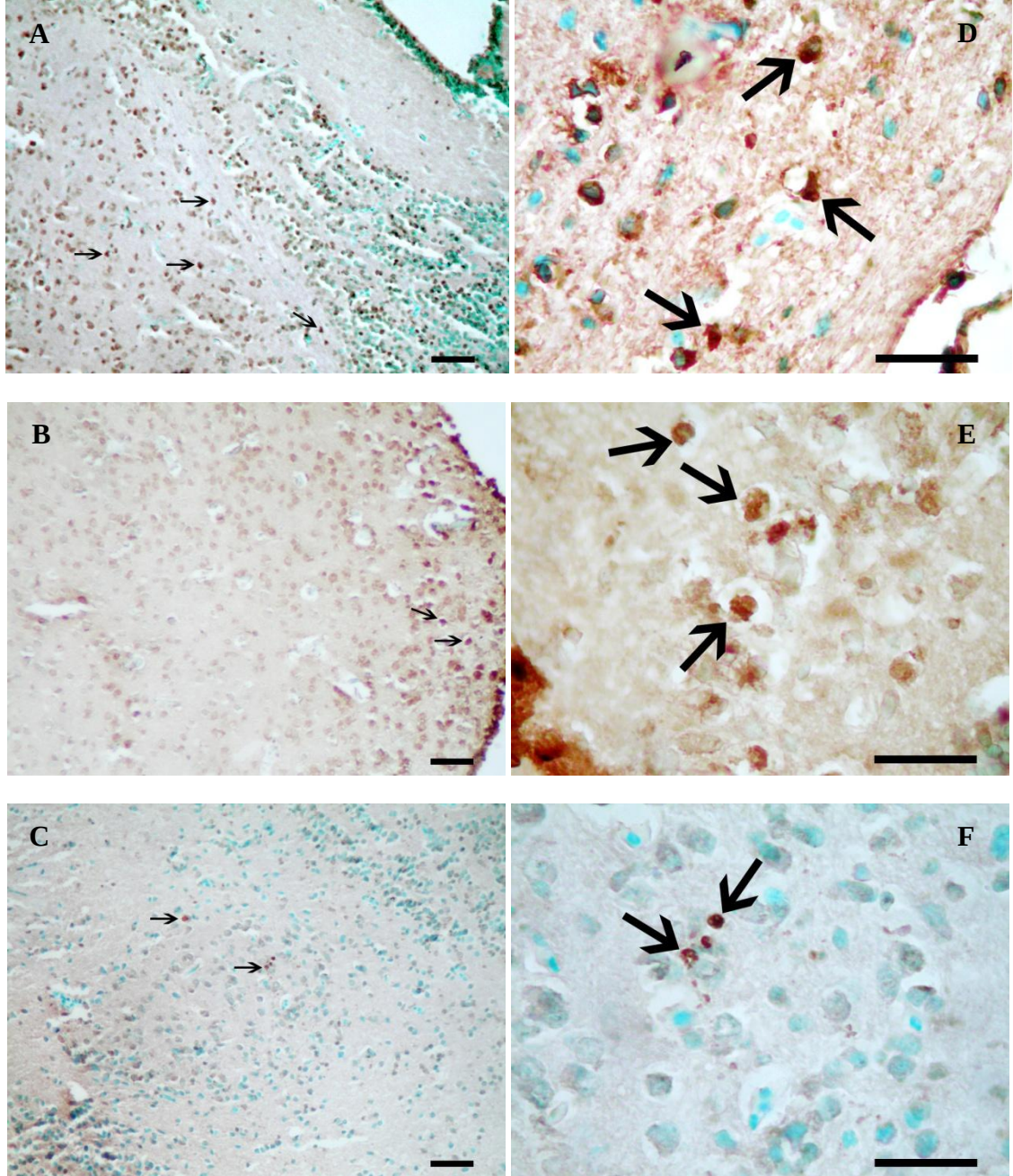
#### 4.3.2.TUNEL Uygulaması

Otuz örneğin 15'inde söz konusu dört polimorfizm (L203V, N205I, V225A, M237V) birlikte gözlenmiştir. Bir örnekte, L203V, N205I, M237V olmak üzere üç polimorfizm, geri kalan 14 örnekte ise L203V, N205I olmak üzere iki polimorfizm birlikte izlenmiştir.

Apoptotik hücreleri saptamak için yapılan TUNEL uygulamalarında, dört polimorfik dizinin (L203V, N205I, V225A, M237V) belirlendiği örneklerin beyin dokularında (optic tectum), iki polimorfik dizinin (L203V, N205I) belirlendiği örneklerin dokularına kıyasla daha çok apoptotik hücre bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Üç polimorfik

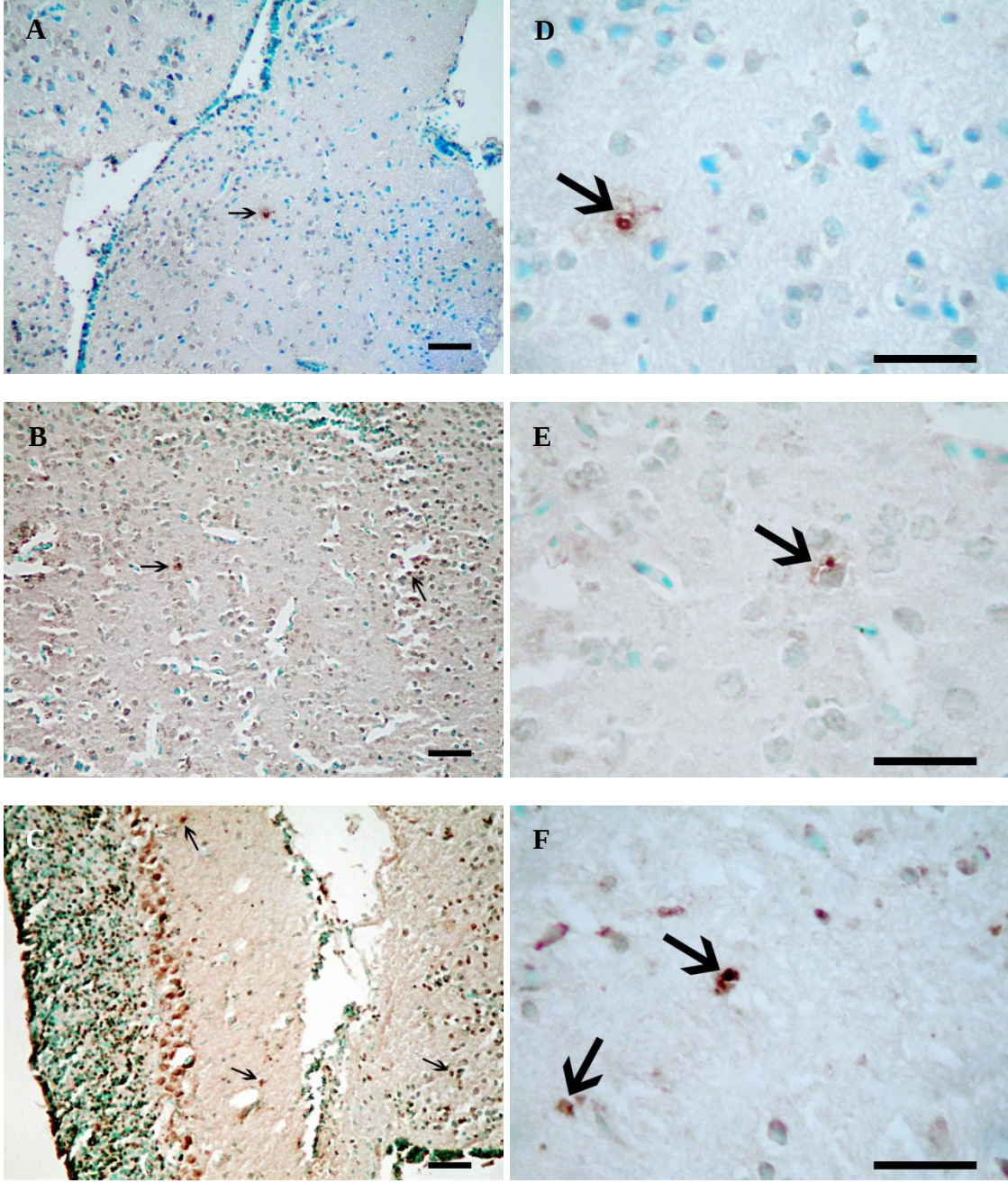
dizinin (L203V, N205I, M237V) bulunduğu tek örneğin dokusu ise, örnek sayısının az olması nedeniyle değerlendirmeye alınmamıştır.

Optic tectumda belirlenen apoptotik hücreler genellikle superficial bölgede daha sonra central bölgede ve en az periventriküler bölgede saptanmıştır. Yani içerden yüzeye doğru gidildikçe apoptotik hücre sayısında artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Dört polimorfik dizinin (L203V, N205I, V225A, M237V) belirlendiği 3 farklı örneğin (A-C) optic tectumlarındaki apoptotik hücreler. Oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. Barlar; A-C’de 50µm, D-F’de 30 µm.





Şekil 4.11. İki polimorfik dizinin (L203V, N205I) belirlendiği 3 farklı örneğin (A-C) optic tectumlarındaki apoptotik hücreler. Oklar apoptotik hücreleri göstermektedir. Barlar; A-C’de 50µm, D-F’de 30 µm.

## 5.TARTIŞMA

Çeşitli protein yanlış katlanma bozuklukları arasında yer alan Alzheimer hastalığı,  $\beta$ -amiloid peptidi ve tau'dan oluşan plakların oluşumu ile karakterizedir. Huntington hastalığı, *huntingtin* genindeki CAG tekrarları sonucunda huntingtin proteindeki kalıtsal poli-glutamin yığılması sonucu mutant protein oluşumu ve nörotoksisite ile kendini gösterir. Parkinson hastalığında alfa-sinuklein, Lewis cisimleri adı verilen hücre içi inklüzyonlarda kümelenir. Genel olarak prion hastalıklarında,  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin anormal otokatalitik formu olan  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 'ye dönüşümü ile birlikte giden diffüz birikintilerin, amiloid fibril ya da plakların kümelenmesi söz konusudur. Bu hastalıklarda protein yanlış katlanması ve kümelenmesinin önemi biliniyor olmasına karşın proteinlerin yanlış katlanmasındaki mekanizmaların neler olduğu ve nörodejenerasyonu nasıl gerçekleştirdikleri henüz bilinmemektedir (220).

Prion gen ailesinin  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gibi prion hastalıkları ile ilişkili izoformların öncüsü olan  $\text{PrP}^{\text{C}}$  molekülünü kodlayan *Prnp*, erkek üreme sisteminde rol alan, testise sınırlı bir protein olan Doppel'i kodlayan *Prnd* ve PrP benzeri bir protein olan Shadoo'yu kodlayan *Sprn* olmak üzere üç üyesi vardır (39). İnsan *Prnp* ve *Prnd* ile aynı genomik kümede (*Prnd*'nin yaklaşık 3 kb downstreamında) yerleşim gösteren hipotetik dördüncü bir prion geni (*Prnt*) betimlenmiştir (48). Günümüzde  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda *Prnp* nakavt farelerin prion hastalıklarına dirençli olduğu ve infeksiyöz prionların bu farelerde çoğalmadığı gösterilmiştir (221, 222). Bu nedenle, prion hastalıklarının oluşmasında  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin gerekliliği ön plana çıkmaktadır (185, 223). Bununla birlikte,  $\text{PrP}^{\text{C}}$ 'nin farklı türler arasında oldukça iyi bir biçimde korunmuş olması bu proteinin yararlı özelliklerinin olacağını ortaya koymaktadır.

İnsan, hamster ve fare prion proteinlerini kodlayan genler ilk olarak 1986 yılında klonlanmıştır (15, 224). *Prnp*'nin 129. kodonu polimorfiktir ve metionin ya da valin kodlar. 129 metionin veya 129 valin, proteinin normal formunda biyokimyasal etkiler ya da fenotipik özellikler adına bir değişiklik oluşturmaz, ancak insan ve fare prion genlerinde

kodon 129 polimorfizmlerin insanlarda Alzheimer, Down sendromu ve Wilson hastalığı gibi bozukluklarda hastalık duyarlılığı ile ilişkili olabilmektedir (39, 225-231). *Prnp* 129 tek nukleotid polimorfizmlerinin (SNP'lerinin) yaşlı bireylerde uzun süreli hafıza üzerine negatif etki gösterdiği belirlenmiştir (232, 233). Ayrıca, *Prnp* deki E219K, D178N, E200K ve P102L gibi çeşitli mutasyonların genetik CJD (gCJD) ve ilişkili hastalıklara neden olduğu belirlenmiştir (234-236).

*Prnp*'deki genetik polimorfizmlerin hangi mekanizmalarla merkezi sinir sistemi fonksiyonlarını ve hastalık fenotiplerini değiştirdiği konusu günümüzde belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızda en yaygın görülen polimorfizm olan L203V ve N205I, 30 örneğin tamamında da izlenmiştir. Bunu takiben M237V polimorfizmi 16 örnekte; V225A polimorfizmi ise 15 örnekte görülmüştür. Bununla beraber, 30 örneğin 15'inde söz konusu dört polimorfizm (L203V, N205I, V225A, M237V) birlikte gözlenmiştir. Bir örnekte, L203V, N205I, M237V olmak üzere üç polimorfizm, geri kalan 14 örnekte ise L203V, N205I olmak üzere iki polimorfizm birlikte izlenmiştir.

Memeli türlerinde prionların bulaşıcılığı konak ile enfekte edicideki prion proteinlerinin primer yapısına bağlı olan bir “**tür bariyeri**” ile sınırlandırılır. Tür bariyerinin biyolojik etkisi inkübasyon periyodu ile artarken hastalığa eğilim ile azalır (237). Genel olarak prionlar, özel bir konağa ve ilişkili birkaç türe sınırlıdır. Ancak prionlar zaman zaman tür bariyerini geçerek yeni konakları enfekte edebilirler. Bir prion bir türe geçiş yaptığında yeni bir prion tipini oluşturabilir (238). Yeni tip prionlar farklı zamanlarda ve beynin farklı bölgelerini etkileyerek hastalığa neden olabilir. Bu nedenle her an yeni bir türe bulaşabilecek bir yanlış katlanmış prion proteini oluşma olasılığı vardır.

Tür bariyeri, donör ve alıcı hayvanlardaki PrP amino asit dizisi değişikliğinden büyük ölçüde etkilenir (239). Transgenik farelerle yapılan çalışmalarda tür bariyerinin farklı türlerdeki prion proteinleri arasındaki dizi homolojisi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (240). Bazı amino asitlerin PrP'de yapısal değişiklik yaptığı ve proteini hastalık ile ilişkili forma dönüştürdüğü bilinmektedir. Üstelik, PrP içerisindeki amino asit yer değişimleri prion hastalıklarında tür bariyerini kontrol etmektedir. Koyunlarda kodon 136Ala>Val ya da kodon 141Leu>Phe büyük ölçüde proteaza dirençli form oluşumu ile ilişkilidir. Bununla birlikte, kodon 171 Gln>Arg, kodon 154 Arg>His ve kodon 112 Met>Thr polimorfizmleri proteaza dirençli form oluşumunda etkin değildir (241). İnsan PrP'de M109, PrP<sup>C</sup>'nin PrP<sup>Sc</sup>'ye dönüşümü sırasında  $\beta$ -sheet yapısının artmasına neden olan önemli bir amino asittir (242). Bunun yanında, PrP'de 90 ile 120. amino asitler arasındaki

amino asit bölgesi hem PrP<sup>Sc</sup> oluşumu hem de tür içi TSE bulaşıcılığı açısından önemlidir (243). Dolayısıyla *Prnp* de görülen polimorfizmler hastalığın duyarlılığı ya da direnci ile ilişkili olabilmektedir. Çalışmamızda kaplumbağa amino asit dizisiyle insan amino asit dizisi arasında homoloji gösteren korunmuş bölgeler incelendiğinde: insanda ailesel Creutzfeldt-Jakob hastalığıyla ilişkisi olan V180I, kaplumbağada L203V polimorfizm ile; prion hastalıklarıyla ilişkili olan T183A, kaplumbağada 206. kodondaki eşanlamlı mutasyon ile; Creutzfeldt-Jakob hastalığıyla ilişkili olan V203I, kaplumbağada V225A polimorfizmi ile denk düştüğü belirlenmiştir. Kaplumbağalarda henüz tanımlanmış bir prion hastalığı bulunmadığından bu polimorfizmlerin prion hastalıklarına duyarlılığa veya dirençliliğe neden olup olmadığı hakkında herhangi bir kesin yargıya varılamamaktadır.

TSE patogenezinin anlaşılması ve bir prion pasajının bir türden diğerine geçme riskinin belirlenmesi açısından, prion proteinini kodlayan genin yapısının ve proteinin farklı türlerdeki amino asit dizisinin araştırılması oldukça önemlidir. Prion hastalıklarında genetik duyarlılığı ortaya koymak için düzenleyici bölgelerde ve fonksiyonel domainlerdeki dizi varyasyonlarını belirlemek yararlı olmaktadır. Günümüzde *Prnp* geni hamster, insan (22), fare, koyun, buzağı, keçi (244, 245), ve kanguru (246) gibi sınırlı sayıda memelide karakterize edilmiştir. İlk memeli olmayan PrP, piliç beyninden ekstrakte edilmiş ve primer yapısı fare PrP proteini ile %35'den az homoloji gösterdiği belirlenmiştir (247). Bununla birlikte diğer bazı kuş türlerinde analiz edilen PrP geninin memelilerle genellikle %30'luk bir nükleotid homolojisi olduğu gösterilmiştir (248). Öte yandan, *Trachemys scripta* PrP'sinin memeli PrP'si ile %38-42 homoloji gösterdiği ve PrP'nin memeli ve kuşlarda belirlenen tüm yapısal özelliklerinin kaplumbağalarda da korunduğu saptanmıştır (209). Bununla birlikte, daha önce yaptığımız bir çalışmada *Testudo graeca* türü kara kaplumbağalarında prion protein gen bölgesini PCR ile çoğaltmak amacıyla *Trachemys scripta* türü su kaplumbağasının prion gen dizisi (209) dikkate alınarak hazırlanmış 3 farklı primer çifti kullanılmıştır. Ancak, dizayn edilen bu primerlerle kara kaplumbağalarında *Prnp* çoğaltmak mümkün olmamıştır. Bu bulgu *Testudo graeca* ile *Trachemys scripta* arasında prion geni nükleotid diziliminde önemli derecede bir farklılık olduğunu düşündürmüştür.

Daha önce sığırlar ile yapılan çalışmalarda *Prnp* geninin promotor ve intron 1 bölgelerinde polimorfizmlerin olduğu gösterilmiştir (249-252). Yaptığımız çalışmada *Trachemys scripta* türüne ait prion protein geninde çeşitli polimorfizmlere rastlanmıştır. Bu polimorfizmlerin kaplumbağaların TSE'ye dirençli ya da duyarlı olması ile bir ilişkisi

olabilir. Ancak, kaplumbağa türlerinin *Prnp* genleri hakkında bilinenler çok azdır ve bu konuda yeterli literatür bulunmamaktadır. Öyle ki koyun prion genlerindeki SNP'lerin bu hayvanların scrapie'ye duyarlılığı ya da direnç göstermeleri ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (253, 254).

Yapılan çalışmalarda *Trachemys scripta* PrP'sinin N-terminal dizisinin endoplazmik retikulum sinyal peptidine uygun olarak 28 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir. Bu bulgu daha önce aynı tür ile yapılmış analiz sonuçlarına uygundur (209). Kaplumbağa PrP'sinin N-terminalinin en belirgin özelliği, 10 ardışık hekzatekrarlardan oluşmasıdır. Kuşlarda N-terminal bölge 6.5-9 hekzatekrar içerirken memeli PrP proteinleri 5 oktatekrar içermektedir (16, 26, 255). Kaplumbağa ve kuş hekzapeptid tekrarları ortak bir konsensus dizisine (XNPXYP) sahiptir, ancak kuşlarda iki Gln-Asn yerdeğişimi söz konusudur (209).

Kaplumbağa PrP proteininin hidrofobik 135-150. bölgeleri oldukça iyi korunmuştur ve çalışmamızda bu bölgede polimorfizm görülmemiştir. Bu bölge ve öncesindeki 7 amino asit dizisi (insanlarda 106-128) olası yapısal değişiklik gösteren bölge olarak değerlendirilmektedir. N-terminal delesyon eğer bu hidrofobik bölgeyi içeriyorsa protein yapısal değişime gitmemektedir (256).

### **5.1.Prion Polimorfizmleri ve Apoptozis Arasındaki İlişki**

PrP'nin N-terminalinde yer alan oktapeptid bölgesi hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik proteinlerin yapısında yer alan BH2 domaini ile büyük ölçüde amino asit dizi homolojisi gösterir. Bu homoloji PrP'nin hücre ölümü ya da survivali ile yakından ilişkili olabilir (51). Örneğin, PrP'lerin Bax ile etkileşerek apoptozise engel olduğu bilinmektedir (165-168). Bununla birlikte PrP, primer insan nöron kültürlerinde Bax aracılığı ile apoptozise engel olurken bazı hücre kültür hatlarında [fare N2a, insan BE(2)-M17, insan SK-N-SH, insan embriyonik böbrek 293] anti-apoptotik etki gösteremez (257). PrP'nin hücreye özgü bu nöroprotektif fonksiyonu izorform özgüllüğüne, hücresel lokalizasyonuna, sinyalleme yollarının ya da PrP ile etkileşen proteinlerin varlığı ya da yokluğuna bağlı olabilir (257). Öte yandan, bir murin nöronal hücre hattında PrP'nin aşırı ekspresyonunun apoptozise duyarlılığı arttırdığı ileri sürülmüştür (258). Ayrıca Bcl-2 proteininin C-terminali mayalarda PrP ile etkileşebildiğinin gösterilmesi, PrP'nin Bcl-2 ailesinin bir üyesi olarak görev yaptığını düşündürmüştür (259, 260).

PrP<sup>C</sup>'nin farzedilen nöroprotektif aktivitesinin prion hastalıkları sırasında nörotoksik etkiye nasıl değiştiği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Mevcut bulgular PrP<sup>C</sup>'nin aşırı

ekspresyonunun p53'e bağımlı olarak farklı hücre tiplerinde apoptotik uyarıya duyarlı hale getirdiğini ileri sürmüştür (135). Öte yandan, apoptozise giden, PrP<sup>C</sup>'den yoksun hücrelerde PrP<sup>C</sup> ekspresyonu antiapoptotik etkiler yaratabilmektedir. Bu nedenle PrP<sup>C</sup> ekspresyonunun varlığı/yokluğu ve/veya düzeyleri PrP<sup>C</sup>'nin pro- ve antiapoptotik etkileri arasındaki değişimleri belirlemesi açısından önemlidir (261).

Apoptozisin inhibisyonu, kanserin ayırıcı özelliklerinden bir tanesidir (112, 262). Prion proteinlerinin kanser gelişiminde hücre çoğalmasını arttırdığı ve apoptozisi inhibe ettiği ileri sürülmüştür ancak bu süreçte PrP proteinlerinin anti-apoptotik etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (72). PrP<sup>C</sup>'nin bakır iyonlarına bağlanarak PI3K/AKT yolağını aktive ettiği ve tümörlerde proliferasyonu ve hücre yaşamını arttırdığı gösterilmiştir (113, 127). PrP<sup>C</sup> neoplastik dokularda büyük ölçüde artış göstermektedir (263). Ancak, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili polimorfizmlerin kanser ile bir ilişkisinin olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın kodon 129 polimorfizminin kolorektal kanser için bir risk faktörü olamayacağı gösterilmiştir (263). Gerçekten PrP<sup>C</sup> gastrik neoplastik dokularda aşırı miktarlarda bulunarak kanser hücrelerinde Bcl-2 üzerinden apoptozisi engellemektedir (113, 264).

Daha önce *Prnp* polimorfizmleri ile apoptozis arasındaki olası ilişkiyi inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Yaptığımız çalışmada belirlenen dört polimorfizmi de içeren örneklerle ait beyin dokularının optic tectumlarında apoptotik hücre sayısının diğer polimorfik örneklerle oranla daha fazla olduğunu belirledik. *Prnp*'de görülen polimorfizmlerin PrP<sup>C</sup>'nin hastalık yapıcı forma (PrP<sup>Sc</sup>) dönüşümünü sağlaması ve oluşan prion hastalıklarının nöronal apoptozisi indükleyecek nörodejeneratif karakterde olması nedeniyle polimorfik bireylerde apoptotik hücre sayısının belirlenmesi anlamlı bir parametre olabilir. Dolayısıyla belirlenen polimorfizmlerin apoptozis ile ilişkisi, aynı zamanda bu polimorfizmlerin PrP'nin nörodejeneratif hastalığa neden olacak yapısal dönüşüme eğilimini de açıklayabilir. Bununla birlikte, nöronal apoptozisin biyopatolojik nedenlerden gerçekleştiği ve proteaza dirençli PrP<sup>RES</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) kümelenmesi ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (265). Ancak, nörotoksik bir mekanizmayla sitosolik PrP<sup>Sc</sup> yığınları kaspaza bağımlı nöron apoptozisini aktive etmektedir (266). Ayrıca özellikle hipokampus ve serebellumdaki nöronların apoptozisi ile bu bölgedeki PrP<sup>C</sup> ekspresyonları arasında bir ilişki olduğu ve dolayısıyla PrP<sup>C</sup>'nin nöron survivalinde önemli bir fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir (267).



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER:

Kırktan fazla PrP geninin dizi analizi sonuçları, bu genin memelilerde büyük ölçüde korunduğunu ortaya koymuştur. Bu durum PrP proteinin önemli bazı fonksiyonlarının evrimsel süreçte korunduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte bireylerde ve türlerde PrP dizilerindeki varyasyonlar prion enfeksiyonlarına duyarlılığı büyük ölçüde arttırmaktadır (267). *Prnp* genindeki mutasyonlar ailesel prion hastalıkları oluşumunda önemli bir yer tutmaktadır (26). İnsan *Prnp* polimorfizmleri prion hastalıklarının sporadik, kalıtsal ve enfeksiyöz formlarına duyarlılığı etkileyebilir. Günümüzde prion hastalıkları ile ilişkili insan PrP geninde en az 30 farklı mutasyon belirlenmiştir (26). Prion proteini memelilerde büyük ölçüde korunmuş olmasına karşın günümüzde bu küçük proteinin fonksiyonlarının neler olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun yanında, yapılan birçok çalışma  $PrP^C$ 'nin nöron gelişimi ve nöron korunmasında bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Hatta bu proteinin nöronların dışında, lenfositler ve antijen sunan hücreler gibi immün sistem hücrelerinde de yoğun olarak bulunması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi üzerine bir etkilerinin olduğu düşüncesini doğurmuştur. PrP yapısının ve fonksiyonunun ayrıntılı olarak belirlenmesi ve  $PrP^C$ 'nin  $PrP^{Sc}$ 'ye dönüşüm mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması, özellikle nörodejeneratif hastalıkların etki mekanizmasının ve bu hastalıklara karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli olacaktır. Günümüzde, birçok terapötik strateji  $PrP^{Sc}$  inhibisyonu üzerine yoğunlaşmıştır (268).  $PrP^C$  fonksiyonlarındaki değişiklikler prion-indüklü patolojilerde önemli bir rol oynuyorsa,  $PrP^C$ 'nin biyolojik aktivitelerini düzenleyen hücresel yolların hedeflenmesi alternatif bir yaklaşım olabilir. Örneğin, çalışmamızda *Prnp* polimorfizmleriyle programlanmış hücre ölümü arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, prion hastalıklarının tedavisinde apoptotik (ve/veya otofajik) yolların kontrolüne yönelik stratejilerin geliştirilmesi açısından önemli olabilir.  $PrP^C$ 'nin normal fonksiyonunu anlamak için ileri süreçlerde PrP ile etkileşen ilişkili moleküllerin belirlenmesi zorunlu hale gelecektir. Bu hedeflerin gerçekleştirilmesinde maya ve *Drosophila* gibi genetik analizlere uygun model sistemler kullanılabilir. Bununla birlikte, prion proteininin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması ve

patolojisindeki mekanizmaların ortaya çıkarılması için farklı türlerde organizmalarda proteomik ve genomik analizlere gereksinim vardır. Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada bir su kaplumbağası olan *Trachemys scripta*'nın prion protein kodlayan gen bölgesi PCR ile amplifiye edilmiş ve dizi analizi ile polimorfik bölgeler belirlenmiştir. Öte yandan, nörodejeneratif hastalıklara yatkınlığı arttıran *Prnp* polimorfizmlerinin beyin dokusunda apoptotik hücre sayısının artışı ile bir ilişkisinin olabileceği ilk kez bu çalışma ile vurgulanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, özellikle, prion proteinlerinin hücre fizyolojisi (yaşam, proliferasyon, göç ya da ölüm gibi) üzerine etkilerinin araştırılması önemli bir hedef olabilir. Ayrıca, memelilerde *Prnp*'nin büyük ölçüde beyinde, kısmen nöronlarda ve az oranlarda dalak, böbrek, akciğer ve kalpte eksprese edildiği bilinmektedir fakat henüz reptillerde çeşitli dokularda ekspresyon düzeyleri hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan, prion patolojilerine yatkınlığın proteinde meydana gelen katlanmalar ve *Prnp*'deki polimorfizmler ile birlikte bu proteinin hücre içi sinyal iletimini ve dolayısıyla apoptotik mekanizmaları tetikleyebilecek bir glikozilasyon değişikliğine gidip gitmediğinin araştırılması da son derece önemli gözükmektedir.

## 7.KAYNAKLAR

1. Buchberger A, Bukau B, Sommer T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell*. 2010;40(2):238-52.
2. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003;426(6968):884-90.
3. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(6):574-81.
4. Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008;65(2):184-9.
5. Pastore A, Zagari A. A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion*. 2007;1(3):185-97. PMID: 2634592.
6. Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, et al. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):11062-7. PMID: 1904148.
7. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(1):14-22. PMID: 2674794.
8. Makarava N, Kovacs GG, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, et al. Genesis of Mammalian Prions: From Non-infectious Amyloid Fibrils to a Transmissible Prion Disease. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002419. PMID: 3228811.
9. Riesner D. The prion theory: background and basic information. *Contrib Microbiol*. 2001;7:7-20.
10. Shkundina IS, Ter-Avanesyan MD. Prions. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;72(13):1519-36.
11. Prusiner SB, Garfin DE, Cochran SP, Baringer JR, Hadlow WJ, Eklund CM, et al. Evidence for hydrophobic domains on the surface of the scrapie agent. *Trans Am Neurol Assoc*. 1978;103:62-4.
12. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982;216(4542):136-44.
13. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. 1985;315(6017):331-3.
14. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 1985;40(4):735-46.
15. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 1986;46(3):417-28.
16. Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9097-101. PMID: 50072.
17. Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, Gabriel JM, Holtzman DM, Cohen F, et al. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):10940-4. PMID: 50458.
18. Rivera-Milla E, Stuermer CA, Malaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet*. 2003;19(2):72-5.
19. Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*. 1987;51(4):651-62.
20. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. 1989;338(6213):342-5.

21. Sakaguchi S. Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. *J Med Invest.* 2007;54(3-4):211-23.
22. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet.* 1991;49(2):320-9. PMID: 1683278.
23. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell.* 1987;51(2):229-40.
24. Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21140-8.
25. Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* 2010;290(1):1-23.
26. Hu W, Rosenberg RN, Stuve O. Prion proteins: a biological role beyond prion diseases. *Acta Neurol Scand.* 2007;116(2):75-82.
27. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207(2):621-9.
28. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 1997;390(6661):684-7.
29. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem.* 1998;273(50):33107-10.
30. Perera WS, Hooper NM. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol.* 2001;11(7):519-23.
31. Krasemann S, Zerr I, Weber T, Poser S, Kretzschmar H, Hunsmann G, et al. Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;34(1):173-6.
32. Westergaard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(6):629-44. PMID: 1986710.
33. Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6324-31.
34. Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 1994;125(6):1239-50. PMID: 2290925.
35. Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, et al. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 2003;22(14):3591-601. PMID: 165614.
36. Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rulicke T, Janett F, Heppner FL, et al. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J.* 2002;21(14):3652-8. PMID: 125402.
37. Paisley D, Banks S, Selfridge J, McLennan NF, Ritchie AM, McEwan C, et al. Male infertility and DNA damage in Doppel knockout and prion protein/Doppel double-knockout mice. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2279-88. PMID: 1615753.
38. Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simoncic T, Gready JE. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene.* 2003;314:89-102.
39. Watts JC, Westaway D. The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(6):654-72.
40. Rivera-Milla E, Oidtmann B, Panagiotidis CH, Baier M, Sklaviadis T, Hoffmann R, et al. Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB J.* 2006;20(2):317-9.
41. Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, et al. The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J.* 2007;26(17):4038-50. PMID: 1950727.

42. Qin K, O'Donnell M, Zhao RY. Doppel: more rival than double to prion. *Neuroscience*. 2006;141(1):1-8.
43. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*. 1999;292(4):797-817.
44. Li A, Sakaguchi S, Atarashi R, Roy BC, Nakaoke R, Arima K, et al. Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(5):553-67.
45. Mastrangelo P, Westaway D. The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Gene*. 2001;275(1):1-18.
46. Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, et al. Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2352-7. PMID: 30142.
47. Premzl M, Gready JE, Jermini LS, Simonic T, Marshall Graves JA. Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins--clues from comparative genomic analysis. *Mol Biol Evol*. 2004;21(12):2210-31.
48. Makrinou E, Collinge J, Antoniou M. Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. *Mamm Genome*. 2002;13(12):696-703.
49. Choi SH, Kim IC, Kim DS, Kim DW, Chae SH, Choi HH, et al. Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. *Genomics*. 2006;87(5):598-607.
50. Harrison PM, Khachane A, Kumar M. Genomic assessment of the evolution of the prion protein gene family in vertebrates. *Genomics*. 2010;95(5):268-77.
51. Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP. Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res*. 2008;39(4):9.
52. Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, Sorgato MC. The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*. 2001;17(3):521-38.
53. Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, et al. PrP<sup>C</sup> on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem*. 2004;88(4):769-81.
54. Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2333-8. PMID: 20088.
55. Hooper NM, Taylor DR, Watt NT. Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1272-6.
56. Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, et al. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol*. 2003;162(4):703-17. PMID: 2173792.
57. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14945-9. PMID: 26242.
58. Harris ED. Basic and clinical aspects of copper. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40(5):547-86.
59. Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, et al. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J*. 2001;20(21):5863-75. PMID: 125290.
60. Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J*. 2002;368(Pt 1):81-90. PMID: 1222984.
61. Silva JL, Gomes MP, Vieira TC, Cordeiro Y. PrP interactions with nucleic acids and glycosaminoglycans in function and disease. *Front Biosci*. 2010;15:132-50.
62. Lima LM, Cordeiro Y, Tinoco LW, Marques AF, Oliveira CL, Sampath S, et al. Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry*. 2006;45(30):9180-7.

63. Gomes MP, Cordeiro Y, Silva JL. The peculiar interaction between mammalian prion protein and RNA. *Prion*. 2008;2(2):64-6. PMID: 2634520.
64. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;76(1):85-92.
65. Hachiya NS, Watanabe K, Sakasegawa Y, Kaneko K. Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(3):818-23.
66. Petrakis S, Sklaviadis T. Identification of proteins with high affinity for refolded and native PrPC. *Proteomics*. 2006;6(24):6476-84.
67. Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, et al. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem*. 2001;276(52):49400-9.
68. Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR. Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol*. 2003;13(6):399-408.
69. Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, et al. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J*. 2001;20(3):377-86. PMID: 133469.
70. Kovacs GG, Budka H. Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*. 2008;172(3):555-65. PMID: 2258253.
71. Turu M, Slevin M, Ethirajan P, Luque A, Elsbali A, Font A, et al. The normal cellular prion protein and its possible role in angiogenesis. *Front Biosci*. 2008;13:6491-500.
72. Antony H, Wiegman AP, Wei MQ, Chernoff YO, Khanna KK, Munn AL. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011.
73. Viles JH, Klewpatinond M, Nadal RC. Copper and the structural biology of the prion protein. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 6):1288-92.
74. Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*. 1998;37(20):7185-93.
75. Thakur AK, Srivastava AK, Srinivas V, Chary KV, Rao CM. Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions. *J Biol Chem*. 2011;286(44):38533-45. PMID: 3207452.
76. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci*. 1997;15(8):961-72.
77. Yu S, Yin S, Pham N, Wong P, Kang SC, Petersen RB, et al. Ligand binding promotes prion protein aggregation--role of the octapeptide repeats. *FEBS J*. 2008;275(22):5564-75. PMID: 2648294.
78. Gonzalez-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Espinosa JC, Oesch B, Gasset M. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J Mol Biol*. 2002;319(2):527-40.
79. Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, et al. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9064-72.
80. Hoshino S, Inoue K, Yokoyama T, Kobayashi S, Asakura T, Teramoto A, et al. Prions prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary report. *Acta Neurochir Suppl*. 2003;86:297-9.
81. Krebs B, Wiebelitz A, Balitzki-Korte B, Vassallo N, Paluch S, Mitteregger G, et al. Cellular prion protein modulates the intracellular calcium response to hydrogen peroxide. *J Neurochem*. 2007;100(2):358-67.
82. Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol*. 1998;75(1):29-37.

83. Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannsperger V, Nolting S, et al. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol.* 2007;17(2):174-83. PMID: 1859984.
84. Aude-Garcia C, Villiers C, Candeias SM, Garrel C, Bertrand C, Collin V, et al. Enhanced susceptibility of T lymphocytes to oxidative stress in the absence of the cellular prion protein. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(4):687-96.
85. Malaise M, Schatzl HM, Burkle A. The octarepeat region of prion protein, but not the TM1 domain, is important for the antioxidant effect of prion protein. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(12):1622-30.
86. Steinacker P, Hawlik A, Lehnert S, Jahn O, Meier S, Gorz E, et al. Neuroprotective function of cellular prion protein in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1409-20. PMID: 2832160.
87. Restelli E, Fioriti L, Mantovani S, Airaghi S, Forloni G, Chiesa R. Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein. *PLoS One.* 2010;5(10):e13725. PMID: 2965675.
88. Martins VR, Mercadante AF, Cabral AL, Freitas AR, Castro RM. Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(5):585-95.
89. Barenco MG, Valori CF, Roncoroni C, Loewer J, Montrasio F, Rossi D. Deletion of the amino-terminal domain of the prion protein does not impair prion protein-dependent neuronal differentiation and neuritogenesis. *J Neurosci Res.* 2009;87(3):806-19.
90. Pantera B, Bini C, Cirri P, Paoli P, Camici G, Manao G, et al. PrP<sup>c</sup> activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. *J Neurochem.* 2009;110(1):194-207.
91. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 2000;482(3):257-60.
92. Moya KL, Hassig R, Breen KC, Volland H, Di Giamberardino L. Axonal transport of the cellular prion protein is increased during axon regeneration. *J Neurochem.* 2005;92(5):1044-53.
93. Adle-Biassette H, Verney C, Peoc'h K, Dauge MC, Razavi F, Choudat L, et al. Immunohistochemical expression of prion protein (PrP<sup>c</sup>) in the human forebrain during development. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(7):698-706.
94. Santucci A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59<sup>fyn</sup> and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 2005;169(2):341-54. PMID: 2171870.
95. Malaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, et al. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol.* 2009;7(3):e55. PMID: 2653553.
96. Roberts TK, Eugenin EA, Morgello S, Clements JE, Zink MC, Berman JW. PrP<sup>c</sup>, the cellular isoform of the human prion protein, is a novel biomarker of HIV-associated neurocognitive impairment and mediates neuroinflammation. *Am J Pathol.* 2010;177(4):1848-60. PMID: 2947280.
97. Viegas P, Chaverot N, Enslin H, Perriere N, Couraud PO, Cazaubon S. Junctional expression of the prion protein PrP<sup>c</sup> by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 22):4634-43.
98. Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, et al. Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol.* 2006;176(12):7254-62.
99. Mabbott NA, Brown KL, Manson J, Bruce ME. T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology.* 1997;92(2):161-5. PMID: 1364053.

100. Lo RY, Shyu WC, Lin SZ, Wang HJ, Chen SS, Li H. New molecular insights into cellular survival and stress responses: neuroprotective role of cellular prion protein (PrPC). *Mol Neurobiol.* 2007;35(3):236-44.
101. Schmalzbauer R, Eigenbrod S, Winoto-Morbach S, Xiang W, Schutze S, Bertsch U, et al. Evidence for an association of prion protein and sphingolipid-mediated signaling. *J Neurochem.* 2008;106(3):1459-70.
102. Kim BH, Lee HG, Choi JK, Kim JI, Choi EK, Carp RI, et al. The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;124(1):40-50.
103. Ferreira E, Costa R, Marques S, Cardoso SM, Oliveira CR, Pereira CM. Involvement of mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death pathway triggered by the prion peptide PrP(106-126). *J Neurochem.* 2008;104(3):766-76.
104. de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, PM ES, Martins MA, Linden R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol.* 2005;77(2):238-46.
105. Strom A, Wang GS, Picketts DJ, Reimer R, Stuke AW, Scott FW. Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(5):414-9.
106. Pan Y, Zhao L, Liang J, Liu J, Shi Y, Liu N, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB J.* 2006;20(11):1886-8.
107. Muras AG, Hajj GN, Ribeiro KB, Nomizo R, Nonogaki S, Chammass R, et al. Prion protein ablation increases cellular aggregation and embolization contributing to mechanisms of metastasis. *Int J Cancer.* 2009;125(7):1523-31.
108. Li QQ, Sun YP, Ruan CP, Xu XY, Ge JH, He J, et al. Cellular prion protein promotes glucose uptake through the Fyn-HIF-2 $\alpha$ -Glut1 pathway to support colorectal cancer cell survival. *Cancer Sci.* 2011;102(2):400-6.
109. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 1992;115(1):117-22.
110. Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, Lodish HF. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2184-9. PMID: 1413720.
111. Miranda A, Pericuesta E, Ramirez MA, Gutierrez-Adan A. Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PLoS One.* 2011;6(4):e18422. PMID: 3070729.
112. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
113. Liang J, Pan Y, Zhang D, Guo C, Shi Y, Wang J, et al. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *FASEB J.* 2007;21(9):2247-56.
114. Liang J, Ge F, Guo C, Luo G, Wang X, Han G, et al. Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrP(C)-induced drug resistance in gastric cancer cells. *FEBS J.* 2009;276(3):685-94.
115. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 2002;25(8):412-7.
116. Taylor DR, Hooper NM. The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol.* 2006;23(1):89-99.
117. Mouillet-Richard S, Schneider B, Pradines E, Pietri M, Ermonval M, Grassi J, et al. Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1096:106-19.
118. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, et al. Signal transduction through prion protein. *Science.* 2000;289(5486):1925-8.



119. Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O. NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13326-31. PMID: 263804.
120. Mouillet-Richard S, Pietri M, Schneider B, Vidal C, Mutel V, Launay JM, et al. Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4592-601.
121. Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, Baekkeskov S, Legname G. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J Neurochem*. 2005;95(5):1373-86.
122. Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci*. 2003;22(2):227-33.
123. Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem*. 1997;272(3):1876-84.
124. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J*. 2002;21(13):3307-16. PMID: 125391.
125. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J*. 2002;21(13):3317-26. PMID: 125390.
126. Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, et al. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke*. 2006;37(5):1296-300.
127. Vassallo N, Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(1):75-82.
128. Selvaggini C, De Gioia L, Cantu L, Ghibaudi E, Diomede L, Passerini F, et al. Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194(3):1380-6.
129. Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*. 1993;362(6420):543-6.
130. Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport*. 1994;5(16):2057-60.
131. Thellung S, Villa V, Corsaro A, Arena S, Millo E, Damonte G, et al. p38 MAP kinase mediates the cell death induced by PrP106-126 in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurobiol Dis*. 2002;9(1):69-81.
132. Carimalo J, Cronier S, Petit G, Peyrin JM, Boukhtouche F, Arbez N, et al. Activation of the JNK-c-Jun pathway during the early phase of neuronal apoptosis induced by PrP106-126 and prion infection. *Eur J Neurosci*. 2005;21(9):2311-9.
133. Pietri M, Caprini A, Mouillet-Richard S, Pradines E, Ermonval M, Grassi J, et al. Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. *J Biol Chem*. 2006;281(38):28470-9.
134. Paitel E, Sunyach C, Alves da Costa C, Bourdon JC, Vincent B, Checler F. Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem*. 2004;279(1):612-8.
135. Sunyach C, Cisse MA, da Costa CA, Vincent B, Checler F. The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 2007;282(3):1956-63.

136. Sunyach C, Checler F. Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem.* 2005;92(6):1399-407.
137. Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(6):825-34.
138. Grassilli E, Carcereri de Prati A, Monti D, Troiano L, Menegazzi M, Barbieri D, et al. Studies of the relationship between cell proliferation and cell death. II. Early gene expression during concanavalin A-induced proliferation or dexamethasone-induced apoptosis of rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188(3):1261-6.
139. Pittoni V, Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2002;1(3):154-61.
140. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57. PMID: 2008650.
141. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest.* 1998;78(8):893-913.
142. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature.* 1998;396(6707):119-22.
143. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46. PMID: 99015.
144. Perez-Pinzon MA, Xu GP, Born J, Lorenzo J, Busto R, Rosenthal M, et al. Cytochrome C is released from mitochondria into the cytosol after cerebral anoxia or ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(1):39-43.
145. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326 ( Pt 1):1-16. PMID: 1218630.
146. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999;59(7 Suppl):1693s-700s.
147. Reed JC, Miyashita T, Krajewski S, Takayama S, Aime-Sempe C, Kitada S, et al. Bcl-2 family proteins and the regulation of programmed cell death in leukemia and lymphoma. *Cancer Treat Res.* 1996;84:31-72.
148. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148(7):2207-16.
149. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 2001;69(25-26):2957-64.
150. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am.* 1996;275(6):80-7.
151. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:186-94.
152. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 2001;104(3):325-8.
153. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct.* 2011;29(6):468-80.
154. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv.* 2000;74(2-3):281-6.
155. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):32-43.
156. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:87. PMID: 3197541.
157. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205-19.
158. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003;7(3):249-57.
159. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(4):521-31.

160. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S2-19. PMCID: 2928556.
161. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.
162. Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, et al. Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis*. 2005;20(2):442-9.
163. Roucou X, Montessuit S, Antonsson B, Martinou JC. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J*. 2002;368(Pt 3):915-21. PMCID: 1223025.
164. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(1):63-7.
165. Lin DT, Jodoin J, Baril M, Goodyer CG, Leblanc AC. Cytosolic prion protein is the predominant anti-Bax prion protein form: exclusion of transmembrane and secreted prion protein forms in the anti-Bax function. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(10):2001-12. PMCID: 2662133.
166. Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, LeBlanc A. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death Differ*. 2005;12(7):783-95.
167. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(42):39145-9.
168. Roucou X, LeBlanc AC. Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(1):3-11.
169. Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G, et al. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res*. 2004;64(2):719-27.
170. Meslin F, Hamai A, Gao P, Jalil A, Cahuzac N, Chouaib S, et al. Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res*. 2007;67(22):10910-9.
171. Barbieri G, Palumbo S, Gabrusiewicz K, Azzalin A, Marchesi N, Spedito A, et al. Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy*. 2011;7(8):840-53.
172. Mattei V, Matarrese P, Garofalo T, Tinari A, Gambardella L, Ciarlo L, et al. Recruitment of cellular prion protein to mitochondrial raft-like microdomains contributes to apoptosis execution. *Mol Biol Cell*. 2011;22(24):4842-53. PMCID: 3237627.
173. Li XL, Wang GR, Jing YY, Pan MM, Dong CF, Zhou RM, et al. Cytosolic PrP induces apoptosis of cell by disrupting microtubule assembly. *J Mol Neurosci*. 2011;43(3):316-25.
174. Wang X, Dong CF, Shi Q, Shi S, Wang GR, Lei YJ, et al. Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB Rep*. 2009;42(7):444-9.
175. Hetz CA, Soto C. Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Curr Mol Med*. 2006;6(1):37-43. PMCID: 2838391.
176. Castilla J, Hetz C, Soto C. Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med*. 2004;4(4):397-403.
177. Yang Y, Chen L, Pan HZ, Kou Y, Xu CM. Glycosylation modification of human prion protein provokes apoptosis in HeLa cells in vitro. *BMB Rep*. 2009;42(6):331-7.
178. Chen L, Yang Y, Han J, Zhang BY, Zhao L, Nie K, et al. Removal of the glycosylation of prion protein provokes apoptosis in SF126. *J Biochem Mol Biol*. 2007;40(5):662-9.
179. Moreno-Gonzalez I, Soto C. Misfolded protein aggregates: mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(5):482-7. PMCID: 3175247.
180. Soto C, Saborio GP. Prions: disease propagation and disease therapy by conformational transmission. *Trends Mol Med*. 2001;7(3):109-14.

181. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13363-83. PMID: 33918.
182. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:519-50.
183. Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(1):49-60.
184. Munch C, Bertolotti A. Propagation of the Prion Phenomenon: Beyond the Seeding Principle. *J Mol Biol*. 2012.
185. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 1993;73(7):1339-47.
186. Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, et al. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10608-12. PMID: 47826.
187. Manson JC, Clarke AR, McBride PA, McConnell I, Hope J. PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration*. 1994;3(4):331-40.
188. Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, et al. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*. 1995;69(12):7586-92. PMID: 189697.
189. Supattapone S. Prion protein conversion in vitro. *J Mol Med (Berl)*. 2004;82(6):348-56.
190. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):10962-6. PMID: 47901.
191. Zanusso G, Farinazzo A, Prelli F, Fiorini M, Gelati M, Ferrari S, et al. Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38936-42.
192. Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*. 2003;66:213-39.
193. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 1996;39(6):767-78.
194. Tagliavini F, Prelli F, Ghiso J, Bugiani O, Serban D, Prusiner SB, et al. Amyloid protein of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana kindred) is an 11 kd fragment of prion protein with an N-terminal glycine at codon 58. *EMBO J*. 1991;10(3):513-9. PMID: 452678.
195. Piccardo P, Liepnieks JJ, William A, Dlouhy SR, Farlow MR, Young K, et al. Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol*. 2001;158(6):2201-7. PMID: 1891977.
196. Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, Ichimiya Y, Porro M, Perini F, et al. Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(2):744-8. PMID: 40125.
197. Zou WQ, Capellari S, Parchi P, Sy MS, Gambetti P, Chen SG. Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40429-36.
198. Noinville S, Chich JF, Rezaei H. Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet Res*. 2008;39(4):48.
199. Chernoff YO. Stress and prions: lessons from the yeast model. *FEBS Lett*. 2007;581(19):3695-701. PMID: 2695654.
200. Chien P, Weissman JS, DePace AH. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:617-56.

201. Novitskaya V, Bocharova OV, Bronstein I, Baskakov IV. Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem.* 2006;281(19):13828-36.
202. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl).* 2003;81(11):678-99.
203. Cappai R, Jobling MF, Barrow CJ, Collins S. Structural biology of prions. *Contrib Microbiol.* 2001;7:32-47.
204. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature.* 1967;215(5105):1043-4.
205. Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S63-7.
206. Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell.* 1993;73(6):1055-8.
207. Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13452-7. PMCID: 28326.
208. Liemann S, Glockshuber R. Transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(2):187-93.
209. Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Cecilian F, Ronchi S. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* 2000;469(1):33-8.
210. Mosley CAE. Anesthesia and analgesia in reptiles. . *Seminars in avian and exotic pet medicine.* 2005;14:243-62.
211. Mutsukura K, Satoh K, Shirabe S, Tomita I, Fukutome T, Morikawa M, et al. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation: comparative analysis with pathological findings and diffusion-weighted images. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;28(6):550-7. PMCID: 2837892.
212. Yang TI, Jung DS, Ahn BY, Jeong BH, Cho HJ, Kim YS, et al. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *J Korean Med Sci.* 2010;25(7):1097-100. PMCID: 2890893.
213. Iwasaki Y, Mori K, Ito M, Nagaoka M, Ieda T, Kitamoto T, et al. An autopsied case of V180I Creutzfeldt-Jakob disease presenting with panencephalopathic-type pathology and a characteristic prion protein type. *Neuropathology.* 2011;31(5):540-8.
214. Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, Attane F, Besson G, Hannequin D, et al. Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. *Hum Mutat.* 2000;15(5):482.
215. Jeong BH, Jeon YC, Lee YJ, Cho HJ, Park SJ, Chung DI, et al. Creutzfeldt-Jakob disease with the V203I mutation and M129V polymorphism of the prion protein gene (PRNP) and a 17 kDa prion protein fragment. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010;36(6):558-63.
216. Grasbon-Frodl E, Lorenz H, Mann U, Nitsch RM, Windl O, Kretzschmar HA. Loss of glycosylation associated with the T183A mutation in human prion disease. *Acta Neuropathol.* 2004;108(6):476-84.
217. Chebaro Y, Derreumaux P. The conversion of helix H2 to beta-sheet is accelerated in the monomer and dimer of the prion protein upon T183A mutation. *J Phys Chem B.* 2009;113(19):6942-8.
218. Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy - Evolution and Adaption:* Wiley; 2005.
219. Reiner A, Beinfeld MC. The distribution of cholecystokinin-8 in the central nervous system of turtles: an immunohistochemical and biochemical study. *Brain Res Bull.* 1985;15(2):167-81.
220. Barton KA, Caughey B. Is PrP the road to ruin? *EMBO J.* 2011;30(10):1882-4. PMCID: 3098489.

221. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 1992;356(6370):577-82.
222. Westaway D, Carlson GA. Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(6):301-7.
223. Sailer A, Bueler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*. 1994;77(7):967-8.
224. Loch C, Chesebro B, Race R, Keith JM. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(17):6372-6. PMID: 386505.
225. Riemenschneider M, Klopp N, Xiang W, Wagenpfeil S, Vollmert C, Muller U, et al. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004;63(2):364-6.
226. Mastrianni JA. The genetics of prion diseases. *Genet Med*. 2010;12(4):187-95.
227. Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, Van den Broeck M, Cruts M, Hofman A, et al. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2003;53(3):409-12.
228. Del Bo R, Comi GP, Giorda R, Crimi M, Locatelli F, Martinelli-Boneschi F, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. *J Neurol*. 2003;250(6):688-92.
229. Grubenbecher S, Stuve O, Hefter H, Korth C. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson disease. *Neuroreport*. 2006;17(5):549-52.
230. Brown P, Cervenakova L, Goldfarb LG, McCombie WR, Rubenstein R, Will RG, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine. *Neurology*. 1994;44(2):291-3.
231. Shibuya S, Higuchi J, Shin RW, Tateishi J, Kitamoto T. Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1998;351(9100):419.
232. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ. The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2241-6.
233. Croes EA, Dermaut B, Houwing-Duistermaat JJ, Van den Broeck M, Cruts M, Breteler MM, et al. Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. *Ann Neurol*. 2003;54(2):275-6.
234. Prusiner SB, Scott MR. Genetics of prions. *Annu Rev Genet*. 1997;31:139-75.
235. Petraroli R, Pocchiari M. Codon 219 polymorphism of PRNP in healthy Caucasians and Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Am J Hum Genet*. 1996;58(4):888-9. PMID: 1914686.
236. Soldevila M, Andres AM, Ramirez-Soriano A, Marques-Bonet T, Calafell F, Navarro A, et al. The prion protein gene in humans revisited: lessons from a worldwide resequencing study. *Genome Res*. 2006;16(2):231-9. PMID: 1361719.
237. Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10248-53. PMID: 27848.
238. Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C. Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*. 2008;134(5):757-68. PMID: 2740631.
239. Schatzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol*. 1995;245(4):362-74.
240. Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, et al. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*. 1993;73(5):979-88.

241. Bossers A, de Vries R, Smits MA. Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J Virol.* 2000;74(3):1407-14. PMID: 111475.
242. Langedijk JP, Fuentes G, Boshuizen R, Bonvin AM. Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. *J Mol Biol.* 2006;360(4):907-20.
243. Lawson VA, Priola SA, Wehrly K, Chesebro B. N-terminal truncation of prion protein affects both formation and conformation of abnormal protease-resistant prion protein generated in vitro. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35265-71.
244. Comincini S, Foti MG, Tranulis MA, Hills D, Di Guardo G, Vaccari G, et al. Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND). *Mamm Genome.* 2001;12(9):729-33.
245. Iannuzzi L, Palomba R, Di Meo GP, Perucatti A, Ferrara L. Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;81(3-4):202-4.
246. Premzl M, Delbridge M, Gready JE, Wilson P, Johnson M, Davis J, et al. The prion protein gene: identifying regulatory signals using marsupial sequence. *Gene.* 2005;349:121-34.
247. Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(17):7664-8. PMID: 52362.
248. Zhang L, Li N, Wang QG, Fan BL, Meng QY, Wu CX. Cloning and sequencing of quail and pigeon prion genes. *Anim Biotechnol.* 2002;13(1):159-62.
249. Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, et al. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 2004;5(1):19-25.
250. Geldermann H, He H, Bobal P, Bartenschlager H, Preuss S. Comparison of DNA variants in the PRNP and NF1 regions between bovine spongiform encephalopathy and control cattle. *Anim Genet.* 2006;37(5):469-74.
251. Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries R. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 2006;4:33. PMID: 1601964.
252. Haase B, Doherr MG, Seuberlich T, Drogemüller C, Dolf G, Nicken P, et al. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 2007;8:15. PMID: 1857697.
253. Xu L, Zhang Z, Zhou X, Yin X, Yang L, Zhao D. Molecular cloning and polymorphism analysis of the prion protein gene in Tan sheep of Ningxia, China. *Gene.* 2011;485(2):102-5.
254. Hussain A, Babar ME, Imran M, Haq IU, Javed MM. Detection of four novel polymorphisms in PrP gene of Pakistani sheep (Damani and Hashtnagri) and goats (Kamori and Local Hairy) breeds. *Virol J.* 2011;8:246. PMID: 3120785.
255. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* 1999;289(5):1163-78.
256. Muramoto T, Scott M, Cohen FE, Prusiner SB. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15457-62. PMID: 26426.
257. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC. Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res.* 2004;75(2):153-61.
258. Paitel E, Fahraeus R, Checler F. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem.* 2003;278(12):10061-6.
259. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;30(1):165-8.

260. Kurschner C, Morgan JI. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;37(1-2):249-58.
261. Ramljak S, Asif AR, Armstrong VW, Wrede A, Groschup MH, Buschmann A, et al. Physiological role of the cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>): protein profiling study in two cell culture systems. *J Proteome Res.* 2008;7(7):2681-95.
262. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009;124(3):511-5.
263. Antonacopoulou AG, Palli M, Marousi S, Dimitrakopoulos FI, Kyriakopoulou U, Tsamandas AC, et al. Prion protein expression and the M129V polymorphism of the PRNP gene in patients with colorectal cancer. *Mol Carcinog.* 2010;49(7):693-9.
264. Liang J, Pan YL, Ning XX, Sun LJ, Lan M, Hong L, et al. Overexpression of PrP<sup>c</sup> and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2006;27(2):84-91.
265. Cortelli P, Gambetti P, Montagna P, Lugaresi E. Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics. *J Sleep Res.* 1999;8 Suppl 1:23-9.
266. Aguzzi A, Calella AM. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1105-52.
267. Colby DW, Prusiner SB. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a006833.
268. Cashman NR, Caughey B. Prion diseases--close to effective therapy? *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(10):874-84.



## 8.EKLER

### EK-1:

#### EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2009-102  
KONU: Onay

25/02/2011

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “SU KAPLUMBAĞASINDA (TRACHEMYS SCRIPTA) PRİON PROTEİN GEN (PRNP) POLİMORFİZMİNİN VE APOPTOZİS İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

**Yürütücü:** Yrd. Doç. Dr. Erdal BALCAN, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Tuğçe BİRKAN, Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Raşih YILMAZ  
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Süleyman AKKAN

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL

Doç. Dr. Tansel TANRIKUL

Doç. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Özcan NALBANTOĞLU

Tingiz ÖZCAN

EK-2:

07-GUB-2011 12:41 Kind.BERKUM LTD STI BORN

FROM : FATIHA-PEI

PKS NO: 02164268218

EYL 16 2012 17:03

# CERTIFICATE OF ORIGIN

## GENERAL FORM

The undersigned Concordia Turkey Farm hereby declares that the merchandise  
(Name of firm)  
below described which are to be exported to Turkey through the  
(Country)  
port of New Orleans, LA by \_\_\_\_\_ assigned to  
(Name of Airline)  
Fatih Per originated in the USA:  
(Name of Consignee)

(35boxes) 35,000 500 lbs five turkeys perceiving writing papers (Value-USD)  
(No. of Pieces) (Weight) (Merchandise Description)

Concordia Parish, Louisiana (Date) March 8, 2010

\_\_\_\_\_  
(Signature of Exporter)

The Chamber of Commerce of the Parishes, Louisiana (Concordia Parish, Louisiana Area)  
recognized by the laws of the state of Louisiana, after having examined the documents  
submitted by the mentioned shippers, certifies that in accordance to the best of its belief the  
said articles originated in the United States of America.

Parishes, (Concordia Parish) Louisiana Chamber of  
Commerce:

By: Phyllis L. Ellis  
President

Date March 8, 2010

Sworn to and subscribed before me, this 8th day of March, 2010

\_\_\_\_\_  
Notary Public

SN: DO. DR. FIDAN BALKAN - TURK BIRKAN'IN ISHARTIRI.

BERKUM SÜS HAYVANLARI  
Türkiye Gıda ve Tarım Bakanlığı  
Türkiye San. ve Tic. Ltd. Şti.  
MARMARA Caddesi No: 111B Bornova - 12310  
Tel: 0232) 373 65 341 Fax: 0232) 380 53 21  
Bornova M.D. 166 010 7468

**EK-3:**

| TEK HARF<br>KODU | KISALTMA | TAM ADI       |
|------------------|----------|---------------|
| A                | Ala      | Alanin        |
| R                | Arg      | Arjinin       |
| N                | Asn      | Asparajin     |
| D                | Asp      | Aspartik asit |
| C                | Cys      | Sistein       |
| Q                | Gln      | Glutamin      |
| E                | Glu      | Glutamik asit |
| G                | Gly      | Glisin        |
| H                | His      | Histidin      |
| I                | Ile      | İzolösın      |
| L                | Leu      | Lösın         |
| K                | Lys      | Lizin         |
| M                | Met      | Metiyonin     |
| F                | Phe      | Fenilalanin   |
| P                | Pro      | Prolin        |
| S                | Ser      | Serin         |
| T                | Thr      | Treonin       |
| W                | Trp      | Triptofan     |
| Y                | Try      | Tirozin       |
| V                | Val      | Valin         |

□

## **ÖZGEÇMİŞ**

Doğum Tarihi: 2 Kasım 1987

Doğum Yeri: Konak/İzmir

## **İletişim**

E-posta : tugcebirkan@gmail.com

Telefon : 0555 614 41 78

## **Eğitim Durumu**

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı. (2008-2012)

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü. (2004-2008)

Lise : Manisa Lisesi. (2005-2008)

## **Projeler**

Erdal Balcan, Tuğçe Birkan. *Trachemys scripta* türü su kaplumbağasında prion protein gen (*prnp*) polimorfizminin ve apoptozis ile ilişkisinin belirlenmesi, FBE 2009–087, Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Lisansüstü Tez Projesi