



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOYUN (*Ovis aries*) PRND GENİNDEKİ
CİNSİYETE BAĞLI GENETİK FARKLILIKLARIN
ARAŞTIRILMASI**

Erdoğan Pekcan ERKAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu : 401.02.00
Sunuş Tarihi : 14.01.2011**

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2009

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KOYUN (*Ovis aries*) PRND GENİNDEKİ
CİNSİYETE BAĞLI GENETİK FARKLILIKLARIN
ARAŞTIRILMASI**

Erdoğan Pekcan ERKAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cemal ÜN

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.02.00

Sunuş Tarihi : 14.01.2011

Bornova-İZMİR

2011

ÖZET

ERKAN, Erdoğan Pekcan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Cemal ÜN

Ocak 2011, 51 sayfa

Stanley Prusiner tarafından “proteinaceous infectious particle” anlamına gelen bulaşıcı etkenleri tanımlamak için kullanılan prion, insanlarda ve hayvanlarda bulaşıcı süngerimsi ensefalopatileri olarak bilinen bir grup hastalığın temel etkenidir. Prion proteinlerini kodlayan genlerin keşfi, prionlar üzerindeki çalışmaların çoğalmasına ve hız kazanmasına yol açmıştır. Prion gen ailesinin bilinen dört üyesinden biri olan *PRND* geni, cinsiyete bağlı olarak farklı gen ifadesi göstermesinin yanı sıra, dokuya özgü gen ifadesi göstermesi nedeniyle de prion ailesinin diğer üyelerinden ayrılır. *PRND* geninin kodladığı Doppel proteininin erkek üreme sisteminin sağlıklı gelişimi için kritik bir rol oynadığı bir çok çalışma ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, koyunlardaki *PRND* geni üzerindeki genetik farklılıkların koçlardaki üreme verimini etkilediği belirlenmiştir. Bu çalışma ile i) Türkiye’deki yerel koyun ırklarında *PRND* geninin yapısal özelliklerini inceleyerek, çeşitli polymorphism’lerin var olup olmadığını saptamak, ii) polymorphism’lerin cinsiyete bağlı olarak farklılık gösterebildiği noktasından yola çıkarak, *PRND* geninde bu tür farklılıkların olup olmadığını tespit etmek ve iii) elde edilecek sonuçlar ışığında, *PRND* genindeki polymorphism’lerin fenotipe olası etkilerini tartışmak amaçlanmıştır.

Anahtar sözcükler: *PRND* geni, Doppel proteini, polimorfizm

ABSTRACT

GENOTYPING SHEEP (*Ovis aries*) *PRND* GENE FOR SEX-DIFFERENTIAL POLYMORPHISMS

ERKAN, Erdoğan Pekcan

MSc in Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cemal UN

January 2011, 51 pages

Meaning “proteinaceous infectious particle”, the term prion was coined by Stanley Prusiner to define the infectious agent responsible for a group of animal and human diseases referred to as “transmissible spongiform encephalopathies”. The discovery of prion genes enabled and resulted in extensive studies on this field. *PRND*, one of the four known members of the prion gene family, is unique as it shows gender- and tissue-specific gene expression. Several lines of evidence have shown that the *PRND* gene product, Doppel, is crucial for the integrity of male reproductive system. In addition, polymorphisms on ovine *PRND* gene was shown to influence ram fertility. The objectives of this study were to i) analyze ovine *PRND* gene in local Turkish sheep for potential polymorphisms, ii) to determine whether observed polymorphisms were sex-differential and iii) to discuss potential effects of observed polymorphisms on phenotype in light of the observed data.

Keywords: *PRND* gene, Doppel protein, polymorphism

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, E.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından 2010-FEN-017 numaralı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma teşekkür ederim.

Bu araştırma sırasında yararlı yorumları ile beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Cemal ÜN'e teşekkür ederim.

Doğumumdan bu güne yanımda olan, beni ben yapan özellikleri kazanmamı sağlayan anne ve babama olan duygularımı sözlere dökmek oldukça zor. İyi ki varsınız.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca bana maddi-manevi destek olan amcalarım Serdar ERKAN ve Oğuz ERKAN'a da teşekkür borçluyum. Onlar olmadan bugünlere gelmem çok zor olurdu.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Taylan DOĞAROĞLU'na, Aşkım İÇKA'ya ve Gizem DEMİREL'e teşekkür ediyorum. Varlığınız geride bıraktığımız iki buçuk yıllık süreyi katlanılabilir kıldı.

Deneyler ve tez yazımı sürecinin her anında yanımda olan ve bana katlanan, gerektiğinde beni yönlendiren Araş. Gör. İnci TÜNEY'e gösterdiği sabır için teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
1.1 Genetik Polimorfizm Kavramı.....	1
1.2 Cinsiyete Bağlı Polimorfizmler	2
1.3 DNA Dizi Analizi Yöntemleri	3
2.PRION GEN AİLESİ.....	6
2.1 Prion Protein Geni (<i>PRNP</i>).....	6
2.2 Doppel Protein Geni (<i>PRND</i>)	8
2.3 Shadow of Prion Protein (Shadoo) Geni (<i>SPRN</i>).....	9
2.4 Testise Özgül Prion Protein Geni (<i>PRNT</i>)	10

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. PRION VE PRION-BENZERİ PROTEİNLERİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE GÖREVLERİ	11
3.1 Prion Proteini (PrP ^C).....	11
3.2 Doppel Proteini (Dpl)	13
3.3 Shadow of Prion Proteini (Shadoo)	14
3.4 Testise Özgü Prion Proteini	15
3.5 Diğer Canlılardaki Prion Proteinleri.....	16
4. PRION HASTALIKLARI.....	17
4.1 İnsan Prion Hastalıkları	17
4.1.1 Creutzfeldt-Jakob Hastalığı (CJD)	17
4.1.2 Ölümcül Ailesel Uykusuzluk (FFI)	18
4.1.3 Gerstmann-Straussler Hastalığı (GSS)	18
4.2 Hayvan Prion Hastalıkları.....	18
4.2.1 Scrapie	18
4.2.2 Sığır Süngerimsi Ensefalopatileri (BSE).....	21
4.2.3 Hayvanlarda Görülen Diğer Prion Hastalıkları	21
4.3 Prion Hastalıklarının Tedavisi.....	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. KULLANILAN YÖNTEMLER	25
5.1 Koyun Kanından Genomik DNA Elde Edilmesi	25
5.2 Koyun <i>PRND</i> Gen Dizisinin İncelenmesi	25
5.3 Primer Tasarımı.....	25
5.4 Koyun <i>PRND</i> Geninin PCR ile Çoğaltılması	27
5.5 PCR Ürünlerinin Dizi Analizi.....	28
5.6 Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması.....	28
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	29
7. ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 SNP genotipleme için kullanılan yöntemler.....	2
1.2 Zincir sonlandırma yöntemi ile DNA dizi analizinin aşamaları.....	4
2.1 İnsan prion proteininin yapısı ve PrP ^C -ilişkili mutasyonların şekilsel gösterimi	7
2.2 İnsan, fare ve zebra balığı <i>SPRN</i> genlerine ait intron-exon yapılarının gösterimi	9
2.3 Fare <i>PRNP</i> , <i>PRND</i> ve <i>SPRN</i> genlerinin şematik gösterimi	10
3.1 PrP ^C 'nin NMR spectroscopy ile açığa çıkarılan üçüncül yapısının gösterimi	12
3.2 İnsan, balık, fare, sıçan, zebra balığı ve fugu Sho'nun amino asit dizilerinin karşılaştırılması	15
5.1 Koyun (<i>Ovis aries</i>) <i>PRND</i> geninin FASTA formatında gösterimi	26
5.2 Primerlerin <i>PRND</i> gen dizisi üzerinde bağlandığı bölgeler	27
6.1 Koyun <i>PRND</i> genine ait exon ve promoter bölgelerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerin gel görüntüsü	29
6.2 PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçlarının incelenmesi	30
6.3 İyi ve kötü analiz edilen DNA dizilerine ait chromatogram'ların karşılaştırılması.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.4	<i>PRND</i> geni promoter bölgesinin transkripsiyon etkenleri için analizi.. 32
6.5	<i>PRND</i> geni promoter bölgesinin dişi ve erkeklerde çoklu hizalama sonucu 33
6.6	Prion gen ailesinin evrimi için öne sürülen bir model 36
6.7	Elde edilen dizi analizi sonuçlarının veritabanları ile karşılaştırılması . 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 <i>PRNP</i> genine ait 136., 154. ve 171. kodonlar için olası genotipler ve bu genotiplerin scrapie'ye yatkınlık/direnç ile ilişkisi.....	19
4.2 <i>PRND</i> geni üzerindeki üç önemli polimorfizm	20
4.3 Prion hastalıklarının tedavisi için denenen yöntemlerin sınıflandırılması ...	23
5.1 Tasarlanan primer çiftleri ve özellikleri	25
5.2 Kullanılan PCR koşulları.....	27
6.1 Koyun <i>PRND</i> geni üzerinde bulunan tek nükleotit değişimleri	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
° C	Centigrade degree.
<u>Kısaltmalar</u>	
SNP	Single nucleotide polymorphism.
QTL	Quantitative trait loci.
DNA	Deoxyribonucleic acid.
ADHD	Attention deficit hyperactivity disorder.
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease.
FFI	Fatal familial insomnia.
IVF	<i>In vitro</i> fertilization.
HSC	Hematopoietic stem cell.
GSS	Gerstmann-Straussler syndrome.
RSV	Respiratory syncytial virus.
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction.
NMR	Nuclear magnetic resonance.
RNAi	RNA interference.
siRNA	Small interfering RNA.
shRNA	Short hairpin RNA.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RISC	RNA induced silencing complex.
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate.
RNA	Ribonucleic acid.
GPI	Glycophosphatidylinositol.
N-CAM	Neural cell adhesion molecule.

1. GİRİŞ

1.1 Genetik Polimorfizm Kavramı

Genetik polimorfizm, ya da daha çok bilinen adıyla tek nükleotit polimorfizmi (İng. single-nucleotide polymorphism; SNP), DNA dizisini oluşturan dört nükleotitten herhangi birisinin i) bir türü oluşturan bireyler arasında; ii) bir bireyin kromozomları arasında farklılık göstermesi olarak tanımlanır. SNP'ler genlerin kodlayan bölgelerinde olabileceği gibi, kodlamayan bölgeler üzerinde, hatta genler arası bölgelerde de SNP'lere rastlamak mümkündür.

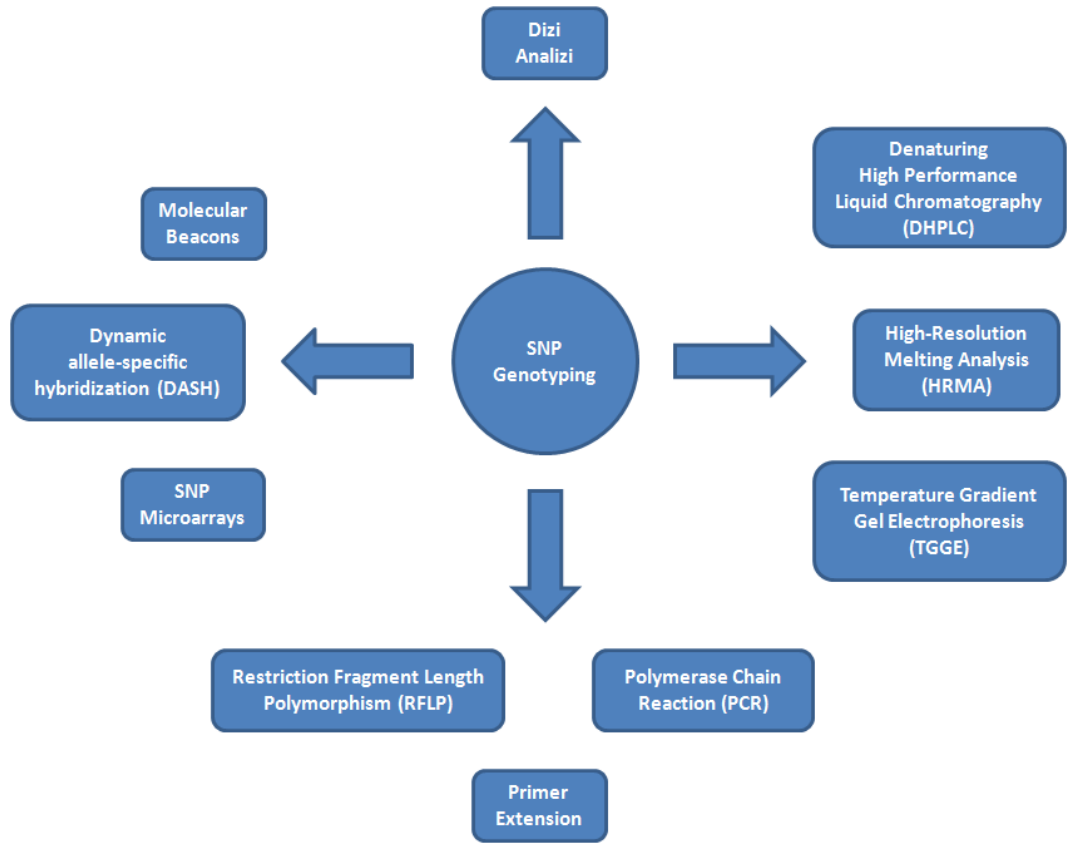
Herhangi bir SNP sonucunda, üretilecek protein dizisinde bir değişim meydana gelmezse bu değişiklik “eş anlamlı” (İng. synonymous) olarak isimlendirilir. Eğer değişiklik farklı bir protein dizisinin üretilmesine yol açarsa, bu durum “eş anlamlı olmayan” (İng. non-synonymous) olarak nitelendirilir. Eş anlamlı olmayan değişiklikler “yanlış anlamlı” (missense) ve “anlamsız” (nonsense) olmak üzere iki türdedir. Missense değişiklikler amino asit farklılığına yol açarken, nonsense değişiklikler erken bir durdurma kodonun oluşmasına neden olur. Bunların yanı sıra, splicing, transkripsiyon etkenlerinin bağlanması ve kodlamayan RNA'ların üretimi gibi süreçler de SNP'lerin varlığından etkilenebilir.

SNP'lerin hastalıklardaki önemi bir çok çalışma ile ortaya konmuştur (Human Genome Project Information, 2010). Ayrıca, tarımda ve hayvancılık alanlarında da SNP üzerine çalışmalar oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Un et al., 2008; Oztabak et al., 2009).

SNP'lerin evrimsel süreçte korunuyor olması, onların QTL (İng. quantitative trait loci) analizlerinde ve “birliktelik” (İng. association) çalışmalarında moleküler düzeyde belirteçler olarak kullanılabilmelerine olanak verir.

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerin ve ilerlemenin sürekliliği, bir çok SNP belirleme yönteminin ortaya çıkmasını sağlamıştır (Şekil 1.1). Pyrosequencing gibi yeni nesil dizi analizi yöntemleri de özellikle küçük genomik bölgelerdeki SNP'lerin belirlenmesi için kullanılabilir.

Şekil 1.1 SNP genotyping için kullanılan yöntemler.



1.2 Cinsiyete Bağlı Polimorfizmler

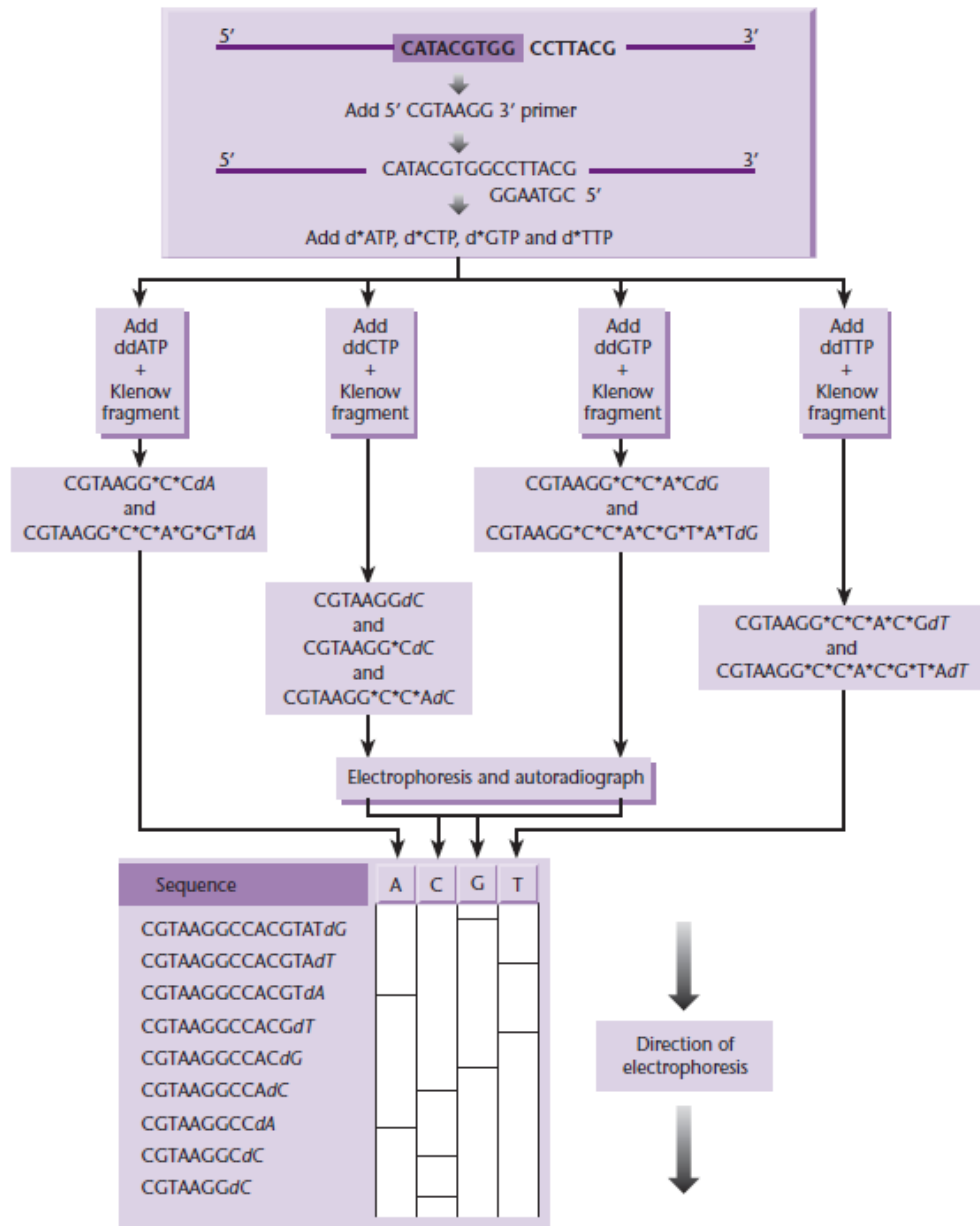
Peki, SNP'lerin varlığı ve etkileri cinsiyete bağlı mıdır? Çeşitli çalışmalar SNP'lerin varlığının ve etkilerinin cinsiyete bağlı farklılık gösterebileceğini göstermiştir. Schuurhof ve arkadaşlarının yeni doğanlar üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada, interleukin-9 geni üzerindeki polimorfizmlerin bir tür solunum yolu sorunu olan “respiratory syncytial virus (RSV)” bronchiolitis hastalığına yatkınlığı etkilediği; bu çalışmada tanımlanan polimorfizmin erkek ve dişi bireylerde zıt etkilere yol açtığı belirlenmiştir (Schuurhof et al., 2010). Bunun yanı sıra, beta T-hücre alıcısı genine ait promoter bölgede yer alan ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu bilinen rs180907 kodlu SNP'in erkek ve dişilerde farklı sıklıkta gözlemlendiği bildirilmiştir (Tripputi et al., 2008). Ayrıca, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (İng. attention deficit hyperactivity disorder; ADHD) gibi nöropsikolojik hastalıklarda (Rommelse et al., 2008) ve nikotine hassasiyette (Perkins et al., 2008) de SNP'lerin varlığının ve etkilerinin cinsiyete göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

1.3 DNA Dizi Analizi Yöntemleri

Nükleik asitlerin yapıtaşları olan nükleotit dizilerinin analizine dair ilk çalışmalar, önce bacteriophage MS2 örtü proteini, sonrasında bacteriophage MS2 genomunu oluşturan RNA dizisini kapsamaktadır (Min Jou et al., 1972; Fiers et al., 1976). DNA dizilerinin analizi için çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışıldıysa da, hiç biri Maxam-Gilbert ve Sanger tarafından geliştirilen iki yöntem kadar etkili olup, genel anlamda kabul görmemiştir. Amerikalı iki bilim insanı olan Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen, ve DNA moleküllerinin kimyasal olarak değişikliğe uğratılması ve baza özgül olarak kesilmesi ilkesine dayanan Maxam-Gilbert yöntemi (Maxam & Gilbert, 1977) ilk başta büyük ilgi gördüyse de, hemen hemen aynı zamanda Frederick Sanger tarafından geliştirilen “zincir sonlandırma yöntemi” (İng. chain-termination; Sanger yöntemi olarak da bilinir) daha etkili olması, daha az zararlı kimyasal kullanımı, ve daha büyük ölçekte kullanılabilir olması nedeniyle dizi analizlerinde tercih edilen yöntem olma özelliğini kazanmıştır.

Zincir sonlandırma ya da dideoxy yöntemi olarak adlandırılan yöntem, DNA polimerase enziminin i) tek zincirli bir DNA molekülünü kalıp olarak kullanarak doğru bir şekilde eş zincirini üretebilme; ii) 2', 3' dideoksinükleotitleri yapıtaşı olarak kullanabilme özelliklerine dayanarak geliştirilmiştir. Dideoksinükleotitlerin 3' ucunda serbest -OH (hidroksil) grubu bulunmaz; DNA polimerase ancak bir önceki nükleotide ait serbest 3' OH grubunu kullanarak zincir uzamasını gerçekleştirebildiğinden, uzayan DNA zincirine dideoksinükleotit eklenmesi, zincir uzamasının sonlanmasına neden olur. Zincir sonlandırma yönteminde kullanılan DNA polimerase enziminin 5'→3' exonuclease işlevi göstermemesi gerekir; bu nedenle DNA polimerase enzimine ait “Klenow parçası” kullanılır.

Şekil 1.2 Zincir sonlandırma yöntemi ile DNA dizi analizinin aşamaları (Primrose and Twyman, 2009).



Yeni nesil dizi analiz yöntemlerinin belki de en önemlisi, 1998 yılında Pål Nyrén ve arkadaşları tarafından geliştirilen “pyrosequencing” yöntemidir (Ronaghi et al., 1998). “Dizi analizi ile üretim (synthesis by sequencing)” ilkesine dayanan bu yöntem, DNA zincirine nükleotit eklenmesi sırasında açığa çıkan pirofosfat moleküllerini tespit etmesi özelliği ile dideoksinükleotit kullanımına bağlı zincir sonlandırılmasını esas alan geleneksel dizi analiz yöntemlerinden ayrılır. Bu yöntem ile ancak 300-500 nükleotit arasında uzunluğa sahip DNA moleküllerinin analiz edilebilirliği, yöntemi sınırlayan en önemli etkidir.

Paralel dizi analizi ile büyük çapta dizi analizlerinin (İng. high-throughput) aynı anda yapılabilmesi, geleneksel DNA dizi analizi yöntemlerinin yüksek maliyetinin düşürülebilmesinin önünü açmıştır. Bu yöntemler arasında, Lynx Therapeutics tarafından geliştirilen “Massively Parallel Signature Sequencing”, 454 Life Sciences tarafından geliştirilen “454 pyrosequencing”, Illumina tarafından geliştirilen “Illumina (Solexa) sequencing” ve Applied Biosystems tarafından geliştirilen “SOLiD sequencing” sayılabilir.

Henüz geliştirilmekte olan ileri nesil DNA dizi analizi yöntemleri arasında yer alan microarray-tabanlı dizi analizi yöntemi, enzim-tabanlı yöntemlerin aksine bir DNA microarray’i kullanır ve bu microarray üzerinde gerçekleşen melezleşme sinyallerinin okunması temeline dayanır (Hanna et al., 2000). Diğer yeni nesil yöntemler arasında DNA polimerase enziminin işaretlenmesi, DNA dizilerinin nanopore’lardan geçişi sırasında okunması (Harvard Nanopore Group, 2010), atomic force microscopy ya da electron microscopy yöntemleriyle DNA dizilerinde yer alan ağır elementlerle işaretlenmiş nükleotitlerin belirlenmesi (Xu et al., 2009) yer almaktadır.

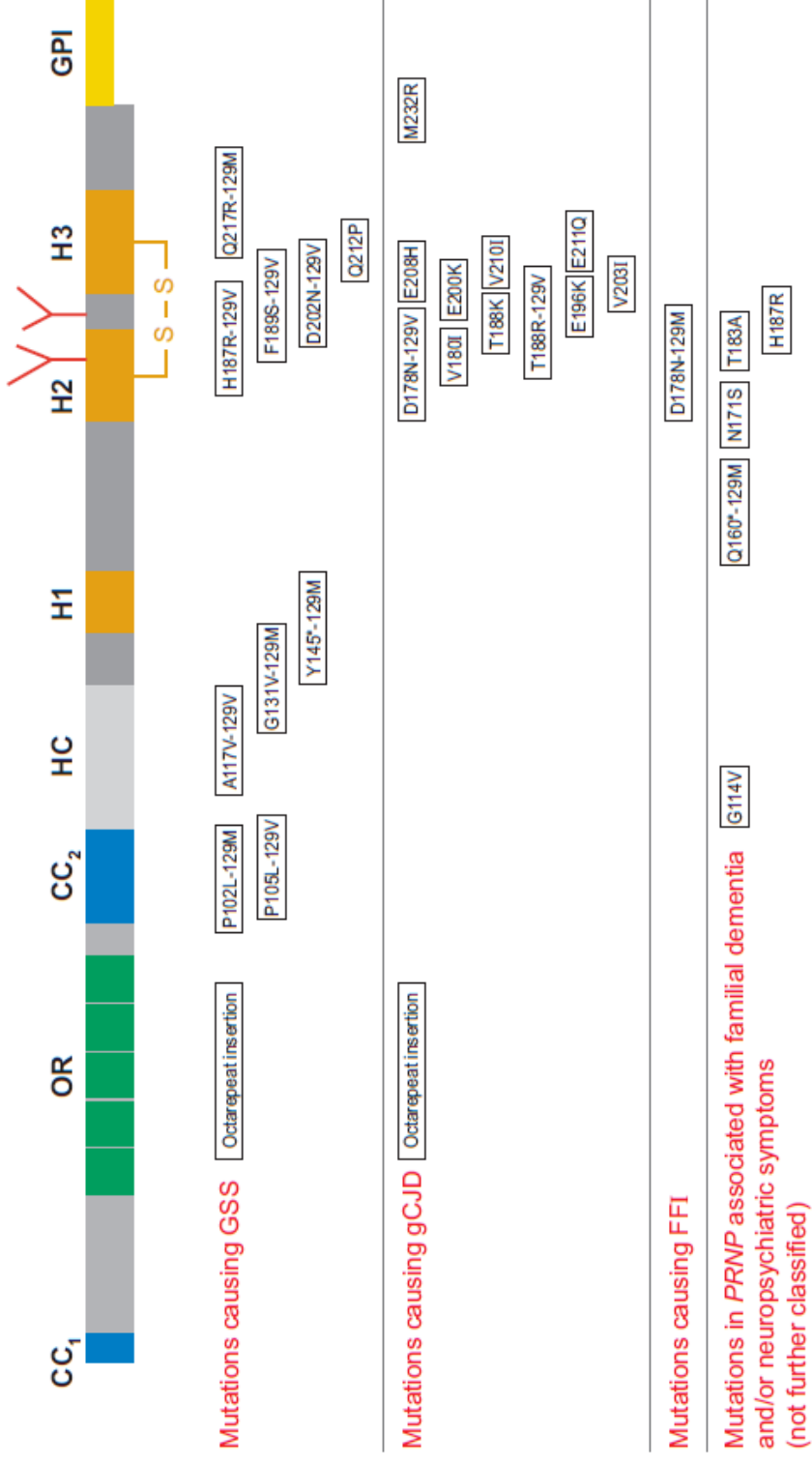
2. PRION GEN AİLESİ

Bu tezin ilk bölümünde, prion gen ailesine ait bilinen dört genin tanıtılması amaçlanmıştır. Prion gen ailesinin insanlarda ve diğer canlılardaki yapısal özelliklerinin anlaşılması; benzerliklerin ve farklılıkların tartışılması ile evrimsel süreçte prion gen ailesinin ve gen ürünleri olan farklı prion proteinlerinin nasıl şekillendiği, ve bu proteinlerin hücrel görevlerinin neler olduğu daha iyi anlaşılacaktır.

2.1 Prion Protein Geni (*PRNP*)

İnsan, fare ve hamster prion proteinlerini kodlayan genler ilk kez 1986 yılında klonlanmıştır (Locht et al., 1986; Baslet et al., 1986; Kretzschmar et al., 1986; Watts & Westaway, 2007). Fare *PRNP* geni 2. kromozom üzerinde yer alırken, insan *PRNP* geni 20. kromozom üzerinde yer almaktadır. Her iki gen yapısı da üç exon içermekte, ve tüm açık okuma bölgesi (İng. open reading frame; ORF) 3. exon üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.1). *PRNP* gen yapısında belirlenen çeşitli polimorfizmlerin insanlarda ve koyun, keçi, sığır gibi hayvanlarda prion hastalıklarına yatkınlık/direnç durumunu belirlediği ortaya konmuştur. Örneğin, *PRNP* geni üzerindeki 129. kodonda belirlenen V129 polimorfizminin insanlara görülen variant Creutzfeldt-Jakob hastalığına karşı direnç sağladığı bulunmuştur (Watts & Westaway, 2007). Bunun yanı sıra, *PRNP* geninde gözlenen çeşitli mutasyonların genetik Creutzfeldt-Jakob hastalığına (gCJD) neden olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1) (Watts & Westaway, 2007).

Şekil 2.1 İnsan prion proteininin yapısı ve PrP^C-ilişkili mutasyonların şekilsel gösterimi (Aguzzi et al., 2009).



2.2 Doppel Protein Geni (*PRND*)

PRNP^{0/0} fare ırklarında yapılan çalışmalar sırasında, bazı ırkların cerebellum'da bulunan Purkinje hücrelerinin ölümü ile tanımlanan late-onset ataxia gösterdiği gözlemlenmiştir (Sakaguchi et al., 1996; Rossi et al., 2001; Watts & Westaway'den, 2007). Bu ilginç durum ilk başta PrP^C'nin Purkinje hücrelerinde uzun dönem survival'da işlev görebileceği şeklinde yorumlandıysa da, gözlenen bu değişik fenotipin aslında knock-out farelerin üretiminde kullanılan genetik mühendisliği tekniklerinin bir yan etkisi olarak oluştuğu anlaşılmıştır. *PRNP* geninin üçüncü exonu üzerinde yer alan splice acceptor bölgesinin silinmesi, chimeric *PRNP/PRND* mRNA'sının oluşmasına, böylece *PRND* geninin ifadesinin *PRNP* promoter'ından gerçekleştirilmesine neden olmuştur. Yapılan dizi analizleri sonucunda, 20. kromozom üzerinde *PRNP* geninin yaklaşık 16 kb downstream kısmında bulunan ve *PRND* olarak adlandırılan yeni bir gen keşfedilmiştir (Moore et al., 1999). Normalde embriyonik dönem sonrasında yalnızca testislerde ifade edilen Doppel proteini, sığırlarda bağışıklık sistemine ait çeşitli hücre tiplerinde de görülmüştür (Paltrinieri et al., 2004; Paltrinieri et al., 2006). İnsan *PRND* geninde çeşitli polimorfizmler keşfedildiyse de, bu polimorfizmlerin prion hastalıklarına karşı yatkınlık/direnç sağlayıp sağlamadığı tam olarak araştırılmamıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, *PRND* gen homologlarının şempanzelerde, köpeklerde, sığırlarda, koyunlarda ve sıçanlarda var olduğu belirlenmiştir.

Koyunlarda *PRND* gen yapısını belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda, *PRND* geninin iki exon ve bu iki exonun arasında yer alan bir intron bölgesini içerdiği bulunmuştur (Comincini et al., 2001). Asıl kodlayan bölgenin (CDS) daha büyük olan ve 3' UTR'yi de içeren ikinci exon yapısında olduğu tespit edilmiştir (Comincini et al., 2001). Sığırlardaki ve koyunlardaki birinci exon yapısı % 96 oranında benzerlik göstermekle birlikte, insan ya da fare dizileri ile karşılaştırıldığında bu benzerlik ancak % 25 oranında kalmaktadır (Comincini et al., 2001). İtron yapısı sığırlarda ve koyunlarda % 84 gibi yüksek bir benzerlik oranına sahiptir. *PRND* geninin türler arasında en çok korunan kısmı, ikinci exon bölgesidir. İkinci exon'un 5' ucundaki nükleotit dizisi sığırlarda ve koyunlarda oldukça yüksek derecede benzerlik göstermektedir (yalnızca tek bir nükleotit farklılığı); genel exon yapısı göz önüne alındığında iki tür arasında nükleotit dizisi düzeyinde benzerlik % 98 oranında olup, bu benzerlik amino asit düzeyinde % 95 oranındadır (Comincini et al., 2001).

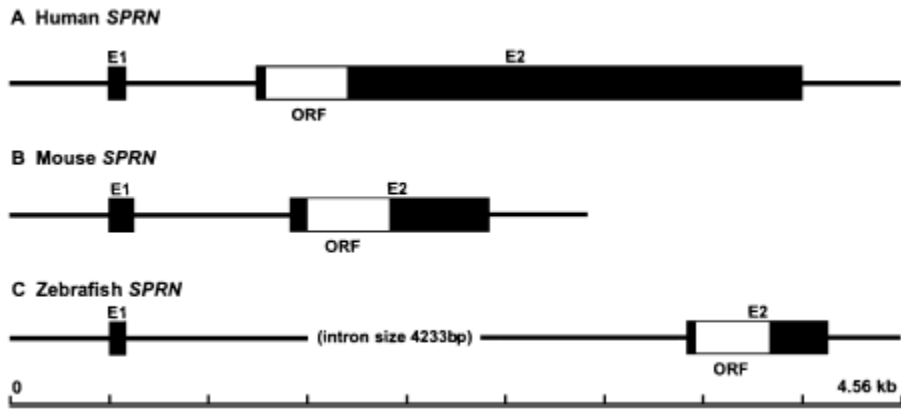
PRND gen ifadesinin dokulara göre değişimini incelemek için sığırlarda ve koyunlarda gerçekleştirilen RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) ve Northern blot analizleri sonucunda, en yüksek *PRND* ifadesinin testis dokusunda olduğu; beyinde ise *PRND* ifadesinin olmadığı tespit edilmiştir (Tranulis et al., 2001). Bu iki dokunun yanı sıra incelenen diğer dokular içerisinde, lenf düğümlerinde, dalakta, ve ovaryumlarda da düşük seviyede *PRND* ifadesinin olduğu belirlenmiştir (Tranulis et al., 2001).

2.3 Shadow of Prion Protein Geni (*SPRN*)

Marko Premzl ve arkadaşları tarafından *PRND* gen yapısına benzerlik gösteren nükleotit dizilerini bulmak amacıyla yapılan biyoinformatik çalışmalar sırasında, prion proteininin valine amino asitince zengin merkezi “su-sevmeyen” (İng. hydrophobic) bölgesine benzer kısa bir protein kodlayan bir cDNA dizisi keşfedilmiştir (Premzl et al., 2003; Watts & Westaway, 2007). Gen bölgesi *SPRN* (shadow of prion protein anlamına gelen), kodladığı protein ise Shadoo olarak isimlendirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda, *SPRN* gen homologlarının şempanzelerde, köpeklerde, sığırlarda, ve sıçanlarda var olduğu belirlenmiştir.

İnsan, fare ve zebra balığında *SPRN* gen yapısını tanımlamak için yapılan çalışmalar sonucunda, her üç türde de *SPRN* geninin iki exon’dan oluştuğu ve açık okuma bölgesinin her üç türde de ikinci exon yapısı içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Premzl et al., 2003) (Şekil 2.2).

Şekil 2.2 İnsan, fare ve zebra balığı *SPRN* genlerine ait intron-exon yapılarının gösterimi (Premzl et al., 2003).

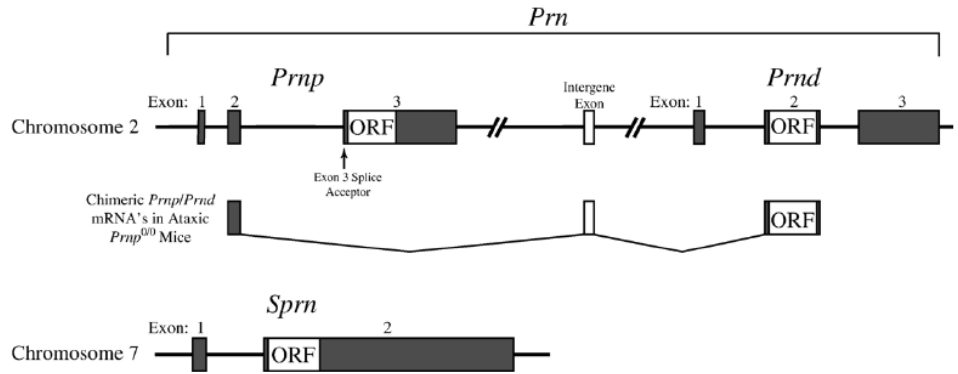


SPRN geninin dokulara göre ifadesini belirlemek amacı ile reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemi ile yapılan çalışmalar sonucunda, test edilen dokular içerisinde gen ifadesinin en yüksek düzeyde olduğu dokunun beyin olduğu; beyin haricinde akciğer ve karaciğer dokularında da az da olsa *SPRN* ifadesinin olduğu belirlenmiştir (Premzl et al., 2003).

2.4 Testise Özgül Prion Protein Geni (*PRNT*)

İnsan *PRNP* ve *PRND* genleriyle aynı genomik bölgede yer alan olası bir prion geni, *PRND* geninden yaklaşık 3 kb downstream bölgede keşfedilmiştir (Makrinou et al., 2002). Üç farklı splicing eş şekline sahip bu gen, gen ifadesinin testislerle sınırlı olduğunun bulunması nedeniyle *PRNT* (testis-specific prion) olarak isimlendirilmiştir. *PRNT* geni üzerinde yapılan çalışmalar, bu genin kemirgenlerde olmadığını (Premzl et al., 2004, Watts & Westaway, 2007); ve varlığının primat türleriyle sınırlı olabileceğine işaret etmektedir (Watts & Westaway, 2007).

Şekil 2.3 Fare *PRNP*, *PRND*, ve *SPRN* genlerinin şematik gösterimi (Watts & Westaway'den, 2007).



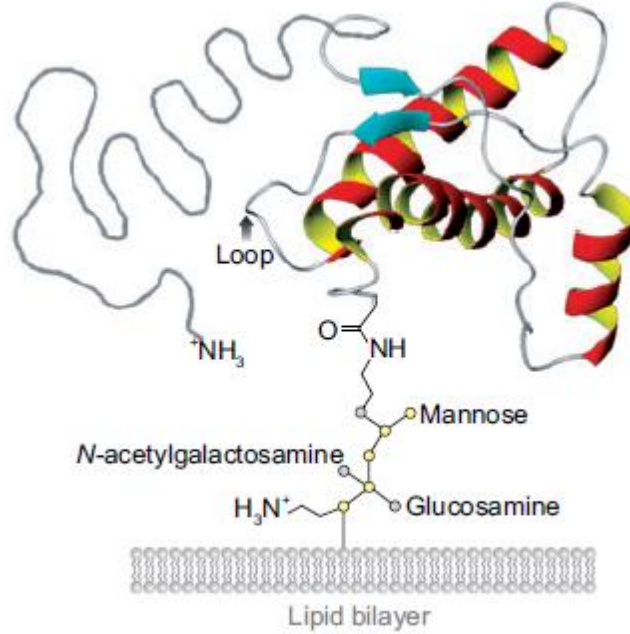
3. PRION VE PRION-BENZERİ PROTEİNLERİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE GÖREVLERİ

Bu bölümde hücreyel prion proteini PrP^C ve prion gen ailesinin diğer üyelerinin kodladığı prion-benzeri özellik gösteren proteinlerin yapısal özellikleri ve görevleri ele alınacaktır.

3.1 Prion Proteini (PrP^C)

C-ucunda bulunan bir adet disülfid bağı, B ve C sarmallarındaki cysteine moleküllerini birbirine bağlar (Watts & Westaway, 2007). N-ucunda bulunan sekizli tekrar bölgesi (octarepeat region) beş kez tekrarlanır. Bu sekizli tekrar bölgesi proteinin işlevleri için çeşitli açılardan önemlidir. İlk olarak, tekrar bölgesi içinde bulunan histidine amino asitleri bakır bağlama özelliğine sahip olup, prion proteininde bulunan dört adet bakır bağlama bölgesini oluşturur (Hornshaw et al., 1995; Brown et al., 1997). Ayrıca, tekrar bölgesi sayısında görülebilecek artışların (en fazla on üç olmak üzere) genetik prion hastalıkları olarak bilinen gCJD ve GSS'ye yol açtığı bilinmektedir (Krasemann et al., 1995). Prion proteininin yapısında bulunan diğer bir bölge, sekizli tekrar bölgesi ve C-ucu arasında yer alan su-sevmeyen dizidir (hydrophobic tract). Bu bölge, bir çok canlıdaki prion proteinleri yapısında korunmuş olarak bulunmaktadır (Watts & Westaway, 2007). Su-sevmeyen dizide meydana gelebilecek genetik değişimlerin, ^{Ctm}PrP olarak adlandırılan bir prion eşbiçiminin oluşumunu artırarak nörodejenerasyona neden olabileceği gösterilmiştir (Hegde et al., 1998; Hegde et al., 1999). Prion proteininin N-ucunun ilk kısmında yer alan ve bazik nitelikte olan (pozitif yüke sahip) bölgenin ise proteinin düzgün bir şekilde hücre içerisinde hareketi için gerekli olduğu bilinmektedir (Sunyach et al., 2003; Hachiya et al., 2004).

Şekil 3.1 PrP^C'nin nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy ile açığa çıkarılan üçüncül yapısının gösterimi. Alfa sarmallar kırmızı ile, anti-paralel beta yapraklar ise turkuaz renkte gösterilmiştir. Şeker molekülleri ise renkli, küçük çemberler ile belirtilmiştir (Aguzzi et al.'den kopyalanmıştır, 2008).



Memelilerde bulunan PrP^C, hücre zarı ve erken endosome'lar arasında bir döngüye sahip bir zar proteini özelliği gösterir (Harris, 2003). PrP^C biyosentezi diğer salgılanan proteinler ve zar proteinleri ile benzerlik taşır. İlk aşamada ER içerisinde üretilen PrP^C, ER ve Golgi içerisinde gerçekleştirilen sinyal dizisinin ayrılması, N-bağlı glikozillenmenin gerçekleşmesi, ve GPI bağının eklenmesi gibi translasyon sonrası değişimlerin ardından hücre yüzeyine taşınır. Hücre yüzeyine ulaştıktan kısa bir süre sonra, muhtemelen clathrin-coated pit'ler ya da caveolae aracılığı ile hücre içine geri alınır (Aguzzi et al., 2009). PrP^C'nin hücre içine geri alınmasının sinyal iletim yollarıyla ilişkili hücresel görevi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda, PrP^C geri alınımı sırasında tyrosine kinase alıcılarının ve G protein-eşlenik alıcılarının aktifleşmesinin neurite outgrowth sürecinin uyarılmasında gerekli olduğu gösterilmiştir (York et al., 2000; Zhang et al., 2000).

PrP^C'nin hücresel yapışma (adhesion) ve tanıma olaylarında görev alabileceği çeşitli çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Basement membrane yapısında yer alan laminin (Graner et al., 2000), laminin-alıcısı öncüsü (Gauczynski et al., 2001; Rieger et al., 1997) ve N-CAM'in PrP^C ile etkileşim gösteren moleküllerden sadece bir kısmını oluşturmaktadır. Laminin, laminin alıcısı ve N-CAM'in hücresel yapışma/tanıma olaylarında ve hücre içi sinyal

iletiminde görev alıyor olması, PrP^C'nin bu moleküller aracılığı ile hücrenel olayları düzenleyebileceği görüşünü desteklemektedir.

Bağışıklık sistemi prion hastalıklarının pathogenesis'inde önemli bir göreve sahiptir. PrP^C'nin bağışıklık sistemi hücrelerinin ve hematopoietic kök hücrelerin (İng. hematopoietic stem cells, HSCs) yüzeylerinde ifade edildiğinin bulunması (Zhang et al., 2006), PrP^C'nin kök hücreler için bir yüzey belirteci olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bunun yanı sıra, PrP^C'nin HSC'leri apoptosis'ten koruyarak onların uzun dönemde kendiliğinden yenilenebilme özelliklerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Zhang et al., 2006).

PrP^C'nin sinir sisteminde görevleri, gelişimsel süreçler ve farklılaşma süreçleri ile sınırlı değildir. PrP^C-deficient fare ırkları üzerinde yapılan çalışmalarda, circadian rhythm'lerde ve uykuda düzensizlikler (Tobler et al., 1996) ve hippocampus'e bağımlı konumsal öğrenme güçlükleri (Criado et al., 2005) gözlenmiştir.

3.2 Doppel Proteini (Dpl)

Doppel proteininin üç boyutlu yapısı PrP^C'nin C-ucu bölgesine oldukça benzemekle birlikte, bu benzerlik amino asit düzeyinde yalnızca % 25 oranındadır (Watts & Westaway, 2007). İnsan ve fare Doppel proteinlerinin NMR analizleri sonucunda, her iki proteinin oldukça benzer ve küresel yapıda olduğu, PrP^C'de bulunan ikincil yapı öğelerini bulundurduğu anlaşılmıştır (Mo et al., 2001; Luhrs et al., 2003; Watts & Westaway'den, 2007). Doppel'i PrP^C'den ayıran en önemli yapısal özellikler arasında N-ucundaki sekizli tekrar bölgelerinin olmaması, fazladan bir disulfide bağı, B sarmalındaki bir bozulma sonucu B ve B' olmak üzere iki ayrı yapının oluşması ve sonuç olarak "bükük" bir sarmal yapı sayılabilir (Watts & Westaway, 2007).

Doppel proteini testiste yüksek seviyede ifade edilirken, diğer organlarda daha az seviyede, beyinde ise çok düşük seviyede ifade edilir. Doppel'in fizyolojik işlevlerini ortaya çıkarmak için *PRND*^{-/-} fare ırklarında yapılan çalışmalar sonucunda, hem erkek hem dişi farelerin viable olduğu, dişilerin üreme özelliklerinde herhangi bir bozukluk olmadığı, buna karşılık erkek farelerin kısır olduğu gözlenmiştir (Behrens et al., 2002). *PRND*^{-/-} genotipe sahip erkek farelerde görülen bu kısırlık çiftleşme davranışındaki bozukluktan ileri gelmemektedir; erkek farelerden alınan spermatozoa örneklerinde bir çok yapısal bozukluk bulunmuştur (Behrens et al., 2003). Bu yapısal bozukluklar arasında spermin baş kısmının flagellum'a göre yanlış konumlanması, flagellum'un düz olması gerekirken sperm başının üzerine katlanması, sperm başlarında acrosome

gelişiminin tamamlanmaması yer almaktadır (Behrens et al., 2003). Doppel'in acrosome işlevindeki görevini daha iyi tanımlamak için yapılan *in vitro* fertilization (IVF) deneyleri sonucunda, *PRND*^{-/-} genotipe sahip erkek farelerden alınan spermlerin zona pellucida'ya yapışabildiği halde, bu bariyerin içerisine giremediği gözlenmiştir; zona pellucida'nın kısmi olarak hasara uğratılmasından sonra IVF deneyinin tekrarlanması ise fertilizasyon oranını yaklaşık % 30 oranında artırmıştır (Behrens et al., 2003). Bütün bu bulgular, Doppel'in akrozom işlevinde ve sperm oluşum sürecinde önemli göreve sahip olduğuna işaret etmektedir.

Doppel'in diğer hücrel görevlerini ortaya çıkarmak için fareler üzerinde yapılan çalışmalarda Doppel'in nöronlar için toksik özellikte olduğu (Cui et al., 2003) ve *PRNP*^{-/-} farelerde Doppel'in yüksek düzeyde ifade edilmesinin reactive HO-1 ve NOS türlerinin üretilmesine neden olduğu keşfedilmiştir (Wong et al., 2001). Qin ve arkadaşlarının neuroblastoma hücreleri ve astrocyte'ler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, Doppel proteininin ektopik ifadesinin caspase-3 ve caspase-10 aracılığı ile apoptotik mekanizmaların uyarılmasına neden olduğu, PrP^C'nin yüksek düzeyde ifade edilmesi ile bu durumun tersine çevirilebildiği göstermiştir (Qin et al., 2006). Bu bulgular, sinir sistemi göz önüne alındığında PrP^C ve Doppel'in örtüşen işlevlere sahip olduğuna işaret etmektedir.

Ferrer ve arkadaşlarının Alzheimer modeli üzerinde yaptığı çalışmalarda, senile plaque'lar üzerindeki dystrofic neurite'lerde Doppel immunoreactivity'nin varlığına rastlamaları, Doppel'in amyloid birikimlere tepki olarak astrocytic ve microglial tepki oluşumundan sorumlu olabileceği yönünde yorumlanmıştır (Ferrer et al., 2004). Doppel'in hastalıklar ilişkisi bu bulgularla sınırlı değildir. Comincini ve arkadaşlarının merkezi sinir sistemi tümörlerinde Doppel gen ifadesini incelediği çalışmalarda, Doppel ifadesinin tümörün malignancy derecesi ile paralellik gösterdiği bulunmuştur (Comincini et al., 2004). Travaglino ve arkadaşlarının leukemia hastalarından alınan kemik iliği örnekleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmalarda, Doppel immunoreactivity'nin hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Travaglino et al., 2005). Elde edilen bulgular, Doppel'in kan kanserinin (İng. leukemia) teşhis ve tedavisi için yeni bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

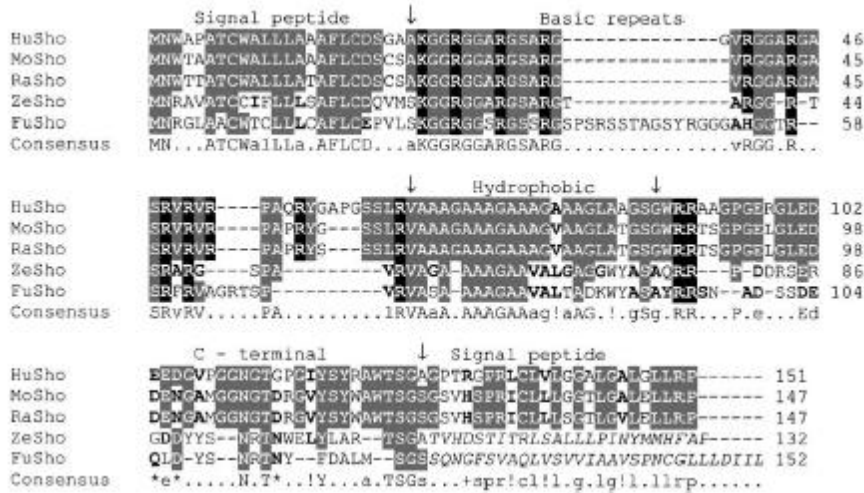
3.3 Shadoo Proteini (Sho)

Shadoo ya da kısa adıyla Sho proteini, genel yapısının PrP^C'nin N-ucunu andırması özelliğiyle Doppel proteininden ayrılır. PrP^C'de bulunan sekizli tekrar bölgeleri Sho'da mevcut değildir; bunun yerini glycine, serine, alanine ve arginine'ce zengin dördümlü tekrar bölgeleri almıştır (Watts & Westaway, 2007).

Cysteine amino asitlerinin bulunmaması nedeniyle Sho yapısında herhangi bir disülfid bağı bulunmaz. Sho ve PrP^C arasındaki en büyük benzerlik, su-sevmeyen dizi üzerindedir. Bu bölgenin bir çok canlıda evrimsel süreçte korunması, prion proteinlerinin işlevinde görev aldığını düşündürmektedir.

Sho'nun türler arasında amino asit düzeyinde karşılaştırılması, proteinin yapısal açıdan önemli bölgelerinin açığa çıkarılmasına yardımcı olmuştur (Şekil 3.2). Proteinin N-ucunda yer alan ve 24 amino asitten oluşan dizi, Sho'yu ER'ye yönlendirip, hücre dışına taşınmasını sağlar. Proteinin orta kısmında yer alan bir su-sevmeyen amino asit dizisi, PrP ve PrP-benzeri diğer proteinlerde görülen su-sevmeyen dizilerle benzerlik gösterir. Sho'nun C-ucunda N-glikozillenme için bir bölge ve GPI bağlantısı için bir sinyal dizisi bulunmaktadır (Premzl et al., 2003).

Şekil 3.2 İnsan, balık, fare, sıçan, zebra balığı ve fuğu Sho'nun amino asit dizilerinin karşılaştırılması (Premzl et al., 2003'ten kopyalanmıştır).



3.4 Testise Özgü Prion Proteini

İnsanlardaki testise özgü prion proteini 94 amino asitten oluşmuş ve hücre dışına salgılanan bir glycoprotein'dir. Proteinin N-ucunda yer alan 18 amino asitlik bir sinyal dizisi, protein işlenmesi sırasında kesilerek atılır. Testise özgü prion proteini, 44. amino asit üzerinde bir N-bağlı glikozillenmeye sahiptir. Yapılan çalışmalarda testise özgü prion proteini ile prion hastalıkları arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

3.5 Diğer Canlılardaki Prion Proteinleri

Reed Wickner ve arkadaşları, prion-benzeri özellik gösteren proteinlerin mayalarda (*Saccharomyces cerevisiae*) da bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (Wickner, 1994; Edskes et al., 1999; Wickner et al., 1999). Bir başka mantar türü olan *Podospora anserina*'da prion-benzeri proteinlerin var olduğu belirlenmiştir (Wickner et al., 1999). Wickner ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bulguların en ilginç tarafı, mantarlarda belirlenen prion-benzeri proteinlerin normal hücrel proteinlerin değişime uğramış hallerini temsil ediyor olması ve normal proteinlerle etkileşim sonucu kendilerindeki değişimi aktarma (diğer proteinleri kendi özelliğine sahip proteinlere dönüştürme) özelliğine sahip olmalarıdır. Bu anlamda, hücrel düzeyde genetik bilginin yalnızca nükleik asitler ile değil, proteinler aracılığı ile aktarılabil-diği gösterilmiştir.

4. PRION HASTALIKLARI

Bu bölümde bilinen prion hastalıkları, insan ve hayvan prion hastalıkları olmak üzere iki ana başlık altında incelenecektir. Prion hastalıklarının nedenlerinin özellikle moleküler düzeyde anlaşılması, prion hastalıklarının tedavisi için mevcut yöntemlerin iyileştirilmesine, ve yeni yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

4.1 İnsan Prion Hastalıkları

İnsan prion hastalıklarına ait ilk vaka 1920'li yıllarda bildirilmiştir (Aguzzi et al., 2009). Creutzfeldt-Jakob hastalığı (İng. Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) olarak isimlendirilen bu hastalığın yanı sıra, Gerstmann-Straussler syndrome (GSS), ölümcül ailesel uykusuzluk (İng. fatal familial insomnia; FFI), ve kuru insanlarda görülen diğer prion hastalıklarını oluşturur.

4.1.1 Creutzfeldt-Jakob Hastalığı (CJD)

İlk olarak nedeni bilinmeyen (sporadic) bir hastalık olarak tarif edilen Creutzfeldt-Jakob hastalığı, görülme sıklığı oldukça düşük olan (yılda $\sim 1/1,000,000$) bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın ana belirtisi bilişsel işlevlerde ani bir düşüş ve bunun sonucunda ortaya çıkan bunama (İng. dementia) durumu olup; bu belirtiyeye ataxia ve myoclonus eşlik edebilir. sCJD'nin ortaya çıkmasında somatik düzeyde *PRNP* geninde meydana gelebilecek mutasyonların ve farkedilmeyen enfeksiyonların (Aguzzi & Glatzel, 2006) rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Bunların dışında, uzun dönemde PrP^C'nin PrP^{Sc}'ye dönüşerek kümeler oluşturması sonucunda sCJD'nin oluşabileceği iddia edilmiştir. Öne sürülen bu olası senaryolardan henüz hiç birisi kanıtlanmamış olup, sCJD'nin kesin neden(ler)i bilinmemektedir.

1980'lerin başlarında sığır süngerimsi ensefalopatisi'nin (İng. Bovine spongiform encephalopathy; BSE) ortaya çıkması ile birlikte, bu yeni prion hastalığının insanlara bulaşabileceği ve Creutzfeldt-Jakob hastalığı'nın yeni bir şekline (İng. "variant" CJD; vCJD) neden olabileceği ileri sürülmüştür. Türler arası böyle bir geçiş deneysel olarak kanıtlanamamışsa da, mevcut veriler BSE'nin insanlara vCJD şeklinde aktarıldığına işaret etmektedir (Aguzzi, 1996; Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997). 2009 yılına kadar olan süre göz önüne alındığında, vCJD'nin dünya genelinde yaklaşık 200 insanın hayatını kaybetmesine neden olduğu bildirilmektedir (Aguzzi et al., 2009).

4.1.2 Ölümcül Ailesel Uykusuzluk (FFI)

İlk olarak 1986'da görülen bir hastalık olan ölümcül ailesel uykusuzluk (İng. Fatal familial insomnia; FFI), 1992 yılında prion proteini geni üzerindeki D178N mutasyonunun ortaya çıkarılması (Medori et al., 1992; Aguzzi et al.'den, 2009) ve hastalığın farelere deneysel olarak aktarılması (Tateishi et al., 1995; Aguzzi et al.'den, 2009) genetik bir tür prion hastalığı olarak tanımlanmıştır.

Çoğunlukla thalamus'u etkileyen FFI, normal uyku-uyanıklık döngüsünün bozulması, dikkat dağınıklığı, sempatik sinir sisteminin aşırı çalışması gibi belirtilerle tanımlanır (Collins et al., 2001; Aguzzi et al.'den, 2009). Bazı vakalarda, 129. kodon üzerindeki bir polimorfizmin FFI ile ilişkili olduğu belirlenmişse de (Goldfarb et al., 1992; Aguzzi et al.'den, 2009), farklı çalışmalar bu durumun bir kesinlik taşımadığına işaret etmektedir (Zarranz et al., 2005; Aguzzi et al.'den, 2009).

4.1.3 Gerstmann-Straussler Hastalığı (GSS)

Gerstmann-Straussler hastalığı, ya da Gerstmann-Straussler-Scheinker hastalığı (İng. Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome; GSS) olarak bilinen hastalığa ait ilk kayıtlar 1930'lara dayanmaktadır (Gerstmann, 1928; Gerstmann et al., 1936). GSD'nin bir prion hastalığı olarak tanımlanması ise ancak 1980'lerde, GSS'li hastalardan alınan beyin dokusu örneklerinin primat türlerine aktarımı sonucu süngerimsi ensefalopati'nin gözlenmesi sonucu mümkün olmuştur (Aguzzi et al., 2009). Her ne kadar GSS'nin bulaşıcı bir hastalık olduğuna dair bulgular varsa da (Hsiao et al., 1989; Tateishi et al., 1988), hastalığa neden olan mutasyonların niteliğinin hastalığın bulaşıcılığını belirlediği düşünülmektedir. GSS'de belirlenen mutasyonlar ve bu mutasyonların gen yapısı üzerinde yer aldığı bölgeler Şekil 2.1 üzerinde belirtilmiştir.

4.2 Hayvan Prion Hastalıkları

Hayvanlarda görülen prion hastalıklarının en önemlileri arasında koyunlarda görülen scrapie; ve sığırlarda görülen sığır süngerimsi ensefalopatisi (İng. Bovine spongiform encephalopathy; BSE) yer almaktadır.

4.2.1 Scrapie

Özellikle koyunları ve keçileri etkileyen bir nörodejeneratif hastalık olan scrapie, bulaşıcı süngerimsi ensefalopatiler (İng. Transmissible spongiform encephalopathies; TSEs) olarak bilinen hastalıklardan birisidir. Prion proteininin pathogenic şekli olan PrP^{Sc}'nin hastalık etkeni olduğu düşünülmektedir. Hastalığın ilk belirtilerini huydaki ve davranışlardaki değişiklik oluşturmaktadır. Sabit nesnelere sürtünme, dengede bozukluk, kilo kaybı, ön ve arka üyeleri ısırma

davranışı hastalığın diğer belirtilerini oluşturur. Bütün bu etkilerin ortaya çıkması, hastalık etkeninin canlıya bulaşmasından sonra oldukça uzun (2 yıldan 5 yıla kadar değişen) sürebilir.

Prion proteinini kodlayan gen olan *PRNP* üzerinde yer alan 136., 154. ve 171. kodonlardaki farklılıklar sonucu oluşacak amino asit düzeyindeki değişimlerin, koyunların scrapie hastalığına yatkınlık derecesini belirlediği ortaya konulmuştur (Goldmann et al., 1994; Westaway et al., 1994; Tranulis et al., 1999). 136. kodon alanine (A) ya da valine (V) amino asitlerini; 154. kodon arginine (R) ya da histidine (H); 171. kodon ise glutamine (Q) ya da arginine (R) amino asitlerini kodlayabilir (Çizelge 4.2). Dolayısıyla *PRNP* geni için 27 olası genotipten söz etmek mümkündür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *PRNP* genine ait 136., 154. ve 171. kodonlar için olası genotipler ve bu genotiplerin scrapie'ye yatkınlık/direnç ile ilişkisi (Cornell Sheep Program, 2010).

Kodonlar			Belirlenen scrapie direnç indeksi ^a
136	154	171	
AA	RR	QQ	3
AA	RR	QR	9
AA	RR	RR	13
AA	RH	QQ	3
AA	RH	QR	9
AA	RH	RR	13
AA	HH	QQ	3
AA	HH	QR	9
AA	HH	RR	13
AV	RR	QQ	1
AV	RR	QR	7
AV	RR	RR	11
AV	RH	QQ	1
AV	RH	QR	7
AV	RH	RR	11
AV	HH	QQ	1
AV	HH	QR	7

AV	HH	RR	11
VV	RR	QQ	0
VV	RR	QR	6
VV	RR	RR	10
VV	RH	QQ	0
VV	RH	QR	6
VV	RH	RR	10
VV	HH	QQ	0
VV	HH	QR	6
VV	HH	RR	10

^aIndex, her bir kodon için belirlenmiş değerin toplamını ifade eder.: 136. kodon: AA=3, AV=1, VV=0; 154. kodon: RR=RH=HH=0; 171. kodon: RR=10, RQ=6, QQ=0. Rakamsal olarak büyük değerler scrapie'ye daha yüksek bir direnç seviyesini belirtmektedir.

Çizelge 4.2 *PRNP* geni üzerinde yer alan üç önemli polimorfizm (Hunter et al., 1997'den alınmıştır).

Kodon	Olası amino asitler	Tek-harf sembolü
136	Valine	V ₁₃₆
	Alanine	A ₁₃₆
154	Arginine	R ₁₅₄
	Histidine	H ₁₅₄
171	Arginine	R ₁₇₁
	Glutamine	Q ₁₇₁

4.2.2 Sığır Süngerimsi Ensefalopati (BSE)

Sığır süngerimsi ensefalopati (İng. Bovine spongiform encephalopathy; BSE) ya da halk arasında bilinen ismiyle “deli dana hastalığı” (İng. mad cow disease), sığırlarda görülen, beyin ve omuriliğin süngerimsi dejenerasyonuna neden olan ve istisnasız ölümle sonuçlanan nörodejeneratif bir hastalıktır. İngiltere’de yapılan çalışmalar ışığında bu epizootiğin normalde herbivor olan sığırların, et ve kemikten oluşan hayvan artıkları ile beslenmesi sonucu hızlı bir şekilde yayıldığı ortaya konulduysa da, hastalığın ilk olarak nasıl ortaya çıktığı hala belirsizliğini korumaktadır.

Hastalığın moleküler temelinde, hücrel prion proteininin patojenik şekline dönüşmesi yatmaktadır. Bu dönüşüm *PRNP* gen yapısında meydana gelecek mutasyonlar nedeniyle gerçekleşebileceği gibi, protein katlanmasında kendiliğinden ortaya çıkabilecek bozukluklar sonucunda da ortaya çıkabilir. Richt ve Hall tarafından sığırlar üzerinde yapılan çalışmalarda, sığır *PRNP* geninde belirlenen E211K mutasyonunun BSE ile ilişkili olduğu ve bu mutasyonun gCJD ile ilişkili E200K ile benzerlik gösterdiği keşfedilmiştir (Richt & Hall, 2008).

4.2.3 Hayvanlarda Görülen Diğer Prion Hastalıkları

Scrapie ve sığır süngerimsi ensefalopatisinin yanı sıra, çeşitli geyik türlerinde görülen kronik tükenme hastalığı (İng. chronic wasting disease; CWD) ve kedilerde görülen kedi süngerimsi ensefalopatisi (İng. feline spongiform encephalopathy; FSE) hayvanlarda görülen diğer prion hastalıkları arasında yer alır.

4.3 Prion Hastalıklarının Tedavisi

Bilinen bütün prion hastalıkları istisnasız bir şekilde ölümle sonuçlanmaktadır ve bu hastalıkların tedavisi için henüz etkili bir yöntem geliştirilememiştir. Prion hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan belki de en temel sorun, hastalığın belirtilerinin görülmeye başladığı ana kadar beyin dokusunun çok fazla hasara uğramış olmasıdır. Belirtilerin böylesine geç görüldüğü bir hastalığı tedavi edebilmek pratikte çok zor olduğu için, şu ana kadar denenilen yöntemler ancak hastalığın gelişimini yavaşlatmayı amaçlamaktadır.

Hastalıkların aşamalı bir şekilde izlenebilmesi için oldukça yararlı araçlar olan biyobelirteçler (İng. biomarker), prion hastalıklarının erken teşhisi için oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Prion hastalıklarıyla ilişki biyobelirteçler üzerine çalışmalar yaklaşık 20 yıl öncesine dayanmaktadır (Huzarewich et al., 2010). Tau proteini ve 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi, sıklıkla kullanılan ve

kesinlik/doğruluk düzeyi oldukça yüksek olan iki biyobelirteçtir (Green et al., 2001).

Prion hastalıklarının ortak özelliklerinin temelinde PrP^C'nin pathogenic şekli olan PrP^{Sc}'nin beyin dokusu başta olmak üzere hastalıkla ilişkili diğer dokularda birikmesi yer almaktadır. Dolayısıyla, i) PrP^C ii) PrP^C-PrP^{Sc} dönüşümü ve iii) PrP^{Sc} prion hastalıklarının tedavisi için olası üç hedeftir. *In vitro* ve *in vivo* deneysel prion modellerinde yapılan çalışmalarda prion hastalıklarının tedavisi için çeşitli yöntemler denenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Prion hastalıklarının tedavisi için denen yöntemlerin sınıflandırılması
(Trevitt & Collinge'den değiştirilmiştir, 2006).

Yaklaşım/Hedef	Kullanılan Yöntem	Örnekler
Çeşitli Bileşikler	Polysulphated polyanionic bileşikler	HPA-23, DS, PPS, heparan sulphate ve analogları
	Polyamine bileşikler	Dendritic polyamine'ler, polysaccharide-oligoamine bileşikleri
	Tetrapyrrole bileşikler	Phthalocyanine'ler, porphyrin'ler
	Tetracyclic bileşikler	IDX, tetracycline, doxycycline
	Tricyclic bileşikler	Acridine'ler, phenothiazine'ler
	Peptide'ler	β -yaprak kırıcı peptide'ler
Tarama Sonucunda Keşfedilen Maddeler	Hücre kültürü taramaları	Çeşitli yeni bileşikler
	<i>In vitro</i> taramalar	Çeşitli yeni bileşikler
Bağışıklık Sistemini Hedef Alan Yöntemler	Antikorlar	Monoclonal, polyclonal, scFv'ler
	Aktif / pasif bağışıklık kazandırma	
	Bağışıklık sistemi uyarımı/baskılama	CpG, interferon; NSAID'ler, steroidler
PrP^C'yi Hedef Alan Yöntemler	RNAi yöntemi ile PrP ^C 'nin susturulması (knock-out)	
Diğer Yaklaşımlar	PrP-dimer'lerinin transgenic olarak ifade edilmesi	
	RNA aptamer'leri	
	Antiviral maddeler	
	Bakır-aracılığı ile müdahale	Bakır chelator'leri, bakır
	Çeşitli bileşikler	DMSO, curcumin, statin'ler

PrP^C ifadesinin transgene aracılığı ile susturulması hayvan prion hastalıkları için bir çözüm olasılığı taşısa da, yöntemin insanlarda şu aşamada uygulanması mümkün değildir (Whilte & Malucci, 2009). Dolayısıyla, PrP^C ifadesini susturmak için dışarıdan bir müdahale yöntemi geliştirmek gereklidir. RNA interference (RNAi) yönteminin keşfedilmesiyle birlikte, bu yöntemin prion hastalıklarının *in vivo* tedavisi için kullanılması popülerlik kazanmıştır.

Gen ifadesinin transkripsiyon sonrası susturulmasında görev alan doğal bir yöntem olan RNAi, bir çok canlının metabolizmasında aktif olarak görev yapmaktadır. Hücre içerisindeki RNAi mekanizması hem hücrenin kendisinde bulunan microRNA genlerinin ifadesi ile, hem de hücreye dışarıdan çift zincirli RNA moleküllerinin girişi ile tetiklenebilir. RNA moleküllerinin parçalanmasında görev alan Dicer enzimi uzun, çift zincirli RNA moleküllerini yaklaşık 20 nucleotide uzunluktaki, small interfering RNA'lara (siRNA) ayırır. siRNA ve microRNA molekülleri, RNA-induced silencing complex (RISC) yapısına katılır ve kendi dizilerine eş özellik gösteren hedef mRNA moleküllerine bağlanarak, onların parçalanmasına, kararsızlığına ya da okunmasının engellenmesine neden olur (Winter et al., 2009).

Golding ve arkadaşlarının keçi ve sığırlarda yaptığı çalışmalarda, PrP^C ifadesi embriyonik düzeyde lentivirus aracılığı ile verilen small hairpin RNA'lar (shRNA) aracılığı ile susturulmuştur (Golding et al., 2006). Gelecekte bu yöntem ile PrP^C ifadesi göstermeyen, dolayısıyla da prion hastalıklarına karşı dirençli hayvan ırklarının üretilmesi ve geliştirilmesi mümkün olabilir.

5. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.1 Koyun Kanından Genomik DNA Elde Edilmesi

10 adet koç ve 10 adet koyundan 2 ml'lik EDTA'lı tüplere kan alınmıştır. Alınan kan örneklerinden, QIAamp Mini DNA Isolation Kit (QIAGEN) kullanılarak, belirtilen DNA izolasyon işlemine uygun şekilde genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar, son hacim 50 µl olacak şekilde ultrasaf su (HyClone) içerisinde çözülmüş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların kalitesini belirlemek için örnekler agarose gel electrophoresis yöntemiyle incelenmiştir. Bunun için hazırlanan % 0.8'lik agarose gel, 1X LB (10 mM lithium borate, pH 8.5) tampon çözeltisi içerisinde 200 V'da 30 dakika boyunca yürütülmüştür.

5.2 Koyun *PRND* Gen Dizisinin İncelenmesi

National Center for Biotechnology Information'a (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ait veritabanları kullanılarak koyun (*Ovis aries*) *PRND* gen dizisi bulunmuştur (Accession Number: AF394223.1). Hem NCBI veritabanı, hem de çeşitli yazılımlar (Sequence Scanner, MEGA5) kullanılarak *PRND* gen dizisi incelenmiştir (Şekil 5.1).

5.3 Primer Tasarımı

Bu çalışmada, koyun *PRND* genine ait exon ve promoter bölgeleri ve bu bölgelerin etrafında kalan bölgelerin (flanking regions) Polymerase Chain Reaction (PCR) yöntemi ile çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu iki bölgeyi özgül olarak çoğaltabilmek için gereken iki farklı primer çifti, NCBI veritabanına ait Primer/BLAST aracı kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 Tasarlanan primer çiftleri ve özellikleri. Primerlerin *PRND* gen dizisi üzerinde nereye bağlandığı Şekil 5.1'de gösterilmiştir.

Gen	Primer	Dizi	Ürün uzunluğu
<i>PRND</i> exon 2	Forward	ACACACAGGAGGGGACATGGGA	1166 bç
	Reverse	TGGCCATCGGCATCAATCATTTTCG	
<i>PRND</i> promoter	Forward	CACATTCAGGAAGAGTGATGTACCCC	1184 bç
	Reverse	AGCAGAGCCTGCTTAGATGGTCTT	

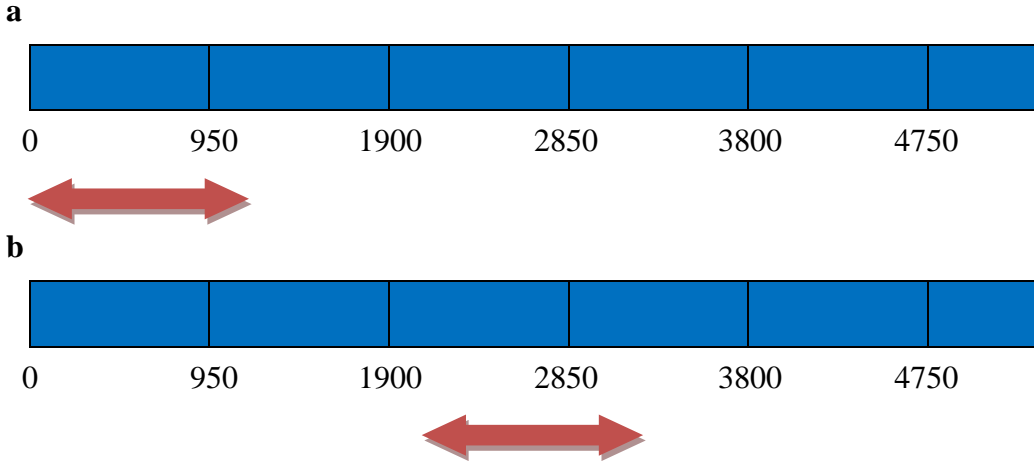
Şekil 5.1

Koyun (*Ovis aries*) *PRND* geninin FASTA formatında gösterimi. Exon 1 ve 2 dahil olmak üzere tüm kodlayan diziyi (cds) içermektedir (AF394223.1; EntrezGene).

```
GAATT CACATTCAGGAAGAGTGATGTACCCACACTCCACGGGAATGTGCTTCCACACTCTTGTGCTGGAAACCTTCTAGG
CATGCCCTGTGTACCTCTTCATCTAGCTGTTTCATTTATATCCTCCTTAATCAAACAGAAATAGTAAGTTTAAATATTTTTTA
ATAAATAAGATAAAATTAAGTCACCTCTCAAGTCTTCTGGCCTTTTACCAAGTCTTCACATGGTGTATTATGGTGTATTATTA
GTAAAGAGTAATGAAAGGGCCATCTGTCTCAAGGCAAAGAAGGACTTTGGAACCCCTGATTGGTCTGCCAGAGGAAAGGCTC
CCATATTTGGAAAGCAGCAGGAATGCACCTCCCCCTGCAGCTCCTACATAGCTAGGCAGGTCCAGGAGTATGTGCAGAAGG
TGCACAAGAGGACAGTGTGCCGTGGCTCCAGAGGTGCGTCAGAGAGATCCTAAGGTATGTGGGGAGCAGAGTTTATGTGTG
ATAACCATTTCTGTGGCCAGGGCTGTTCAATTTTTAATACCCTACAACCATGCAGTATTCTTGAATCTCACCTCCTGGG
ATGGGTCCCAAGTCTGGGGACACTTGAGAGAAGATTCAAACATCACTGGAGTTCCTGTCTATGTTTTGGTGTCTAATAAAA
TGCTAGCTTAAGGGTTGGCTGGTTAGGATTTTCTTTTGTCTTTAAGCCTTTGCCTCTGAAGACTAATCTATTTCTCAAGGTC
TCTATGCTTTTTATTTTTAATTTGATGCATGCATAAATTTATGTATTATTTCTTATTTAAAGCTGTCTGAGCTCACTGTGAT
TGGTGGGCAATGATGAATGGGATGTGGAAGGCTAGGTGCTCAGGCTGCTGCCGGCACACTCATGCCACCCGTGGGCCAGT
AGATCACCATCTGAATGGTGAATTTTCTGCATAAGAAGCTGTGTCCACTAGAGTTGAATATTTTGACCAAAGAAGTACCAATCA
TTTTAAGGAATTTCTGCAGGAGGTATCTTAGGGCTTAAGCAAGATAAACTTGTCAACCTCCTTCACTCTGGCCTGGTGA
CTCAGGAAATCTCCTAGAGACCATCTAAGCAGGCTGTGCTATTGTAACCTCTGTGTATTCTGTATCCATGGACAAGG
TCCAGGTGCTGAATATCCTGAATATTTGACCTTAAGAGATGGAGTTCCACAATAGTATGTAGTTTTGACCAACCTGTTG
ACTAACCAGACTGGGGCCCTAAGGAGGAGGATATTTCTGAGGTTCATCAGCAGTCTTTTCAAGTGTCTTGGGGCCAGA
TTGACTCTTGGTCTTCCCAAGCCCTCTGTCTTCTCTTATTTTCAATTTCTCTGAAATTTCTCACAGGCTCTGTCTGTTC
ACTTAACTGAGGGGCCATCAGAGCTGTATTCACTTAACTCATGCCAGTACTCAAAGACCACCTCCCTTCCAGCAGCTC
AAAAGGTGATGGGACATGGCCCTTGGGTACCCTGGGAGGCAAGAACTTGGTTTTGACTTAAACCTATGCAGACCAAGCCTGGG
TTGTGTGGCCTCAGGAAAATTACTTAACTTCTGAAACCAATACAACCTTTATAAAGTGAAGATAAACAATATCTACCCCAT
GTGAGAATTAAGTTAGGCAATGTGCAGCAGTGGCATGTATGTGCAATAAGAAGCTGGTTGAGGGAGGAGGGTGGGACCCCA
CTCTCCCAGGATGTGATTAGAAAAGATATCCATGAATAATCAAATTCCTGTGCAACTTCTGATCTGTCTGAGAAAACCA
AGATCACCATCTGAATGGTGAATTTTGGTTCAGGCCAGAGCAAGAACTTGGTTTTGACTTAAACCTATGCAGACCAAGCCTGGG
AAAACAGTTATGTTTTCAGGAAAATGTAAGGTGCAAGAATGACATTCCTCTCAAAGAGTCTTCTACACACAGGAGGGGAC
ATGGGAGACTCAGAACCTCCACTGAGGAAGTTAACTGTCCAGCCTTTTTCTGTTGCAGATTCGGACACAATGAGGAAACATCT
GGTGGATGTGGTTGGCCATTTGTCTGTCTGTCTTTAGCCAACCTCTCCTCAGTCAAGGCAGAGGCATAAAGCAGACA
ATCAAGTGGAAACCGGAAGGCTTTGCCAAGTACCTCCCAGTCCAGGAGGCCCACACTGCGGAAATCCGGGGCCCTTCA
TCAAGCAAAGGCCGAAAGCTGGATATCAACTTTGGAGTGGAGGGCAATAGGTACTATGAGGCCAACTATTGGCAGTTTCTGA
CGGCATCCATTACAACGGCTGTCCGAGGCCAATGTCACCAAGGAAAAGTTTGTACCAGCTGCATTAATGCCACCCAGGTG
GCAAAATCAAGAGGAAGTGTCCCGTGAGAAAACAAGCAACAAGCTTTACCAGCGGGTCTGTGGCAGCTGATCAGGGAGCTCT
GCTCCATCAAGCACTGTGACTTTGGTTGTAATTTGGTTCAGGAGGAGGAGGAGGACTTCAAGTCACTCTGGACCAAGCCATGATCTCGCCT
GCTGGTTTTCAATTTGGTTTATTGTGAATAAGCTTGCAGGCAAGTTGGCAGCCACAGAGATCAATAGGCAAGCAAAACCATAA
GCAAGTTATTCAGTCTTCTCCTCTAACCCCAACCCACAGTGTCTGAAGTACCAAGAAGAGTGTGATTGATTTCTTTA
CGCTTGAAATAGCACTCCCAAGTATTCATTCAGGTGTTTGTATTATTTGATAAATGTGTGGGTATCAATCCTCCTCCAGGT
TCTACCTAAAGTGGCTGTTCATCATTGCATTTCAACTCTGTTGTAGCATACTGGCCACCAATATTGCAATAAATGATTTT
GGTAAGCAGATAAAAAGATGTGCCAGGACCATACCAAGCACTTCCACAATGCTTCTCAGCAACTCTCAGAGGTAGGTGTAAT
AAGTGTATTCTCTTGGTATAGATGAGAAAATTGAGGCTCCAAGAAGTAAAATAGTAAAGTAGTTAGAAAAGTATCAGCCATA
ATTCACCCCTGGCTTATCTAACCCAGATTCCTGCTCTGTACATTTCTACTTTTGGAAATACGAAATGATTGATGCCGATGGC
CACAATTTTGTAACTTATTACATGGAAGTTAATAGTTTAAATTAAGTAAGATAAATGAAGGAATTAAGCTAAAATATAA
ATAAATCTAGACAAATGTCCATATTGGCTAGTAAGGAAGTATTACCAGCTTGTATTCCTGGAGTAGTCTAGATCTATGGCAT
AAAGATGTTTTTTCACAAGAAGTATAAGTATTTGCTACTCGCATCTCTGAAGTAGTTAATGATTTAAGAACAATTTCTAA
ATGATAAATTTCTTTCTAATGTTCTCCAACCGTGTGTGCATGTTTTTAGGTATACATGCATACAAGCATCTTTAAATATA
TTCCCTTATACAGGTGCTCCATACAATCTCCAGTCACTTTTACTGTACTTTGGTGGAGGGCCATATTTCCATGAACC
ACTTACAGCTTCAAAAACACAATTCCTCAGTAGAAAGGTTAAAATAAATAATATATTTAAGAAGATCAATTAATGATTTCA
TACATGCCCTAATTAAGAATTATCATTAGTTAAACTACATTTATATTACAAAATATCAATACAGTTTAAATAAAAATAATGA
ATCTAATACTCTAAAAGATGCCCCAGAGGCTCTGTGAGGATATGCTCAGAGTACCCAGCCCCACCCTCAGGAGTTGTTGA
ACCATATTTGGTGATAAAAAGTTGCTGAGTATTATCAATGCTGTGTTGGTGAATAAATGTGCATTTGTGATGATTTTATC
CAAAGTATTTTTAAAATGTGAGTGTGATAAATGGTACCTTTGTTCTGAACCTCCACTGCTAATCAGTGTCTTCTCAAGGAT
ACAGTTGGAAGGTTTTTATATAGAAAGCCAGTGTCTTTCTCATTTCATTAATAGTTCAGAAACCCAGATTTAAGTGGTGT
GTAGTGAATTGGTATATAGTGAATTAATGTCAAATTTATTTGGAACCTTTAAATGATTCCATATTTATTTGAACATCCT
TGCTCATGTTTATGAATATGAGATCCAGTCAAGGCTTTGTGAGTCTAGTTTTCACTTAAACAAAGGTTGGTCAAGTGCCCT
ACTATGTATAAGACATTTGTGAAGGATTTCTGAAATTTATTTGGATGGAGTCAATTTAAAGTGAATAATTTCAACCAACCATG
ATTTCTGTCTCTTCTAAGCATTCAATTTAAAATATGTTTATTTGTAATAAATGGCACTAAAATTAACAAGAAATCCAAAACC
AAACACTGCCACAGTTCAGCATCTGATTTGTCAAGTGTCTCATTTTGCCTATAACCTCCTGGTCTTACCATTGTGCATAT
ACAAATGTACATATTTGCAATAAATAATTAAGTGCATATATATTTCAAATTTTGTCAACTTTGTCTATGCTTTTTTCT
ATTTTTCTATGATTTAGGGGTTCTTGCCTCTGCTGCCCTCCCCAACCCACTCTCCTTCTGAGTGTAGTGCAGCCCATG
```

Şekil 5.2 Primerlerin *PRND* gen dizisi üzerinde bağlandığı bölgeler.

a) Promoter bölgesini çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri, *PRND* gen dizisi üzerinde 6. ve 1189. bazlar arasındaki bölgeyi çoğaltmaktadır. b) Exon 2'yi çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri, *PRND* gen dizisi üzerinde 2035. ve 3200. bazlar arasındaki bölgeyi çoğaltmaktadır.



5.4 Koyun *PRND* Geninin PCR ile Çoğaltılması

Koyun *PRND* genine ait exon 2 ve promoter bölgeleri, iki farklı PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Her iki tepkime için PCR koşulları Çizelge 5.2'de belirtilmiştir. Pipetleme hataları ve olası kontaminasyonları engellemek için her PCR öncesinde "mastermix" hazırlanmış ve eşit hacimde olacak şekilde 0.2 µl hacimli mikrotüplere dağıtılmıştır. Her bir tepkime, içerisinde 1 U DreamTaq Green Polymerase (Fermentas), 1X Reaction Buffer (Fermentas), 0.2 mM dNTP karışımı (Fermentas), 0.2 µM forward ve reverse primer (İONTEK), ve 50-100 ng DNA olacak şekilde hazırlanmış; bu karışım üzerine toplam hacmi 25 µl'ye tamamlayacak kadar ultrasaf su (HyClone) eklenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin kalitesini ve doğruluğunu belirlemek için örnekler agarose gel electrophoresis yöntemiyle incelenmiştir. Bunun için hazırlanan %1.5'lik agarose gel, 1X LB (10 mM lithium borate, pH 8.5) tampon çözeltisi içerisinde 200 V'da 30 dakika boyunca yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünleri, dizi analizine gönderilinceye kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 5.2 Kullanılan PCR koşulları.

	Exon 2	Promoter Bölgesi	
Koşul	Süre		
94 °C	2'	2'	
94 °C	1' 12''	1' 12''	30 döngü
59 °C	1' 12''	1' 12''	
72 °C	1' 12'	1' 12''	
72 °C	10'	10'	
4 °C	∞	∞	

5.5 PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

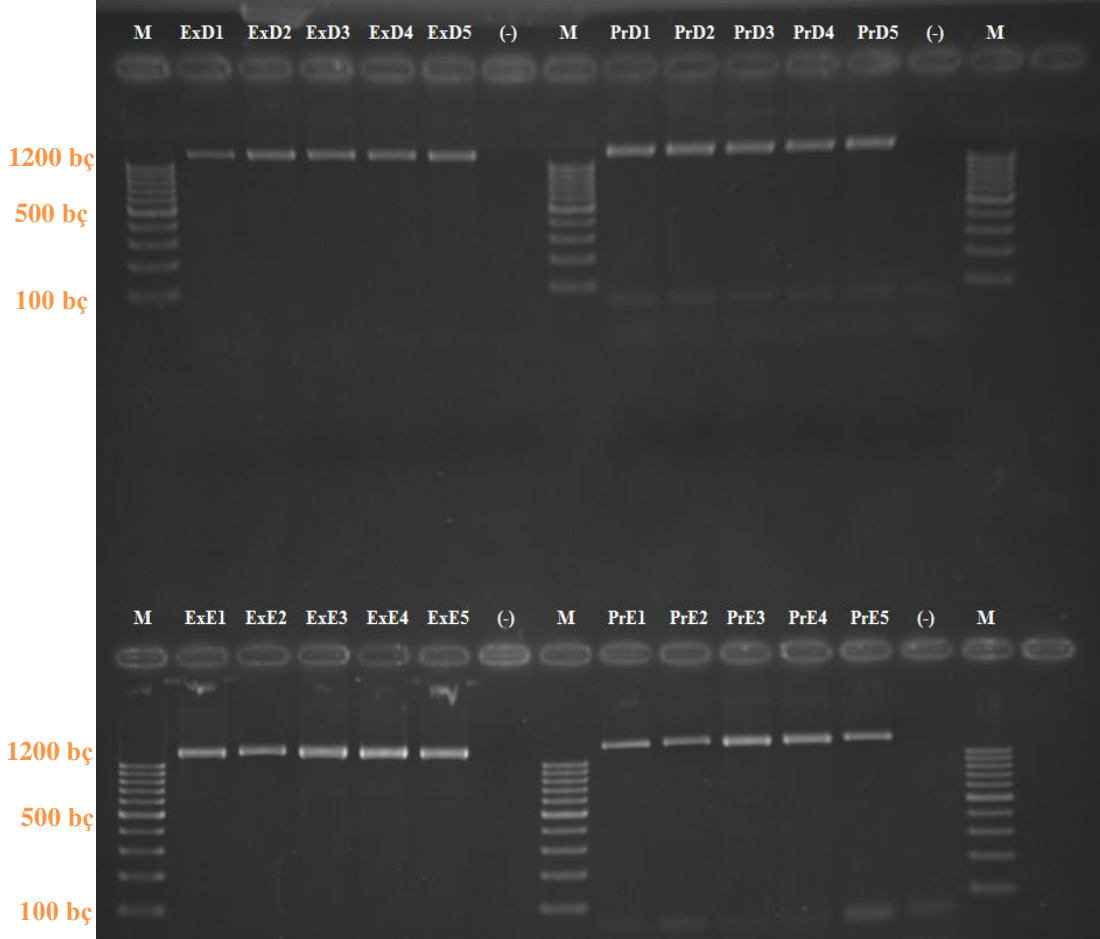
PCR ürünlerinin dizi analizi, RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Şirketi tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi için kullanılan yöntem ile ilgili ayrıntılı bilgiye, Giriş bölümünde yer alan “Dizi analizi yöntemleri” başlığı altında ulaşılabilir.

5.6 Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması

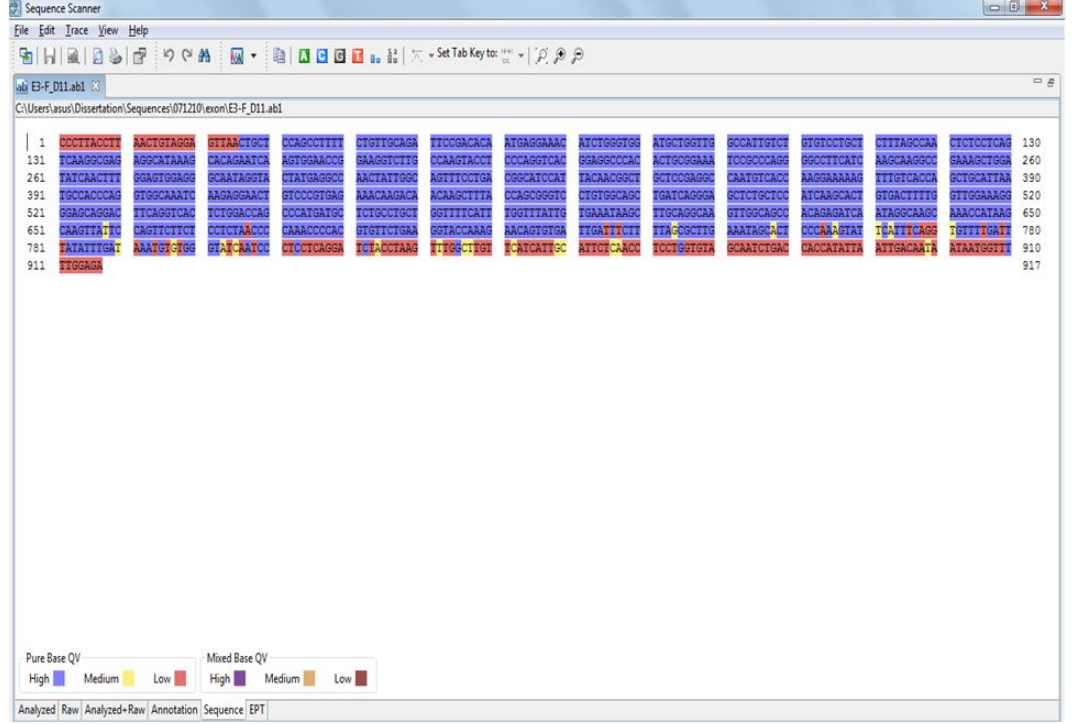
Dizi analizi sonucunda elde edilen chromatogram'lar, Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, USA) yazılımı aracılığı ile görüntülenmiş ve kontrol edilmiştir. Elde edilen diziler, novoSNP (VIB & University of Antwerp) yazılımı kullanılarak olası SNP'lerin varlığı için incelenmiştir.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Şekil 6.1 Koyun *PRND* genine ait exon ve promoter bölgelerinin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünlerinin gel görüntüsü. Ex:Exon, Pr:Promoter, D:Dişi, E:Erkek, M: 100 bp DNA marker, (-):Negatif kontrol.

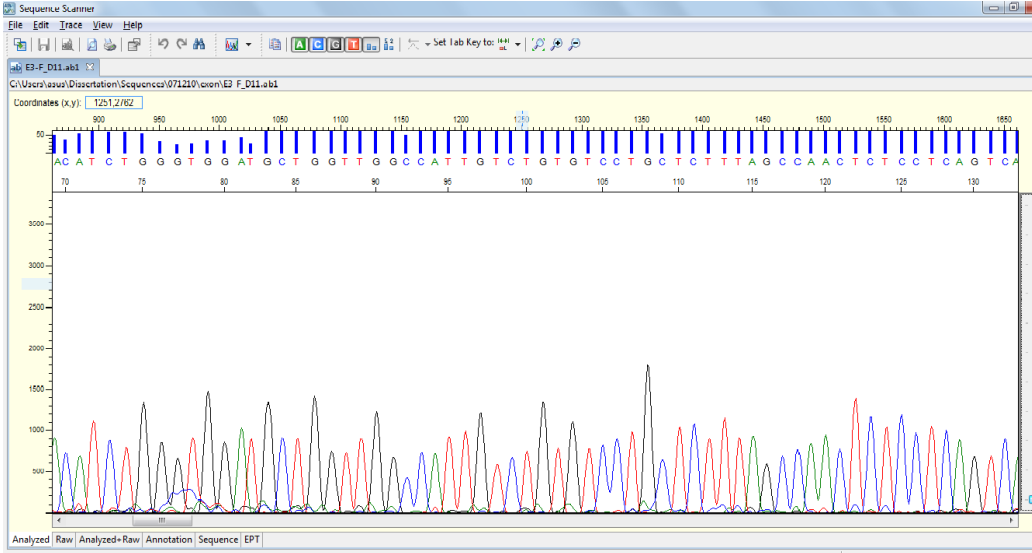


Şekil 6.2 PCR ürünlerinin dizi analizi sonuçlarının incelenmesi. Kırmızı renk düşük kaliteli (daha az güvenilir) nucleotide'leri ifade ederken, mavi renk ise yüksek kalitede nucleotide'leri ifade etmektedir.

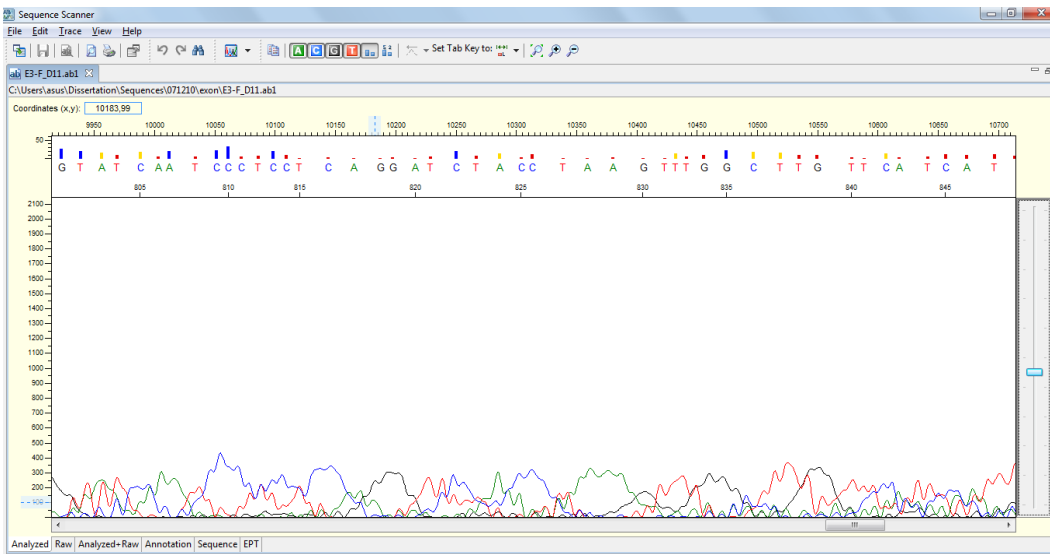


Şekil 6.3 Farklı nitelikte DNA dizilerine ait chromatogram'ların karşılaştırılması. a) Değerlendirilebilir ve iyi kalitede bir dizi analizi sonucu. b) Değerlendirilemeyecek ve kötü kalitede bir analiz sonucu.

a



b



Çizelge 6.1 Koyun *PRND* geni üzerinde bulunan tek nükleotit değişimleri.

Cinsiyet	Bölge (Promoter/Exon)	Konum (Nükleotit)	Değişim	Değişim Türü
Dişi	Exon	2196	G > A	Eş anlamlı
Dişi	Exon	2269	A > T	Eş anlamlı
Dişi	Promoter	212	A > C	-
Dişi	Promoter	214	C > A	-
Dişi	Promoter	216	A > G	-
Dişi	Promoter	217	G > T	-
Erkek	Exon	2196	G > A	Eş anlamlı
Erkek	Promoter	212	A > C	-
Erkek	Promoter	214	C > A	-
Erkek	Promoter	216	A > G	-
Erkek	Promoter	217	G > T	-

Şekil 6.4 *PRND* geni promoter bölgesinin transkripsiyon etkenleri için analizi.

a) Dişilerdeki *PRND* promoter bölgesini, b) erkeklerdeki *PRND* promoter bölgesini göstermektedir.



2000’li yılların başında ortaya çıkan ve toplumda “deli dana hastalığı” olarak bilinen sığır süngerimsi ensefalopati salgınına, hastalık taşıyan hayvanlar kullanılarak elde edilen yemlerin diğer hayvanları beslemek için kullanılmasının neden olduğu bilinmektedir. Yakın zamanda başta balıklar olmak üzere diğer canlı türlerinde de prion-benzeri proteinlerin var olduğunun belirlenmesi, prion hastalıklarının bir kez daha türler arası bir aktarıma uğrayıp uğramayacağı sorusunu beraberinde getirmektedir. Bu nedenle prion gen ailesinin ve prion proteinlerinin evrimsel süreçte nasıl şekillendiği ve değişime uğradığının açığa çıkarılması, bu hastalığın bulaşıcı doğasının moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Prion protein ailesi amino asit düzeyinde oldukça farklı olmakla birlikte, protein yapılarında korunmuş bir çok temel özellik bulunmaktadır. Bütün prion proteinleri GPI-bağına sahip olup, hücre dışında yerleşim gösterir. Ayrıca bütün prion proteinlerinde N-glikozillenme bölgeleri bulunur. Bir diğer ortak özellik ise protein yapılarında bulunan disülfid bağıdır. Doppel proteininde iki adet disülfid bağı bulunması, büyük olasılıkla bu proteinin diğer prion proteinlerine göre daha kararlı yapıda olmasına katkıda bulunur. Ayrıca, fazladan bir disülfid bağının Doppel’in PrP^C’nin patojenik dönüşümüne benzer bir dönüşüm süreci geçirmesini engellediği iddia edilebilir. Doppel’in herhangi bir prion hastalığı ile ilişkili olmaması da bu görüşü desteklemektedir. Kurbağa prion proteini hariç bilinen bütün prion proteinlerinin yapısında tekrar bölgeleri (dörtlü, altılı ya da sekizli) bulunur. Prion proteinlerinin belki de en karakteristik özelliği, protein yapılarının ortasında yer alan ve PrP^C-PrP^{Sc} dönüşümü için gerekli olan su-sevmeyen amino asit dizisidir. Bütün bu özellikler göz önüne alındığında, Doppel proteini PrPC’nin yalnızca C-ucu kısmına benzer ve yapısında tekrar bölgelerinin ve su-sevmeyen bölgenin olmaması nedeniyle diğer prion proteinlerinden ayrılır (Premzl et al., 2004).

Karşılaştırmalı genomik, gen dizilerinin incelenmesi için oldukça yararlı bir yöntemdir (Premzl & Gamulin, 2007). Lee ve arkadaşları tarafından prion gen ailesi üzerinde yapılan ilk karşılaştırmalı genomik incelemede, prion gen ailesi üyelerinin iki ya da üç exon’dan oluşan benzer bir gen düzenlenişine sahip olduğu, ve evrimsel süreçte *PRNP* genlerinde önemli miktarda transposable element birikimi gerçekleştiği bulunmuştur (Lee et al., 1998). Ayrıca, memeli *PRNP* ve *SPRN* genlerine ait promoter bölgelerinin CpG adaları içerdiği, buna karşın dokuya özgü gen ifadesi gösteren *PRND* ve *PRNT* genlerine ait promoter bölgelerinde CpG adalarının bulunmadığı ortaya çıkarılmıştır (Lee et al., 1998; Comincini et al., 2001). Bu bulgular göz önüne alındığında, epigenetik mekanizmaların prion gen ailesi üyelerinin ifadelerinde farklı göreve sahip olduğu

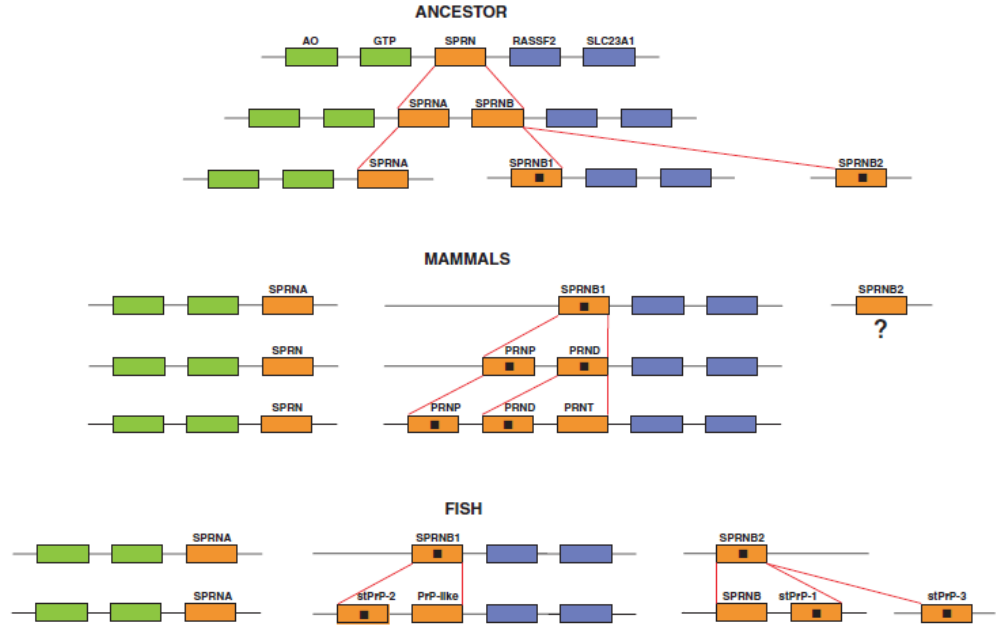
ve cinsiyete bağlı olarak farklı gen ifadesi gösteren *PRND* ve *PRNT* genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynamadığı söylenebilir.

PRNP geni ile aynı genomik bölgede bulunan ve Doppel proteinini kodlayan *PRND*'nin evrimsel süreçte *PRNP*'den eşlenerek ortaya çıktığı düşünülmektedir (Mastrangelo & Westaway, 2001). Yakın zamanda keşfedilen ve *PRNP* geninin paralogu olan *SPRN*'nin varlığı bir çok canlıda belirlenmiştir (Premzl et al., 2003). Shadoo proteinini kodlayan *SPRN* gen dizisi, evrimsel süreçte *PRNP*'ye göre daha fazla korunmuştur. Prion gen ailesinin en yeni üyesi olan *PRNT*'nin, şu ana kadar yalnızca insanlarda var olduğu (Makrinou et al., 2002) bilinmekte, elde edilen bulgular bu genin *PRND*'den eşlenerek ortaya çıktığını işaret etmektedir (Premzl et al., 2004). Yapılan diğer çalışmalar, *PRNP* ve *SPRN* genlerinin memelilerde ve balıklarda, *PRND* geninin yalnızca memelilerde, *PRNT* geninin ise yalnızca primat türlerinde var olduğuna işaret etmektedir (Premzl et al., 2004; Choi et al., 2006; Rivera-Milla et al., 2006)

Premzl ve arkadaşları tarafından memeli prion genleri üzerinde yapılan karşılaştırmalı incelemeler, *SPRN* ve *PRNP* genlerine ait birbirinden farklı özellikte genomik bölgeler olduğunu göstermektedir (Premzl et al., 2004). Elde ettikleri bulgular, *SPRN*'ye ait genomik bölgede herhangi bir transposable element'in olmadığını; buna karşılık *PRND* genini de içeren *PRNP* genomik bölgesinin ~%50 oranında transposable element içerdiğini göstermektedir (Premzl et al., 2004). Bu bulgular ışığında, beyine özgü ifadeye sahip *SPRN* gen yapısının evrimsel süreçte daha çok korunduğu, buna bağlı olarak *SPRN* gen ürününün omurgalı sinir sistemlerinde korunmuş, temel bir işleve sahip olduğu iddia edilebilir. Çeşitli omurgalı türlerine ait *PRNP* genlerinin nükleotit dizilerinin ve içeriklerinin farklı olduğunun bulunması ve *PRNP* gen düzenlenmelerindeki farklılıklar (exon/intron sayı ve yapılarındaki farklılıklar), *PRNP* genomik bölgesinin kuvvetli bir evrimsel baskıya uğramadan farklılaştığına işaret etmektedir (Premzl et al., 2004). Bütün bu sonuçlar göz önüne alınarak, prion gen ailesi üyelerinin *SPRN* geninin atasal şeklinden farklılaşarak ve eşlenerek tüvelendiği görüşü öne sürülmüştür (Premzl et al., 2004) (Şekil 6.4).

Şekil 6.6

Prion gen ailesinin evrimi için öne sürülen bir model (Premzl et al., 2004).



Dokuya özgü *PRND* gen ifadesinin nasıl düzenlendiğini ortaya çıkarmak için yapılan fare modelleri üzerinde gerçekleştirilen incelemelerde, embriyonik dönemde dorsal root ganglia ve spinal cord'da Brn-3a ve Brn-3b transkripsiyon etkenlerinin *PRND* gen ifadesinin düzenlenmesinde görev aldığı (Calissano et al., 2004) ve iki cis-acting element'in (CCAAT box ve E box) *PRND* gen ifadesi için gerekli olduğu (Nagyova et al., 2004) ortaya çıkarılmıştır. Del Vecchio ve arkadaşlarının sığır *PRND* genine ait promotor bölgesinin işlevsel haritasını ortaya çıkarmak için yaptığı çalışmalar sonucunda, promotor bölgesinde bir çok CCAAT bağlayıcı öğelerin bulunduğu keşfedilmiştir (Del Vecchio et al., 2005). Bu bağlanma bölgelerine NFY gibi aktifleştirici özellikte transkripsiyon etkenlerinin yanı sıra, CDP ve SATB1 gibi baskılayıcı transkripsiyon etkenlerinin de bağlanabilecek olmasının, *PRND* gen ifadesinin hassas bir şekilde düzenlenmesi için önemli olduğu düşünülmektedir (Del Vecchio et al., 2005). Sığır *PRND* genine ait promotor bölgesinde Genesis transkripsiyon etkeninin bağlanabileceği bir yerin var olduğunun bulunması, *PRND* gen ifadesinin Sertoli hücrelerinde neden yüksek düzeyde olduğunu açıklayabilir; keza Sertoli hücrelerinde Genesis ifadesi gerçekleşmez (Sutton et al., 1996). Yine de *PRND* gen ifadesinin düzenlenmesine ilişkin elde edilen bulgular, gen ifadesinin embriyonik dönem sonrasında neden testislerle sınırlandığını açıklayamamaktadır.

Prion gen ailesinin bir üyesi olan *PRND* geni ve kodladığı Doppel proteini üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar ışığında, yapı-işlev ilişkileri ve hastalıklarla

bağlantısı başta olmak üzere bir çok önemli bulgu elde edilmiştir. Dişi üreme sistemi için görünürde gerekli olmayan Doppel proteininin erkek üreme sisteminin sağlıklı ve doğru bir şekilde gelişimi için kilit bir göreve sahip olduğunun bulunması, ve *PRND* geni üzerindeki çeşitli polimorfizmlerin özellikle erkek hayvanlardaki üreme potansiyeli ile yüksek derecede ilişkili olması nedeniyle ekonomik değere sahip hayvan türlerinde bu genin doğru şekilde tanımlanıp incelenmesi hayvancılık için oldukça önem taşımaktadır. Başta İngiltere, Portekiz ve Amerika olmak üzere bir çok ülkedeki hayvan yetiştirme programlarında, hayvansal ürünlerin eldesinde verimin artırılması ve hayvanların hastalıklara karşı daha dirençli hale getirilmesine yönelik yetiştiricilik programlarında moleküler biyoloji ve genetik bilimlerinden yoğun bir şekilde yararlanılmaktadır. Ne yazık ki ülkemizde benzer özellikteki çalışmalardan söz etmek mümkün değildir.

Koyun *PRNP* geni üzerindeki bir çok çalışma, bu genin oldukça polimorfik bir niteliğe sahip olduğunu ortaya koymuş; özellikle 136., 154. ve 171. kodonlarda gözlenen polimorfizmlerin scrapie hastalığına yatkınlığı belirlediği kanıtlanmıştır (Baylis and Goldmann, 2004). *PRNP* ile karşılaştırıldığında, *PRND* geninin koyunlarda daha düşük seviyede polimorfik olduğu gözlenmiştir (Alvarez et al., 2006; Pereira et al., 2009). Sığırlar ve koyunlar göz önüne alındığında, *PRND* geni üzerinde belirlenen R50H ve N110H polimorfizmlerinin herhangi bir prion hastalığı ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Comincini et al., 2001); gene de 110. kodonda gözlenen bu değişim protein yapısındaki N-glikozillenme bölgesini etkileyebileceği için önemlidir. Keçilerde yapılan çalışmalarda ise *PRND* geninin sığırlara ve koyunlara kıyasla daha polimorfik olduğu belirlenmiştir (Uboldi et al., 2005; Mesquita et al., 2010).

Portekiz'de bulunan çeşitli koyun ırklarında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar i) *PRND* genine ait 26. kodonda gözlenen bir eş anlamlı polimorfizm ile üreme potansiyelinin ilişkili olduğuna (Pereira et al., 2009), ii) *PRND* genine ait 26. kodon ile *PRNP* geni üzerindeki 154. ve 171. kodonlar arasında anlamlı bir bağlantı dengesizliği (İng. linkage disequilibrium) bulunduğuna (Mesquita et al., 2010) işaret etmektedir. Ayrıca, *PRND* G allelinin *PRNP* ARR alleli ile anlamlı düzeyde bağlantılı olduğu ($D'=1.000$, $r^2=0.026$, $P=0.000$); *PRND* A allelin varlığı ise *PRNP* ARQ ve AHQ allelleri ile anlamlı düzeyde ($D'=0.488$ ve 0.189 , $r^2=0.009$ ve 0.023 , $P=0.004$ ve 0.000) ilişkili olduğu bulunmuştur (Mesquita et al., 2010). Diğer bir deyişle, *PRND* geni için homozigot nitelikte olan bireyler, scrapie'ye en dirençli grupta yer almaktadır.

Bu çalışmada, koyun *PRND* genine ait ikinci exon ve promoter bölgeleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra, dizi analizine gönderilerek olası polimorfizmler için incelenmiştir. İkinci exon'un tercih edilmesinin nedeni, Doppel proteinini kodlayan asıl bölgenin ikinci exon yapısında yer almasıdır. Promoter bölgesinin de çalışmaya dahil edilmesiyle, promoter yapısında gözlenebilecek olası değişimlerin dokuya özgü gen ifadesi üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. *PRND* geni ile ilişkili önceki çalışmalar PCR sonrası restriksiyon enzim kesimleriyle yapılan analizlerle sınırlı kalmıştır. Bu yöntem oldukça yaygın olarak kullanılmasına rağmen, polimorfizmlerin her zaman restriksiyon enzim kesim bölgelerini etkilememesi nedeniyle ilgilenilen gen yapısındaki bütün polimorfizmlerin ortaya çıkarılması amacı için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada PCR ürünlerini doğrudan dizi analizi yöntemi ile inceleyerek, daha önce bulunamayan farklılıkların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Geleneksel zincir sonlandırmasına dayalı DNA dizi analizi yöntemleri ile elde edilen sonuçların hem ilk hem de son kısımlarında yer alan nükleotit dizilerinin sağlıklı analiz sonuçları vermediği bilinmektedir (Şekil 6.3). Mümkün olan en geniş nükleotit dizisini analiz edebilmek için, kullanılan primer çiftleri koyun *PRND* genine ait promoter ve ikinci exon bölgeleri ve her iki bölgenin etrafında yer alan yaklaşık 1200 nükleotitlik bir DNA dizisini çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.

Kullanılan yöntem ile koyun *PRND* genine ait DNA dizilerinin çoğaltıldığını doğrulamak için PCR ürünlerinin dizi analizlerinden elde edilen sonuçlar nucleotide blast algoritması (blastn) kullanılarak NCBI'ye ait mevcut tüm nükleotit dizilerini içeren veritabanları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, çoğaltılan DNA dizilerinin koyun *PRND* genine ait olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 6.7).

Çalışmamızda kullanılan Türk koyun ırkları ele alındığında, elde ettiğimiz dizi analizi sonuçları *PRND* genine ait ikinci exon üzerindeki 26. ve 50. kodonlarda Pereira ve arkadaşları tarafından bildirilen değişimlerin mevcut olduğunu (Pereira et al., 2009) göstermektedir (Çizelge 6.1). Bu iki değişimin görülme sıklığı dişilerde daha yüksek olmakla birlikte, bu çalışmadaki örneklemin küçüklüğü nedeniyle istatistiksel açıdan anlamlı bir değerlendirme yapmak mümkün değildir. Bu çalışma çerçevesinde yapılan *PRND* gen analizine, *PRNP* geni dahil edilmediğinden, Pereira ve Mesquita tarafından bildirilen *PRND* ve *PRNP* allel bağlantısı (Mesquita et al., 2010; Pereira et al., 2009) doğrulanamamıştır. Gene de, *PRNP* ve *PRND* gen allelleri arasındaki bağlantı düzeyinin yüksek oluşu göz önüne alındığında Portekiz'deki koyun ırklarında

Şekil 6.7 Elde edilen dizi analizi sonuçlarının veritabanları ile karşılaştırılması.

```

gb|AF394223.1| Ovis aries doppel protein (Prnd) gene, exons 1 and 2 and complete
cds
Length=4922

GENE ID: 443194 PRND | prion protein 2 (dublet) [Ovis aries]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 1514 bits (1678), Expect = 0.0
Identities = 888/907 (98%), Gaps = 14/907 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 16 GAAGT--ACTGCTC-AGCCITTTTCTGTTGCAGATTCCGACACAATGAGGAAACATCTGGG 72
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2076 GAAGTTAACTGCTCCAGCCITTTTCTGTTGCAGATTCCGACACAATGAGGAAACATCTGGG 2135

Query 73 TGGATGCTGGTTGGCCATTGTCTGTGTCCTGCTCTTTAGCCAACTCTCCTCAGTCAAGGC 132
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2136 TGGATGCTGGTTGGCCATTGTCTGTGTCCTGCTCTTTAGCCAACTCTCCTCAGTCAAGGC 2195

Query 133 GAGAGGCATAAAGCACAGAATCAAGTGGAAACCGGAAGGTCTTGCCAAGTACCTCCCAGGT 192
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2196 GAGAGGCATAAAGCACAGAATCAAGTGGAAACCGGAAGGTCTTGCCAAGTACCTCCCAGGT 2255

Query 193 CACGGAGGCCACACTGCGGAAATCCGCCCAGGGGCCCTTCATCAAGCAAGGCCGAAAGCT 252
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2256 CACGGAGGCCACACTGCGGAAATCCGCCCAGGGGCCCTTCATCAAGCAAGGCCGAAAGCT 2315

Query 253 GGATATCAACTTTGGAGTGGAGGGCAATAGGTACTATGAGGCCAATATGGCAGTTTCC 312
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2316 GGATATCAACTTTGGAGTGGAGGGCAATAGGTACTATGAGGCCAATATGGCAGTTTCC 2375

Query 313 TGACGGCATCCATTACAACGGCTGCTCCGAGGCCAATGTCACCAAGGAAAAGTTTGTAC 372
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2376 TGACGGCATCCATTACAACGGCTGCTCCGAGGCCAATGTCACCAAGGAAAAGTTTGTAC 2435

Query 373 CAGCTGCATTAATGCCACCAGGTGGCAAATCAAGAGGAACTGTCCCGTGAGAAACAAGA 432
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2436 CAGCTGCATTAATGCCACCAGGTGGCAAATCAAGAGGAACTGTCCCGTGAGAAACAAGA 2495

Query 433 CAACAAGCTTTACCAGCGGTCTGTGGCAGCTGATCAGGGAGCTCTGCTCCATCAAGCA 492
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2496 CAACAAGCTTTACCAGCGGTCTGTGGCAGCTGATCAGGGAGCTCTGCTCCATCAAGCA 2555

Query 493 CTGTGACTTTTGGTTGGAAAGGGGAGCAGGACTTCAGGTCACTCTGGACCAGCCATGAT 552
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2556 CTGTGACTTTTGGTTGGAAAGGGGAGCAGGACTTCAGGTCACTCTGGACCAGCCATGAT 2615

Query 553 GCTCTGCCCTGCTGGTTTTTCATTTGGTTTTATTGTGAAATAAGCTTGCAGGCAAGTTGGCAG 612
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2616 GCTCTGCCCTGCTGGTTTTTCATTTGGTTTTATTGTGAAATAAGCTTGCAGGCAAGTTGGCAG 2675

Query 613 CCACAGAGATCAATAGGCAAGCAAACCATAAGC-AGTTATTCCAGTTCTTCTCCTCTAAC 671
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2676 CCACAGAGATCAATAGGCAAGCAAACCATAAGCAGTTATTCCAGTTCTTCTCCTCTAAC 2735

Query 672 CCCAAACCCACGTTGTTCTGAAGGTACCAAAGAACAGTGTGATTGATTCITTAGCGCTTG 731
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2736 CCCAAACCCACGTTGTTCTGAAGGTACCAAAGAACAGTGTGATTGATTCITTAGCGCTTG 2795

Query 732 AAATAGCACTCCCAAGTATTCATTCA-GTGTITGATTATATTTGAI-AAATGTGTGGGTAT 789
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2796 AAATAGCACTCCCAAGTATTCATTCAAGGTGTTTGATTATATTTGATAAATGTGTGGGTAT 2855

Query 790 C-AICCTCICCGGTTCTACCTAAAGT--GCT--GTCATCA-IGCA-ICICCACTIGGT 842
      |  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2856 CAATCCTCICCGGTTCTACCTAAAGTGGCTTGTTCATCATTGCATTCTCAACTCTGGT 2915

Query 843 GTAGCATCTGG-CCACCATAATTATGCAATAAATGTTTGGTAAGCAGATAAAAAGGATTGGC 901
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 2916 GTAGCATCTGGCCACCATAATTATGCAATAAATGTTTGGTAAGCAGATAAAAAGGATTGGC 2975

Query 902 CAGGGAC 908
      |||||
Sbjct 2976 CAGGGAC 2982

```

belirlenen bu bağlantının Türkiye'deki ırklar için de geçerli olabileceği iddia edilebilir.

PRND geni üzerinde şu ana kadar yapılan çalışmalar ikinci exon bölgesiyle sınırlı kalmıştır. Promoter bölgesindeki olası SNP'lerin cinsiyete bağlı farklı gen ifadesinden sorumlu olabileceği hipotezinden yola çıkarak, *PRND* genine ait promoter bölgesi ve bu bölgenin çevreleyen kısım PCR ile çoğaltılıp, dizi analizine gönderilmiştir. Promoter bölgeleri üzerinde bulunan dört adet SNP'nin her iki cinsiyette de aynı konumda olduğu bulunmuştur (Çizelge 6.1). Ayrıca promoter bölgelerine ait nükleotit dizileri cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında oldukça yüksek düzeyde bir benzerlik görülmektedir (Şekil 6.5). Promoter bölgelerine ait diziler, transkripsiyon etkenlerini bağlama özellikleri için MatInspector yazılımı ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hem *PRND* genine ait promoter bölgesini oluşturan 390 nükleotitlik kısımda, hem de bu bölgenin etrafındaki bölgelerde 200'den fazla transkripsiyon etkeni bağlama bölgesi olduğunu göstermektedir (Şekil 6.4). Olası transkripsiyon etkenleri arasında en dikkat çekici olan ve "SOX/SRY-sex/testis determining and related HMG box factors" olarak adlandırılan transkripsiyon etkeninin *PRND* promoter bölgesi üzerindeki 229. ve 253. nükleotitler arasındaki kısma bağlandığı düşünülmektedir. Bu transkripsiyon etkeninin *PRND* geninin dokuya özgül ve hatta cinsiyete özgül gen ifadesindeki farklılıklarla ilişkili olup olmadığını belirlemek için "yeast two-hybrid" gibi DNA-protein etkileşimlerini inceleyebilecek bir analiz yönteminin kullanılması yararlı olabilir.

Yakın zamanda sinir sistemi hücrelerindeki mikroRNA seviyelerindeki bozuklukların hem insan hem de hayvan prion hastalıklarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Saba et al., 2008). Bununla birlikte, mikroRNA'ların prion genlerinin ifadesini nasıl etkilediği üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Cinsiyete ve dokuya özgü *PRND* gen ifadesinde mikroRNA düzenlemesinin incelenmesi, bu genin neden ve nasıl dokuya özgü ifade gösterdiğini açıklamakta yardımcı olabilir.

7. ÖNERİLER

Avrupa Birliği'nin 2003 yılında aldığı karar doğrultusunda, çiftlik hayvanlarını scrapie'den arındırmak için çeşitli yetiştirme programları kurulmasına karar verilmiştir (EU, 2003). Bu durum, ülkemizde prion hastalıklarının moleküler düzeyde incelenmesini, çiftlik hayvanlarının prion hastalıklarına karşı direnç düzeylerinin belirlenmesini ve elde edilen sonuçlara göre gerekli yetiştiricilik programlarının oluşturulmasını gerektirmektedir. Türkiye'de prion genetiği ve hayvan prion hastalıkları üzerindeki sınırlı sayıda çalışmada, Türkiye'deki çeşitli yerel koyun ırklarında *PRNP* genotiplerinin belirlenmesi (Ün et al., 2008), Türkiye'deki sığır ırklarında *PRNP* genine ait promoter bölgesindeki polimorfizmlerin belirlenmesi (Ün et al., 2008) ve Anadolu su bufalosunda *PRNP* genine ait promoter ve intron bölgelerindeki indel polimorfizmlerin belirlenmesi (Öztabak et al., 2009) gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de *PRND* geni üzerinde yapılan bu ilk araştırma ile Türkiye'deki koyun ırklarında *PRND* geninin durumu belirlenerek, mevcut çalışmaları tamamlayıcı ve destekleyici bulgular elde edilmiştir.

Bu çalışmadaki örneklemin finansal yetersizlikler nedeniyle küçük boyutlu oluşu, çalışmanın belki de tek olumsuz yönünü oluşturmaktadır. Daha kapsamlı bir projelendirme ile, Türkiye'deki farklı bölgelerde yetiştiriciliği yapılan koyun ırklarının tamamı incelenerek *PRND* ve *PRNP* genlerinin bir arada analizi mümkün olacaktır. Üreme potansiyeli ayrıca test edilerek, genetik analizlerden elde edilecek sonuçlarla birlikte değerlendirilip, Türkiye'deki koyun ırklarının genetik yapısı, scrapie'ye karşı direnç durumu gibi hayvancılık sektörünü yakından ilgilendiren üretim değişkenleri tespit edilmesi ile Avrupa Birliği'nin çiftlik hayvanlarını scrapie'den arındırmak için aldığı karar doğrultusunda önemli adımlar atılmış olacaktır.

KAYNAK DİZİNİ

- Aguzzi, A. and Glatzel, M.**, 2006, Prion infections, blood and transfusions, *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2:321-329pp.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C.**, 1986, Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene, *Cell*, 46: 417-428pp.
- Behrens, A., Genoud, N., Naumann, H., Rüllicke, T., Janett, F., Heppner, F.L., Ledermann, B. and Aguzzi, A.**, 2002, Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility, *EMBO J*, 21:3652-3658pp.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. and Kretzschmar, H.**, 1997, The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature*, 390:684-687pp.
- Calissano, M., Ensor, E., Brown, D.R. and Latchman, D.S.**, 2004, Doppel expression is regulated by the Brn-3a and Brn-3b transcription factors, *Dev. Neurosci.*, 15:483-486pp.
- Comincini, S., Foti, M.G., Tranulis, M.A., Hills, D., Di Guardo, G., Vaccari, G., Williams, J.L., Harbitz, I. and Ferretti, L.**, 2001, Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND), *Mamm. Genome*, 12:729-733pp.
- Comincini, S., Facchetti, A., Del Vecchio, I., Peoc'h, K., Laplanche, J.L., Magrassi, L., Ceroni, M., Ferretti, L. and Nano, R.**, 2004, Differential expression of the prion-like protein doppel gene (PRND) in astrocytomas: a new molecular marker potentially involved in tumor progression, *Anticancer Res.*, 24:1507-1517pp.
- Cornell Sheep Program**, "Genetics of Scrapie Resistance in Sheep", <http://www.sheep.cornell.edu/management/health/scrapiegenetics.htm> (Erişim tarihi: 26.11.2010).
- Criado, J.R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J.L., Wills, D.N., Henriksen, S.J., Race, R., Manson, J.C., Chesebro, B. and Oldstone, M.B.**, 2005, Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons, *Neurobiol. Dis.*, 19:255-65pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Cui, T., Holme, A., Sassoon, J. and Brown, D.R.**, 2003, Analysis of doppel protein toxicity, *Mol. Cell. Neurosci.*, 23:144-155pp.
- Del Vecchio, I., Azzalin, A., Guidi, E., Amati, G., Caramori, T., Uboldi, C., Comincini, S. and Ferretti, L.**, 2005, Functional mapping of the bovine Doppel promoter region, *Gene*, 356:101-108pp.
- Edzkes, H.K., Gray, V.T. and Wickner, R.B.**, 1999, The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4):1498-1503pp.
- EU**, 2003, Commission Decision of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep. *Official Journal of the European Union*, 41:41-45pp.
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. and Ysebaert, M.**, 1976, Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene, *Nature*, 260(5551):500-507pp.
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S.**, 2001, The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein, *EMBO J.*, 20:5863-5875pp.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. and Hope, J.**, 1994, PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie, *J. General Virology*, 75:989-995pp.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.M, Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R. and Brentani, R.R.**, 2000a, Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 76:85-92pp.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Martins, V.R., Jay, D.G. and Brentani, R.R.**, 2000b, Laminin induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein, *FEBS Lett.*, 482:257-260pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Hachiya, N.S., Watanabe, K., Yamada, M., Sakasegawa, Y. and Kaneko, K.,** 2004, Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315:802-807pp.
- Hanna, G.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Martinez-Picado, J., Sutton, L., Hazelwood, J.D. and D'Aquila, R.T.,** 2000, Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7):2715-2721pp.
- Harvard Nanopore Group,** “Probing Molecules with Nanopores”, <http://mcb.harvard.edu/branton/index.htm>, (Erişim Tarihi:17.12.2010).
- Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R.,** 1998, A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease, *Science*, 279:827-834pp.
- Hegde, R.S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. and Lingappa, V.R.,** 1999, Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration, *Nature*, 402:822-826pp.
- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R. and Candy, J.M.,** 1995, Copper binding to the N terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207:621-629pp.
- Human Genome Project Information,** “SNP Fact Sheet”, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml (Erişim Tarihi:24.12.2010)
- Hunter, N.,** 1997, PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE, *Trends Microbiol.*, 5:331–334pp.
- Kong, Q., Surewicz, W.K., Petersen, R.B., Zou, W., Chen, S.G., Gambetti, P., Parchi, P., Capellari, S., Goldfarb, L., Montagna, P., Lugaresi, E., Piccardo, P. and Ghetti, B.,** 2004, “Inherited Prion Diseases”, *Prion Biology and Diseases Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 673-775pp.
- Krasemann, S., Zerr, I., Weber, T., Poser, S., Kretzschmar, H., Hunsmann, G. and Bodemer, W.,** 1995, Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 34:173-176pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Kretzschmar, H.A., Stowring, L.E., Westaway, D., Stubblebine, W.H., Prusiner, S.B. and Dearmond, S.J.**, 1986, Molecular cloning of a human prion protein cDNA, *DNA*, 5: 315–324pp.
- Lee, I.Y., Westaway, D., Smit, A.F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S.B. and Hood, L.E.**, 1998, Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species, *Genome Res.*, 8:1022-1037pp.
- Liao, Y.C., Lebo, R.V., Clawson, G.A. and Smuckler, E.A.**, 1986, Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications, *Science* 233: 364–367pp.
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R. and Keith, J.M.**, 1986, Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83:6372–6376pp.
- Luhrs, T., Riek, R., Guntert, P. and Wuthrich, K.**, NMR structure of the human doppel protein, 2003, *J. Mol. Biol.*, 326:1549-1557pp.
- Makrinou, E., Collinge, J. and Antoniou, M.**, 2002, Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus, *Mamm. Genome*, 13:696-703pp.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W.**, 1977, A new method for sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74(2):560-564pp.
- Mesquita, P., Batista, M., Marques, M.R., Santos, I.C., Pimenta, J., Silva Pereira, M., Carolino, I., Santos Silva, F., Oliveira Sousa, M.C., Gama, L.T., Fontes, C.M., Horta, A.E., Prates, J.A. and Pereira, R.M.**, 2010, Prion like doppel gene polymorphisms and scrapie susceptibility in Portuguese sheep breeds, *Anim. Genet.*, 41(3):311-314pp.
- Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M. and Fiers, W.**, 1972, Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein, *Nature*, 237(5350): 82-88pp.
- Mo, H., Moore, R.C., Cohen, F.E., Westaway, D., Prusiner, S.B., Wright, P.E. and Dyson, H.J.**, 2001, Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98:2352-2357pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Nagyova, J., Pastorek, J. and Kopacek, J.**, 2004. Identification of the critical cis-acting elements in the promoter of the mouse Prnd gene coding for Doppel protein, *Biochim. Biophys. Acta*, 1679:288-293pp.
- Oztabak, K., Ozkan, E., Soysal, I., Paya, I. and Un, C.**, 2009, Detection of prion gene promoter and intron1 indel polymorphisms in Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Anim. Breed. Genet.*, 126:463-467pp.
- Paltrinieri, S., Comazzi, S., Spagnolo, V., Rondena, M., Ponti, W. and Ceciliani, F.**, 2004, Bovine Doppel (Dpl) and prion protein (PrP) expression on lymphoid tissue and circulating leukocytes, *J. Histochem. Cytochem.*, 52:1639-1645pp.
- Paltrinieri, S., Spagnolo, V., Giordano, A., Gelmetti, D. and Comazzi, S.**, 2006, Bovine prion (PrP) and Doppel (Dpl) proteins expression after in vitro leukocyte activation or Dpl/PrP blocking, *J. Cell. Physiol.*, 208:446-450pp.
- Pereira, R.M., Mesquita, P., Batista, M., Baptista, M.C., Barbas, J.P., Pimenta, J., Santos, I.C., Marques, M.R., Vasques, M.I., Silva Pereira, M., Santos Silva, F., Oliveira Sousa, M.C., Fontes, C.M., Horta, A.E., Prates, J.A. and Marques, C.C.**, 2009, Doppel gene polymorphisms in Portuguese sheep breeds: insights on ram fertility, *Anim. Reprod. Sci.*, 114(1-3):157-166pp.
- Perkins, K.A., Lerman, C., Coddington, S., Jetton, C., Karelitz, J.L., Wilson, A., Jennings, J.R., Ferrell, R., Bergen, A.W. and Benowitz, N.L.**, 2008, Gene and gene by sex associations with initial sensitivity to nicotine in nonsmokers, *Behav Pharmacol.*, 19(5-6):630-640pp.
- Premzl, M., Sangiorgio, L., Strumbo, B., Marshall Graves, J.A., Simonic, T. and Gready, J.E.**, 2003, Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein, *Gene*, 314:89–102pp.
- Premzl, M., Gready, J.E., Jermiin, L.S., Simonic, T. and Marshall Graves, J.A.**, 2004, Evolution of vertebrate genes related to Prion and Shadoo proteins – clues from comparative genomic analysis, *Mol Biol Evol.*, 21:2210-2231pp.
- Premzl, M. and Gamulin, V.**, 2007, Comparative genomic analysis of prion genes, *BMC Genomics*, 8:1.
- Prusiner, S.B. and Scott, M.R.**, 1997, Genetics of prions, *Annu. Rev. Genet.*, 31:139–175pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Qin, K., Zhao, L., Tang, Y., Bhatta, S., Simard, J.M. and Zhao, R.Y.**, 2006, Doppel-induced apoptosis and counteraction by cellular prion protein in neuroblastoma and astrocytes, *Neuroscience*, 141:1375-1388pp.
- Richt, J.A. and Hall, S.M.**, 2008, BSE case associated with prion protein gene mutation, *PLoS*, 4(9):e1000156.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I. and Weiss, S.**, 1997, The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells, *Nat. Med*, 3:1383–1388pp.
- Rivera-Milla, E., Oidtmann, B., Panagiotidis, C.H., Baier, M., Sklaviadis, T., Hoffmann R., Zhou, Y., Solis, G.P., Stuermer, C.A. and Malaga-Trillo, E.**, 2006, Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *FASEB J.*, 20:317-319pp.
- Rommelse, N.N.J., Altink, M.E., Arias-Vasquez, A., Buschgens, C.J.M, Fliers, E., Faraone, S.V., Buitelaar, J.K, Sergeant, J.A., Oosterlaan, J. and Franke, B.**, 2008, Differential association between MAOA, ADHD and neuropsychological functioning in boys and girls, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 147B(8):1524-1530pp.
- Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P.**, 1998, A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science*, 281(5375):363-365pp.
- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M.A., Rulicke, T., Aguzzi, A. and Weissmann, C.**, 2001, Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain, *EMBO J.*, 20:694–702pp.
- Saba, R., Goodman, C.D., Huzarewich, R.L., Robertson, C. and Booth, S.A.**, 2008, A miRNA signature of prion induced neurodegeneration, *PLoS One*, e:3652pp.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. and Noda, T.**, 1996, Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene, *Nature*, 380:528–531pp.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.**, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12):5463-5467pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Schuurhof, A., Bont, L., Siezen, C.L.E, Hodemaekers, H., van Houwelingen, H.C., Kimman, T.G., Hoebee, B., Kimpen, J.L.L and Janssen, R., 2010,** Interleukin-9 polymorphism in infants with respiratory syncytial virus infection: an opposite effect in boys and girls, *Pediatr Pulmonol.*, 45(6):608-613pp.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M.W. and Morris, R., 2003,** The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein, *EMBO J.*, 22:3591-3601pp.
- Sutton, J., Costa, R., Klug, M., Field, L., Xu, D., Largaespada, D.A., Fletcher, C.F., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Klemsz, M. and Hromas, R., 1996,** Genesis, a winged helix transcriptional repressor with expression restricted to embryonic stem cells, *J Biol Chem.*, 271(38):126-133pp.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A. and Manson, J.C., 1996,** Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein, *Nature*, 380:639-42pp.
- Tranulis, M.A., Espenes, A., Comincini, S., Skretting, G. and Harbitz, I., 2001,** The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression, *Mamm. Genome*, 12:376–379pp.
- Tranulis, M.A., Osland, A., Bratberg, B. and Ulvund M.J., 1999,** Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway, *J. General Virology*, 80:1073-1077pp.
- Travaglino, E., Comincini, S., Benatti, C., Azzalin, A., Nano, R., Rosti, V., Ferretti, L. and Invernizzi, R., 2005,** Overexpression of the Doppel protein in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes”, *Br. J. Haematol.*, 128:877-884pp.
- Tripputi, P., Cigonini, D., Bianchi, S. and Fedele, L., 2008,** Different allelic distribution of a single SNP between sexes in humans, *Biochem Genet.*, 46:733-736pp.
- Un, C., Oztabak, K., Ozdemir, N., Tesfaye, D., Mengi, A. and Schellander, K., 2008,** Detection of bovine spongiform encephalopathy-related prion protein gene promoter polymorphisms in local Turkish cattle, *Biochemical Genetics*, 46:820-827pp.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Un, C., Oztabak, K., Ozdemir, N., Akis, I. and Mengi, A.,** 2008, Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep, *Small Ruminant Research*, 74(1-3):260-264pp.
- Wadsworth, J.D., Asante, E.A., Desbruslais, M., Linehan, J.M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloyd, S.E., Hill, A.F., Brandner, S. and Collinge, J.,** 2004, Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype, *Science*, 306:1793-1796pp.
- Watts, J.C. and Westaway, D.,** 2007, The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction, *Biochim Biophys Acta*, 1772:654-672pp.
- Wecks, S., Del-Favero, J., Rademakers, R., Claes, L., Cruets, M., De Jonghe, M., Van Broeckhoven, C. and De Rijk, P.,** 2005, novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery, *Genome Research*, 15:436-442pp.
- Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C.M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A.L., Detwiler, L. and Prusiner, S.B.,** 1994, Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie, *Genes & Development*, 8:959-969pp.
- White, M.D. and Mallucci, G.R.,** 2009, Therapy for prion diseases, *Prion*, 3(3):121-128pp.
- Wickner, R.B.,** 1994, [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science*, 264(5158):566-569pp.
- Wickner, R.B., Taylor K.L., Edskes H.K., Maddelein, M.L., Moriyama, H. and Roberts, B.T.,** 1999, *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4):844-861pp.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S.,** 2009, Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat. Cell Biol.*, 11(3):228-234pp.
- Wong, B.S., Liu, T., Paisley, D., Li, R., Pan, T., Chen, S.G., Perry, G., Petersen, R.B., Smith, B.A., Melton, D.W., Gambetti, P., Brown, D.R. and Sy, M.S.,** 2001, Induction of HO-1 and NOS in doppel-expressing mice devoid of PrP: implications for doppel function, *Mol. Cell. Neurosci.*, 17:768-775pp.
- Xu, M., Fujita, D. and Hanagata, N.,** 2009, Perspectives and challenges of emerging single-molecule DNA sequencing technologies, *Small*, 5(23):2638-2649pp.

KAYNAK DİZİNİ

- York, R.D., Molliver, D.C., Grewal, S.S., Stenberg, P.E., McCleskey, E.W. and Stork P.J.**, 2000, Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signalregulated kinase activation via Ras and Rap1, *Mol. Cell Biol.*, 20:8069-8083pp.
- Zhang, C.C., Steele, A.D., Lindquist, S. and Lodish, H.F.**, 2006, Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:2184-89pp.
- Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A. and Segal, R.A.**, 2000, Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation, *J. Neurosci.*, 20:5671-56718pp.

ÖZGEÇMİŞ

Erdoğan Pekcan Erkan, 28.08.1986 tarihinde İzmir ilinin Konak ilçesinde doğmuştur. Orta öğretimini 60.Yıl Anadolu Lisesi'nde, lise öğretimini İzmir Özel Fatih Fen Lisesi'nde tamamlamıştır. 2004 yılında bu liseden mezun olduktan sonra, aynı yıl içerisinde Orta Doğu Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kazanmıştır. Lisans eğitiminin üçüncü yılındaki zorunlu stajını Harvard Medical School & Massachusetts General Hospital'a bağlı Neurogenetics Unit'te (MA, USA) bulunan Breakefield Lab.'de yapmıştır. Burada üç ay boyunca beyin tümörleri ve mikroRNA'larla ilgili çeşitli projelerde çalışmıştır. 2008 yılında lisans eğitimini tamamlayarak Moleküler Biyolog ünvanını kazanmıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

