



## ARAŞTIRMA MAKALESİ

### Türkiye’de bulunan bazı koyun ırklarının PrP lokus polimorfizmleri yönünden incelenmesi

Ercan Kurar<sup>1,3\*</sup>, Zafer Bulut<sup>2</sup>, Mehmet Nizamlioğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genetik Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Biyokimya Anabilim Dalı, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 42075, <sup>3</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 42080 Konya, Türkiye  
Geliş: 17.03.2014, Kabul: 14.04.2014  
\*ekurar@konya.edu.tr

#### Özet

**Kurar E, Bulut Z, Nizamlioğlu M.** Türkiye’de bulunan bazı koyun ırklarının PrP lokus polimorfizmleri yönünden incelenmesi.

#### Abstract

**Kurar E, Bulut Z, Nizamlioglu M.** Investigation of PrP locus polymorphisms in some native Turkish sheep breeds.

**Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 3, 145-151**  
DOI:10.15312/EurasianJvetSci.201436514

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de bulunan bazı yerli koyun ırklarında PrP lokusu 136., 154. ve 171. kodon polimorfizmlerinin belirlenmesidir.

**Aim:** The objective of this study was to investigate polymorphisms in codons 136, 154 and 171 of the PrP gene in native sheep breeds of Turkey.

**Gereç ve Yöntem:** Akkaraman, Güney Karaman, Kangal Akkaraman, Dağlıç ve İvesi koyunlarından (n=175) örnekleme çalışması yapılmıştır. Kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemi kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. PrP bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiş, restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi ile allel genotipleri tespit edilmiştir. Genel populasyon parametrelerinden allel sayısı (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk değerleri ile Hardy-Weinberg Dengesinden (HWE) sapma değerleri hesaplanmıştır.

**Materials and Methods:** Sampling (n=175) was conducted from Akkaraman, Guney Karaman, Kangal Akkaraman, Daglic and Awassi breeds. Genomic DNA was isolated using a standard phenol/chloroform method. PrP region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and allele genotypes were determined by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. General population parameters including allele numbers (Na), observed (Ho) and expected (He) heterozygosities and deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were calculated.

**Bulgular:** Bütün populasyonlarda yüksek oranda A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotipi tespit edilmiştir. Scrapie’ye en dirençli genotip olarak kabul edilen A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotipi düşük (0.175-0.313) oranda gözlenmiştir. Ancak, hastalığa en duyarlı olan V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotipine çalışmaya konu olan koyun ırklarında rastlanmamıştır. Bu çalışmada kullanılan koyun populasyonlarının Ulusal Scrapie Plan (NSP)’ına göre genel olarak R2 (dirençli) ve R3 (az dirençli) risk kategorilerinde yer aldığı tespit edilmiştir.

**Results:** High level of A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotype was observed in all populations. A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>, which is known as the most resistant genotype to scrapie, was observed at lower (0.175-0.313) frequencies. However, V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>, the most susceptible genotype to the disease, was not determined in all investigated breeds. All sheep population investigated in this study were found to be generally in R2 (resistant) and R3 (little resistant) risk categories described in National Scrapie Plan (NSP).

**Öneri:** Bu ırkların ıslah programlarında PrP polimorfizmlerinin dikkate alınmasının ve scrapie dirençli genotiplerin frekanslarının artırılmasının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

**Conclusions:** It is critically important to consider PrP polymorphisms and increase frequencies of scrapie resistant genotypes in breeding of these breeds.

**Anahtar kelimeler:** Koyun, scrapie, PrP, polimorfizm

**Keywords:** Sheep, scrapie, PrP, polymorphism





## Giriş

Bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE; Transmissible Spongiform Encephalopathy) grubu hastalıklar beyin mikroskopik olarak "süngerimsi" bir görünüm almasına neden olurlar. Koyun ve keçilerde scrapie TSE grubu hastalıklardandır (Yılmaz 2002). Scrapie, İngiltere ve Batı Avrupa ülkelerinde 250 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir. Türkiye'de hastalığın mevcut olduğuna dair henüz bir vakaya rastlanmamıştır (Aytuğ ve ark 1990).

Scrapie ve diğer TSE hastalıklarının henüz bilinen bir tedavisi ve aşısı bulunmamaktadır. Hastalık etkenine karşı bağışıklık oluşmamaktadır. Scrapie'li koyunlardan elde edilen yan ürünlerin (kan, kemik unu gibi) sığır rasyonlarına katılması sonucunda sığırlarda BSE'nin ortaya çıktığı bildirilmektedir (Yılmaz 2002). Scrapie dolaylı olarak insan sağlığını tehdit etmektedir.

Hastalığın etkeninin bir genetik mutasyon, virüs, virino olduğuna dair görüşler olmakla beraber, diğer TSE hastalıklarında olduğu gibi scrapie ajanının prion olarak isimlendirilen bir protein (PrP) olduğu kabul edilmektedir (Prusiner 1982, Hunter 1997). Etken farklı fiziksel, kimyasal ve çevre şartlarına oldukça dayanıklıdır. Prion proteini (PrP) glikoprotein özelliğinde olup normal formu (PrP<sup>C</sup>) insan ve hayvanlarda farklı dokuların hücre membranında bulunmaktadır. PrP<sup>C</sup> 250 amino asitten meydana gelmektedir ve 35 kDa büyüklüğündedir. Prion proteinin fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir. Ancak bakır, çinko gibi elementlerin taşınması, oksidatif strese karşı korunma, sinyal iletimi gibi fonksiyonlarının olduğu bildirilmektedir (Thackray ve ark 2002). Bununla birlikte hastalık formu (PrP<sup>Sc</sup>), normal prion proteinin posttranslasyonel olarak yanlış katlanması sonucu kümelenmiş (aggregated) görünümündedir ve proteazlara dayanıklıdır. Hastalığın etiolojisi hakkında iki yaygın görüş bulunmaktadır. İlki, PrP<sup>Sc</sup> enfeksiyon ajanının veya prionun kendisi olup, bir mutasyon sonucu PrP<sup>C</sup>'den meydana gelmektedir. Günümüzde daha yaygın olarak kabul gören ikinci görüş ise, normal PrP proteini scrapie ajanı için bir reseptör görevi görmektedir. PrP<sup>Sc</sup> scrapie ajanına normal proteine göre daha yüksek affinitesi bulunmaktadır (Hunter 1997).

Scrapie, genellikle yaşlı koyun ve keçilerde, davranış ve koordinasyon bozuklukları, kaşıntı ve buna bağlı olarak yapağı döküntüleri, kaşeksi ile karakterize kronik, bulaşıcı ve nörodejeneratif bir hastalıktır (Wells ve ark 1998). Hastalık belirtileri klinik olarak 1-6 ay kadar sürer. Mortalite oranı %100 dür. PrP<sup>Sc</sup> hücre içerisinde birikerek vakuol oluşmasına ve SAF (scrapie ile ilişkili fibriller) oluşmasına ve dolayısıyla beyin dokusunun süngerimsi olarak gözükmesine neden olur. Histopatolojik muayenede sinir sisteminde nöral dejenerasyonla karakterize vakuollerin oluşumu (süngerimsi görünüm) ve astroglial çoğalma belirgindir (Wells ve ark 1998). Lezyonlar simetrik olup demyelinasyon ve hiç

bir yangısal oluşum bulunmamaktadır. Elektron mikroskop ile incelemede PrP fibrilleri (SAF) çubukçuklar halinde gözlemlenebilir. PrP spesifik antikorları ile western blotting yöntemiyle veya deney hayvanı inokülasyonu ile kesin teşhis konulabilmektedir (Hunter 1997).

Scrapie'nin inkübasyon süresi ve morbidite oranı açısından koyun ırkları arasında farklılıkların olduğu bildirilmektedir. PrP geni koyunun 13. çift kromozomunun q15 bölgesinde PRNP lokusunda bulunmaktadır. PrP lokusunun detaylı incelenmesi sonucunda 83., 101., 112., 116., 127., 137., 138., 141., 143., 146., 172., 173., 175., 176., 179., 180., 189., 195., 196., 211., 213., 231., 237. ve 241. kodonları ile bunlara ilaveten 3'-UTR (untranslated region) bölgesinde bir EcoRI polimorfizmi bulunmuştur (Hunter 1997, Tranulis ve ark 1999, Vaccari ve ark 2001, Thorgeirsdottir ve ark 2002, Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011). PrP lokusu polimorfizmleri inkübasyon süresini ve koyunların scrapie'ye olan dirençlerini etkilemektedir. Goldmann ve ark (1994) deneysel inokülasyon çalışmalarında, PrP 136. kodonunda valin amino asidi (V<sub>136</sub>) bulunan koyunların hastalığa daha duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte homozigot alanin (AA<sub>136</sub>) bireyler hastalık semptomları göstermemektedir. Yine 171. kodondaki glutamin (Q<sub>171</sub>) ve arjinin (A<sub>171</sub>) polimorfizmi koyunların scrapie'ye olan duyarlılığı etkilemektedir (Hunter 1997).

Doğal scrapie enfeksiyonları görülen Cheviot koyunları genotipik olarak incelenmiş ve hastalığın oluşması için V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (VRQ) genotipine gereksinim duyulmuştur. Homozigot V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> genotipine sahip koyunlar hastalığa en duyarlı, A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (ARR) genotipindeki koyunlar ise hastalığa en dirençli olarak bulunmuştur (Hunter ve ark 1994, Hunter ve ark 1996). PrP lokusunun 136., 154. ve 171. kodon polimorfizmlerinin scrapie oluşumu üzerine olan etkileri Ile-de-France (Laplanche ve ark 1993), Lacaunes (Cloucard ve ark 1995), Suffolk (Westaway ve ark 1994), Texel (Belt ve ark 1995) ve Romanov (Elsen ve ark 1999) koyun ırklarında yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan bazı koyun ırklarında PrP lokusu 136., 154. ve 171. kodonları yönünden polimorfizm profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada, Akkaraman (n=42), Güney Karaman (n=40), Kangal Akkaraman (n=13), Dağlıç (n=40) ve İvesi (n=40) ırkı koyunlardan K<sub>3</sub>-EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Organik yöntem (Sambrook ve ark 1989) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmış, DNA kalitesi % 0.8 agaroz jel elektroforez ve 260/280 nm UV'de kontrol edilmiştir. Koyun PrP lokusu 136., 154. ve 171. kodon polimorfizmleri ve genotiplerinin tespit edilmesi amacıyla Elsen ve ark (1999) tarafından belirtilen polimeraz zincir reaksiyonu - restriksiyon parça



Tablo 1. Çalışmada kullanılan PZR primerleri.

Primer	Primer Dizisi (5' → 3')	Referans
PrP1	AAGTGACTACAGACCAGTTGATC	Elsen ve ark 1999
PrP2	GCACATTTGCTCCACCACTCGC	Elsen ve ark 1999
PrP5	GGAGCTGCTGCAGCTGGAGC	Elsen ve ark 1999

uzunluk polimorfizm (PZR-RFLP) yöntemi kullanılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) 1x Mg<sup>2+</sup> free PCR buffer (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 1.5 mM MgCl<sup>2+</sup>, 0.750 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 200 M dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 10 pMol primer çifti (Tablo 1) ve 50 ng DNA kalıp olacak şekilde toplam 30 µl hacimde hazırlanmıştır. Koyun PrP 136. ve 154. kodon bölgesini içeren genom bölgesi PrP5 ve PrP2 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiştir. PrP 171. kodon bölgesinin PZR ile yükseltgenmesinde ise PrP1 ve PrP2 primerleri kullanılmıştır.

Touchdown PZR (Don ve ark 1991) profilinde, 95 °C'de 4 dakika denatürasyon sonrası I. aşamada 16 döngü için 94 °C'de 30 saniye, 60 °C-0,5 °C/döngü 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye tutulmuştur. II. aşamada 25 döngü 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52 °C'de 30 saniye annealing ve 72 °C'de 30 saniye uzama uygulanmıştır. Örnekler, tam bir adenilasyon için 72 °C'de 10 dakika tutulmuştur. RFLP analizi öncesi yükseltgenen 10 µl PZR ürünü 6X Loading Dye ile birlikte %1.5 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp EtBr ile boyanarak UV kaynağı altında kontrol edilmiştir.

Prp 136. ve 154. kodonlarına ait genotiplerin tespitinde BspHI (PacI), 171. kodon genotipleme çalışmalarında ise BclI restriksiyon endonükleaz (RE) ile PZR ürünlerine kesim

uygulanmıştır. RE analizlerinde 10 µl PZR ürünü, 5 ünite ilgili RE enzimi (Fermentas) ve 1X konsantrasyonunda ilgili RE tampon solüsyonu ve toplam 20 µl hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. RE reaksiyonları 37°C veya 55°C'de 18 saat tutularak tam bir kesim olanağı sağlanmıştır. RE analiz ürünleri 6X-Loading Dye ile birlikte % 2.5 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp EtBr boyama sonrası UV kaynağı altında gözlemlenmiştir.

PrP lokusuna ait allel sayısı (Na), beklenen (He) ve gözlenen (Ho) heterozigotluk düzeyleri ile Hardy-Weinberg Dengesi (HWE)'nden sapma değerleri GenAEx6 (Peakall ve Smouse 2006) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### Bulgular

Bu çalışmada, PrP 136. ve 154. kodon bölgelerini içeren genom bölgelerinin PrP5 ve PrP2 primerleri kullanılarak yükseltgenmesi ile 301 bç büyüklüğünde PZR ürünleri elde edilmiş, BspHI RE kullanılarak PZR-RFLP analizi uygulanmıştır. PZR-RFLP ürünlerinin agaroz jel elektroforez analizlerinde 301 baz çifti (bç) DNA ürünleri homozigot A<sub>136</sub>/R<sub>154</sub>, 187 bç ve 114 bç DNA parçacıklarının gözlemlendiği hayvanlar homozigot A<sub>136</sub>/H<sub>154</sub> olarak tanımlanmıştır. RE kesimi sonrası 114 bç, 187 bç ve 301 bç gözlenen koyunlar ise heterozigot A<sub>136</sub>/R<sub>154</sub>-A<sub>136</sub>/H<sub>154</sub> olarak genotiplendirilmiştir.

PrP 171. kodon bölgesinin PrP1 ve PrP2 primerleri kullanılarak PZR ile yükseltgenmesi ile 162 bç büyüklüğünde PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR ürünlerinin BclI RE ile kesimi sonrasında 162 bç DNA ürünleri homozigot R<sub>171</sub>/R<sub>171</sub> olarak tanımlanmıştır. 171. kodonda glutamin (Q) amino asit bulunması durumunda BclI kesim alanı oluşturmaktadır. Dolayısıyla homozigot Q<sub>171</sub>/Q<sub>171</sub> koyunlarda 138 bç ve 24 bç,

Tablo 2. PrP lokusunda gözlenen allel (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk ile Hardy-Weinberg Dengesinden (HWE) sapma değerleri.

Populasyon	n	Na	Ho	He	HWE
Akkaraman	42	3	0.333	0.516	***
Güney Karaman	40	3	0.350	0.508	***
Kangal Akkaraman	13	3	0.154	0.462	***
Dağlıç	40	3	0.275	0.466	**
İvesi	40	3	0.225	0.329	ns

ns= P > 0.05, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

Tablo 3. PrP 136., 141. ve 171. kodonunda gözlenen allel frekansları.

Allel	Populasyon				
	Akkaraman	Güney Karaman	Kangal Akkaraman	Dağlıç	İvesi
ARQ	0.619	0.625	0.692	0.675	0.800
ARR	0.310	0.313	0.231	0.275	0.175
AHQ	0.071	0.063	0.077	0.050	0.025



Tablo 4. PrP lokusunda gözlenen genotipler ve frekansları.

Genotip	Populasyon				
	Akkaraman	Güney Karaman	Kangal Akkaraman	Dağlıç	İvesi
ARQ/ARQ	0.452	0.450	0.615	0.550	0.700
ARQ/ARR	0.286	0.325	0.154	0.225	0.175
ARR/ARR	0.167	0.150	0.154	0.150	0.075
ARQ/AHQ	0.048	0.025	0.000	0.025	0.025
ARR/AHQ	0.000	0.000	0.000	0.025	0.025
AHQ/AHQ	0.048	0.050	0.077	0.025	0.000

Tablo 5. NSP risk seviyesi (Anonim 2002) kapsamında gözlenen genotiplerin oranı.

NSP Risk Seviyesi	Genotip	Populasyon				
		Akkaraman	Güney Karaman	Kangal Akkaraman	Dağlıç	İvesi
R1	ARR/ARR	0.167	0.150	0.154	0.150	0.075
R2	ARQ/ARR	0.286	0.325	0.154	0.250	0.200
	ARR/AHQ					
R3	ARQ/ARQ	0.548	0.525	0.692	0.600	0.725
	ARQ/AHQ					
	AHQ/AHQ					

heterozigot R<sub>171</sub>/Q<sub>171</sub> hayvanlarda ise 162 bç, 138 bç ve 24 bç DNA parçacıkları gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm populasyonlarda yalnızca A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (ARQ), A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>R<sub>171</sub> (ARR) ve A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (AHQ) allelleri tespit edilmiştir (Tablo 2 ve 3). Gözlenen heterozigotluk (Ho) değerleri genel olarak düşük olup 0.152 (Kangal Akkaraman) - 0.350 (Güney Karaman) arasında değişmektedir. Beklenen heterozigotluk (He) değerleri ise en yüksek Akkaraman (0.516) ve en düşük İvesi (0.329) populasyonlarında gözlenmiştir. İvesi hariç tüm populasyonların Hardy-Weinberg Dengesinden (HWE) saptıkları tespit edilmiştir (Tablo 2).

Çalışmaya konu olan tüm populasyonlarda genel olarak yüksek oranda ARR alleli gözlenmiş ve frekansı 0.175 (İvesi) - 0.313 (Güney Karaman) arasında değişmektedir. PrP AHQ alleli oldukça düşük oranda (0.025 - 0.077) gözlenmiştir (Tablo 3). Bu çalışmada kullanılan tüm koyun populasyonlarında V<sub>136</sub>R<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> (VRQ) genotipine rastlanmamıştır. A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>R<sub>171</sub> (ARR) allel frekansı 0.175 (İvesi) - 0.313 (Güney Karaman) arasında değişmektedir (Tablo 4).

Gözlenen genotipler Tablo 4'de özetlenmiştir. Predominant ARQ/ARQ genotipinin frekansı 0.450 (Güney Karaman) ve 0.700 (İvesi) arasında değişmektedir. ARQ/AHQ genotipi düşük oranda gözlenmiş olup Kangal Akkaraman populasyonunda tespit edilememiştir. ARR/AHQ genotipi ise Dağlıç ve İvesi populasyonlarında yalnızca birer koyunda gözlenmiştir. Homozigot AHQ/AHQ İvesi hariç diğer populasyonlarda

düşük oranda (0.025-0.077) bulunmuştur. Çalışmaya konu olan populasyonların Ulusal Scrapie Planı'na (NSP; National Scrapie Plan) göre genel olarak R2 (dirençli) ve R3 (az dirençli) risk kategorilerinde yer aldıkları gözlenmiştir (Tablo 5).

### Tartışma

Scrapie ve BSE enfeksiyonlarından etkilenen İngiltere 2001 yılında, scrapie enfeksiyonlarının eradikasyonunda yardımcı olması amacıyla hastalığa dirençli hayvanların damızlıkta ve yetiştiricilikte kullanılması amacıyla Ulusal Scrapie Planı (NSP; National Scrapie Plan) geliştirmiştir. NSP kapsamında PrP genotipleri 5 farklı risk grubunda (R1-R5) tanımlanmıştır (Anonim 2002). R1 risk grubunda koyunlar (ARR/ARR) hastalığa genetik olarak en dirençli, R5 grubu koyunlar ise (VRQ/VRQ) ise hastalığa en duyarlı olup bu genotipe sahip koyunların ıslah programlarında kesinlikle kullanılmaması tavsiye edilmiştir. NSP programı kapsamında Avrupa Birliği (AB) üyesi ülkelerde koyun ıslah programlarında hastalığa dirençli genotiplerin kullanılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda ARR genotipinin frekansı yükseltirken, VRQ genotipinin frekansının azaltılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla AB ülkelerinde yetiştiriciliği yapılan koyun ırklarında scrapie genotipleme çalışmaları ve scrapie genetik dirençlilik-duyarlılık risk seviyelerinin belirlenmesi çalışmaları yapılmaktadır (Laplanche ve ark 1993, Belt ve ark. 1995, Westaway ve ark 1994, Colouscard ve ark 1995, Arnold ve ark 2002, Sipos ve ark 2002, Drögemüller ve ark 2004).

Arkeolojik ve genetik çalışmaların sonuçları sığır, koyun ve



keçinin Dünya’da en az iki farklı merkezde evcilleştirildiğini göstermektedir (Loftus ve ark 1994, Troy ve ark 2001, Hiendleder ve ark 2002). Bu merkezlerden en önemli ve eskisi “Bereketli Hilal” olarak isimlendirilen Mezopotamya bölgesidir ve Doğu-Güneydoğu Anadolu bölgesini kapsamaktadır. Dolayısıyla, sığır, koyun ile keçinin coğrafik olarak Asya ve Avrupa arasında bir köprü olan Anadolu’dan tüm Dünya’ya yayıldığı belirtilmektedir (Loftus ve ark 1999, Luikart ve ark 2001, Cymbron ve ark 2005, Özsensoy ve ark 2010). Bu nedenle Türkiye’de bulunan koyun ırklarının PrP lokusu polimorfizmi yönünden incelenmesinin kritik önemi bulunmaktadır.

Hastalık belirtilerinin gözlenmesi için gerekli olan uzun inkübasyon süresi, çeşitli çevresel faktörler, sürü yönetimi ve uygun teşhis yöntemlerinin eksikliği neden olarak gösterilse de Türkiye’de henüz rapor edilmiş scrapie vakası bulunmamaktadır. Ancak, hayvan ve hayvansal ürünlerin hareketlerinden dolayı Türkiye’de koyun yetiştiriciliği Scrapie enfeksiyonunun tehdidi altındadır. Scrapie’ye karşı mücadele ve koruyucu hekimlik uygulamalarında dirençli genotiplerin ıslah çalışmalarında ve yetiştiricilikte kullanılmasının kritik önemi bulunmaktadır. Bu amaçla, Türkiye yerli koyun ırklarının scrapie’ye doğal dirençlilik seviyesinin DNA düzeyinde araştırılması amacıyla farklı çalışmalar yapılmıştır (Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011, Frootan ve ark 2012 Meydan ve ark 2012).

PrP lokusu polimorfizmlerinin DNA düzeyinde belirlenmesi amacıyla sanger ve pyrosequencing DNA dizi analizi, MALDI-TOF, kapiller elektroforez, PZR-tek zincir konformasyon polimorfizmi (PZR-SSCP), denatüre gradient jel elektroforez (DGGE), Realtime-PZR ve PZR-RFLP gibi yöntemler kullanılmaktadır (Hunter ve ark 1991, Belt ve ark 1995, Elsen ve ark 1999, Marcos ve ark 2003, Zsolnai ve ark 2003, Buitkamp ve Semmer 2004). Ancak PrP lokusunda gözlenen 136., 154. ve 171. kodon polimorfizmlerinin scrapie genetik dirençlilik düzeylerine etkilerinden dolayı bu çalışmada pratik ve ekonomik olmasından dolayı PZR-RFLP teknolojisi kullanılmıştır.

Bu çalışmaya konu olan tüm koyun ırklarında en yüksek oranda ARQ alleli (0.619-0.800) gözlenmiştir. Bu bulgular, Türkiye yerli koyun ırkları kullanılarak yapılan diğer PrP genotipleme çalışmaları ile uyumludur (Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011, Frootan ve ark 2012 Meydan ve ark 2012). Bulgular ayrıca ARQ allelinin Türkiye yerli koyun ırklarının predominant alleli olduğu görüşünü desteklemektedir. Benzer şekilde Dünya’nın farklı koyun ırklarında yapılan genotipleme çalışmalarında da ARQ alleli yüksek oranda gözlenmiştir. (Vaccari ve ark 2001, Sipos ve ark 2002, Thorgeirsdottir ve ark 2002, Drögemüller ve ark 2004, Meydan ve ark 2012). Bu bulgular ve HWE sapma değerleri ARQ allelinin atasal (wild-type) PrP alleli olduğu görüşünü desteklemektedir. (Meydan ve ark 2012).

Scrapie’ye karşı en dirençli allel olarak tanımlanan ARR, bu çalışmada en düşük İvesi (0.175) en yüksek Güney Karaman (0.313) populasyonlarında gözlenmiştir. İvesi ırkında ARR frekansı diğer çalışmalarda da düşük gözlenmiştir (Frootan ve ark 2012, Meydan ve ark 2012). Meydan ve ark (2012) ARR allelini en düşük İvesi (0.059) en yüksek Sakız (0.380) ırklarında gözlemlemiştir. ARR alleli Akkaraman (0.240), Kangal Akkaraman (0.275), Güney Karaman (0.259) ve Dağlıç populasyonlarında da (0.205) genel olarak düşük gözlenmiştir.

Marmara ve Ege Bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan Kıvırcık, Sakız ve İmroz koyunlarında PrP genotipleri direkt DNA dizi analizi ile araştırılmıştır (Ün ve ark 2008). Toplam 6 allel (ARR, ARQ, AHQ, VRQ, TRQ ve ARH) ve 12 genotip tespit edilmiştir. Ün ve ark (2008) ve bu çalışmada kullanılan koyun populasyonları aynı değildir. Ancak ARQ 0.294 (Sakız) - 0.741 (İmroz), ARR 0.241 (İmroz) - 0.558 (Sakız) ve AHQ allellerinin 0.000 (Kıvırcık ve Sakız) - 0.016 (İmroz) frekansları her iki çalışmada da benzerdir.

Alvarez ve ark (2011), Akkaraman, Morkaraman, Tuj, Hemşin ve Karayaka koyun ırklarında PrP lokusunun genetik karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Altı farklı allel (ARQ, ARR, ARK, ARH, TRQ ve VRQ) tespit edilmiştir. ARQ ve ARR allel frekansları sırasıyla 0.804 (Hemşin) - 0.605 (Karayaka) ve 0.206 (Tuj) - 0.048 (Akkaraman) olarak bulunmuştur. Ancak, AHQ alleli tespit edilememiştir. En duyarlı allel olan VRQ yalnızca Karayaka (0.026), Hemşin (0.043) populasyonlarında düşük oranda gözlenmiştir.

Bu çalışmada AHQ oldukça düşük (0.025-0.077) oranda gözlenmiştir. Meydan ve ark (2012)’nin yüksek sayıda örnek (n=100) kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada İvesi populasyonunda AHQ alleli tespit edilememiştir. Benzer şekilde, Morkarakaman, Norduz, Karakaş, Herik, Hemşin, Karayaka, Tuj, Çineçaparı, Karagül ve Zom koyun populasyonlarında da AHQ alleli gözlenmemiştir. Ancak Akkaraman (0.005), Kangal Akkaraman (0.010), Güney Karaman (0.034) ve Dağlıç (0.013) ırklarında bu çalışmaya benzer şekilde düşük oranda AHQ alleli tespit edilmiştir (Meydan ve ark 2012).

Scrapie’nin gelişmesi için VRQ alleleline gereksinim bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmada VRQ/VRQ genotipine sahip koyunların scrapie’ye karşı en duyarlı oldukları bildirilmektedir (Hunter 1997). Bu çalışmaya konu olan ırklarda V136 alleli hatta VRQ genotipi gözlenmemiştir. Türkiye yerli koyun ırklarında V136 alleli ve VRQ genotipi genel olarak düşük oranda bulunmaktadır (Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011, Frootan ve ark 2012 Meydan ve ark 2012). Örneğin, VRQ bugüne kadar yapılan çalışmalarda İvesi (0.006), Güney Karaman (0.007), Kıvırcık (0.021-0.034), Sakız (0.010-0.014), Karayaka (0.011-0.026), Çine çaparı (0.012) ve Hemşin (0.043) ırklarında gözlenmiştir (Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011, Meydan ve ark 2012). Türkiye’de bulunan koyun ırklarının PrP genotipleme







çalışmalarında VRQ/VRQ homozigot genotipi (Ün ve ark 2008, Alvarez ve ark 2011, Medyan ve ark 2012) yalnızca Kıvrıkcık ırkında 0.007 oranında gözlenmiştir (Meydan ve ark 2012). Bu populasyonların HWE dengesinde olduğu kabul edilirse, gözlenen VRQ allel frekansının düşük olması yerli ırkların scrapie enfeksiyonuna karşı genetik olarak avantajlı olduğunu göstermektedir.

### Öneriler

Bu çalışmada kullanılan koyun populasyonlarının genel olarak Avrupa Birliği tarafından yayınlanan Ulusal Scrapie Planı (NSP)'na göre R2 (dirençli) ve R3 (az dirençli) risk kategorilerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu ırkların ıslah programlarında PrP polimorfizmlerinin dikkate alınmasının ve scrapie dirençli genotiplerin frekanslarının artırılmasının kritik önemi bulunmaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (2003/156) tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın özeti 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi (25-27 Haziran 2013, Kars)'nde sunulmuştur.

### Kaynaklar

- Alvarez L, Gutierrez-Gil B, Uzun M, Primitivo FS, Arranz JJ, 2011. Genetic variability in the prion protein gene in five indigenous Turkish sheep breeds. *Small Rum Res*, 99, 260-264.
- Anonim 2002. British National Scrapie Plan (NSP), the European Commission, Brussels, 25-11-2002-C, 4279.
- Arnold M, Meek C, Webb CR, Hoinville LJ, 2002. Assessing the efficacy of a ram-genotyping programme to reduce susceptibility to scrapie in Great Britain. *Prev Vet Med*, 56, 227-249.
- Aytuğ CN, Alaçam E, Özkoç Ü, 1990. Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. *Teknografik Matbaası, İstanbul*, pp; 195.
- Belt PBGM, Muileman IH, Schreuder BEC, Bos-de Ruijter J, Gielkens ALJ, Smits MA, 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 76, 509-517.
- Buitkamp J, Semmer J, 2004. A robust, low- to medium-throughput PRNP genotyping system in sheep. *BMC Infect Dis*, 4, 30.
- Cloucard C, Beaudry P, Elsen JM, Milan D, Dussaucy M, Bounneau C, Schelcher F, Chatelain J, Launay JM, Laplanche JL, 1995. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 76, 2097-2101.
- Cymbron T, Freeman AR, Isabel Malheiro M, Vigne JD, Bradley DG, 2005. Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle

populations. *Proc R Soc B*, 272, 1837-1843.

- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acid Res*, 19, 4008.
- Drögemüller C, de Vries F, Hamann H, Leeb T, Distl O, 2004. Breeding German sheep for resistance to scrapie. *Vet Rec*, 154, 257-260.
- Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andreoletti O, Eychenne F, Tien Khang JV, Poivey JP, Lantier F, Laplanche JL, 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol*, 144, 431-445.
- Frootan F, Nikbakht G, Özgenterk NO, Ün C, 2012. Prion protein coding gene (PRNP) variability in sheep from Turkey and Iran. *Biochem Genet*, 50, 277-284.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster JD, Hope J, 1994. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75, 989-995.
- Hiendleder S, Kaup B, Wassmuth R, Janke A, 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proc R Soc B*, 269, 893-904.
- Hunter N, Foster JD, Benson G, Hope J, 1991. Restriction fragment length polymorphisms of the scrapie-associated fibril protein (PrP) gene and their association with susceptibility to natural scrapie in British sheep. *J Gen Virol*, 72, 1287-1292.
- Hunter N, Goldmann W, Smith, G, Hope J, 1994. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol*, 137, 171-177.
- Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C, 1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, 141, 809-824.
- Hunter N, 1997. Molecular Biology and Genetics of Scrapie in Sheep, In: *The Genetics of Sheep* Ed; Piper L, Ruvinsky A, CAB International, New York, USA, pp;225-240.
- Laplanche JL, Chatelain J, Westaway D, Thomas S, Dussaucy M, Brugere-Picoux J, Launay JM, 1993. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 15, 30-37.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham EP, 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *PNAS USA*, 91, 2757-2761.
- Loftus RT, Ertugrul O, Harba AH, El-Barody MAA, MacHugh DE, Park SD, Bradley DG, 1999. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: The Near East. *Mol Ecol*, 8, 2015-2022.
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Taberlet P, 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *PNAS USA*, 98, 5927-5932.



- Marcos S, Calvo JH, González C, Serrano M, 2003. Haplotype determination and new variants within the ovine prion CDs region. In: Proceedings of the International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goat: 8–11 December 2003; Toulouse.
- Meydan H, Yüceer B, Degirmenci R, Özkan MM, Yıldız MA, 2012. Prion protein gene polymorphism and genetic risk evaluation for scrapie in all Turkish native sheep breeds. *Virus Genes*, 45, 169–175.
- Özşensoy Y, Kurar E, Doğan M, Bulut Z, Altunok V, Işık A, Çamlıdağ A, Nizamlıoğlu M, 2010. Türkiye’de bulunan bazı yerli sığır ırklarının STR markörler ile genetik karakterizasyonu. *BİBAD*, 3, 163-171.
- Peakall R, Smouse PE, 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6, 288–295.
- Prusiner SB, 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold-Spring Harbor, New York, USA, Volume 2, pp: 9.16-9.19.
- Sipos W, Kraus M, Schmoll F, Achmann R, Baumgartner W, 2002. PrP genotyping of Austrian sheep breeds. *J Vet Med A*, 49, 415-418.
- Thackray AM, Knight R, Haswell SJ, Bujdosó R, Brown DR, 2002. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem J*, 362, 253-258.
- Thorgeirsdóttir S, Georgsson G, Reynisson E, Sigurdarson S, Palsdóttir A, 2002. Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection of sheep in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PrP genotypes. *Arch Virol*, 147, 709–722.
- Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ, 1999. Prion protein polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol*, 80, 1073–1077.
- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus TR, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC, Bradley DG, 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410, 1088-1091.
- Ün C, Oztabak K, Ozdemir N, Akıs I, Mengi A, 2008. Genotyping of PrP gene in native Turkish sheep breeds. *Small Rum Res*, 74, 260-264.
- Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, Di Bari MA, Morelli L, Ligios C, Busani L, Nonno R, Di Guardo G, 2001. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. *Arch Virol*, 146, 2029–2037.
- Wells GAH, Hawkins SAC, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ, Dawson M, 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec*, 142, 103-106.
- Westaway D, Zuliani V, Cooper CM, Da Costa M, Neuman S, Jenny AL, Detwiler L, Prusiner SB, 1994. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev*, 8, 959-969.
- Yılmaz H, 2002. Prion hastalıkları-bulaşabilen süngerimsi ensefalopatiler. *ANKEM Derg*, 16, 161-166.
- Zsolnai A, Anton I, Kühn C, Fésüs L, 2003. Detection of single-nucleotide polymorphisms coding for three ovine prion protein variants by primer extension assay and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, 634-638.

