

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

KATARINA ŠPIRANEC

**Određivanje osjetljivosti ovaca hrvatske izvorne pasmine
dalmatinska pramenka na grebež (scrapie) analizom gena
prp za prionski protein**

Zagreb, 2009.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju pod vodstvom dr. sc. Aleksandra Vojte u sklopu znanstvenog projekta „Normizacija nekih pokazatelja zdravlja hrvatskih izvornih pasmina ovaca“ (053-1780469-2110, prof. dr. sc. Miljenko Šimpraga) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008./2009.

SADRŽAJ RADA:

Uvod	1
Hipoteza	5
Opći cilj i specifični ciljevi rada	5
Materijal i metode	6
Rezultati	10
Rasprava	14
Zaključci	16
Zahvale	17
Popis literature	18
Sažetak	21
Summary	21
Životopis	22

UVOD

Grebež ovaca (scrapie) je letalna, kronična prionska bolest ovaca i koza, koja pripada skupini transmisivnih spongiformnih encefalopatija (TSE). Toj grupi bolesti pripadaju i Creutzfeld-Jakobova bolest, kuru, transmisivna encefalopatija američke vidrice, spongiformne encefalopatije jelena, goveda, mačke i egzotičnih životinja u zoološkim vrtovima te nova varijanta Creutzfeld-Jakobove bolesti (ŠOŠTARIĆ, 2000).

Iako unutar grupe TSE postoje značajne razlike u epizootiologiji, načinu širenja i vrstama koje mogu biti prirodno ili pokusno zaražene, ove bolesti izdvajaju određene zajedničke karakteristike.

Karakterizira ih dugi period inkubacije, subkroničan ili kroničan klinički tijek bolesti, neosjetljivost na bilo kakvu terapiju i neminovno letalan ishod. Zajednička klinička karakteristika ovih bolesti su teški poremećaji funkcije središnjeg živčanog sustava (ŠOŠTARIĆ, 2000).

Uzročnici bolesti iz skupine transmisivnih spongiformnih encefalopatija su prioni, infektivne proteinske molekule nastale post-translacijskom modifikacijom normalnog staničnog proteina. Prioni sadrže otprilike 250 aminokiselina, a njihova funkcija u organizmu nije do kraja razjašnjena. Umnažaju se mijenjajući normalni stanični protein (PrP) u infektivan oblik (PrnP) promjenom konformacije. Normalni stanični protein i prion imaju isti slijed aminokiselina, ali se različito spiralno omotavaju oko središnje osi. Dakle, promjena α konformacije u β konformaciju rezultira nastajanjem infektivnog oblika proteina. Mehanizam promjene konformacije i njegova veza s patološkim učincima prionskih bolesti nije još do kraja razjašnjena (EGHIAIAN i sur., 2004).

Prioni se teško prenose između različitih životinjskih vrsta, ukoliko dođe do prijenosa vrijeme inkubacije je izrazito dugo (WEISSMAN, 1996).

Uzročnicima transmisivnih spongiformnih encefalopatija mogu se inficirati laboratorijske životinje, međutim oni pokazuju značajan afinitet prema određenoj životinjskoj vrsti kao domaćinu. Specifičnost priona za vrstu proizilazi iz činjenice da je prion promijenjeni normalni stanični protein. U slučaju prijenosa prionskog proteina hrčka na miša, vrsna barijera prijeđena je inokulacijom *prp* gena hrčka u miša primatelja. Osobine nastalih priona u transgenetičkom mišu odgovarale su vrsti inokuliranog priona, odnosno infekcija prionima hrčka rezultirala je stvaranjem priona hrčka, a infekcija prionima miša dovela do stvaranja priona miša. Prionski proteini miša i hrčka razlikuju se u 10 aminokiselina (WEISSMAN, 1996).

Prioni su otporni prema visokim temperaturama pa ih ni kuhanje od nekoliko sati ne uništava potpuno. Otporni su na djelovanje proteaza, ultraljubičastog i ionizirajućeg zračenja te na djelovanje formalina. Osjetljivi su na tvari sposobne denaturirati proteine, kao što su urea i SDS. Prioni kao derivati normalnog staničnog proteina ne potiču stvaranje protutijela zbog čega se ne mogu dokazivati serološkim metodama. Svojstvo priona je formiranje nakupina ili polimera. U inficiranom moždanom

tkivu moguće je vidjeti štapičaste strukture koje se sastoje od filamenata ili fibrila građenih od prionskih proteina (SHIMADA, 2005).

Grebež se većinom pojavljuje u ovaca starih između 2,5 i 4,5 godine. Uzročnik ulazi u organizam preko ozlijeđene kože i konjunktiva. Može se prenijeti i iglama i kirurškim instrumentima pa je potreban oprez pri cijepljenju i kirurškim zahvatima. Ovce se zaraze na paši, u zaraženoj staji ili kontaminiranom hranom. Kada uzročnik grebeži ovaca peroralno uđe u organizam nastupi razdoblje mirovanja. Za to se vrijeme ne može dokazati nikakva infektivnost u bilo kojem organu. Nakon toga se uzročnik umnoži u crijevnom i limforetikularnom tkivu, zatim slezeni, retrofaringealnim i mezenterijalnim limfnim čvorovima. Umnožavanje se nastavlja u limforetikularnom sustavu, a to traje približno dvije godine prije nego što se uzročnik može dokazati u mozgu. Način putovanja uzročnika do mozga nije poznat, pretpostavlja se da bi to moglo biti krvnim ili živčanim putem. Kada se uzročnik pojavi u središnjem živčanom sustavu, počinje se umnožavati u velikom titru. Nakon inkubacije od više mjeseci do nekoliko godina, pojavljuju se inkoordinacije, hiperestezija, opći nemir i svrbež po koži. Bolest traje različito dugo, ali uvijek završi uginućem. Patološke promjene se očituju encefalomijelozom u produženoj moždini, mozgu i leđnoj moždini. Histološke promjene se očituju degenerativnim procesima na ganglijskim stanicama uz gliozu i izrazit udio astrocita. U nezaražena područja bolest se unosi uvozom ovaca koje su u inkubaciji (CVETNIĆ, 2005).

Spongiformne encefalopatije ne mogu se prevenirati imunoprofilaktički i za sada nije poznat lijek za ovu skupinu bolesti. Navedeno upućuje da rano otkrivanje primljivijih jedinki može spriječiti velike gospodarske štete uzrokovane ugibanjem oboljelih životinja, neškodljivim uklanjanjem njihova potomstva, a ponekad i cijelih stada. Selektivnim uzgojem može se smanjiti vertikalno prenošenje bolesti, jer se selekcija usmjerava na nepoželjne gene.

Budući da je grebež zarazna bolest, uzročnik bolesti mora izravno ili neizravno doći u dodir s primljivom jedinkom, međutim varijacije prirodne pojavnosti bolesti ukazuju na utjecaj genetskih faktora.

U ovaca koje su bile izložene infektivnom uzročniku, mogućnost nastanka bolesti povezana je s genetskim polimorfizmom gena *prp* koji kodira prionski protein, a u ovce je smješten na kromosomu 13 (BOSSERS i sur., 1997).

Istraživanja na transgenetičkim miševima su pokazala da su jedinke bez funkcionalnog *prp* gena potpuno otporne prema prionskim bolestima (TRANULIS i sur., 2002).

Mutacija gena *prp* koja dovodi do promjene određenih aminokiselina kodiranog proteina ima značajnu ulogu u određivanju osjetljivosti ili otpornosti na grebež. Opisano je petnaest mutacija prionskog gena kod ovaca, na kodonu 112, 127, 136, 137, 138, 141, 143, 151, 154, 171, 176 i 211 (TKAČIKOVA i sur., 2003). Mutacije kodona 112, 137, 138, 141, 151 i 211 vrlo su rijetke i nisu dovedene u vezu s kliničkom pojavom bolesti u prirodno ili eksperimentalno zaraženih ovaca

(GOMBOJAV i sur., 2004). Najznačajnije mutacije su valin (V) ili alanin (A) na kodonu 136, arginin (R) ili histidin (H) na kodonu 154 i glutamin (Q), arginin (R) ili histidin (H) na kodonu 171 (BAYLIS i sur., 2000). Od dvanaest mogućih haplotipa, opisano je slijedećih pet: ARQ, VRQ, ARR, AHQ i ARH (BELT i sur., 1995). Alel ARR povezan je s otpornošću prema bolesti, a alel VRQ sa primljivošću. (BAYLIS i sur., 2000). Ovce s genotipom ARR/ARR su vrlo otporne prema grebežu, ovce s genotipom ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ su genetski otporne, ali treba posvetiti pažnju pri njihovom korištenju u uzgojnom programu, genotip ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ predstavlja veću predispoziciju za bolest, genotip ARR/VRQ uvjetuje osjetljivost prema grebeži ovaca, a ovce s genotipom AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ vrlo su osjetljive prema bolesti (COSIER i sur., 2008).

Utvrđeno je da je vrijeme inkubacije bolesti u ovaca povezano s određenim PrP genotipom. Kod homozigota sa genotipom VRQ/VRQ vrijeme inkubacije trajalo je 160 dana, kod heterozigota (VRQ/ARQ ili VRQ/ARR) inkubacija je trajala 260-360 dana. Homozigoti za alanin na kodonu 136 (ARQ/ARQ, ARQ/ARR, ARR/ARR, itd.) bili su potpuno otporni na infekciju (HUNTER, 2003).

Bolest se pojavljuje enzootski u mnogim dijelovima svijeta. U pojedinim područjima zapadne Europe trajan je problem već više od 200 godina. Prvi put je opisana u Velikoj Britaniji, a krajem 18. i početkom 19. stoljeća prenesena je u Njemačku i Francusku. Uvozom (posebice iz Velike Britanije) unesena je u sve zemlje gdje se uzgajaju ovce. Iako bolest u Hrvatskoj nije dokazana, za pretpostaviti je da se javlja neprepoznata i da je niske incidencije (ŠOŠTARIĆ, 2000). Do otkrića PrP genotipa bolest je bilo vrlo teško dijagnosticirati *ante mortem*. U obzir je dolazila samo biopsija dostupnog limfoidnog tkiva kao što su tonzile, treća očna vjeđa i limfatičko tkivo povezano sa rektalnom sluznicom. Takav način dijagnostike nije se mogao provoditi rutinski i bio je ograničen na pojedine slučajeve životinja sumnjivih na zaraženje. Sigurnija dijagnoza postavljala se prepoznavanjem kliničkih znakova bolesti i patohistološkom pretragom mozga nakon uginuća. U novije vrijeme koristi se tehnika imunoblotinga za dokazivanje prionskog proteina u limfatičkom i moždanom tkivu (SHIMADA i sur., 2005).

Nemogućnost rane dijagnostike povećava izvore infekcije i doprinosi širenju bolesti, jer inficirane ovce posteljicom mogu izlučivati velike količine uzročnika i na taj način kontaminirati okoliš te vrlo vjerojatno izazvati infekciju janjeta (DAWSON i sur., 2008).

Program kontrole bolesti PrP genotipizacijom započeo je 1990-ih. Velika Britanija prihvatila je takav način kontrole i selektivnim uzgojem ovaca otpornih prema grebežu smanjila rizik pojave bolesti (DAWSON i sur., 2008).

Europska Unija postavlja genetsku metodu kao metodu izbora za kontrolu grebeži ovaca. Zakonski, EU nalaže ubijanje i neškodljivo uklanjanje svih životinja kod kojih se očekuje pojava bolesti, osim životinja kod kojih je utvrđen ARR/ARR genotip i ovaca koje posjeduju ARR alel, odnosno ne

posjeduju VRQ alel. Nadalje, Europska komisija predlaže uzgojni rad koji bi se trebao bazirati na odabiranju otpornih ovaca te na taj način povećati frekvenciju ARR alela i smanjiti učestalost rizičnih alela. Od ovih zahtjeva se odustaje ukoliko određenoj pasmini prijeti izumiranje ili ako je učestalost ARR alela manja od 25%. U pasmina kod kojih je učestalost ARR alela manja od 10%, odustaje se od uzgojnog programa ukoliko postoji drugi zadovoljavajući način kontrole bolesti (ACUTIS i sur., 2004).

HIPOTEZA

Grebež ovaca je prionska bolest koja se javlja u mnogim zemljama, a u Hrvatskoj do sada još nije zabilježena. Potrebno je utvrditi da li je razlog tome genetska otpornost hrvatskih izvornih pasmina ovaca ili neki drugi čimbenici.

OPĆI CILJ I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj rada je utvrditi učestalost polimorfizma kodona 136, 154 i 171 u hrvatske izvorne pasmine ovaca, dalmatinske pramenke te na taj način odrediti osjetljivost pasmine na grebež ovaca.

Specifični ciljevi rada su optimizacija metode izolacije DNA, uspostavljanje standardnih i alternativnih metoda za određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 gena *prp*.

MATERIJAL I METODE

OVCE

Istraživanje je provedeno na 16 ovaca pasmine dalmatinska pramenka, iz dva stada s područja Dalmatinske zagore (Oklaj, Radučić). Sve ovce su bile klinički zdrave, što je na terenu pregledom utvrdio veterinar.

KEMIKALIJE

Etanol, eriokromcrno T, NaCl, NaOH, MgCl₂, HNO₃ i AgNO₃ nabavljeni su od tvrtke Kemika (Zagreb). Proizvođač ostalih općih kemikalija (puferi, soli, detergencije, otapala) je Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD), osim ako je drugačije naznačeno.

IZOLACIJA DNA IZ KRVI

Uzorci krvi uzeti su punkcijom *v. jugularis* u količini od 5 mL u zatvoreni vakutener sustav s antikoagulansom EDTA. Dio uzoraka krvi bio je odmah korišten za izolaciju DNA, a dio pohranjen na -20°C.

Izolacija DNA uz proteinazu K

Kao polazna metoda za izolaciju DNA iz krvi korištena je prilagođena metoda MILLERA i suradnika (1988). Uzorku krvi dodan je dvostruki volumen pufera RCLB (10 mM Tris HCl pH 7,6, 5 mM NaCl, 8 mM MgCl₂) i 150 µL detergenta Nonidet P-40 za lizu eritrocita. Smjesa je inkubirana na sobnoj temperaturi 5 do 10 minuta uz povremeno okretanje. Zatim je uzorak centrifugiran 10 minuta na 1000×g pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog leukocita ispran je u puferu RCLB i ponovo centrifugiran. Ispiranje i centrifugiranje je ponavljano sve dok talog nije postao blijedožute boje, odnosno potpuno ispran od eritrocita. Isprani talog je resuspendiran u puferu NLB (1% SDS, 400 mM NaCl, 0,1 mg/ml proteinaza K). Smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 37°C preko noći. Nakon inkubacije proteini i ostaci stanica uklonjeni su ispoljavanjem, koje je provedeno dodavanjem 1/3 volumena 5 M NaCl na jedan volumen suspenzije, snažnim miješanjem i centrifugiranjem 5-10 minuta na 1000×g pri sobnoj temperaturi. Supernatantu je nakon toga dodano 0,65 volumena hladnog 2-propanola. Uzorak je zatim centrifugiran 10 minuta na 10 000×g pri sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen i talog ispran dodatkom 1 mL 70% etanola, nakon čega je centrifugiranje ponovljeno 5 minuta. Supernatant je pažljivo uklonjen i talog DNA osušen oko 10 minuta na 55°C. Talog DNA resuspendiran je u 100 µL pufera TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) i pohranjen na 4°C.

Izolacija DNA bez proteinaze K

Kako bi izolacija bila što ekonomičnija, iskušana je slična metoda koja ne uključuje korištenje proteinaze K (LAHIRI i NURNBERG, 1991). Uzorku krvi (4 ml) dodan je dvostruki volumen pufera TKM (0,32 M saharoza, 5 mM MgCl₂) i 125 µL Nonidet P-40 za lizu eritrocita. Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 1000×g. Dobiveni talog ispran je u puferu TKM i ponovno centrifugiran. Centrifugiranje je ponavljano dok talog nije bio potpuno ispran od eritrocita. Talog je resuspendiran u 900 µL pufera TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS) i inkubiran 1 sat na 55°C uz povremeno miješanje. Dodano je 350 µL 5M NaCl za izoliranje proteina i centrifugirano 10 minuta pri 14 000×g. Supernatantu je dodano 0,65 volumena 2-propanola i ponovljeno je centrifugiranje 15 minuta. Supernatant je uklonjen i dodan je 1 mL 70% etanola, slijedilo je centrifugiranje 5 minuta. Supernatant je uklonjen, talog DNA je osušen oko 10 minuta na 55°C i resuspendiran u 100 µL pufera TE.

Brza izolacija DNA bez proteinaze K

U svrhu daljnje optimizacije metode izolacije DNA iz krvi, isprobna je varijanta kod koje je vrijeme inkubacije znatno skraćeno (LAHIRI i SCHNABEL, 1993). Uzorku krvi od 4 mL dodano je 10 mL pufera TKM (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 4 mM MgCl₂) i 100 µL Nonidet P-40. Uzorak je centrifugiran 8 minuta na 1000×g. Dobiveni talog je resuspendiran u puferu TKM i centrifugiranje je ponovljeno barem dva puta (sve dok talog nije bio bezbojan). Nakon toga je talog resuspendiran u 200 µL pufera TKM i dodano mu je 15 µL 10% SDS. Uzorak je inkubiran 5 minuta na 55°C uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije proteini i ostaci stanica uklonjeni su izoliranjem, koje je provedeno dodavanjem 0,2 volumena zasićene otopine (oko 6 M) NaCl. Supernatantu je dodano 0,65 volumena 2-propanola i centrifugiran je 15 minuta na 10 000×g pri sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen i dodan je 1 mL 70% etanola te ponovno centrifugiran 5 minuta. Supernatant je uklonjen i talog DNA osušen oko 10 minuta na 55°C. Talog DNA je resuspendiran u 100 µL TE pufera.

ELEKTROFOREZA U GELU AGAROZE

Za izradu 1% gela korišteno je 0,2 g agaroze (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) otopljene u 20 mL pufera TAE (Tris-Acetat-EDTA). Grijanjem u mikrovalnoj pećnici agarozu se u potpunosti otopi, nakon čega se gel hladi do oko 60°C. Nakon toga dodano je 2 µL SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, SAD), kako bi se omogućila vidljivost DNA pod transiluminatorom. Nakon polimerizacije gela hlađenjem na sobnu temperaturu u odgovarajućem kalupu, nanose se uzorci (2-6 µL) uz oko 1 µL BlueJuice (Invitrogen, Carlsbad, SAD) pufera. Elektroforeza se provodi uz jakost električnog polja od 10 V/cm u trajanju od 5-25 minuta. Vizualizacija vrpce DNA se postiže pobudom fluorescencije pod Safe Imager transiluminatorom (Invitrogen, Carlsbad, SAD).

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR) ZA EGZON 3 OVČJEG GENA *PRP*

Dio egzona 3 koji kodira amino kiseline 47 do 246 prionskog proteina umnožen je u 50 µL reakcijskoj smjesi koristeći 5 µL genomske DNA, 1 µL (0,2 µM) svake oligonukleotidne početnice (seq 1: 5'-tcc tgg agg caa ccg cta tc-3' i seq 2: 5'-gga gga tca cag gag ggg aag-3', BUITKAMP i SEMMER, 2004), 200 µM svakog deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 1 U Taq polimeraze (GoTaq, Promega, Madison, SAD), 2 mM MgCl₂ i 1× GoTaq PCR pufer (Promega, Madison, SAD). Uvjeti reakcije bili su: prethodna denaturacija 4 minute na 95°C, zatim 35 ciklusa umnažanja koji su se sastojali od 30 sekundi denaturacije na 94°C, 30 sekundi sparivanja početnica pri 55°C i 1 minuta i 30 sekundi produljivanja na 72°C. Posljednje produljivanje trajalo je 5 minuta na 72°C. Reakcije su provedene u aparatu ABI Veriti (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Uspješnost umnažanja provjerena je elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze.

ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA - SEKVENCIRANJE DNA

Sekvenciranje umnoženog dijela egzona 3 gena *prp* je obavljeno korištenjem 96-kapilarnog genskog analizatora ABI3730×1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, SAD), uz Big Dye Terminator kit i protokol za fluorescento automatsko sekvenciranje prema uputama proizvođača.

ANALIZA SEKVENCI DNA

Genotip s obzirom na polimorfizme kodona 136, 154 i 171 gena *prp* utvrđen je direktnom analizom kromatograma. Jedan maksimum na određenoj poziciji karakterizirao je homozigota, dok su dva maksimuma jednake visine na istoj polimorfnoj poziciji omogućavala otkrivanje heterozigota.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (ARMS-PCR) ZA ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA KODONA 171 GENA *PRP*

Polimorfizam kodona 171 gena *prp* određen je metodom ARMS-PCR (NEWTON i sur., 1989). Pripremljena je 10 µl reakcijska smjesa s 0,5 µl genomske DNA, 1× GoTaq PCR pufer (Promega, Madison, SAD), 200 µM svakog deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 0,25 U Taq polimeraze (GoTaq, Promega, Madison, SAD), 2 mM MgCl₂. Koncentracija početnica bila je 0,5 µM, a njihove sekvence prema BUITKAMPU i SEMMERU (2004). U tri zasebne reakcije, za svaki testirani uzorak DNA korištena je oligonukleotidna početnica seq1 (5'-tcc tgg agg caa ccg cta tc-3') u kombinaciji s jednom od H171 (5'-ttc tga gca taa agt tgt tct ggt tac tat aa-3') / Q171 (5'-ttc tga gca taa agt tgt tct ggt tac tat aa-3') / R171 (5'-tca gtt aag ttg ttc tgg tta cta ttc c-3'). Uvjeti reakcije bili su: 95°C, 15 min početna aktivacija polimeraze, 33 ciklusa: 94°C, 30 s denaturacija, 62°C, 60 s spajanje početnica, 74°C, 60 s produljenje početnica, bez konačnog produljivanja (BUITKAMP i SEMMER, 2004). Elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze utvrđeno je koji su parovi početnica doveli do stvaranja produkta, temeljem čega je utvrđen genotip. Pozitivna reakcija (produkt) s početnicom H171, Q171 ili R171 upućivala je na prisutnost odgovarajućeg alela.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (ARMS-PCR) ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA KODONA 136, 154 I 171 GENA *PRP*

Istovremeno određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 gena *prp* pokušano je modifikacijom metode BUITKAMPA i SEMMERA (2004), koju je bilo potrebno prilagoditi raspoloživoj opremi. Pripremljena je 10 µl reakcijska smjesa s 1 µl genomske DNA, 1× GoTaq PCR pufer (Promega, Madison, SAD), 200 µM svakog deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 0,25 U Taq polimeraze (GoTaq, Promega, Madison, SAD), 2 mM MgCl₂. Opisane početnice H171, Q171 i R171, zatim H154 (5'-agt ttg taa cgg tac atg ttt tga t-3'), R154 (5'-act aac ggt aca tgt ttt cac-3'), A136 (5'-ata cat gct ggg aag tgc-3') i V136 (5'-cta cat get ggg aag tgt-3') korištene su u koncentraciji 1,67 µM svaka, u kombinacijama A mix (A136, H154, R154, H171, Q171 i R171) i V mix (V136, H154, R154, H171, Q171 i R171).

Za svaki uzorak DNA pripremljene su dvije PCR reakcije, po jedna s A mix i V mix kombinacijom početnica. Uvjeti reakcije bili su: 95°C, 15 min početna denaturacija, 33 ciklusa: 94°C, 30 s denaturacija, 62°C, 60 s sparivanje početnica, 74°C, 60 s produljivanje početnica (BUITKAMP i SEMMER, 2004). Rezultat je tumačen na temelju elektroforeze produkata u gelu poliakrilamida.

NEUTRALNA ELEKTROFOREZA U GELU POLIAKRILAMIDA

Za pripremu 8%-tnog gela priređena je smjesa od 8 ml 40% otopine akrilamida (akrilamid:bisakrilamid 29:1), 4 ml 10×TBE (Tris-Borat-EDTA) pufera i 28 ml redestilirane vode. Polimerizacija je započeta dodatkom 280 µl 10%-tne otopine amonijevog persulfata (APS) i 25 µl otopine TEMED-a. Gel je polimerizirao 60-90 minuta pri sobnoj temperaturi u kalupu dimenzija 20x50x0,035 cm. Na gel je nanoseno po 10 µl produkta lančane reakcije polimeraze. Elektroforeza je trajala ~18 sati pri jakosti električnog polja od 8 V/cm u aparatu za vertikalnu elektroforezu uz pufer TBE. Vrpce DNA vizualizirane su bojanjem gela srebrom.

BOJANJE GELA POLIAKRILAMIDA SREBROM

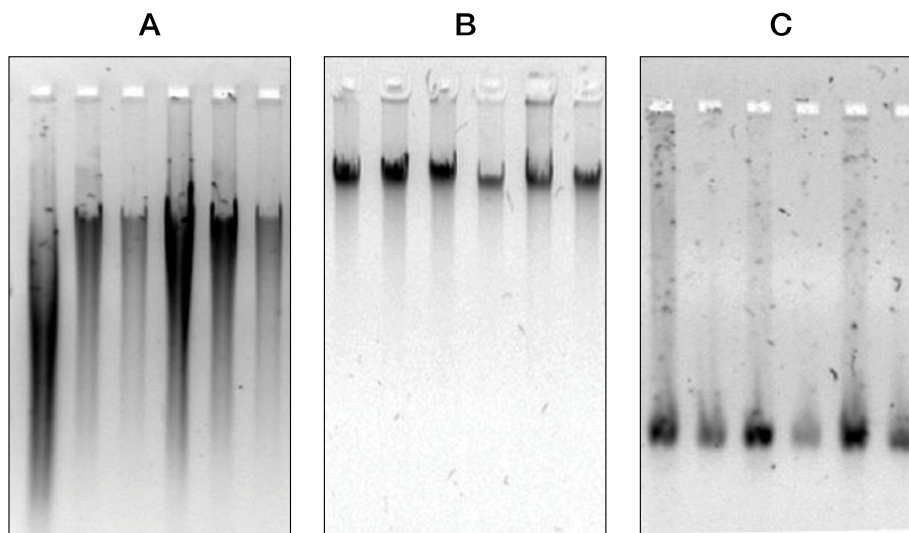
Nakon završetka elektroforeze gel je odmah inkubiran u 0,1% otopini AgNO₃ u 1% HNO₃ 5 minuta na sobnoj temperaturi i kratko ispran destiliranom vodom. Nakon toga dodana je otopina za razvijanje (2% NaOH, 2 ml/L 37% HCOH, 0,0025% eriokromcrno T). Djelovanjem otopine na gel vrpce DNA se boje smeđe zbog izlučivanja koloidnog elementarnog srebra (JI i sur., 2007). Kada je postignut zadovoljavajući intenzitet obojenja, razvijanje se prekida dodavanjem 10%-tne octene kiseline.

REZULTATI

IZOLACIJA DNA IZ KRVI

Početna metoda izolacije DNA uz proteinazu K rezultirala je dobivanjem zadovoljavajuće količine DNA, ali nije bila prikladna, jer korištenje enzima umanjuje ekonomičnost cijelog postupka (slika 1.A).

Izolacijom DNA bez korištenja proteinaze K dobivena je zadovoljavajuća količina DNA, ali postupak izolacije bilo je potrebno dalje optimizirati kako bi se skratilo vrijeme trajanja izolacije (slika 1.B). Brzom izolacijom DNA bez proteinaze K došli smo do prihvatljivih rezultata u pogledu kvalitete, trajanja i ekonomičnosti postupka. Ovom metodom vrijeme inkubacije znatno je skraćeno, isključeno je korištenje proteinaze K, a kvaliteta i količina dobivene DNA bile su odgovarajuće za daljnje postupke, PCR umnažanje i sekvenciranje (slika 1.C)



Slika 1. Uspješnost izolacije DNA provjerena je elektroforezom 4 μ L izolata u 1% gelu agaroze. Izolacija DNA uz proteinazu K (A), bez proteinaze K (B) i brza izolacija bez proteinaze K (C). Vrpce DNA pod (B) i (C) pokazuju kompaktan signal karakterističan za kvalitetne izolate genomske DNA. Razlika u migraciji posljedica je različitog trajanja elektroforeze (10-30 minuta), a ne veličine fragmenata.

ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA - SEKVENCIRANJE DNA

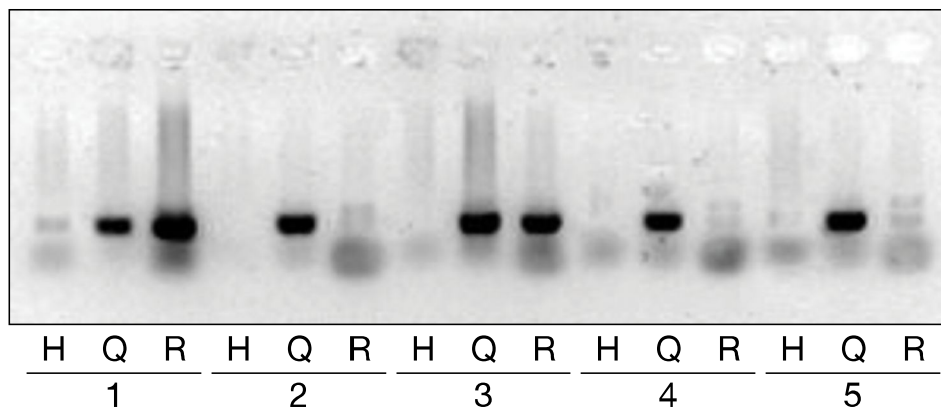
Sekvenciranje *prp* gena vrlo je precizna metoda koja daje pouzdanu informaciju o varijacijama kodona 136, 154 i 171, a tom metodom mogu se otkriti i druge mutacije na *prp* genu. Sekvenciranjem smo

dobili uvid u učestalost pojedinih genotipova i poslužilo nam je kao usporedna metoda za kontrolu drugih alternativnih metoda utvrđivanja polimorfizama (Tablica 1).

Sekvenciranjem su određeni genotipovi ovaca, međutim, pokazalo se da je sekvenciranje vrlo osjetljivo na polazni materijal. Samo kvalitetne izolirane genomske DNA dale su pouzdanu sekvencu. Direktnom analizom kromatograma vrlo jednostavno su se mogli razlikovati homozigoti od heterozigota.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (ARMS-PCR) ZA ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA KODONA 171 GENA *PRP*

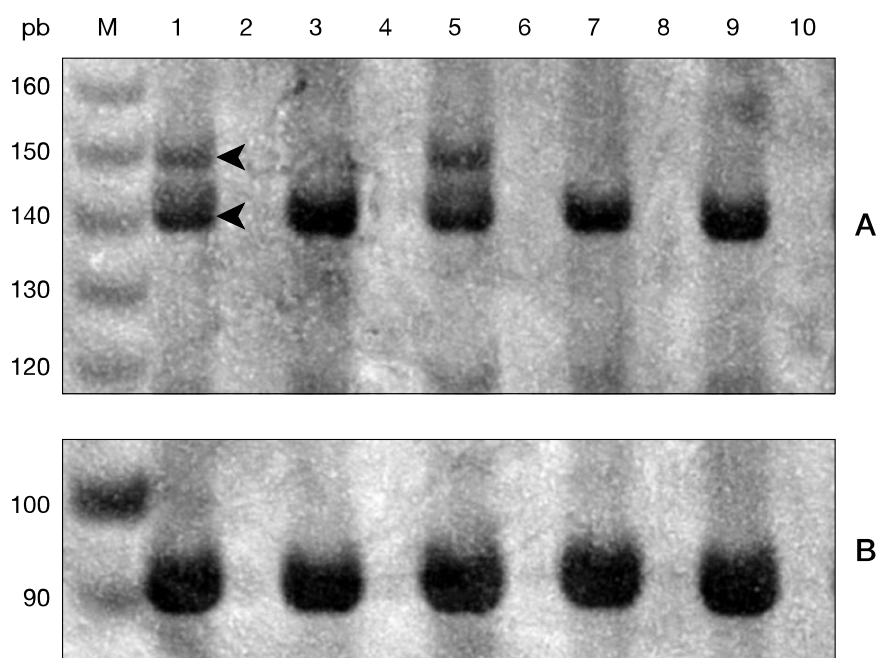
Na kodonu 171 gena *prp* javljaju se tri polimorfizma, glutamin (Q), arginin (R) ili histidin (H). Utvrđivanjem tih polimorfizama jednostavno se može odrediti kojoj rizičnoj skupini ovce pripadaju. Određivanje polimorfizma kodona 171 gena *prp* postavljeno je kao alternativna metoda. Elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze utvrđeno je koji su parovi početnica doveli do stvaranja produkta, temeljem čega je utvrđen genotip. Pozitivna reakcija (produkt) s početnicom H171, Q171 ili R171 upućuje je na prisutnost odgovarajućeg alela. Rezultati koje smo na taj način dobili odgovaraju rezultatima sekvenciranja.



Slika 2. Određivanje polimorfizma kodona 171 gena *prp*. Elektroforezom proizvoda triju zasebnih reakcija (H, Q, R) određen je genotip polimorfizma kodona 171 za DNA 1-5 (1: R22 – Q/R, 2: R24 – Q/Q, 3: R26 – Q/R, 4: R27 – Q/Q i 5: R28 – Q/Q). Prisutnost produkta ukazuje na postojanje odgovarajućeg alela.

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (ARMS-PCR) ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA KODONA 136, 154 I 171 GENA *PRP*

Određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 daje potpunu sliku o osjetljivosti ili rezistenciji ovaca na grebež. Jedna mogućnost je sve polimorfizme odrediti sekvenciranjem gena, a ova metoda uz dodatnu optimizaciju može poslužiti kao potpuna zamjena za sekvenciranje. Elektroforezom u gelu poliakrilamida razlikovali su se aleli umnoženi lančanom reakcijom polimerazom. U reakcijama u kojima je korištena V mix kombinacija početnica nije došlo do stvaranja produkta. Na kodonu 136 pojavljuje se samo alanin (A). Na kodonu 171 moguće je razlikovati homozigote od heterozigota (Slika 3.A) što odgovara rezultatima sekvenciranja. Određivanje polimorfizma kodona 154 (Slika 3.B) nije uspjelo, jer nije moguće razlikovati homozigote od heterozigota.



Slika 3. Utvrđivanje genotipa za polimorfizam *prp* gena elektroforezom produkata lančane reakcije polimerazom u 8%-tnom gelu poliakrilamida. Linija 1: biljeg; broj s lijeve strane odgovara broju parova baza (pb), Linije 1, 3, 5, 7, 9 - A mix (A136, H154, R154, H171, Q171 i R171), Linije 2, 4, 6, 8 - V mix (V136, H154, R154, H171, Q171 i R171). Produkti s A odnosno V mix-om ukazuju na odgovarajući genotip za polimorfizam kodona 136. (A) Polimorfizam kodona 171. Strelice označavaju poziciju vrpce heterozigotnog alela (Q171-146 pb, R171-150 pb). (B) Polimorfizam kodona 154 nije moguće utvrditi iz gela, zbog preklapanja signala različitih alela uslijed prevelike količine PCR produkta.

Iskušali smo tri različite metode za utvrđivanje polimorfizama gena *prp* u ovaca. Sekvenciranje je korišteno kao standardna metoda kojom se pouzdano određuje genotip. Druge dvije metode vrlo su jednostavne i mogle bi biti korištene u rutinskoj analizi uzoraka u mnogim laboratorijima. Određujući polimorfizme *prp* gena pronašli smo da se na kodonu 136 javlja samo alanin (A), na kodonu 154 javljaju se dva polimorfizma arginin (R) i arginin (R)/histidin (H) i na kodonu 171 se javljaju dva polimorfizma, glutamin (Q) i glutamin (Q)/arginin (R).

Proučavajući polimorfizme na kodonima 136, 154 i 171 pronašli smo tri različita genotipa. Od ukupno 16 ovaca, osam ih je imalo genotip ARQ/ARQ, četiri ARQ/AHQ i četiri ARQ/ARR.

Utvrđeni genotip dalmatinsku pramenku svrstava u skupinu koja nije osobito genetski otporna prema grebežu ovaca. Potrebno je usmjeriti pažnju na selekcijski uzgoj kako bi se smanjio rizik od pojave bolesti.

Tablica 1. Genotip istraživanih jedinki utvrđen sekvenciranjem. Iz rezultata tri polimorfne pozicije mogao se zaključiti haplotip. Rezultati sekvenciranja korišteni su kao standard za provjeru ostalih metoda.

DNA	No	136	154	171	Haplotip
R13	1	A	R	Q	ARQ/ARQ
R18	2	A	R/H	Q	ARQ/AHQ
R19	3	A	R/H	Q	ARQ/AHQ
R20	4	A	R	Q	ARQ/ARQ
R21	5	A	R	Q/R	ARQ/ARR
R22	6	A	R	Q/R	ARQ/ARR
R24	7	A	R	Q	ARQ/ARQ
R26	8	A	R	Q/R	ARQ/ARR
R27	9	A	R	Q	ARQ/ARQ
R28	10	A	R	Q	ARQ/ARQ
R29	11	A	R/H	Q	ARQ/AHQ
R31	12	A	R	Q/R	ARQ/ARR
R33	14	A	R	Q	ARQ/ARQ
R40	16	A	R	Q	ARQ/ARQ
R25	20	A	R/H	Q	ARQ/AHQ
O12	21	A	R	Q	ARQ/ARQ

RASPRAVA

Izolacija DNA iz krvi je izvor polaznog materijala za sve daljnje postupke određivanja polimorfizama gena *prp*. Za izolaciju DNA iz ljudske krvi opisane su brojne metode (MILLER i sur., 1988, LAHIRI i NURNBERG, 1991, LAHIRI i SCHNABEL, 1993) koje se osnivaju na uklanjanju eritrocita osmotskim šokom, deproteinaciji taloga leukocita izoliranjem i taloženju DNA etanolom ili 2-propanolom. Idealna metoda trebala bi biti brza, jednostavno izvediva, ekonomična, ekološki sigurna i davati dobre rezultate s obzirom na koncentraciju i integritet izolirane DNA. Na tržištu postoje brojni komercijalni kitovi kojima se postupak izolacije DNA znatno ubrzava i pojednostavljuje, međutim zbog ekonomičnosti pristupilo se ispitivanju tri klasična protokola korištena u humanoj medicini. Sve iskušane metode omogućile su dobivanje upotrebljivih izolata, međutim znatno se razlikuju po potrebi za skupim reagensima (proteinaza K) i po vremenu potrebnom za izolaciju (1-16 sati). Kao najbolja se pokazala modificirana metoda LAHIRIA i SCHNABELA (1993), koja isključuje korištenje enzima i toksičnih kemikalija, relativno je brza, jednostavna i vrlo ekonomična. Izolirana DNA bila je zadovoljavajuće kvalitete i mogla je poslužiti kao kalup za lančanu reakciju polimerazom.

Genotip ovaca s obzirom na polimorfizme kodona 136, 154 i 171 gena *prp* utvrđen je određivanjem slijeda nukleotida - sekvenciranjem. Sekvenciranje je predstavljalo standardnu metodu, s obzirom da je dobro opisano u brojnim radovima koji se bave genotipizacijom ovčjeg prionskog proteina (BAYLIS i sur., 2000, BUITKAMP i SEMMER, 2004, GOLDMANN i sur., 2005, GOMBOJAV i sur., 2003).

Kako bi se cijeli postupak genotipizacije mogao u potpunosti provesti korištenjem dostupne opreme, bez potrebe za uslugom sekvenciranja koju u pravilu pružaju samo specijalizirani laboratoriji, pristupilo se razvoju alternativnih metoda, kojima bi se ciljano mogao ispitati genotip na određenim polimorfnim lokusima bez potrebe za određivanjem čitave sekvence.

Polimorfizam kodona 171 gena *prp* određen je metodom ARMS-PCR (NEWTON i sur., 1989). Metoda se temelji na produljivanju samo one početnice koja se u potpunosti komplementarno sparuje sa ciljanom sekvencom na svojem 3' kraju. Ova metoda se pokazala puno jednostavnijom, bržom i ekonomičnijom od sekvenciranja. Iako metoda ne daje uvid u polimorfizme sva tri kodona, određivanjem polimorfizma kodona 171 vrlo jednostavno se može razlučiti u koju rizičnu skupinu (DEFRA, 2001) ovce pripadaju te na taj način može poslužiti kao smjernica za eventualni selektivni uzgoj ovaca otpornih prema grebežu i smanjiti rizik pojave bolesti. U slučaju potrebe za ovakvim određivanjem genotipa sva tri polimorfna lokusa, bilo bi razmjerno jednostavno na istom principu uspostaviti odgovarajući test. U ovom radu je umjesto toga iskušana nešto složenija metoda, kojom bi se kroz manji broj reakcija istovremeno mogao odrediti genotip za više polimorfnih lokusa.

Za istovremeno određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 pokušao je razvoj metode koja bi bila potpuna alternativa sekvenciranju. Prednost ove metode je u tome što je učinkovita, ekonomična i lako izvediva i u manjim laboratorijima. Metoda je ustanovljena prema principu kojeg su opisali BUITKAMP I SEMMER (2004), koristeći sekvence početnica koje su navedeni autori opisali, međutim princip utvrđivanja genotipa značajno se razlikuje s obzirom da se umjesto fluorescentno obilježenih početnica i kapilarne elektroforeze s automatskim detektorom koristi elektroforeza u gelu poliakrilamida i bojenje srebrom. Rezultati dobiveni ovom metodom za polimorfizme kodona 136 i 171 u potpunosti odgovaraju rezultatima sekvenciranja. Metodu je ipak potrebno dodatno optimizirati, jer na kodonu 154 nije moguće razlikovati homozigote od heterozigota. S obzirom da je princip uspješno potvrđen za dva od tri lokusa, vjerojatno se radi o koncentraciji početnica H154 i R154 koju treba prilagoditi kako bi se postigla optimalna koncentracija produkta PCR za razlučivanje elektroforezom u gelu poliakrilamida.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju učestalost tri genotipa u dalmatinske pramenke, 50% ovaca ima genotip ARQ/ARQ, 25% ARQ/AHQ i 25% ARQ/ARR. Prema podacima programa kontrole grebeži ovaca Velike Britanije sva tri genotipa pripadaju skupini ovaca koje su osjetljive prema grebežu. S obzirom na to da naše ovce nisu prirodno otporne prema bolesti, iznenađujuća je činjenica da grebež nije opisan u Hrvatskoj (ŠOŠTARIĆ, 2000). Grebež je zarazna bolest koja se javlja kada infektivan uzročnik dođe u dodir s genetski primljivim ovcama, stoga je za pretpostaviti da bolest nije opisana iz tog razloga što ovce nisu bile u kontaktu s uzročnikom.

Prema istraživanju BAYLISA i sur. (2004) rizik za pojavu bolesti u britanskih ovaca najveći je kod ovaca genotipa VRQ/VRQ, ali učestalost tog genotipa je vrlo rijetka. Genotip ARQ/ARR pojavljuje se u 28% ovaca oboljelih od grebeža, genotip ARQ/ARH u 1,6% ovaca, a genotip ARQ/ARQ u 12% ovaca. ACUTIS i sur. (2004) navode da u talijanske pasmine ovaca biellese učestalost ARQ/ARQ genotipa iznosi 56.3%, ARQ/AHQ 5.5%, a genotipa ARQ/ARR 10.1%.

Određivanje polimorfizama *prp* gena u ovaca provodi se diljem svijeta, proučeno je više od 80 pasmina ovaca u Europi, Americi i Aziji (GOLDMANN i sur., 2005). Osjetljivost prema grebežu treba razmatrati individualno za svaku pasminu. U ovaca pasmine suffolk *prp* genotip ARQ/ARQ predstavlja najveću predispoziciju za bolest. Kod ovaca pasmine cheviot genotip ARQ/ARQ i ARR/VRQ uvjetuje otpornost prema bolesti. Genotip VRQ/ARR ovaca pasmine romanovska uvjetuje otpornost, a genotip ARQ/ARQ primljivost. U ovaca pasmine texel genotip ARR/VRQ i ARQ/ARQ uvjetuje primljivost prema grebežu (BAYLIS i sur., 2004).

Kako bi se dobio uvid u stvarno stanje situacije u Hrvatskoj ovakvim istraživanjem trebalo bi obuhvatiti sve hrvatske izvorne pasmine ovaca.

ZAKLJUČCI

Modificirana metoda brze izolacije DNA bez proteinaze K rezultirala je zadovoljavajućom količinom i kvalitetom DNA i može biti korištena u daljnjim istraživanjima.

Za određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 gena *prp* postavljene su tri metode. Sekvenciranje kao standardna metoda i dvije alternativne metode.

1. Lančana reakcija polimerazom za određivanje polimorfizma kodona 171 gena *prp* čiji su rezultati odgovarali rezultatima sekvenciranja. Metoda je učinkovita, jednostavno izvediva i brza i daje informaciju o tome u koju rizičnu skupinu genotipa ovce pripadaju.
2. Lančana reakcija polimerazom za istovremeno određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 gena *prp*. Za polimorfizme na kodonima 136 i 171 gena *prp* rezultat je odgovarao rezultatima sekvenciranja. Polimorfizam na kodonu 154 nije se mogao jasno očitati, odnosno nije bilo moguće razlikovati homozigote od heterozigota i zbog toga metodu treba dodatno optimizirati kako bi mogla poslužiti kao potpuna zamjena za sekvenciranje.

Genotipizacijom ovaca pasmine dalmatinska pramenka utvrđena su tri genotipa, ARQ/ARQ, ARQ/AHQ i ARQ/ARR. Takav genotip uvjetuje osjetljivost prema grebežu. Kako bi se spriječila pojava bolesti potrebno je onemogućiti direktni dodir ovaca sa infektivnim uzročnikom te posvetiti pažnju u uzgojnom programu kako ne bi došlo do nastajanja genetski vrlo primljivih potomaka.

Daljnja istraživanja provesti na većem uzorku te napraviti usporedbu sa svim izvornim hrvatskim pasminama ovaca.

Zahvaljujem prof.dr.sc .Miljenku Šimpragi što mi je omogućio sudjelovanje u ovom istraživačkom projektu.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Aleksandru Vojti na strpljenju, razumijevanju i nesebičnoj pomoći koju mi je pružio tijekom izrade ovoga rada.

POPIS LITERATURE:

ACUTIS, P. L., L. SBAIZ, F. VERBURG, M. V. RIINA, G. RU, G. MODA, M. CARAMELLI, A. BOSSERS (2004): Low frequency of scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. *Journal of General Virology*. 85, 3165-3172.

BAYLIS, M., F. HOUSTON, W. GOLDMANN, N. HUNTER, A. R. McLEAN (2000): The signature of scrapie: differences in the PrP genotype profile of scrapie-affected and scrapie-free UK sheep flocks. *Proc. R. Soc. Lond.* 267, 2029-2035.

BAYLIS, M., C. CHIHOTA, E. STEVENSON, W. GOLDMANN, A. SMITH, K. SIVAM, S. TONGUE, M. B. GRAVENOR (2004): Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *Journal of General Virology*. 85, 2735-2740.

BELT, P. B. G. M., I. H. MUILEMAN, B. E. C. SCHREUDER, J. B. De RUIJTER, A. L. J. GIELKENS, M. A. SMITS (1995): Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural Scrapie. *Journal of General Virology*. 76, 509-517.

BOSSERS, A., P. B. M. BELT, G. J. RAYMOND, B. CAUGHEY, R. DE VRIES, M. A. SMITS (1997): Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4931-4936.

BUITKAMP, J., J. SEMMER (2004): A robust, low- to medium-throughput *prnp* genotyping system in sheep. *BMC Infectious Diseases*. 4, 30.

COSIER, V., A. VLAIC, I. PADEANU, S. DARABAN, S. VOIA, C. CATOI, R. CONSTANTINESCU, G. VICOVAN (2008): The primer extension technique for the polymorphisms detection at ovine prn-p locus. *Zootehnie si Biotehnologii*. 41, 40-44.

CVETNIĆ, S. (2005): Scrapie. U: *Virusne bolesti životinja*. Školska knjiga, Zagreb, 237-241.

DAWSON, M., R. C. MOOR, S. C. BISHOP (2008): Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet. Res.* 39, 25.

DEFRA (2001): National Scrapie Plan for Great Britain. Schemes Brochure, pp. 1–28. London: Department for Environment, Food and Rural Affairs.

EGHIAIAN, F., J. GROSCLAUDE, S. LESCEU, P. DEBEY, B. DOUBLET, E. TREGUER, H. RETAEI, M. KNOSSOW (2004): Insight into the PrPc – PrPsc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. PNAS. 101, 10254-10259.

GOLDMAN, W., M. BAYLIS, C. CHIHOTA, E. STEVENSON, N. HUNTER (2005): Frequencies of *PrP* gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. Journal of Applied Microbiology. 98, 294-1302.

GOMBOJAV, A., N. ISHIGURO, M. MORIUCHI, D. SERJMYADAG, B. BYAMBAA, M. SHINAGAWA (2003): Amino Acid Polymorphisms of PrP Gene in Mongolian Sheep. J. Vet. Med. Sci. 65, 75-81.

GOMBOJAV, A., N. ISHIGURO, M. HORIUCHI, M. SHINAGAWA (2004): Unique Amino Acid Polymorphisms of PrP Genes in Mongolian Sheep Breeds. J. Vet. Med. Sci. 66, 1293-1295.

HUNTER, N. (2003): Scrapie and experimental BSE in sheep. British Medical Bulletin. 66, 171-183.

JI, Y. T., C. Q. QU, B. Y. CAO (2007): An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 28, 1173-1175.

LAHIRI D. K., J. I. NURNBERG (1991): A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acid Research. 19, 5444.

LAHIRI D. K., B. SCHNABEL (1993): DNA Isolation by a Rapid Method from Human Blood Samples: Effects of MgCl₂, EDTA, Storage Time and Temperature on DNA Yield and Quality. Biochemical Genetics. 31, 321-328.

MILLER, S. A., D. D. DYKES, H. F. POLESKY (1998): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16, 1215.

NEWTON, C. R., A. GRAHAM, L. E. HEPTINSTALL, S. J. POWEL, C. SUMMERS, N. KALSHEKER, J. C. SMITH, A. F. MARKHAM (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research. 17, 2503-2516.

SHIMADA K., H. K. HAYASHI, Y. OOKUBO, Y. IWAMARU, M. IMAMURA, M. TAKATA, M. J. SCHMERR, M. SHINAGAWA, T. YOKOYAMA (2005): Rapid PrP Detection in Lymphoid Tissue and Application to Scrapie Surveillance of Fallen Stock in Japan: Variable PrP Accumulation in Palatal Tonsil in Natural Scrapie. *Microbiol. Immunol.* 49, 801-804.

ŠOŠTARIĆ, B., Z. LIPEJ, S. ŠEPAROVIĆ (2000): Transmisivne spongiformne encefalopatije. U: Preventiva, dijagnostika i kontrola govede spongiformne encefalopatije, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.

TKAČIKOVA, L., E. HANUŠOVSKA, M. NOVAK, M. ARVAYOVA, I. MIKULA (2003): The PrP Genotype of Sheep of the Improved Valachian Breed. *Folia Microbiol.* 48, 269-276.

TRANULIS, M. A. (2002): Influence of the prion protein gene, Prnp, on scrapie susceptibility in sheep. *APMIS*, 110, 33-43.

WEISSMANN, C. (1996): Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Letters*, 389, 3-11.

SAŽETAK

KATARINA ŠPIRANEC: Određivanje osjetljivosti ovaca hrvatske izvorne pasmine dalmatinska pramenka na grebež (scrapie) analizom gena *prp* za prionski protein

Osjetljivost ovaca prema grebežu povezana je s polimorfizmima prionskog gena *prp*. Istraženi su polimorfizmi prionskog gena s obzirom na kodone 136, 154 i 171 kako bi se procijenila osjetljivost pasmine dalmatinska pramenka na grebež ovaca. Kao rezultat ustanovljena su tri različita genotipa. Nađeni genotipovi pripadaju skupini koja uvjetuje osjetljivost na bolest.

Genomska DNA izolirana je iz krvi ovaca, dio egzona 3 koji kodira amino kiseline 47 do 246 prionskog proteina umnožen je lančanom reakcijom polimerazom i sekvenciran. Kako bi se cijeli postupak genotipizacije mogao u potpunosti provesti korištenjem dostupne opreme pristupilo se razvoju alternativnih metoda. Polimorfizam kodona 171 gena *prp* određen je metodom ARMS-PCR. Za istovremeno određivanje polimorfizama kodona 136, 154 i 171 pokušao je razvoj metode koja bi bila potpuna alternativa sekvenciranju.

Ključne riječi: *prion, grebež ovaca, dalmatinska pramenka, polimorfizam*

SUMMARY

KATARINA ŠPIRANEC: Determination of sensitivity of Croatian indigenous sheep breed dalmatian pramenka to scrapie by analysis of the gene *prp* encoding prion protein

Sensitivity of sheep to scrapie is associated with polymorphisms of the prion gene *prp*. Prion protein gene was genotyped to investigate polymorphisms at scrapie-associated codons 136, 154 and 171 to assess the natural resistance sheep breed dalmatian pramenka to scrapie. As a result, we established three different genotypes. Found genotypes belong to the group which confers low-grade genetic resistance. DNA was isolated from sheep blood, and part of the exon 3 encoding amino acids 47 to 246 of the prion protein was amplified by polymerase chain reaction and sequenced. In order to completely establish the process of genotyping using the available equipment, new methods have been developed. Polymorphism of the codon 171 was determined by ARMS-PCR. To simultaneously determine the polymorphisms of codons 136, 154 and 171 we attempted to develop methods that would be a complete alternative to sequencing.

Key words: *prion, scrapie, dalmatian pramenka, polymorphisms*

ŽIVOTOPIS

Rodena sam u Zagrebu 08. rujna 1986. godine. Veterinarski fakultet u Zagrebu upisala sam 2004. godine. Tijekom studija obavljala sam dužnost demonstratora u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju u razdoblju od 2006. – 2009. godine. Za vrijeme studija volontirala sam u Veterinarskoj ambulanti Trias d.o.o. u razdoblju od 2002.-2009. godine.

Povodom dana Veterinarskog fakulteta 2006., 2007. i 2008. godine nagrađena sam kao najbolja studentica u svojoj generaciji. Dodijeljena mi je i Godišnja nagrada *Veterine d.d.* za 2008. godinu za postignuća ostvarena za vrijeme studiranja i perspektivu za daljnji razvoj unutar struke.

Maturirala sam 2004. godine u Gimnaziji Bjelovar, a osnovnu školu završila sam 2000. godine. Pohađala sam i osnovnu glazbenu školu Vatroslav Lisinski u Bjelovaru u razdoblju od 1994.-2000. godine.