T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN HİZMET KÖPEKLERİNDE KALÇA DİSPLAZİSİ İLE İLİŞKİLİ GENETİK MARKIRLARIN ARAŞTIRILMASI

SERTAÇ ATALAY

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI

Doç.Dr.Süleyman KÖK

EDİRNE-2020

Sertaç ATALAY'ın hazırladığı "TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN HİZMET KÖPEKLERİNDE KALÇA DİSPLAZİSİ İLE İLİŞKİLİ GENETİK MARKIRLARIN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Doç.Dr. Süleyman KÖK	……
Prof.Dr. Eser Kemal GÜRCAN	……
Prof.Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR	……
Doç.Dr. İsmail KILIÇ	……
Doç.Dr. Selçuk KAPLAN	……

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2020

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Süleyman KÖK

Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

01 / 07 / 2020

Sertaç ATALAY

Doktora Tezi

Türkiye'de Üretilen Hizmet Köpeklerinde Kalça Displazisi İle İlişkili Genetik Markırların Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Gelişimsel ortopedik bir hastalık olan kalça displazisi, kalıtsal ve çevresel faktörlerin etkisi ile meydana gelir. Hem insanlarda hem de köpeklerde yaygın olarak görülmesine rağmen hastalığın genetik arka planı aydınlatılamamıştır. Köpek kalça displazisine (KKD) karşı, fenotipe dayanan seleksiyon programları uzun yıllarca uygulanmış olsa da istenilen başarı elde edilememiştir. Günümüzde, kalça displazisini erken teşhis edebilecek bir DNA testi geliştirmek için, hastalığa neden olan genetik lokuslar tespit edilmeye çalışılmaktadır.

Bu araştırmada, KKD hastalığın gelişimi ile ilişkili olabilecek genetik varyasyonları tespit etmek için, bir vaka kontrol çalışması tasarlanmıştır. Türkiye'de hizmet köpeği olarak yetiştirilen, 53 adet Labrador Retriever (17 vaka, 36 kontrol), 63 adet Belçika Malinois (14 vaka, 49 kontrol) ve 56 adet Alman Çoban Köpeği (24 vaka ve 32 kontrol) araştırma kapsamına dahil edilmiştir.

Moleküler genetik analizler yapılmak üzere, KKD hastalığının gelişimi ile ilişkili olabilecek 5 gen belirlenmiştir (CX3CR1, CHST3, OSTF1, IBSP, FGF12). Seçilen bu genlerden, CX3CR1 geninin 2. ekson ve 3' UTR bölgeleri DNA dizi analizi metodu ile araştırılarak varyasyonlar tespit edilmiştir. Diğer genler üzerinde ise, KKD gelişimi ile ilişkili olduğu, daha önce farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiş olan 5 adet TNP (CHST3 geni 5' UTR'de rs24076746 ve 3' UTR'de rs24105396, OSFT1 geni 4. intronda rs8995004, IBSP geni 3. intronda rs23759713 ve FGF12 geni 3. intronda rs851690466) RFLP metodu ile araştırılmıştır. Haplotiplerin belirlenmesi, miRNA bağlanma bölgelerinin tespit edilmesi ve TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığının gelişimi

üzerine etkileri, biyoinformatik metotlar ile araştırılmıştır. Ki-kare değerleri, olabilirlik oranı (OR) ve %95 güven aralığı (GA) lojistik regresyon analizi ile hesaplanmıştır.

CX3CR1 geninin 2. ekson bölgesinde varyasyon bulunamamıştır, 3' UTR bölgesinde ise 8 varyasyon (6 TNP, 1 insersiyon, 1 delesyon) tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, rs9022770 G>A ve rs9022769 G>A TNP'lerinin Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD gelişimi ile ilişkili ($p<0,05$) olduğu görülmüştür. Diğer iki köpek ırkında ise bireysel olarak varyasyonlar ile hastalık arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Belçika Malinois ırkı köpeklerde, rs9022770 G>A TNP'si için A allelinin, $p=0,002$ anlamlılık düzeyinde patojen allel olduğu (OR=13,091, %95 GA=2,474-69,264) belirlenmiştir. rs9022769 G>A TNP'si için ise G allelinin $p=0,011$ anlamlılık düzeyinde patojen allel olduğu (OR=3,333, %95 GA=1,279-8,688) hesaplanmıştır. CX3CR1 rs9022769/rs852431030 TNP'lerinin oluşturduğu GT haplotipinin, $p=0,022$ anlamlılık düzeyinde patojen haplotip olduğu (OR=6,222, %95 GA=1,280-30,243) belirlenmiştir. Araştırılan diğer köpek ırklarında, oluşan haplotipler ile KKD gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

Önceki araştırmacıların, KKD gelişimi ile ilişkili olduğunu rapor ettikleri 5 TNP'den sadece bir tanesi, IBSP geni 3. introndaki rs23759713 C>T TNP'si, Alman Çoban Köpeklerinde KKD gelişimi ile ilişkili bulunarak desteklenmiştir. rs23759713-T allelinin $p=0,026$ anlamlılık düzeyinde koruyucu allel olduğu (OR=0,207, %95 GA=0,048-0,891) belirlenmiştir. Diğer 4 TNP'nin (rs24076746, rs24105396, rs8995004, rs851690466) KKD gelişimi ile ilişkisi bulunamamıştır.

Araştırmamız sonucunda, KKD gelişimi ile ilişkili olduğunu bulduğumuz CX3CR1 geninin 3' UTR polimorfizmlerinin (rs9022770, rs9022769), farklı köpek popülasyonlarında da çalışılıp doğrulandıktan sonra, KKD hastalığına karşı uygulanacak markör destekli seleksiyon (MAS) programlarına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. IBSP geni 3. intronundaki rs23759713 TNP'sinin ise KKD gelişimi ile ilişkisi çalışmamızda da desteklenmiştir. Araştırmamız, hem KKD hastalığın genetik arka planını aydınlatmak için, hem de MAS çalışmaları için faydalı olabilecek veriler sunmaktadır.

Yıl : 2020

Sayfa Sayısı : 219

Anahtar Kelimeler : Köpek Kalça Displazisi, CX3CR1, IBSP, OSTF1, CHST3, FGF12, Polimorfizm, Genetik Markır

PhD Thesis

Investigation of Genetic Markers Associated with Canine Hip Dysplasia in Service Dogs in Turkey

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Hip dysplasia, a developmental orthopedic disease, occurs with the influence of hereditary and environmental factors. Although it is common in both humans and dogs, the genetic background of the disease has not been elucidated. Although the selection programs based on phenotype against canine hip dysplasia (CHD) have been applied for many years, the desired success has not been achieved. Today, to develop a DNA test that can diagnose hip dysplasia early, the disease causing genetic loci are being identified.

In this study, a case-control study was designed to detect genetic variations that may be associated with the development of CHD disease. Breding as service dogs in Turkey, 53 Labrador Retrievers (17 case, 36 control), 63 Belgian Malinois (14 case, 49 control) and German Shepherd 56 (24 case ve 32 control) were included in the study.

5 genes (CX3CR1, CHST3, OSTF1, IBSP, FGF12) that may be associated with the development of CHD have been determined for molecular genetic analysis. The exon 2 and 3' UTR regions of the CX3CR1 gene were investigated by DNA sequence analysis method and variations were determined. On other genes, it was investigated 5 SNP (CHST3 gene 5' UTR-rs24076746 ve 3' UTR-rs24105396, OSFT1 gene intron 4-rs8995004, IBSP gene intron 3-rs23759713 ve FGF12 gene intron 3-rs851690466) by RFLP method, which were previously reported by different researchers. Determination of haplotypes, determination of miRNA binding sites and the effects of SNP-SNP interactions on the development of CHD disease were investigated by bioinformatics methods. Chi square values, likelihood ratio (OR) and 95% confidence interval (GA) were calculated by logistic regression analysis.

No variation was found in the exon 2 region of the CX3CR1 gene, while 8 variations (6 SNP, 1 insersion, 1 deletion) were detected in the 3' UTR region. As a result of the statistical evaluations, it was found that rs9022770 G> A and rs9022769 G> A SNPs were associated with the development of CHD in Belgian Malinois breed dogs ($p < 0.05$). In the other two breeds of dogs, there was no statistically significant relationship between individual variations and the disease. In the Belgian Malinois breed, the G allele for rs9022770 G> A SNP was determined to be the pathogen allele (OR=13,091, %95 GA=2,474-69,264) at the significance level of $p = 0.002$. For the G> A SNP of rs9022769, the G allele was calculated to be the pathogen allele (OR=3,333, %95 GA=1,279-8,688) at the significance level of $p = 0.011$. The GT haplotype formed by the CX3CR1 rs9022769 / rs852431030 SNPs was determined to be a pathogen haplotype (OR=6,222, %95 GA=1,280-30,243-0,891) with a significance level of $p = 0.022$. In other dog breeds investigated, a statistically significant relationship could not be detected between the resulting haplotypes and the development of CHD.

Only one of the 5 SNPs that previous researchers reported was associated with the development of CHD, the rs23759713 C> T SNP in the IBSP gene intron 3 was supported by being associated with the development of CHD in German Shepherd Dogs. It was determined that the rs23759713-T allele was a protective allele (OR=0,207, %95 GA=0,048-0,891) at the level of $p = 0.026$. The other 4 SNPs (rs24076746, rs24105396, rs8995004, rs851690466) have not been associated with the development of CHD.

As a result of our research, we think that the 3' UTR polymorphisms (rs9022770, rs9022769) of the CX3CR1 gene, which we found to be associated with the development of CHD, will contribute to marker assised selection (MAS) programs to be applied against CHD disease. The relation of rs23759713 SNP in the intron 3 of the IBSP gene with the development of CHD was also supported in our study. Our research results provide data that can be useful both for illuminating the genetic background of CHD disease and for MAS studies.

Year : 2020

Number of Pages : 219

Keywords : Canine Hip Dysplasia, CX3CR1, IBSP, OSTF1, CHST3, FGF12, Polymorphism, Genetic Marker

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim doktora eğitimim süresince beni yönlendiren ve çok değerli katkıları olan danışmanım sayın Doç. Dr. Süleyman KÖK (T.Ü. Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) başta olmak üzere bilimsel katkı ve yönlendirmelerinden dolayı sayın Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a (T.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı), sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a (T.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) ve sayın Doç. Dr. İsmail KILIÇ'a (T.Ü. Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı), finansal olarak desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje Numarası: 2018/139) ve bu süreçte bana destek olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vii
TEŞEKKÜR x
İÇİNDEKİLER xi
SİMGELER DİZİNİ xvii
KISALTMALAR DİZİNİ xviii
ŞEKİLLER DİZİNİ xxii
ÇİZELGELER DİZİNİ xxix
EKLER DİZİNİ xxx
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ VE AMAÇ 1
BÖLÜM 2 6
GENEL BİLGİLER 6
2.1 Köpeğin Kökeni, Taksonomisi ve Evcilleştirilmesi 6
2.2 Hizmet Köpekleri 11
2.3 Köpek Kalça Displazisi (KKD) 13
2.3.1 Teşhis 17
2.3.2 Tedavi 22
2.3.3 Islah 24
2.3.4 KKD Gelişimi İle İlişkili Genetik Markır Araştırmaları 25
2.3.4.1 Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 27
2.3.4.2 Üçüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 28

2.3.4.3 Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 28
2.3.4.4 Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 29
2.3.4.5 Yedinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 29
2.3.4.6 Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 30
2.3.4.7 Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 30
2.3.4.8 Onuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 30
2.3.4.9 On Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 31
2.3.4.10 On İkinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 31
2.3.4.11 On Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 31
2.3.4.12 On Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 31
2.3.4.13 On Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 32
2.3.4.14 On Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 32
2.3.4.15 Yirminci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 32
2.3.4.16 Yirmi Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 33
2.3.4.17 Yirmi Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 33
2.3.4.18 Yirmi Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 33
2.3.4.19 Yirmi Altıncı Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 35
2.3.4.20 Yirmi Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 35
2.3.4.21 Yirmi Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 35
2.3.4.22 Otuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 36
2.3.4.23 Otuz İkinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 36
2.3.4.24 Otuz Üçüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 37
2.3.4.25 Otuz Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 37
2.3.4.26 Otuz Altıncı Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 38
2.3.4.27 Otuz Yedinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar 38
2.4 İnsan ve Köpek Kalça Dispalizisinin Ortak Değerlendirilmesi 39

2.4.1 CX3CR1 (C-X3-C Motifli Kemokin Reseptör 1) Geni 43
BÖLÜM 3 46
MATERYAL VE YÖNTEM 46
3.1 Materyal 46
3.2 DNA Ekstraksiyonu 46
3.3 DNA Dizi Analizi Metodu İle CX3CR1 Genindeki Varyasyonların Araştırılması 47
3.3.1 CX3CR1 Geninin 2. Ekson ve 3' UTR Bölgelerini Çoğaltılacak Primerlerin Tasarlanması 47
3.3.2 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 50
3.3.3 Örneklerin DNA Dizi Analiz Cihazına Yüklenmesi 50
3.3.4 DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 51
3.4 PCR-RFLP Metodu İle TNP Araştırılması 52
3.4.1 CHST3 Geni 52
3.4.1.1 rs24076746 C>T TNP'sinin Bulunduğu Bölgeyi Çoğaltacak Primerlerin Tasarlanması 52
3.4.1.2 C ve T Allellerini Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Belirlenmesi 53
3.4.1.3 rs24105396 A>G TNP'sinin Bulunduğu Bölgeyi Çoğaltacak Primerlerin Tasarlanması 57
3.4.1.4 A ve G Allellerini Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Belirlenmesi 57
3.5 OSTF1 Geni, rs8995004 A>G TNP'sinin RFLP Metodu İle Genotiplendirilmesi 61
3.6 IBSP Geni, rs23759713 C>T TNP'si 64
3.7 FGF12 Geni, rs851690466 T>G TNP'si 68
3.8 Verilerin İstatiksel Analizi 71

3.8.1 Hardy Weinberg Dengesi 71
3.8.2 Genotiplerin ve Allellerin KKD Hastalığı İle İlişkisinin Araştırılması 71
3.8.3 Haplotip Bloklarının KKD Hastalığı İle İlişkisinin Araştırılması 72
3.8.4 İki Boyutlu TNP-TNP Etkileşimleri İle İlişki Testi 72
3.8.5 miRNA Bağlanma Bölgelerinin Tahmin Edilmesi ve TNP'ler İle İlişkilerinin Araştırılması 73
BÖLÜM 4 74
SONUÇLAR 74
4.1 CX3CR1 Geninde Tespit Edilen Varyasyonlar 74
4.1.1 Tespit Edilen Polimorfizmlerin Varyasyon Veri Tabanlarında Araştırılması 76
4.1.2 CC/-- İnsersiyonunun (rs851814810) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 76
4.1.3 CC İnsersiyonun (rs851814810) KKD İle İlişkisi 78
4.1.4 G>A TNP'sinin (rs9022770) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 80
4.1.5 G>A TNP'sinin (rs9022770) KKD İle İlişkisi 82
4.1.6 G>A TNP'sinin (rs9022769) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 84
4.1.7 G>A TNP'sinin (rs9022769) KKD İle İlişkisi 85
4.1.8 AA Delesyonunun Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 87
4.1.9 AA Delesyonunun KKD İle İlişkisi 88
4.1.10 T>G TNP'sinin (rs852431030) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 89
4.1.11 T>G TNP'sinin (rs852431030) KKD İle İlişkisi 91
4.1.12 T>C TNP'sinin (rs852569240) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 93
4.1.13 T>C TNP'sinin (rs852569240) KKD İle İlişkisi 94
4.1.14 A>G TNP'sinin (rs851634517) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 96
4.1.15 A>G TNP'sinin (rs851634517) KKD İle İlişkisi 97
4.1.16 C>T TNP'sinin (rs853018978) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 99

4.1.17 C>T TNP'sinin (rs853018978) KKD İle İlişkisi 101
4.2 CX3CR1 Geninde Tespit Edilen TNP'lerin Haplotiplerinin KKD İle İlişkisinin Araştırılması 103
4.2.1 Belçika Malinois Irkı Köpeklerde Haplotip Sonuçları 103
4.2.2 Labrador Retriever Irkı Köpekler 105
4.3 miRNA Bağlanma Bölgeleri Üzerindeki Varyasyonların KKD İle İlişkisi.... 106
4.4 CHST3 Geni C>T TNP'sinin (rs24076746) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 107
4.4.1 C>T TNP'sinin (rs24076746) KKD İle İlişkisi 109
4.5 CHST3 Geni A>G TNP'sinin (rs24105396) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 111
4.5.1 A>G TNP'sinin (rs24105396) KKD İle İlişkisi 113
4.6 OSTF1 Geni A>G TNP'sinin (rs8995004) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 115
4.6.1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD İle İlişkisi 117
4.7 IBSP Geni C>T TNP'sinin (rs23759713) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 119
4.7.1 C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD İle İlişkisi 121
4.8 FGF12 Geni T>G TNP'sinin (rs851690466) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı 123
4.9 İki Boyutlu TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı Arasındaki İlişki Analizi 123
4.9.1 Belçika Malinois Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi 123
4.9.2 Labrador Retriever Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi 125
4.9.3 AÇK Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi 128

BÖLÜM 5 129
TARTIŞMA 129
5.1 CX3CR1 Geni Varyasyonlarının KKD Hastalığı İle İlişkisi 129
5.2 CHST3 Geni Üzerindeki TNP'lerin KKD Hastalığı İle İlişkisi 133
5.3 OSTF1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD Hastalığı İle İlişkisi 136
5.4 IBSP C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD Hastalığı İle İlişkisi 138
5.5 FGF12 T>G TNP'sinin (rs851690466) KKD Hastalığı İle İlişkisi 140
KAYNAKLAR 143
ÖZGEÇMİŞ 186

SİMGELER DİZİNİ

A **:** Adenin

bp **:** Baz çifti

C **:** Sitozin

EtBr **:** Ethidium Bromür

G : Guanin

kb **:** Kilo baz

ml **:** Mililitre

ng **:** Nanogram

ºC **:** Santigrat derece

pmol **:** Pikomol

T **:** Timin

U **:** Ünite

V **:** Volt

µL **:** Mikrolitre

µM **:** Mikromolar

% **:** Yüzde değer

KISALTMALAR DİZİNİ

ABI3BP : ABI ailesi üyesi 3 bağlayıcı protein geni

ACVR2A : Aktivin A reseptörü tip 2A geni

AÇK : Alman Çoban Köpeği

ADAMTS17 : ADAM metallopeptidaz trombospondin tip 1 motif 17 geni

ARID1 : AT zengini etkileşim bölgesi 1B geni

ASB18 : Ankirin ve SOCS kutusu tekrarı içeren 18 geni

BVA : İngiliz Veterinerler Birliği

CDS1 : CDP-diaçilgliserol sentaz geni

CHERP : Kalsiyum homeostasis endoplazmik retikulum proteini geni

CHST3 : Karbonhidrat sülfotransferaz 3 geni

CHSY1 : Kondrotin sülfat sentaz 1 geni

CILP2 : Kıkırdak ara tabaka proteini geni

COL6A3 : Tip 6 kollejenin alfa 3 zinciri geni

CS : Kondroitin sülfat

CTBP2 : C-terminal bağlayıcı protein 2 geni

CTTNBP2 : Kort-aktin bağlayıcı protein 2 geni

CKK : Çekoslovakya Kurt Köpeği

CX3CL1 : C-X3-C motifli kemokin ligand 1 geni

CX3CR1 : C-X3-C motifli kemokin 1 reseptörü geni

DI : Distraksiyon indeksi

DPP4 : Dipeptidil peptidaz 4 geni

EPHA3 : EPH reseptör A3 geni

FCI : Uluslararası Kinoloji Federasyonu

FCN2 : Ficolin 2 geni

FGF : Fibroblast büyüme faktörü

FGF12 : Fibroblast büyüme faktörü 12 geni

FN1 : Fibronektin 1 geni

%95 GA : %95 Güven Aralığı

GKD : Gelişimsel kalça displazisi

HDAC4 : Histon deasetilaz 4 geni

HES6 : HES ailesi bHLH transkripsiyon faktörü 6 geni

IBSP : İntegrin bağlayıcı sialoprotein geni

INPP5D : İnositol polifosfat 5 fosfataz geni

INSL3 : insülin benzeri protein 3 geni

IQCA1 : IQ motif içeren AAA Bölgesi 1 geni

KKD : Köpek kalça displazisi

KLHL17 : Kelch benzeri protein ailesi üyesi 17 geni

KroP : Kromozom pozisyonu

KSR2 : Ras 2 proteinin kinaz supresörü 2 geni

LAMA2 : Laminin subunit alpha 2 geni

LD : Bağlantı dengesizliği

LOC487839 : Kreatin tip II sitoskeletal 8 pseudogen

LRR1 : Lösin zengini tekrar proteini 1 geni

LSM4 : U6 küçük nüklear RNA geni

LTF : Laktotransferin geni

MAS : Markır destekli seleksiyon

MKH : Mezenkimal kök hücre

MYPN : Miyopalladin geni

Na : Norberg Açısı

NPHP4 : Nefrosistin 4 geni

NSAI : Steroid olmayan antiinflamatuar

NWD1 : NACHT ve WD tekrar bölgesi içeren 1 geni

OFA : Hayvanlar İçin Ortopedi Vakfı

OLFM1 : Olfaktomedin 1 geni

OR : Odds ratio

OSTF1 : Osteoklast uyarıcı faktör 1 geni

PBX4 : PBX homeobox 4 geni

PennHIP : Pennsylvania Hip Improvement Program

PEX2 : Peroksizomal biyogenez faktörü 2 geni

PGM2 : Fosfoglukomutaz 2 geni

PON2 : Paraoksonaz 2 geni

PRKCE : Protein kinaz C epsilon geni

PTGDR : Prostoglandin D2 reseptör geni

QTL : Kantitatif özellik lokusu

RAB7A : RAS onkogen ailesi üyesi geni

RFLP : Restriksiyon endonükleaz fragment polimorfizm

RG : Referans genotip

rs : Referans TNP

SEMA5A : Semaforinin 5A geni

SH3BP4 : SH3 domain bağlayıcı protein 4 geni

SKI : SKI proto onkogen geni

SLC6A3 : Çözünür taşıyıcı aile 6 üye 3 geni

SMYD3 : SET ve MYDN alanı içeren 3 geni

SPP2 : Salgılanan fosfoprotein 2 geni

SRC : SRC proto-onkogen geni

TNP : Tek nükleotit polimorfizmi

TRIM2 : Üçlü motif içeren protein 2 geni

TRIO : Üçlü rho guanin değişim faktörü geni

VKR : Ventrodorsal Kalça Radyografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Köpekler, vücut boyutları, kafa boyutları ve şekilleri, tüy rengi ve dokusu yönünden ekstrem morfolojik çeşitlilik gösterirler. 1
Şekil 1.2. Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerde KKD gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiş genler üzerindeki TNP' ler 3 farklı köpek ırkında ve aynı ırkın farklı popülasyonunda araştırılacaktır. 5
Şekil 2.1. Canis türlerine örnekler..... 7
Şekil 2.2. Köpeğin evcilleştirilmesinde önemli adımlar. 9
Şekil 2.3 a) Karpat Kurdu, b) Alman Çoban Köpeği, c) Çekoslovakya Kurt Köpeği 11
Şekil 2.4. Birinci dünya savaşında Fransız Kızıl Haçında görevli hizmet köpekleri..... 12
Şekil 2.5 Belçika Malinois 13
Şekil 2.6. Kalça ekleminin Osteoartrit geliştirme sürecinde uğradığı deformasyon..... 14
Şekil 2.7. Kalça eklemi anatomisi..... 15
Şekil 2.8. OFA' ya göre KKD hastalığının ırklara göre görülme oranları..... 16
Şekil 2.9. (a) Normal kalça eklemi, (b) İlerlemiş osteoartritli kalça eklemi 18
Şekil 2.10. VKR radyografisi..... 19
Şekil 2.11. Norberg açısının VKR üzerinden hesaplanması 20
Şekil 2.12. PennHip yönteminde kullanılan 3 radyografik görüntü. A: VKR, B: Kompresyon Radyografisi, C: Distraksiyon Radyografisi..... 21
Şekil 2.13. Kalça ekleminin şematik görünümü üzerinde, DI değerinin hesaplanması.. 22
Şekil 2.14. KKD' li köpeklerin farklı parametrelere göre tedavi seçenekleri..... 23
Şekil 2.15. KKD ile ilişkisi olduğu rapor edilmiş markırların köpek kromozomları üzerindeki dağılımı..... 26
Şekil 2.16. İnsan ve köpeğin yaşam sürelerinin karşılaştırılması ve sıklıkla osteoartrit geliştirdikleri eklemleri 40
Şekil 2.17. Köpek ve insanda kalça eklemi elemanlarının makroskobik diseksiyonu.... 41
Şekil 2.18. İnsanlarda GKD'ne duyarlılığı arttırdığı rapor edilen rs3732378 C>T TNP'sinin CXCR1 geni üzerindeki konumu 44

Şekil 2.19. CX3CR1 geninin insan ve köpeklerdeki aminoasit sekansının BioEdit programı ile hizalanmış görüntüsü, %84,9 benzerlik göstermektedir. 45
Şekil 3. 1. CX3CR1 geninin şematik görüntüsünün altında, 3160 bç' lik bölgenin 5 fragment şeklinde çoğaltıldığı gösterilmiştir. 47
Şekil 3.2. CX3CR1 gen bölgesinde çoğaltılan 5 DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 49
Şekil 3.3. Sekansların BioEdit programı ile hizalanmış görüntüsü, TNP' lerin tespit edilebilmesi için farklı nükleotit içeren sütunlar renklendirilmez. 51
Şekil 3.4. KKD hastalığı ilişkilendirilmiş 2 TNP' nin CHST3 geni üzerinde şematik gösterimi. 52
Şekil 3.5. CHST3 geni 5' UTR bölgesinde çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. 53
Şekil 3.6. CHST3 geninin rs24076746 TNP' sini belirlemede kullanılacak restriksiyon endonükleaz enziminin NEBcutter programı ile tespit edilmesi. 54
Şekil 3.7. CHST3 geni 5' UTR bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 55
Şekil 3.8. 443 bç' lik DNA fragmentinin AgeI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir. 56
Şekil 3.9. rs24076746 C>T TNP' sinin DNA dizi analizi metodu ile doğrulanması. 56
Şekil 3.10. CHST3 geni 3' UTR bölgesinde çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. 58
Şekil 3.11. CHST3 geninin rs24105396 TNP'sini belirlemede kullanılacak restriksiyon endonükleaz enziminin NEBcutter programı ile tespit edilmesi. NEBcutter (NEBcutter V2.0, 2018) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır. 58
Şekil 3.12. CHST3 geni 3' UTR bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 59
Şekil 3.13. 352 bç' lik DNA fragmentinin PstI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir. 60
Şekil 3.14. rs24105396 TNP' sinin DNA dizi analizi metodu ile doğrulanması. 60
Şekil 3.15. OSTF1 geninin şematik görünümü ve A>G TNP' sinin gen üzerindeki pozisyonu. 61

Şekil 3.16. OSTF1 geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. 62
Şekil 3.17. OSTF1 geni 4. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 63
Şekil 3.18. 349 bç' lik DNA fragmentinin BciVI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir. 63
Şekil 3.19. OSTF1 Geni, rs8995004 A>G TNP' sinin DNA dizi analizi metodu ile tespiti 64
Şekil 3.20. IBSP geninin şematik görünümü ve C>T TNP' sinin gen üzerindeki konumu 65
Şekil 3.21. IBSP geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. 65
Şekil 3.22. IBSP geni 3. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 66
Şekil 3.23. 555 bç' lik DNA fragmentinin HphI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir. 67
Şekil 3.24. IBSP Geni, rs23759713 C>T TNP' sinin DNA dizi analizi metodu ile tespiti. 67
Şekil 3.25. FGF12 geninin şematik görünümü ve T>G TNP' sinin gen üzerindeki konumu..... 68
Şekil 3.26. FGF12 geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. 69
Şekil 3.27. FGF12 geni 2. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 69
Şekil 3.28. 368 bç' lik DNA fragmentinin Hpy188III enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir. 70
Şekil 3.29. FGF12 Geni, rs851690466 T>G TNP' sinin DNA dizi analizi metodu ile araştırılması. 71
Şekil 4.1. CX3CR1 geni üzerinde tespit edilen varyasyonların gen üzerindeki konumu ve kromozom pozisyonlarının (KroP) şematik görünüşü.. 75
Şekil 4.2. CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 77

Şekil 4.3. CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 78
Şekil 4.4. CX3CR1 geni G>A TNP' sinin (rs9022770) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 81
Şekil 4.5. CX3CR1 geni G>A TNP' sinin (rs9022770) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 81
Şekil 4.6. CX3CR1 geni G>A TNP' sinin (rs9022769) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 84
Şekil 4.7. CX3CR1 geni G>A TNP' sinin (rs9022769) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 85
Şekil 4.8. CX3CR1 geni AA delesyonunun araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 87
Şekil 4.9. CX3CR1 geni AA delesyonunun araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 88
Şekil 4.10. CX3CR1 geni T>G TNP' sinin (rs852431030) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 90
Şekil 4.11. CX3CR1 geni T>G TNP' sinin (rs852431030) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 90
Şekil 4.12. CX3CR1 geni T>C TNP' sinin (rs852569240) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 93
Şekil 4.13. CX3CR1 geni T>C TNP' sinin (rs852569240) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 94
Şekil 4.14. CX3CR1 geni A>G TNP' sinin (rs851634517) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 96
Şekil 4.15. CX3CR1 geni A>G TNP' sinin (rs851634517) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 97
Şekil 4.16. CX3CR1 geni C>T TNP' sinin (rs853018978) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 100
Şekil 4.17. CX3CR1 geni C>T TNP' sinin (rs853018978) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 100
Şekil 4.18. Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerindeki TNP' lerin oluşturduğu haplotilerin HaploView programı ile değerlendirilmesi. 104

Şekil 4.19. Labrador retrieve ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerindeki TNP' lerin oluşturduğu haplotilerin HaploView programı ile değerlendirilmesi. 105
Şekil 4.20. cfa-miR-488 miRNA' sının, CX3CR1 mRNA' sına bağlanma konumu ve C>T TNP' sinin (rs853018978) konumu 107
Şekil 4.21. CHST3 geni C>T (rs24076746) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı 108
Şekil 4.22. CHST3 geni C>T (rs24076746) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı 109
Şekil 4.23. CHST3 geni A>G (rs24105396) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 112
Şekil 4.24. CHST3 geni A>G (rs24105396) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 112
Şekil 4.25. OSTF1 geni rs8995004 A>G TNP' sinin genotip frekanslarının dağılımı. 116
Şekil 4.26. OSTF1 geni rs8995004 A>G TNP' sinin allel frekanslarının dağılımı. 116
Şekil 4.27. IBSP geni C>T (rs23759713) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı. 120
Şekil 4.28. IBSP geni C>T (rs23759713) TNP' sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı. 120
Şekil 4.29. Belçika Malinois ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği. Üst üçgende istatistiksel olarak anlamlı sonuca sahip ($p<0,05$) kutucuklar, numaralandırılmıştır. 124
Şekil 4.30. Labrador Retriever ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği.. 127
Şekil 4.31. AÇK ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği. 128

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 İnsanlarda GKD hastalığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiş CX3XR1 geni üzerindeki TNP 3
Çizelge 1.2 Araştırılmak üzere belirlenen TNP listesi 4
Çizelge 2.1. Köpeğin bilimsel sınıflandırması 7
Çizelge 2.2. Uluslararası kuruluşlarının KKD derecelendirme sistemleri 20
Çizelge 2.3. Köpek ve insanda kalça displazisinin karşılaştırılması 42
Çizelge 3.1. Hasta ve sağlıklı köpeklerden toplanılan örnek sayıları 46
Çizelge 3.2. CX3CR1 geninin 2. ekson - 3' UTR bölgelerini çoğaltacak 5 primer çiftinin sekansı ve PCR ürünlerinin boyutları 48
Çizelge 3.3. PCR çalışmasında kullanılan mix içeriği 48
Çizelge 3.4. Gradient çalışmasında kullanılan PCR protokü 49
Çizelge 3.5. DNA dizi analizi sekans reaksiyon içeriği 51
Çizelge 3.6. DNA dizi analizi sekans reaksiyonu sıcaklık koşulları 51
Çizelge 3.7. rs24076746 TNP' sini içeren gen bölgesini çoğaltacak primerler 53
Çizelge 3.8. CHST3 geninin rs24076746 TNP' sini AgeI enzimi ile kesildikten sonra genotiplendirme tablosu 54
Çizelge 3.9. rs24105396 TNP' sini içeren gen bölgesini çoğaltacak primerler 57
Çizelge 3.10 CHST3 geninin rs24105396 A>G TNP' sini PstI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu 57
Çizelge 3.11. OSTF1, A>G polimorfizmini içeren 349 bç' lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları 61
Çizelge 3.12. OSTF1 geninin rs8995004 A>G TNP' sini BciVI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu 63
Çizelge 3.13. IBSP, C>T polimorfizmini içeren 555 bç' lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları 65
Çizelge 3.14. IBSP geninin rs23759713 C>T TNP' sini HphI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu 66

Çizelge 3.15. FGF12, T>G polimorfizmini içeren 368 bç' lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları 68
Çizelge 3.16 FGF12 geninin rs851690466 T>G TNP' sini Hpy188III enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu 70
Çizelge 4.1. CX3CR1 geninde dizilenen gen bölgeleri ve bulunan varyasyonlar. 74
Çizelge 4.2. CX3CR1 geninde bulunan varyasyonların rs kodları. 76
Çizelge 4.3. Araştırılan köpek ırklarında CC insersiyonunun (rs851814810) KKD ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. 79
Çizelge 4.4. Köpek ırklarında CX3CR1 G>A TNP'sinin (rs9022770) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. 83
Çizelge 4.5. Köpek ırklarında CX3CR1 G>A TNP'sinin (rs9022769) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 86
Çizelge 4.6. Malinois ırkı köpeklerde CX3CR1 AA delesyonunun KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 89
Çizelge 4.7. Köpek ırklarında CX3CR1 T>G TNP'sinin (rs852431030) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. 92
Çizelge 4.8 Köpek ırklarında CX3CR1 T>C TNP'sinin (rs852569240) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 95
Çizelge 4.9. Köpek ırklarında CX3CR1 A>G TNP'sinin (rs851634517) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 98
Çizelge 4.10 Köpek ırklarında CX3CR1 C>T TNP'sinin (rs853078978) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 102
Çizelge 4.11. Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerinde, rs9022769 ve rs852431030 TNP'lerinin oluşturduğu haplotipler ve ve bu haplotiplerin KKD hastalığı ile ilişkileri 104
Çizelge 4.12. Labrador retrieve ırkı köpeklerde CX3CR1 geni üzerinde rs852431030, rs852569240 ve rs851634517 TNP'lerinin oluşturduğu haplotipler ve KKD hastalığı ile ilişkileri. 106
Çizelge 4.13. CX3CR1 geninin 3' UTR ucunda bağlanma sekasları olan olan miRNA' ların listesi. 106
Çizelge 4.14 Köpek ırklarında CHST3 C>T TNP'sinin (rs24076746) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 110

Çizelge 4.15 Köpek ırklarında CHST3 A>G TNP'sinin (rs24105396) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi 114
Çizelge 4.16. Köpek ırklarında OSTF1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. 118
Çizelge 4.17. Köpek ırklarında IBSP C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. 122
Çizelge 4.18. Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ilişkili TNP-TNP etkileşimleri ve LR testi p değerleri (p<0,05) 125
Çizelge 4.19. Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ilişkili TNP-TNP etkileşimleri ve LR testi p değerleri (p<0,05) 126

EKLER DİZİNİ

Ek 1. KKD Gelişimi İle İlişki Olarak Rapor Edilmiş Genetik Markırlar. 160

Ek 2. İnsanlarda Ve Köpeklerde CX3CR1 Geninin 2. Eksonunun Nükleotit Ve Amino Asit Sekansları 171

Ek 3. Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Kararı 172

Ek 4. CX3CR1 Geninde Çoğaltılan CX1 Fragmentinin DNA Sekansı 173

Ek 5. CX3CR1 Geninde Çoğaltılan CX2 Fragmentinin DNA Sekansı 173

Ek 6. CX3CR1 Geninde Çoğaltılan CX3 Fragmentinin DNA Sekansı 174

Ek 7. CX3CR1 Geninde Çoğaltılan CX4 Fragmentinin DNA Sekansı 174

Ek 8. CX3CR1 Geninde Çoğaltılan CX5 Fragmentinin DNA Sekansı 175

Ek 9 .CX3CR1 Genindeki CC İnsersiyonun DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 176

Ek 10. CX3CR1 Geni G>A TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 177

Ek 11. CX3CR1 Geni G>A TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 178

Ek 12. CX3CR1 Geni AA Delesyonunun DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 179

Ek 13. CX3CR1 Geni T>G TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu..... 180

Ek 14. CX3CR1 Geni T>C TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 181

Ek 15. CX3CR1 Geni A>G TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 182

Ek 16. CX3CR1 Geni C>T TNP'sinin DNA Dizi Analizi Grafik Sonucu 183

Ek 17. Belçika Malinois ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 12 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri 184

Ek 18. Labrador Retriever ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri 185

Ek 19. AÇK ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri 186

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Köpeğin, atası olan kurtlardan (Gri Kurt; *Canis lupus*) evcilleştirilmesi, tarihin en kapsamlı ve belki de en karmaşık genetik deneyidir. Kurt ile başlayan süreç, avcı veya çoban, küçük veya büyük, bağımsız veya sadık olan köpeklere evrilmiştir (Parker & Ostrander, 2005). Morfolojik olarak en fazla çeşitlenen memeli türü olan köpekler, boyutlarının yanı sıra, kafataslarının şekilleri, tüylerinin renkleri ve dokuları gibi fenotipik özellikler bakımından aşırı uçlarda farklılıklar gösterebilir (Şekil 1.1.) (Shearin & Ostrander, 2010a, 2010b).



Şekil 1.1. Köpekler, vücut boyutları, kafa boyutları ve şekilleri, tüy rengi ve dokusu yönünden ekstrem morfolojik çeşitlilik gösterirler. a) Tazı, b) Tüysüz Çin Köpeği, c) Dandie Dinmont Terrier, d) İskoç Geyik Tazısı, e) Chihahua, f) Fransız Bulldog (Shearin & Ostrander, 2010b)

Tam olarak zamanının bilinmesi zor olmakla beraber, köpekler ilk olarak 15.000 yıl önce evcilleştirilmiştir. Modern köpek ırklarının oluşumu ise 150-200 yıl öncesine dayanmaktadır (Lindblad-Toh vd., 2005; Vilà vd., 1997). Yeni bir köpek ırkını oluşturmak için yapılan yoğun seleksiyon, akrabalı yetiştirme ve genellikle popüler damızlıkların kullanılması, ırklar içerisindeki genetik çeşitliliğin azalmasına ve homozigotlaşmaya neden olmuştur. Bu homozigotlaşma, ırklara spesifik olarak bazı kalıtsal hastalıkların görülme sıklığını arttırmış ve hayvanların genetik olarak hastalıklara direncini olumsuz etkilemiştir (Farrell, Schoenebeck, Wiener, Clements, & Summers, 2015; Leroy, Phocas, Hedan, Verrier, & Rognon, 2015; Wiener vd., 2017). Köpeklerde, en sık rastlanan ortopedik hastalık olan, Köpek Kalça Displazisi (KKD) bu hastalıklardan biridir. Irklar arasındaki yaygınlığı %0 - %71,8 oranlarında değişmektedir ve şimdiye kadar 183 köpek ırkında rapor edilmiştir (S Wang vd., 2017). Büyük köpek ırklarında hastalığın görülme olasılığı, küçük köpek ırklarına göre çok daha fazladır (Fealey vd., 2017; Hayward vd., 2016).

Kalıtsal ve çevresel faktörlerden etkilenen KKD, gelişimsel bir hastalıktır. Normal kalça eklemine sahip olarak doğan köpeğin eklem yapısı, gelişim sürecinde bozularak KKD'ye neden olmaktadır. KKD ilk olarak eklemdeki gevşeklik, subluksasyon (yarı çıkıklık) ile tanımlanır. Subluksasyonun yarattığı dengesizlik, bazı eklem yüzeylerine aşırı yük binmesine neden olarak kıkırdak hasarları oluşturur. Kıkırdak dokunun kısmen veya tamamen parçalanması ile kemiklerin birbirine sürtmesi kaçınılmaz olur. Femur başı ve asetabulum çeşitli derecelerde düzleşir ve ikincil olarak osteoartrit (halk dilince kireçlenme) gelişir. Osteoartritin son aşamasında ise eklem tamamen kullanılamaz hale gelir (Huang vd., 2017; King, 2017; Kyriazis, 2016; Richardson, 1992; Sánchez-Molano vd., 2015; Witte, 2019).

Yapılan geniş çaplı araştırmalara rağmen, kalça displazisi insanlarda ve köpeklerde yaygın olarak görülmeye devam etmektedir (Guo vd., 2011; L. Mikkola vd., 2019a) ve hastalığın genetik arka planı aydınlatılamamıştır (Kenanidis vd., 2020; Pascual-Garrido vd., 2017). İnsanlarda görülen gelişimsel kalça displazisi (GKD), birçok açıdan KKD ile benzerlik göstermektedir. Hastalığın geliştiği kalça ekleminin yapısal benzerliğinin yüksek olmasının yanında, her iki organizmada da hastalığın ilerlemesi ile osteoartrit gelişmektedir (Guo vd., 2011; Hayward vd., 2016; Huang vd., 2017). Bununla beraber kalça displazisinin osteoartrite ilerlemesi insanlarda 30 yıl sürerken, köpeklerde 1-2 yıl

sürmektedir. Bu nedenle, köpeklerde hastalığın tüm seyrinin ve tedaviye verilen cevapların kısa bir sürede izlenmesi mümkün olmaktadır. (Pascual-Garrido vd., 2017; Todhunter vd., 2019).

Köpeklerde görülen 350'den fazla hastalık insanlar ile benzerlik göstermektedir. Bu hastalıklara benzer biyokimyasal yolaklar ve genler neden olmaktadır (Hayward vd., 2016; Shearin & Ostrander, 2010a). Tüm bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda, genetik markır araştırmalarında KKD ve GKD'nin beraber değerlendirilmesi, hastalık ile ilişkili lokusların aydınlatılması içinde eşsiz veriler sunabilir.

İnsanlarda, GKD'nin erken teşhisine olanak tanıyacak genetik markırları tespit etmek için günümüze kadar birçok çalışma yapılmış (Basit, Alharby, Albalawi, & Khoshhal, 2018; G. Feldman, Offemaria, Sawan, Parvizi, & Freeman, 2017; G. J. Feldman vd., 2013; L. Li vd., 2017; Liu vd., 2014) ve birçok gen (CX3CR1, PAPPA2, COL2A1, HOXD9, GDF-5, TGFB1) aday olarak gösterilmiştir (Zamborsky, Kokavec, Harsanyi, Attia, & Danisovic, 2019). Bu aday genlerden biri olan CX3CR1 geninin, GKD gelişimi ile ilişkili olduğu birbirinden bağımsız 3 çalışmada rapor edilmiştir (Basit vd., 2018; G. J. Feldman vd., 2013; L. Li vd., 2017). Hastalık ile ilişkili olduğu rapor edilen TNP'ler Çizelge 1.1'de verilmiştir. Ancak, KKD ve GKD'nin birçok açıdan yüksek benzerlik göstermesine rağmen (Meeson, Todhunter, Blunn, Nuki, & Pitsillides, 2019; Pascual-Garrido vd., 2017), CX3CR1 genindeki varyasyonların, KKD ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunamamıştır. Köpeklerde, kalça displazisi gelişimi ile ilişkili markır araştırmaları için CX3CR1 geninin önemli bir aday olduğu öngörülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, CX3CR1 geninin 2. ekson ve 3' UTR bölgesi üzerindeki genetik varyasyonların KKD hastalığının gelişimi üzerine etkileri, Türkiye' de hizmet köpeği olarak yetiştirilen 3 köpek ırkında (Belçika Malinois, Labrador Retriever, Alman Çoban Köpeği) araştırıldı.

Çizelge 1.1 İnsanlarda GKD hastalığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiş CX3CR1 geni üzerindeki TNP'ler

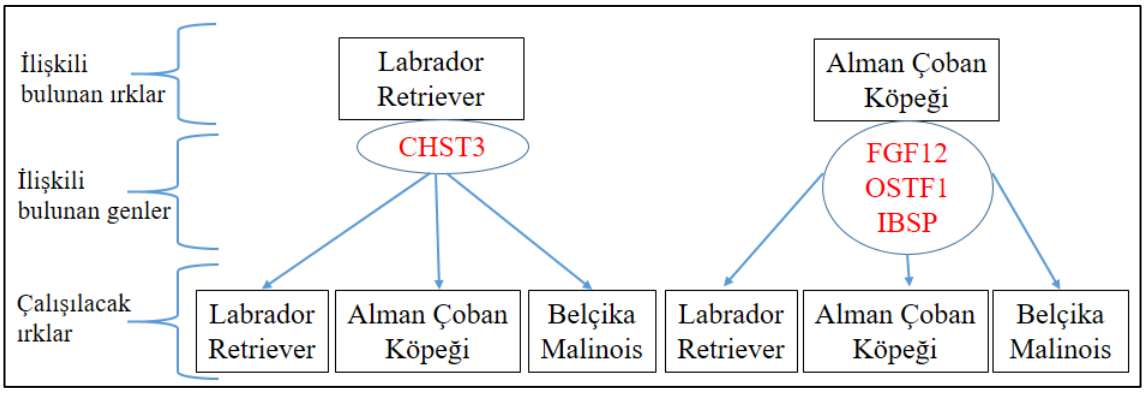
Gen	TNP Kodu	Alleller	Patojen allel	Amino asit değişikliği	Referans
CX3CR1	rs3732378	C>T	T	Treonin>Metiyonin	Basit vd., 2018; G. J. Feldman vd., 2013; L. Li vd., 2017
CX3CR1	rs3732379	C>T	C	Valin>İzolösin	

Köpeklerde, acı verici, hareket engelleyici ve ağır tedavi masrafları gerektiren bir hastalık olan KKD (Guo vd., 2011) ile savaşmak için fenotipe dayalı ıslah programları onlarca yıldır uygulanmaktadır. Kalça eklemlerinin skorlanmasına göre oluşturulan üreme şemaları ile sürdürülen bu ıslah programlarından beklenen başarı elde edilememiştir (MMD Ginja, Silvestre, Gonzalo-Orden, & Ferreira, 2010). Günümüzde, genetik markır destekli seleksiyon programlarının, KKD'ye karşı yürütülen ıslah programlarında daha başarılı olacağı düşünülmektedir (Sánchez-Molano vd., 2015).

KKD'nin gelişimine katkıda bulunan genleri veya genetik mutasyonları tespit etmek için günümüze kadar birçok araştırma yapılmıştır (Bartolomé vd., 2015; Distl, Marschall, & Stock, 2013; Fels, Marschall, Philipp, & Distl, 2014b; Hayward vd., 2016; Martin, 2019). Bu araştırmalarda tespit edilen 116 genetik varyasyon, hastalık ile ilişkili genetik markır adayı olarak gösterilmiştir (*Ek 1*). Bu genetik markırlar, 38 otozomal köpek kromozomundan 27'si üzerine dağılmış şekilde bulunmaktadır. Belirli ırklar ve popülasyonlar ile yapılan araştırmalarda tespit edilen genetik markırların, aynı ırkın farklı popülasyonlarında çalışılarak validasyonunun yapılması gerekmektedir. Ancak bu markır adaylarından çok azı, bağımsız popülasyonlar üzerinde test edilmiştir. Bu nedenle araştırmamızda, daha önce KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiş, 116 genetik markırdan 5 tanesi (Çizelge 1.2.) farklı köpek ırklarında ve aynı köpek ırkının farklı bir popülasyonunda (Şekil 1.2.) çalışılmak üzere belirlenmiştir.

Çizelge 1.2 Çalışmada araştırılmak üzere belirlenen TNP listesi

Markırın KKD ile ilişkili bulunduğu köpek Irkı	Gen	TNP Kodu	Alleller	KKD duyarlılığını arttıran allel	Referans
Labrador Retriever	CHST3	rs24105396	A>G	G	Bartolomé vd., 2015
		rs24076746	C>T	C	
Alman Çoban Köpeği	FGF12	rs851690466	A>C	A	Distl vd., 2013
	OSTF1	rs8995004	A>G	G	
	IBSP	rs23759713	C>T	C	



Şekil 1.2. Labrador Retriever ve Alman Çoban Köpeği (AÇK) ırkı köpeklerde, KKD gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiş genler üzerindeki TNP'ler, 2 farklı köpek ırkında ve aynı ırkın farklı popülasyonunda araştırılacaktır.

Bu araştırmada, Türkiye'de üretilen hizmet köpeklerinde, KKD gelişimini önceden tahmin edebilecek genetik markırlar tespit edilmeye çalışıldı. Araştırmanın ilk basamağında, insanlarda kalça displazisi ile ilişkili olduğu rapor edilmiş olan CX3CR1 geninin, köpeklerdeki kalça displazisi ile ilişkisi araştırıldı ve yeni genetik markırlar tespit edilmeye çalışıldı. İkinci basamağında ise, daha önceki çalışmalarda KKD ile ilişkisi rapor edilmiş 5 genetik markırın, Türkiye'de üretilen hizmet köpeklerindeki karakterizasyonu ve fenotipik etkileri test edildi. Tüm bu araştırmaların sonucunda hedeflenen ise, KKD hastalığına duyarlılığı tespit edebilecek bir genetik testin geliştirilmesine katkı sağlamaktır. Böylece, hayvan refahının artması ve ekonomik kayıpların azaltılması sağlanabilecektir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Köpeğin Kökeni, Taksonomisi ve Evcilleştirilmesi

Bir asırdan uzun süren tartışmaların ardından, eskiden yaşamış ve günümüzde yaşayan tüm köpeklerin tek bir atadan, Gri Kurttan (*Canis lupus*) geldiği genel olarak kabul görmüştür (Miklosi, 2014, s.8; Serpell, 2016, s.260). Evcil köpek ile en yakın akrabası olan Gri Kurt arasındaki DNA benzerliği % 99,96'dır (Lindblad-Toh vd., 2005). Bu, yeni bir soruyu beraberinde getirmiştir; köpek, evcilleştirilmiş bir kurt mudur yoksa ayrı bir tür müdür?

Klasik tanıma göre tür; kendi aralarında üreme potansiyeli olan ve verimli yavrular oluşturan popülasyonlardır (Mayr' dan aktaran Miklosi, 2014, s.267, Sepell, 2016, s.8). İnsan elinde beslenen ve vahşi doğada yaşayan Canis üyelerinin çiftleşebildiği ve verimli yavrular meydana getirdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Köpek ile Gri Kurdun (Hindrikson, Männil, Ozolins, Krzywinski, & Saarma, 2012; Lorenzini, Fanelli, Grifoni, Scholl, & Fico, 2014; Randi & Lucchini, 2002) ve Kır Kurdu (*Canis latrans*) ile Gri Kurdun (Lehman vd., 1991; P. J. Wilson vd., 2000) verimli yavrular meydana getirdiğine dair kanıtlar rapor edilmiştir. Dolayısıyla, klasik tür tanımına göre, tüm Canislerin tek bir türün alt türleri olması gerekmektedir. Ancak durum faklıdır, çünkü Kır Kurtları (*Canis latrans*) ve Gri Kurt (*Canis lupus*) farklı türler olarak kabul görmüştür (Şekil 2.1.). Köpek konusunda ise tartışmalar sürmektedir. Özellikle Kuzey Amerikalı araştırmacılar tarafından yazılmış birçok makalede köpek, kurdun bir alt türü olarak (C*anis lupus familiaris*) tanımlanırken, Avrupalı zoolog ve genetikçiler tarafından ayrı bir tür olarak (*Canis familiaris*) tanımlanmaktadır (Miklosi, 2014, s.267). Bu durumda, tür kavramının faklı bir tanımı daha faydalı olabilir; "türler, kendi içlerinde üreme yoluyla, benzer gruplarından izole edilmiş popülasyonlardır" (Mayr' dan aktaran Sepell, 2016, s.8). Bu tanım kullanıldığında, tamamen evcilleştirilmiş tüm hayvanlar, üreme yoluyla izole

edilmiş oldukları vahşi öncülerinden ayrı türler olarak sınıflandırılabilir. Köpek artık evcilleştirilmiş kurt değildir, insan kontrolü altında gerçekleşen yapay seleksiyonun sonucu olarak yeni bir türe dönüşmüştür (Clutton-Brock, 2012, s.5) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Köpeğin bilimsel sınıflandırması

Bilimsel sınıflandırma	
Alem	Animalia (Hayvanlar)
Şube	Chordata (Kordalılar)
Sınıf	Mammalia (Memeliler)
Takım	Carnivora (Etçiller)
Alt takım	Canifornia (Köpeğimsiler)
Familya	Canidae (Köpekgiller)
Cins	Canis
Tür	*Canis familiaris*

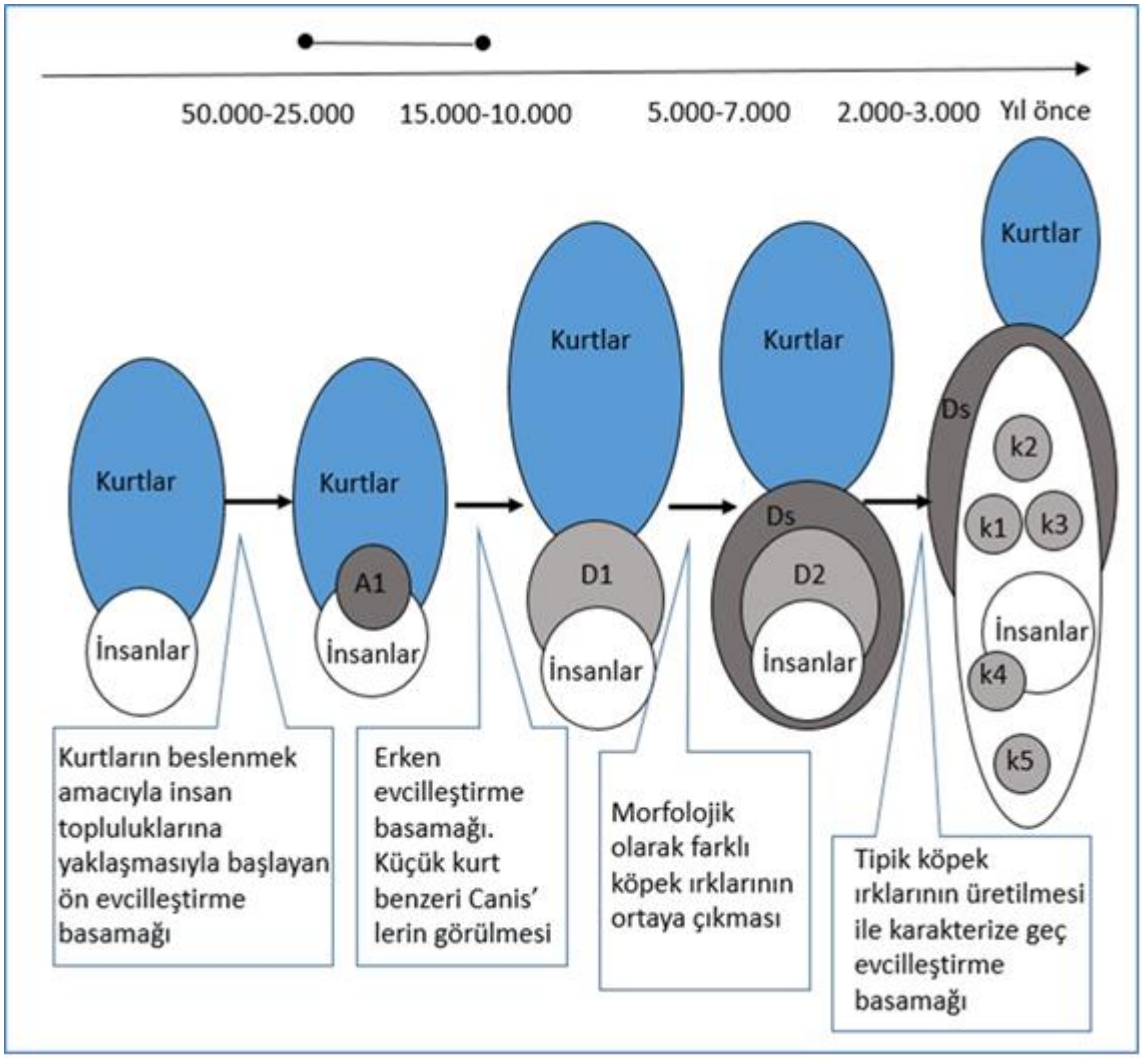


Şekil 2.1. Canis türlerine örnekler

Bir türün evcilleştirilmesi, yapay seleksiyon yoluyla gerçekleştirilen kalıtsal bir süreçtir. Yani, yapay seleksiyon, doğal seleksiyon yoluyla gerçekleşen evrimin bir benzerini gerçekleştirir. İnsanlar, hangi morfolojik ve davranışsal özellikleri gelecek nesillere aktarmak istiyorsa, o yönde seçilim yaparak istenilen özelliğin frekansını arttırırlar. Birçok araştırmacı, köpeğin evcilleştirilmesini açıklamak için farklı teoriler öne sürmüş olsa da insanların oynadığı önemli rol hepsinde ortaktır (Morey, 2006; Schleidt & Shalter, 2003).

En çok kabul gören teoriye göre, köpeğin evcilleştirilme süreci; diğerlerine göre daha cesur olan kurt popülasyonlarının, insan topluluklarının çevrelerine attıkları gıdalardan kolayca beslenmek için onlara yaklaşmaları ile başlamıştır. Bu kurtlar, insan topluluklarına yakın yerlere yavrulamışlar ve buna paralel olarak morfolojik, fizyolojik ve davranışsal olarak değişikliğe uğramaya başlamışlardır (protodomestication) (Crockford' tan aktaran Miklosi, 2014, s.328). İnsanların, bu kurt yavrularından bazılarını seçip yetiştirmesi ile yapay seleksiyon ve evcilleştirme süreci başlamıştır. Bu süreç, Şekil 2.2.'de özetlenmiştir. Erken evcilleştirme dönemi, köpek benzeri küçük boyutlu Canis'lerin ortaya çıkması ile karakterizedir. Ardından, farklılaşma evcilleştirmesi basamağında ilk defa morfolojik olarak farklı kategorilerde köpek ırkları ortaya çıkmıştır. Geç evcilleştirme basamaklarında ise tipik köpek ırkları meydana gelmiştir (Miklosi, 2014, s.340).

200 yıl öncesine kadar evcil köpeklerin fenotipik çeşitliliği azdı ve temel olarak bekçi, avcı, çoban ve kızak köpekleri olarak kullanılıyorlardı. Günümüzde yaşayan modern köpek ırklarının büyük çoğunluğu, Viktoria döneminde (İngiltere,1837-1901), üst ve orta sınıfın oyuncak (arkadaş) köpek yetiştirme hobisi ile başlamış ve son 200 yılda ortaya çıkmıştır (Gough, Thomas, & O'Neill, 2018, s.2). Bu dönemde yapılan seleksiyon çalışmaları, insanlara daha iyi uyum sağlama, arkadaşlık etme, sevimli görünme ve estetik çekicilik baskılarını arttırmış, vahşi hayatta kalmak için adaptasyon yeteneklerini azaltmıştır. Bununla beraber, yeni bir köpek ırkının oluşmasında uygulanan ıslah çalışmaları, genetik çeşitliliği azaltarak resesif genlerden kaynaklanan hastalıkların frekansını arttırmıştır. Her ne kadar, bir ırka ait köpeklerde, replikasyon hataları nedeniyle yeni mutasyonların meydana gelerek hastalıklara neden olabileceği ileri sürülmüş olsa da (Shearin & Ostrander, 2010b), bir ırk boyunca tek bir mutasyonun çoğaldığı fikri ağır basmaktadır (Gough vd., 2018, s.5).



Şekil 2.2. Köpeğin evcilleştirilmesinde önemli adımlar. Miklosi (2014, s.340)'den uyarlanmıştır. A1; köpek benzeri küçük Canis'ler, D1-D2; erken köpek popülasyonları, k1-k5; tipik köpek ırkları, Ds; vahşi köpekler

Evcil köpeklerde, fonksiyonel genler üzerinde bulunan TNP'lerin kurtlara göre daha fazla olduğu ve fonksiyonel genlerde meydana gelen değişliklerin, sağlık için zararlı olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Cruz, Vilà, & Webster, 2008). Yeni bir köpek ırkının oluşumunda uygulanan, popülasyon darboğazları (çok kısıtlı sayıda ata), akrabalı yetiştiricilik ve yoğun seleksiyon bu durumu daha da kötüleştirerek bazı ırklar için bazı mutasyonları sabit hale getirmiştir. Evcil hayvanların, bu zararlı mutasyonlara karşı doğal seleksiyona uğrama olasılığı vahşi atalarına göre daha azdır. Bu nedenle köpeklerin kurtlardan daha fazla kalıtsal hastalığa sahip olduğu söylenebilir (Gough vd., 2018, s.2). Ancak melez köpekler, safkan (pedigrili) köpek cinslerine göre kalıtsal hastalıklara daha az yakalanır ve daha uzun yaşarlar (Nicholas, Arnott, & McGreevy,

2016). Heterosis (melez azmanlığı) kavramıyla açıklanan bu durum melezlerin ebeveynlerine göre üstün özellik göstermesidir.

Çekoslovakya Kurt Köpeği (CKK) ırkının oluşumu, çok kısıtlı atadan-genetik kaynaktan bir köpek ırkının nasıl oluşabileceğine güzel bir örnek teşkil edebilir. 1950'li yıllarda, soğuk savaş döneminde, Çekoslovakya'nın dağlık sınırlarının güvenliğini sağlamak amacıyla bir devriye köpeğine ihtiyaç duyulmuştur. AÇK'ların eğitilebilir mizacını, itaatkârlığını ve Karpat Kurdunun (*Canis lupus lupus*) duyusal yeteneklerini ve gücünü gösteren, yeni bir ırk elde etmek için askeri deneyler başlatılmıştır (Smetanová vd., 2015). İlk melezler 1958 yılında, bir dişi Karpat Kurdu (Brita) ile bir erkek AÇK (Sezar)'dan elde edilmiştir. Sonrasında, bu melezler, 4 defa daha Karpat Kurtları ile melezlenmiştir. Melezlemeler sırasıyla şu şekilde olmuştur; 1960 yılında yine Brita, 1968 yılında erkek Karpat Kurdu (Argo), 1974 yılında erkek Karpat Kurdu (Sarik), 1983 yılında dişi Karpat kurdu (Lejdy). Sadece bu beş atadan gelen (1 AÇK, 4 Kurt) kısıtlı genetik kaynaktan, akrabalı çiftleştirmeler ve yoğun seleksiyonlar yapılarak sabit davranışsal ve fenotipik özellikler elde edilmiştir. Nihayetinde, Uluslararası Kinoloji Federasyonu (FCI) 1989 yılında, CKK'leri kurt benzeri morfolojisi, evcil ve itaatkâr özellikleri ile yeni bir ırk olarak kabul etmiştir (Şekil 2.3.). FCI kabulünden sonra, ırk standartları sabitlendiği için yeniden melezleme yapılamaz ve morfolojik görünüm farklılıklar gösteremez, çiftleşmeler sadece ırk içerisinde yapılabilir. Özetle, CKK ırkının kurucu gen kaynakları, 1 adet AÇK ve 4 Karpat Kurdunun gösterdiği çeşitlilik ile sınırlıdır. AÇK'larda %26,62 oranında gözlenen KKD, CKK'lerde % 14,69 oranında gözlenmektedir. Bunula beraber tek bir gendeki (LHX3) mutasyondan kaynaklı hipofiz cücelik, resesif bir mutasyondan (SOD1) kaynaklanan dejeneratif miyelopati gibi genetik mutasyon kaynaklı hastalıklar CKK'lerde sıklıkla gözlenmektedir (Caniglia vd., 2018).



Şekil 2.3. a) Karpat Kurdu, b) Alman Çoban Köpeği, c) Çekoslovakya Kurt Köpeği

2.2 Hizmet Köpekleri

İnsanlar, köpeğin evcilleştirilmesinden bu yana, onların benzersiz yeteneklerini kendi yararlarına kullanmak için çeşitli yollar bulmuşlardır (A. J. Worth & Cave, 2018). Geçmişte, hizmet köpekleri temel olarak dört işlev için seçilime uğramıştı; avlanma, korunma, kızak çekme ve sürü gütme. Günümüzde ise hizmet köpekleri aldıkları eğitim sayesinde birçok farklı alanda faaliyet göstermektedirler (Miklosi, 2014; Serpell, 2016). Arama kurtarma, sınır devriye, mayın arama vb. gibi alanlarda güvelik güçlerine yardımcı olan köpeklerin yanında, körler için rehber köpekler, epilepsi hastaları için yardımcı köpekler gibi kişisel asistan olarak isimlendirilebilecek köpekler insanlara hizmet etmektedir. Bununla beraber, son zamanlarda bazı hastalıkların tespit edilmesi için koku ile tarama yapan hizmet köpekleri yetiştirilmektedir (Horvath, Järverud, Järverud, & Horváth, 2008; A. J. Worth & Cave, 2018).

19. yüzyılın sonlarına kadar güvenlik güçlerine hizmet eden köpeklerin resmi bir eğitimi yoktu. İz sürmede ve bekçi olarak kullanılıyorlardı. İlk defa 1895 yılında, Belçika ve Fransa'da, polis devriye köpekleri yetiştirmek için eğitim programları başlatıldı. Birinci dünya savaşına gelindiğinde ise köpekler birçok alanda hizmet etmeye

başlamışlardı; tıbbi hizmet köpekleri (Şekil 2.4.) nöbetçiler, izciler, haberciler, ikmalciler ve bekçiler (Jones, Raschke, & Riches, 2018; Sloane, 1955).



Şekil 2.4. Birinci dünya savaşında Fransız Kızıl Haçında görevli hizmet köpekleri (Greenhill, 2013)

Güvenlik güçlerine hizmet eden köpeklerin yetiştirilmesi ve branşlarına göre eğitilmesi uzun süren çalışmalar ve yüksek bütçeler gerektirmektedir. Bir hizmet köpeğinin çalışamayacak şekilde yaralanması veya hastalanması, uzun süren eğitimlerin boşa gitmesine ve yüksek mali zararlara neden olmaktadır (Jones vd., 2018; E. A. Leighton vd., 2019). Her ne kadar bu gibi durumlardan hassasiyetle kaçınılmaya çalışılsa da, sıklıkla karşılaşılmaktadır. Hizmet köpekleri, çalıştıkları ortamlara ve ırklarının genetik özelliklerine bağlı olarak, bazı spesifik hastalıklara ve sakatlanmalara maruz kalırlar. En çok maruz kaldıkları hastalık grubu, kas ve iskelet sınıfı hastalıklardır (A. J. Worth & Cave, 2018).

Belçika Malinois ırkı köpekler (Şekil 2.5) ve AÇK' lar dünya genelinde güvenlik güçlerinin en sık kullandıkları ırklardır. Bu ırklar özellikle dayanıklılık, hız, güç, cesaret, zeka, çevre koşullarına uyum sağlama konularındaki üstün özellikleri nedeniyle tercih

edilmektedirler. AÇK'ları hizmet köpeği olarak kullanan Yeni Zelanda Polis Güçlerinde yapılan bir çalışmada (A. Worth vd., 2013), görev dışı kalan köpeklerin durumları araştırılmıştır. Bu teşkilatlanmada, AÇK'ların planlanmış emeklilik yaşı 8'dir. Ancak ölüm veya görev yapamayacak hale gelmeleri nedeniyle zorunlu emekli olanların yaş ortalaması 6,6'dır. Planlanan emeklilik yaşına kadar çalışabilen köpeklerin oranı % 40'dır. Zorunlu emekliliğe neden olan durumlar arasında, birinci sırada kalça/dirsek displazisi ve omurga artriti olduğu rapor edilmiştir.

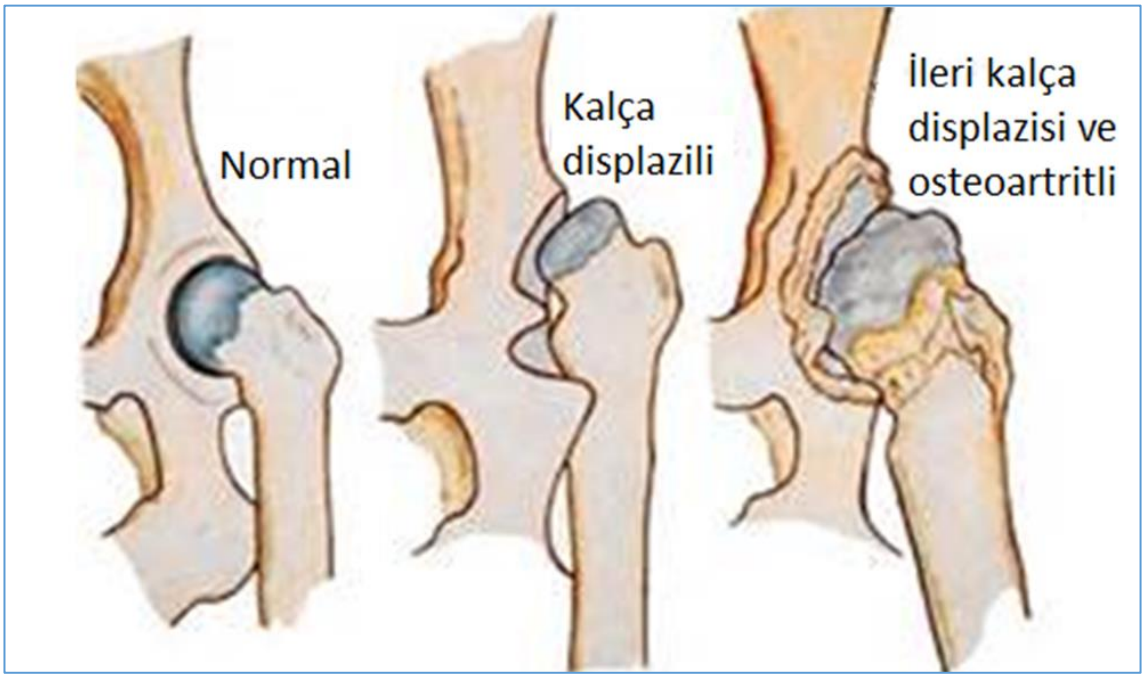


Şekil 2.5. Belçika Malinois

2.3 Köpek Kalça Displazisi (KKD)

İlk defa 1935 yılında tanımlanan KKD (Schnelle, 1935), genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan, gelişimsel bir hastalıktır. Normal kalça eklemine sahip olarak doğan köpekler, büyürken anormal yapıda kalça eklemi geliştirir (Mário Ginja, Gaspar, & Ginja, 2015). Bu anormal durumun birinci nedeni olan kalça ekleminin gevşekliği, yaşamın erken dönemlerinde eklem yüzeylerinin birbirlerinden kısmen uzaklaşmasına neden olur (subluksasyon; yarı çıkıklık). Subluksasyon, eklem yüzeylerinin bazı kısımlarına aşırı yük binmesiyle kıkırdak hasarları oluşturur, asetabulum çeşitli derecelerde sığlaşır, femur başı düzleşir ve sonunda KKD hastalığının klinik belirtileri görülmeye başlar (Kyriazis, 2016; Richardson, 1992). Sekonder olarak, kalça ekleminin deformasyonuna, osteoartrite (OA) ve kıkırdak dejenerasyonuna yol açar (Şekil 2.6.).

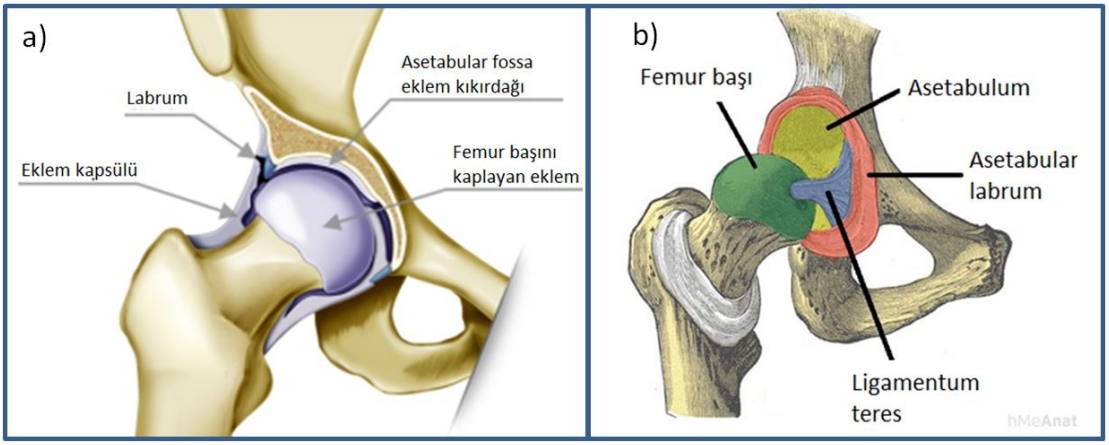
Kalça ekleminin aşırı gevşekliğinin yanında, kemik dokusu gelişiminde önemli rol oynayan endokondrial kemikleşmenin doğru bir şekilde gerçekleşmemesi de hastalık gelişimini tetikler (Huang vd., 2017; Sánchez-Molano vd., 2015). Bununla beraber, eklem gevşekliği ve kemik gelişim bozuklukları tek başına hastalığın sebebi olarak gösterilememektedir. Farklı derecelerdeki eklem gevşekliğini tolere etmede ırklar arası ve bireyler arası farklar olduğu görülmektedir. Hastalığın, çoklu genlerin (poligenik) ve çevresel (beslenme, egzersiz, vb.) birçok etkenin kontrolü altında olduğu düşünülmektedir (King, 2017).



Şekil 2.6. Kalça ekleminin osteoartit geliştirme sürecinde uğradığı deformasyon. https://townsendvets.com.au/hip-dysplasia adresinden ulaşılmıştır.

Kalça eklemi, sinovyal (oynar) eklemdir (Şekil 2.7.). Sinovyal eklemler, sinovyal sıvıdan ve eklemlerin serbestçe hareket etmesine izin veren, sinovyal eklem kapsülünü oluşturan yoğun ve düzensiz bağ dokudan oluşur (Archer, Dowthwaite, & Francis-West, 2003). Sinovyal eklem kapsülü içerisindeki sinovyal sıvı besin, kayganlık sağlarken aynı zamanda eklem kıkırdağı için bir yastık görevi görür. Hiyalin kıkırdaktan oluşan eklem kıkırdağı, hücre dışı kollajen matriksi içerisine gömülü kondrositlerden, proteoglikanlardan ve kollajen olmayan proteinlerden oluşan bir dokudur. Hiyalin kıkırdak, sinovyal eklemlerin çalışması için vazgeçilmezdir. Kıkırdak, düzgün yüzeyi ve basınçlara dayanıklı moleküler yapısı sayesinde, kaygan yüzeyler oluşturur ve

subkondrial kemik üzerindeki basıncı dağıtır, şok emici bir amortisör gibi davranarak kemik hareketlerini kolaylaştırır (Bonnevie, Galesso, Secchieri, & Bonassar, 2018; Malekipour & Lee, 2019).

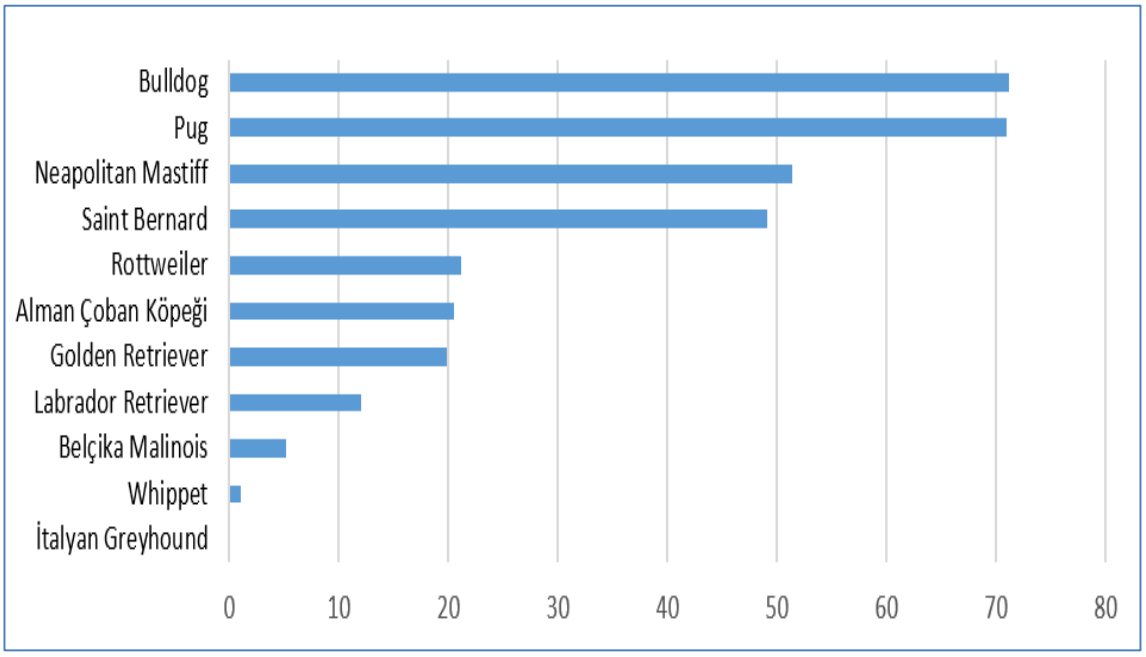


Şekil 2.7. Kalça eklemi anatomisi (https://teachmeanatomy.info/lower-limb/joints/hip-joint/ sitesinden ulaşılmıştır.)

Eklem kıkırdaklarında, KKD veya travmalar nedeniyle hasarlar oluşabilir. Ancak, hasarların onarım kabiliyeti çok sınırlıdır. Çünkü kıkırdak dokularında kan damarları, nöral sistem ve lenf damarları bulunmaz. Kıkırdak parçalanmaya devam ettikçe ve tamamen bozulunca kemikler arasındaki sürtünme kaçınılmaz olur. Sonuç olarak ortaya çıkan osteoartrit, kıkırdak, sinovyal sıvı ve kemik dahil olmak üzere tüm eklemi etkiler. Ağrıya, dejenerasyona, iltihaplanmaya, yumuşak dokunun kalınlaşmasına ve en sonunda eklem hareketinin kaybolmasına neden olur (Berg-Foels, Schwager, Todhunter, & Reeves, 2011; Bland, 2015; Hunziker, Lippuner, Keel, & Shintani, 2015; Lo Monaco vd., 2018).

Kalça displazisi hastalığının görülme sıklığı, köpeğin ırkına bağlı olarak değişmektedir. Hayvanlar İçin Ortopedi Vakfına (OFA) göre, bazı ırklarda %0 görülürken bazı ırklarda ise %71,2 oranında görülmektedir (Şekil 2.8.) (Hayvanlar İçin Ortopedi Vakfı, 2019). KKD, tüm boyutlardaki ve ırklardaki köpeklerde görülebilir ancak büyük ve dev köpek ırklarında daha sık görülmektedir (Syrcle, 2017). Büyüklükten bağımsız olarak, kondrodistrofik köpek ırklarında da yüksek frekansta görülmektedir (Kyriazis, 2016). Ancak vücut formu, büyüme oranı, deri altı yağ miktarı, bağ dokusu tipi, pelvik kas kütlesi ile KKD arasında ilişki kuran çalışmalar vardır (Pascual-Garrido vd., 2017; Riser, 1975; Riser & Shirer, 1967). Beslenmenin de KKD üzerine etkisinin

olduğu düşünülmektedir. Yem kısıtlamasıyla beslenen köpeklerde, normal beslenen köpeklere göre daha az KKD ve osteoartrit geliştiği rapor edilmiştir (Kealy vd., 1992; G. K. Smith vd., 2006). Bu sonuçların aksine, ilk altı aylık dönemde kilo alımının eklem gevşekliği ve KKD gelişimi ile ilişkili olmadığına dair kanıtlar sunan çalışmalar da bulunmaktadır (Krontveit vd., 2010; Lopez, Quinn, & Markel, 2006). Yine beslenme ile ilgili olarak, köpek yavrularının yemlerine katılan kalsiyum ve D vitamini takviyelerinin osteoklastik aktiviteyi azalttığı, kemiklerin formunu almasını geciktirerek KKD gelişimine neden olduğu rapor edilmiştir (G. Smith, Karbe, Agnello, & McDonald-Lynch, 2012). Egzersizin de KKD gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Özelikle ilkbahar ve yaz mevsimlerinde özgürce hareket edebilecekleri çiftliklerde doğan köpeklerin, kış mevsimlerinde doğan ve kısıtlı alanlarda gelişen köpeklere göre daha fazla kas kütlesi geliştirdikleri ve daha sıkı kalça eklemlerine sahip oldukları rapor edilmiştir (Krontveit, Nødtvedt, Sævik, Ropstad, & Trangerud, 2012).



Şekil 2.8. OFA'ya göre KKD hastalığının ırklara göre görülme oranları (Hayvanlar İçin Ortopedi Vakfı, 2019)

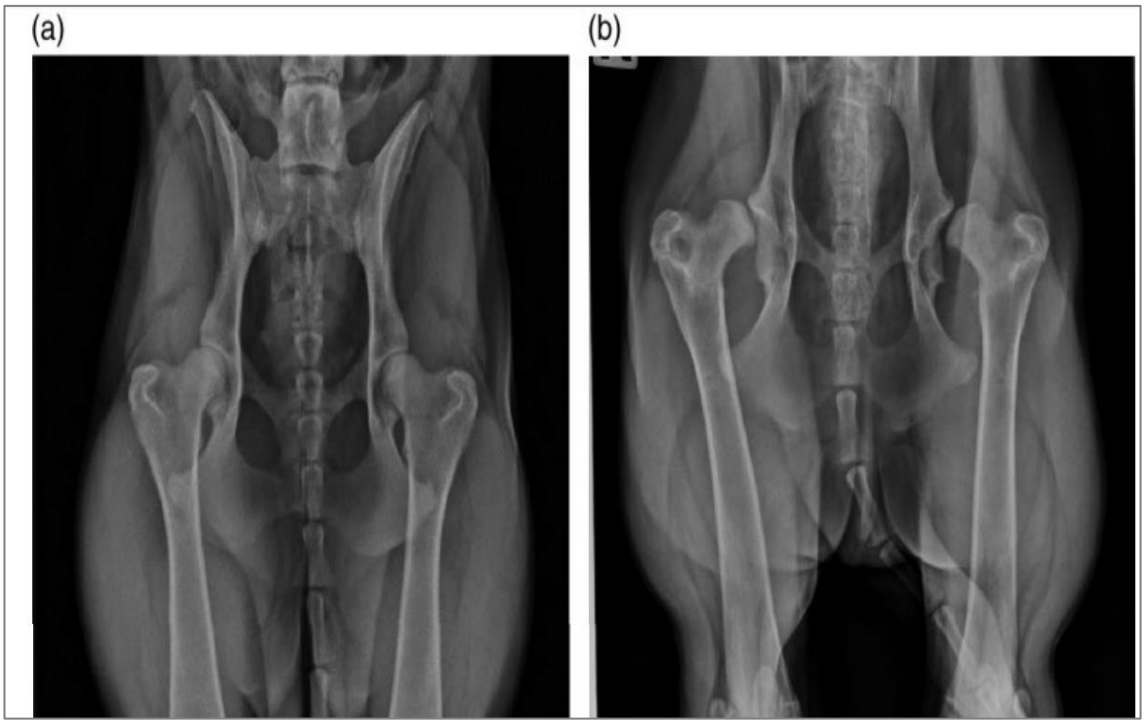
Kalça displazisi ile ilişkili klinik belirtilerde bireysel farklılıklar olduğu görülmektedir. Bir başka deyişle, hafif radyografik belirtileri olan bir köpek ciddi şekilde topal olabilirken, şiddetli radyografik belirtileri olan bir köpek yalnızca hafif topallık göstermektedir. Belirtilerin bu bireyselliğinin köpeklerin faklı genetik mekanizmalara

sahip olmasıyla açıklanabileceği düşünülmektedir (Witte, 2019). KKD gelişiminin cinsiyet ile ilişkili olmadığı farklı köpek ırkları için rapor edilmiştir (Freeman, Evans, & McEwan, 2013; Hou vd., 2010; Krontveit vd., 2010; Runge, Kelly, Gregor, Kotwal, & Smith, 2010; Sarierler, 2004; Wood, Lakhani, & Dennis, 2000). Bununla beraber kısırlaştırılan erkek köpeklerde, özellikle erken yaşlarda kısırlaştırıldıklarında KKD için yüksek risk taşıyabilecekleri rapor edilmiştir (Witsberger, Villamil, Schultz, Hahn, & Cook, 2008). KKD'nin kalıtım derecesi, yapılan farklı araştırmalarda, 0,1 ila 0,83 arasında tahmin edilmiştir (E. Leighton, 1997; Loder & Todhunter, 2017; S Wang vd., 2017). Bu değerler arasındaki farklılıklar, farklı ırklar ve soy ağaçlarının takip edilmesi, kalça eklemlerinin farklı değerlendirme kriterleri ile skorlanması ve kalıtım derecesinin hesaplanmasında kullanılan metotların farklı olmasından kaynaklanabilir (Mário Ginja vd., 2015).

2.3.1 Teşhis

Genel olarak köpeklerde, KKD'nin klinik belirtilerinin görüldüğü 2 dönem vardır; birincisi bir yaşından küçük köpeklerde kalça ekleminin stabilitesinin bozulması ve eklemin bazı bölgelerine aşırı yük binmesi ile ligamentum teresin yırtılması, gerilmesi ve asetabular mikro kırıkların ağrıya neden olmasıdır. İkincisi ise yetişkin köpeklerde ilerlemiş osteoartirit kaynaklı kronik ağrıdır (Manley, Adams, Danielson, Dueland, & Linn, 2007) (Şekil 2.9.). Tipik klinik belirtiler, kısalmış adım yüksekliği ve adım uzunluğu, tavşan zıplaması şeklinde yürüyüş, merdiven çıkamama, engellerin üzerinden atlayamama gibi yürüyüş bozukluklarıdır (MMD Ginja vd., 2010).

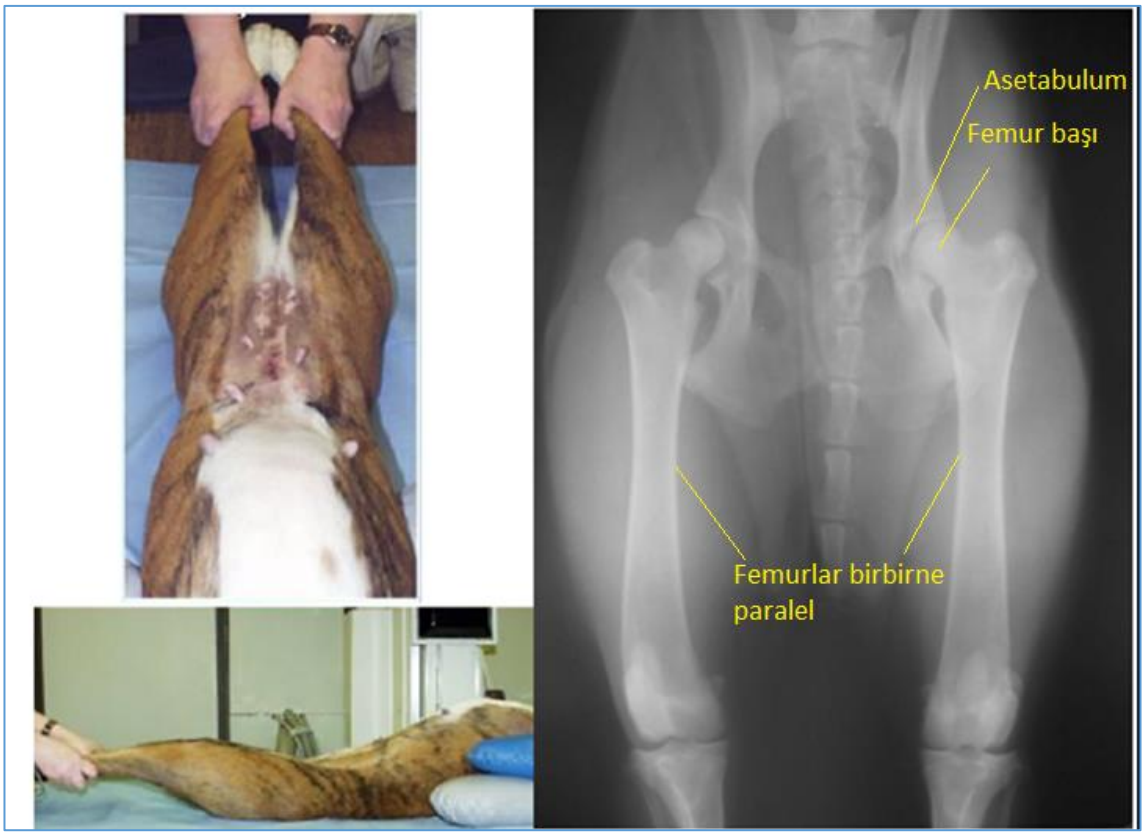
Köpek kalça displazisi teşhisine yardımcı olabilecek, eklem subluksasyonunun değerlendirildiği 3 klinik test vardır; Ortolani testi (Chalman & Butler, 1985; Farese, Todhunter, Lust, Williams, & Dykes, 1998), Barlow testi (Fry & Clark, 1992) ve Barden testi (Bardens & Hardwick, 1968; M. M. Ginja vd., 2009). Elle muayene ederek yapılan bu testler, acı verici olabileceği için anestezi altında yapılır. Kalça ekleminin gevşekliği hakkında önemli bilgiler verseler de, sonuçları hastalık teşhisi koymak için yeterli değildir (Kyriazis, 2016).



Şekil 2.9. (a) Normal kalça eklemi, (b) İlerlemiş osteoartritli kalça eklemi (Yeates, 2019, s.97)

Klinik semptomlara dayanılarak KKD'den şüphelenilse de asıl teşhis radyografik olarak konulur (Broeckx vd., 2018). Her birinin farklı avantaj ve dezavantajları olan, çeşitli radyografik teknikler bulunmaktadır. Bu teknikler 2 ana gruba ayrılabilir; birinci grubu, eklem uyumunu ve osteoartirit belirtilerini değerlendirmek için kullanılan, standart ventrodorsal kalça radyografisi (VKR) oluşturur. İkinci grup ise, kalça eklemi gevşekliği ile ilgili bilgiler sağlayan stres radyografileridir (PennHIP, Dorsolateral Sublüksasyon, Flückiger ve Half-Axial pozisyonu) (MMD Ginja vd., 2010). Bu radyografi tekniklerinden en popüleri, VKR'dir (Şekil 2.10.) (Broeckx vd., 2018).

Ventrodorsal kalça radyografisi tekniği ile kalça ekleminin değerlendirilmesi için, farklı uluslararası kuruluşların farklı puanlama sistemleri vardır. Amerika Birleşik Devletleri, OFA'ya göre, KKD varlığı 7 dereceye ayrılmıştır (3 normal, 1 sınır ve 3 hasta). Bu sistemine göre değerlendirilmesi yapılacak köpeklerin en az 2 yaşında olması gerekmektedir. Avrupa, Asya ve Latin Amerika'da yaygın olarak kullanılan Uluslararası Kinoloji Federasyonu (FCI) sistemine göre, 1 normal, 1 sınır ve 3 hasta olmak üzere 5 dereceye ayrılmıştır. Bu sistemine göre değerlendirilmesi yapılacak köpeklerin 1 ila 2 yaş arasında olması gerekir. İngiliz Veterinerler Birliği (BVA)'ne göre ise daha ayrıntılı bir



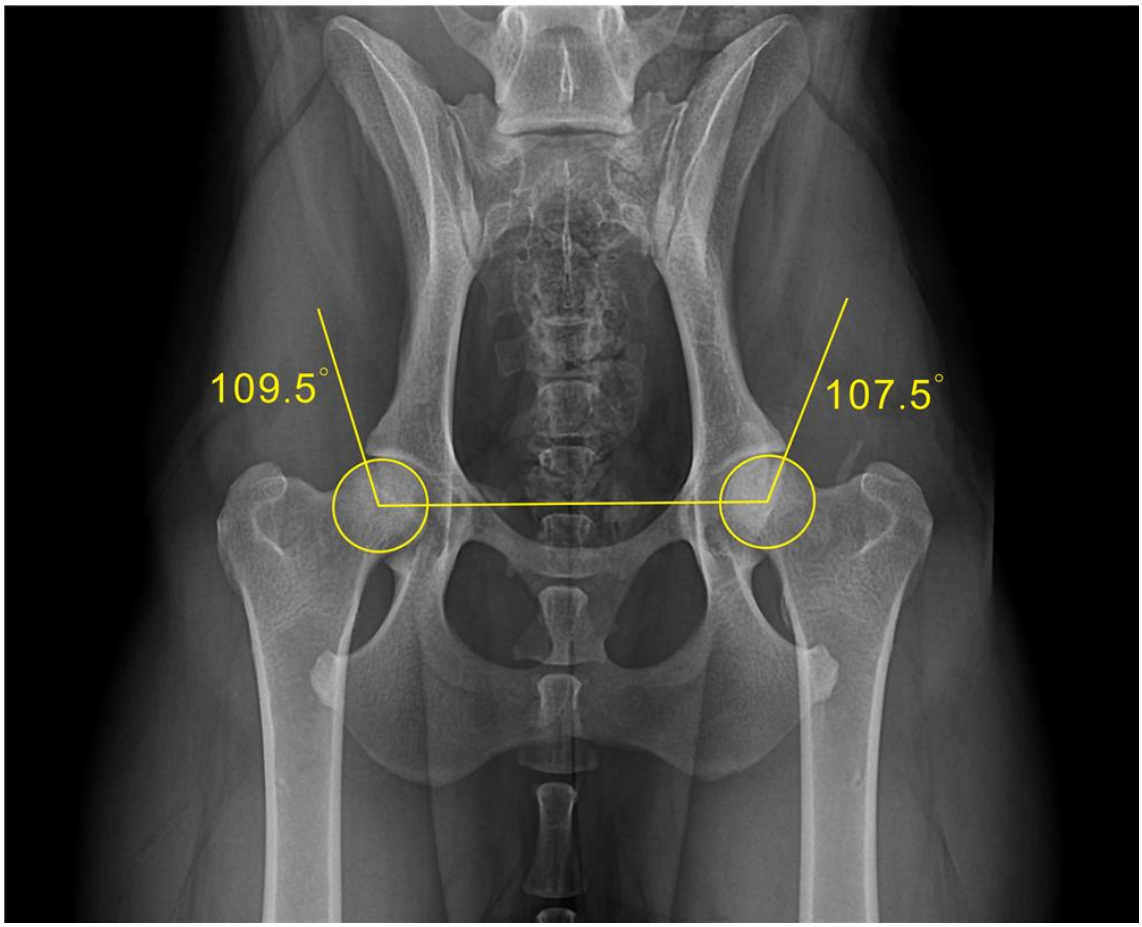
Şekil 2.10. VKR radyografisi (Bilgili, 2019)

puanlama sistemi bulunmaktadır. Her eklem 9 parametre üzerinden değerlendirilir ve her parametreye 0-6 (0 en iyi, 6 en kötü) arasında puan verilir. Böylece, değerlendirilen köpekler iki eklemleri için toplam 0-106 arasında puan alırlar ve bu puana göre KKD durumları derecelendirilir. Bu sisteme göre değerlendirilmesi yapılacak köpeklerin en az 1 yaşında olması gerekmektedir. Uluslararası 3 kuruluşun KKD'yi derecelendirme sistemleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir (M. M. Ginja vd., 2009; Kyriazis, 2016; Uluslararası Kalça Displazisi Enstitüsü, 2018; Shizhi Wang vd., 2019).

Ventrodorsal kalça radyografisi tekniği ile görüntülenmiş köpeklerin, kalça eklemlerinin skorlanmasında kullanılan en önemli parametre Norberg açısıdır (Na) . Her iki femur başının ortasına bir nokta konulur ve noktalar düz bir çizgi ile işaretlenir. Sonrasında bu noktalardan asetabulumun krenial kenarlarına düz çizgiler çekilir. İki çizgi arasında kalan açı Norberg açısıdır. 105 dereceden düşük açılar KKD'yi işaret eder (Şekil 2.11.). Açının küçüklüğü hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (Broeckx vd., 2018; Flückiger, 2007).

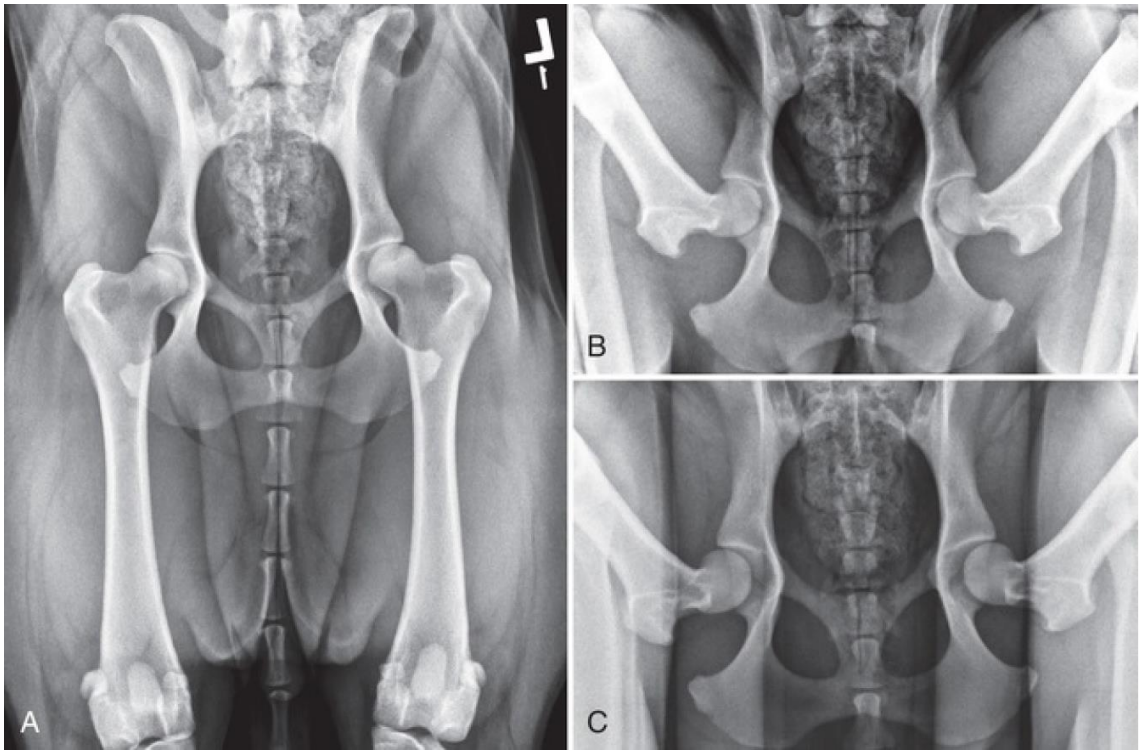
Çizelge 2.2. Uluslararası kuruluşlarının KKD derecelendirme sistemleri, Na; Norberg açısı

KKD'nin şiddet derecesi	FCI (Avrupa, Asya, Latin Amerika)		BVA (İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda)		OFA (Amerika Birleşik Devletleri)
Kalça displazisi bulgusu yok	A	Na>105°	A1	0-4	Mükemmel
			A2	5-10	İyi
Normale yakın kalça eklemi	B	Na≤105°	B1	11-18	Vasat
			B2	19-25	Sınırda
Hafif kalça displazisi	C	Na=100°	C1	26-35	Hafif şiddette displazik
			C2		
Orta şiddette kalça displazisi	D	Na=90°-100°	D1	36-50	Orta şiddette displazik
		Na<90°	D2	51-106	
Şiddetli kalça displazisi	E	Na<80°	E1		Şiddetli displazik
			E2		



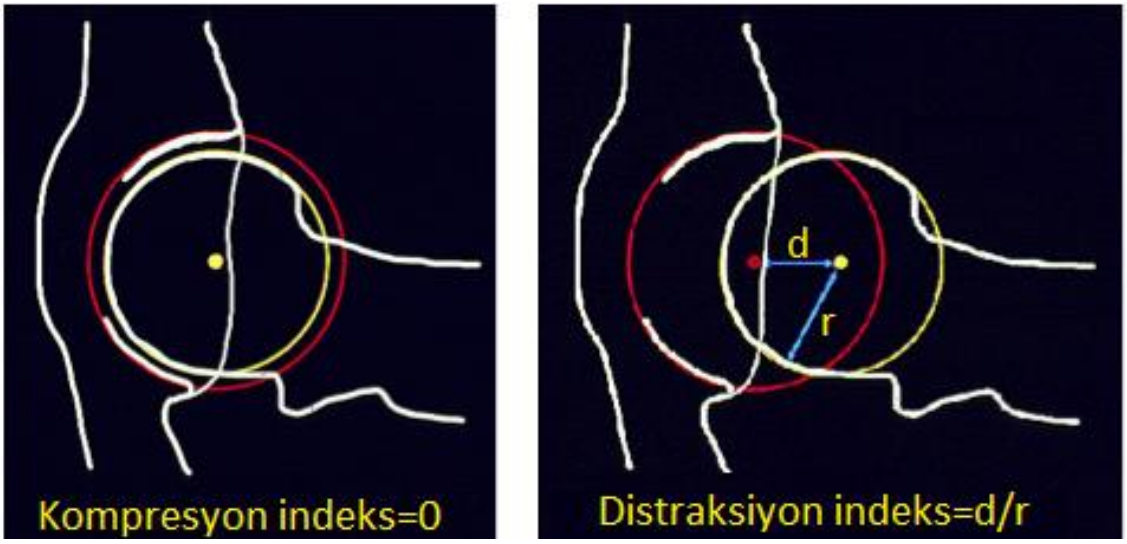
Şekil 2.11. Norberg açısının VKR üzerinden hesaplanması (Superveterinary, 2020)

Stres radyografileri teknikleri içinde yer alan Pennsylvania Hip Improvement Program (PennHIP) yöntemi, Amerika Birleşik Devletleri genelinde çok yaygın kullanılmasına rağmen, dünya genelinde kullanımı azdır. PennHIP yöntemi üç farklı radyografik görüntünün (VKR, Kompresyon radyografisi, Distraksiyon radyografisi) incelenmesi ile kalça ekleminin değerlendirilmesi yapılır (Şekil 2.12.) (Tobias & Johnston, 2013, s.2321).



Şekil 2.12. PennHip yönteminde kullanılan 3 radyografik görüntü. A: VKR, B: Kompresyon Radyografisi, C: Distraksiyon Radyografisi (Tobias & Johnston, 2013, s.2321).

PennHip yönteminde diğer yöntemlerin aksine, 4 aylıktan itibaren köpeklerin KKD taraması gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde, distraksiyon indeksi (DI) (Şekil 2.13.) olarak adlandırılan, eklem gevşekliğinin kantitatif ölçümü sağlayan bir parametreden faydalanılır. DI değeri 0,3 ile 0,7 arasında değişir ve küçük DI değerine sahip köpeklerin normal gelişim gösteren kalça eklemine sahip olacakları değerlendirilir. PennHIP'in, VKR yönteminden daha üstün bir değerlendirme yöntemi olduğunu savunanlar, Norberg açısının eklem gevşekliğini değerlendirmek için uygun bir yöntem olmadığını öne sürerler (Culp vd., 2006; Gaspar, Hayes, Ginja, Ginja, & Todhunter, 2016).

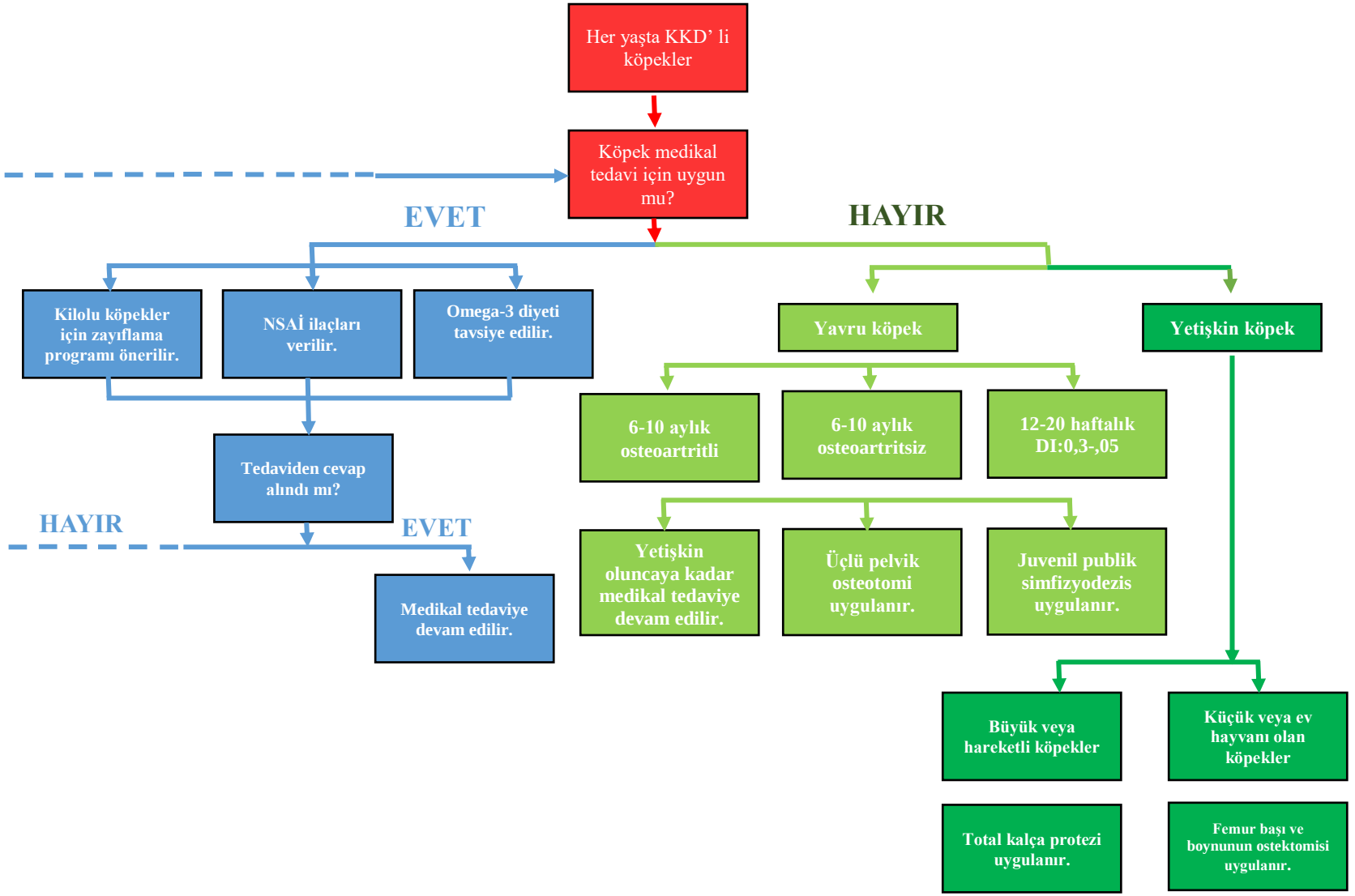


Şekil 2.13. Kalça ekleminin şematik görünümü üzerinde, DI değerinin hesaplanması (PennHIP, 2019)

2.3.2 Tedavi

Köpek kalça displazisinin tedavisi, köpeğin yaşı, hastalığın şiddeti, KKD'ye eşlik eden farklı hastalıkların bulunması, finansal kısıtlamalar gibi çeşitli parametrelere göre değişir. KKD'li her köpeği tedavi edebilecek genel bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Konservatif ve cerrahi tedavi seçeneklerinden biri uygulanabilir (Witte, 2019). Şekil 2.14.'te çeşitli senaryolarda uygulanabilecek tedaviler özetlenmiştir. Konservatif tedavide, kilo verme, egzersiz programları, nutrasötikler, gıda takviyeleri, ağrı kesiciler (steroid olmayan antiinflamatuarlar=NSAİ), kıkırdak koruyucular (kondroprotektif) kullanılabilir. Bu tedavi yöntemlerinin amacı, eklem ağrısını en aza indirgemek, inflamasyonu azaltmak, kıkırdak hasarının ilerlemesini sınırlandırmaktır. Ancak çoğu zaman ağrıyı kesmekte işe yaramazlar (Gagnon vd., 2017; Hunziker vd., 2015; Lo Monaco vd., 2018; Scott, Evans, & Conzemius, 2017).

Cerrahi tedavi, erken olgularda femur başı osteotomisi (Rawson, Aronsohn, & Burk, 2005), tüm kalça protezi, üçlü pelvik osteotomi, çift pelvik osteotomi (Lopes, Selmi, Lins, & Macedo, 2018; Vezzoni, Boiocchi, Vezzoni, Vanelli, & Bronzo, 2010) gibi farklı müdahaleler ile yapılabilir. Kıkırdağın protez olarak kısmen yenilenmesi gibi cerrahi yaklaşımlardaki gelişmeler, muhtemelen ileride tedavi başarılarını arttıracaktır (Witte, 2019).



Şekil 2.14. KKD'li köpeklerin farklı parametrelere göre tedavi seçenekleri. Bank (2016)'ın Smith'ten aktardığı şemadan uyarlanmıştır.

Son yıllarda, KKD tedavisi için, kök hücre kullanımını içeren rejeneratif tıbba olan ilgi artmıştır (Sasaki, Mizuno, Mochizuki, & Sekiya, 2019). Kendini yenileme, çoğalma, immünomodülasyon, antiinflamatuar ve farklılaşma yeteneklerinden dolayı kök hücrelerin farklı klinik problemler için çözüm olabileceği düşünülmektedir (Gugjoo, Amarpal, & Sharma, 2019). Mezenkimal kök hücreler (MKH) büyüme faktörleri salgılayabilirler, endojen tamir hücrelerinin bölgeye göçünü teşvik edebilirler, immün baskılayıcı olabilirler ve kondrositlere farklılaşarak kıkırdak hasarını düzeltebilirler. Bu nedenle umut verici terapötiklerdir (Gugjoo vd., 2019; Sasaki vd., 2019). Köpeklerde MKH'ler kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kas ve sinovyal sıvıdan elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, kıkırdak lezyonlarına, eklem içi enjeksiyon ile verilen MKH'lerin mükemmel derecede hiyalin kıkırdak rejenerasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Osteoartritten muzdarip köpeklerde ağrı ve topallamanın giderilmesinde etkili olmuştur (Sasaki vd., 2019).

2.3.3 Islah

KKD gibi kompleks bir fenotipik özelliğin kontrol edilebilmesi için iki temel stratejiden bahsedilebilir; genetik kontrol ve çevresel kontrol. Genetik kontrol, hastalığa genetik olarak yatkın olan köpeklerin, damızlık olarak kullanılmasının önüne geçerek ileriki nesillerde hastalığın frekansını, popülasyon içinde azaltmayı amaçlar. Bu stratejinin uygulanabilmesi için köpek kalçalarının doğru şekilde skorlanması ve pedigrilerin kayıt altına alınması gerekir. Çevresel kontrol ise, hastalık riski taşıyan köpeklerin, hastalığa yakalanmasını geciktirmek veya hastalığın semptomlarını hafifletmek için yapılır (E. A. Leighton vd., 2019). Uluslararası bağlanmada, sağlıklı ve genetik potansiyeli yüksek olan damızlık köpeklerin kullanımı, köpek sağlığı ve refahını iyileştirmek için hedeflenen ıslah stratejisi olarak kabul görmüştür. Tahmini damızlık değeri (TDD) hesaplamalarını ve kayıtlarını tutmayan ülkelerin KKD'ye karşı yapılan ıslah çalışmalarında TDD kayıtlarını tutan ülkelerden damızlık ithal etmelerinin olumlu olacağı rapor edilmiştir (Shizhi Wang vd., 2019).

Bazı ülkelerde, yaklaşık 60 yıldır, kalça radyografilerine dayalı skorlama sistemleri kullanılmaktadır. Hayvanın üreme tavsiyesi için hesaplanan TDD; kalça ekleminin gevşekliğinin derecesi (yaygın olarak Norberg açısının belirlediği subluksasyon miktarı) ve sekonder olarak gelişen dejeneratif değişikliklerin ciddiyetine dayanılarak verilen

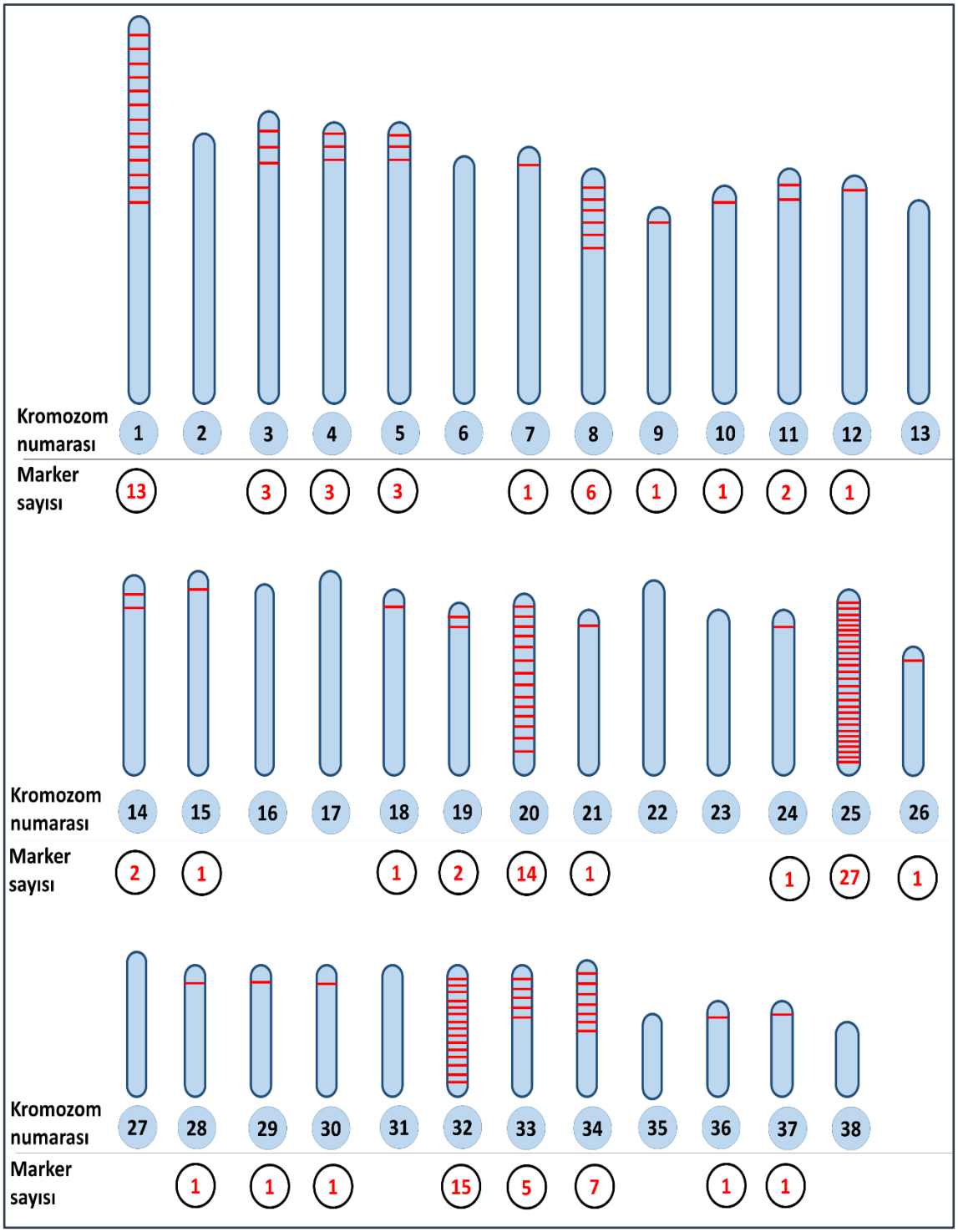
skorlar ile hesaplanmaktadır. Köpek yetiştiricileri, bu skorlama programlarına dayalı olarak damızlık seçimi yapmışlar ve üreme programları hazırlamışlardır. Ancak bu programlar onlarca yıldır kullanılmasına rağmen yüksek başarı yakalanamamıştır (Ledecky, Hluchy, Liptak, & Kuricova, 2016; E. A. Leighton vd., 2019). Yapılan bu ıslah çalışmaları, farklı araştırmalarda; başarılı (Janutta, Hamann, & Distl, 2008; Keller, Dziuk, & Bell, 2011; Oberbauer, Keller, & Famula, 2017), az başarılı (Lavrijsen vd., 2014; Lewis, Blott, & Woolliams, 2013; B. Wilson, Nicholas, & Thomson, 2011) ve başarısız (Witsberger vd., 2008) olarak değerlendirilmiştir.

Günümüzde, genetik markır destekli seleksiyonun veya tüm genom çapında markırları içeren genom çapında seleksiyon uygulamalarının, KKD'ye karşı yürütülen ıslah programlarında başarılı olabileceği düşünülmektedir (Sánchez-Molano vd., 2015). Bu konu üzerine birçok patent (Distl vd., 2013; Martin, 2019; Martinez vd., 2013) alınmış olmasına rağmen henüz genetik testlerin tüm ırklarda veya bir ırkın farklı popülasyonlarında başarılı olacağına dair yeterli kanıtlar ile desteklenmemiştir (Manz, Tellhelm, & Krawczak, 2017).

2.3.4 KKD Gelişimi İle İlişkili Genetik Markır Araştırmaları

Günümüzde araştırmacılar, KKD gelişiminde çok sayıda gen ve/veya kantitatif özellik lokusunun (QTL) etkili olduğu konusunda hemfikirdirler. Bu genlerin, eklem gevşekliği, eklem gevşekliğine tolerans, osteoartrit ilerlemesi, enflamatuar yanıt, kas, kemik ve yumuşak doku oluşumu ve hücre dışı matriksin sentezi/yıkımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ahner vd., 2019).

Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda KKD gelişimi ile ilişkili olabilecek, 116 genetik markır önerilmiştir (*Ek 1*). Bu markırlar, 38 köpek kromozomundan 27 tanesi üzerine dağılmış şekildedir (Şekil 2.15.). En fazla genetik markır 25. kromozom üzerinde bulunmuştur.



Şekil 2.15. KKD ile ilişkisi olduğu rapor edilmiş markırların köpek kromozomları üzerindeki dağılımı. *Ek 1*'de verilen tablodan yararlanılarak çizilmiştir.

2.3.4.1 Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Laminin subunit alpha 2 (LAMA2, Gen ID: 100683420) geni üzerindeki 7 adet TNP'nin, tüm köpek ırklarında KKD ile ilişkili olduğu Martin (2019) tarafından öne sürülmüştür. Bu TNP'lerden 5 tanesi intronik, 1 tanesi eşanlamlı mutasyona ve bir tanesi yanlış anlamlı mutasyona neden olmaktadır. Eş anlamlı mutasyona neden olan TNP'nin, ekson-intron kesim bölgesine (splice) yakın olması nedeniyle kesim bölgesinin hatalı seçimine neden olacağı düşünülmüştür. Yanlış anlamlı kodlamaya neden olan TNP ise 16. eksondadır ve 716. kodonun serin aminoasidi yerine arjnin aminoasidi kodlamasına neden olmaktadır. Laminin proteinindeki mutasyonların eklemin hatalı bir şekilde büyümesine neden olduğu ve merozin yokluğuna bağlı doğuştan kas erimesi hastalığı ile ilişkili olduğu daha önceki araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Martin, 2019).

Osteoklast uyarıcı faktör 1 (OSTF1, Gen ID: 484161) geninin 4. intronundaki bir TNP'nin AÇK'larda KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013). OSTF1 geni, osteoklast hücrelerinin oluşum ve aktivasyonunda dolaylı olarak rol alan, kemik yıkımını aktive eden osteoklast uyarıcı faktör 1 proteinini kodlar. Osteoklast hücreleri, kemik yıkımından birinci derecede sorumlu hücrelerdir. Makrofajlar, dentrik hücreler ve monositler osteoklast hücrelerine dönüşüm yeteneklerini korurlar (An, Narayanan, Manes, & Nita-Lazar, 2014). Osteoblast hücrelerinin aktivitesi ile kemik birikimi ve osteoklast hücrelerinin aktivitesi ile kemik yıkımı olayları; hem kalsiyum dengesini hem de kemik bütünlüğünü korur. Bununla birlikte, osteoblastların ve osteoklastların aktiviteleri dengesiz hale gelirse, özellikle osteoklastik aktivite osteoblastik aktiviteden yüksekse, bireylerin kemik, eklem hastalıklarına ve kırıklarına yakalanma riski artmaktadır (An vd., 2014).

LAMA2 geninin 70.938.018 kromozom pozisyonundaki (KroP) bir TNP (intron bölgesi, T>A) ve 70.997.779 pozisyonundaki bir başka TNP (eksonda, eşanlamlı, A>T) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (Lavrijsen vd., 2014). Lamininlerin kıkırdak gelişimi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Dürr, Lammi, Goodman, Aigner, & von der Mark, 1996).

NADPH oksidaz 3 (NOX3, Gen ID: 484046) geni ile AT zengini etkileşim bölgesi 1B (ARID1, Gen ID: 484047) geni arasındaki 2 TNP'nin AÇK ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Birincisi, 45.382.633 kromozom pozisyonunda bulunan

C>A TNP'si, ikincisi ise 45.161.186 kromozom pozisyonunda bulunan G>C TNP'sidir (L. Mikkola vd., 2019a).

2.3.4.2 Üçüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Kondrotin sülfat sentaz 1 (CHSY1, Gen ID:488704) ve ADAM metallopeptidaz trombospondin tip 1 motif 17 (ADAMTS17, Gen ID: 488708) genleri yakınında bulunan bir TNP'nin (BICF2G630339806) KKD ile ilişki olduğu rapor edilmiştir (Bartolomé vd., 2015). CHSY1 enzimi kondroitin sülfat (CS) sentezinde önemli rol oynar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, CHSY1'in eklem şeklinin oluşumunda önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (D. G. Wilson vd., 2012). ADAMTS17 genleri üzerindeki polimorfizmler, insanlarda osteoartrit ve osteoporoz ile ilişkilendirilmiştir (Rodriguez-Lopez vd., 2009; Xiong vd., 2009).

Fosfoglukomutaz 2 (PGM2, Gen ID: 479116) genin 8. intron bölgesindeki bir TNP'nin, Alman Çoban Köpeklerinde KKD ile ilişkili oldu rapor edilmiştir. Genin, endokondrial kemik oluşumu ve iskelet displazisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b).

Üçüncü kromozom üzerinde, 74.720.873. nükleotid pozisyonundaki intergenik bir TNP'nin (BICF2S2459425) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zhou vd., 2010).

2.3.4.3 Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Karbonhidrat sülfotransferaz 3 (CHST3, Gen ID:100855759) geninin kodladığı protein, CS biyosentezinde, özellikle sülfatlama işleminde rol almaktadır. CS, N-asetil-galaktoz amino glikan ve glukuronik asidin tekrar eden disakarit yapısına sahip, uzun dallı bir polisakarit zincirinden oluşan, sülfatlanmış bir glikozaminoglikandır. CS, kıkırdak, kemik başta olmak üzere; cilt, bağlar ve tendonlar dahil birçok bağ dokusunun hücre dışı matrisinin ana bileşenidir. Eklem kıkırdağının biyomekanik özellikleri için gerekli olmasının yanında kıkırdak dokuya direnç ve esneklik sağlar. Yaşlanmaya veya genetik faktörlere bağlı olarak kıkırdak dokunun yenilenmemesi durumunda oluşan eklem rahatsızlıkları için, reçetesiz gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu gıda takviyeleri köpek balığı ve sığırların kıkırdak dokularından elde edilmektedir (Bartolomé

vd., 2015; Henrotin, Mathy, Sanchez, & Lambert, 2010; Uluslararası Kalça Displazisi Enstitüsü, 2018). Labrador Retriever ırkı köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda, CHST3 geninde 19 TNP'nin KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Martinez vd., 2013). Bu TNP'lerden 8 tanesi 5' UTR ucunda, 2 tanesi 3' UTR ucunda, 5 tanesi intronik bölgede, 3 tanesi eksonlar (2 eşanlamlı, 1 yanlış anlamlı) üzerindedir. Yine Labrador Retriever ırkı köpekler üzerinde yürütülen bir başka çalışmada, 5' UTR (rs24076746) ve 3' UTR ucunda (rs24105396) bulunan 2 TNP, KKD gelişimi ile yüksek önem derecesinde ilişkili bulunmuştur (Bartolomé vd., 2015).

Miyopalladin (MYPN, Gen ID: 489013) geninin 2. intronundaki bir TNP AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Distl vd., 2013)

2.3.4.4 Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Lavrijsen vd. (2014), Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili genetik markırları, genom çapında araştırdıkları çalışmalarında, beşinci kromozom üzerinde bir TNP'nin ve bir delesyonun hastalık ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bunlardan birincisi, Nefrosistin 4 (NPHP4, Gen ID:489625) geninin 5' UTR ucunda, 62.929.475 kromozom pozisyonundaki C>T TNP' sidir. Diğeri ise Kelch benzeri protein ailesi üyesi 17 (KLHL17, Gen ID:489607) genin 3' UTR ucunda, 59.194.609 kromozom pozisyonundaki bir delesyondur (G>-).

SKI proto onkogen (SKI, Gen ID: 489610) geni üzerindeki mutasyonlar, birçok kemik morfolojisiyle ve kemik büyüme hızı ile ilişkilendirilmiştir. Gen üzerinde yanlış anlamlı mutasyona neden olan bir TNP'nin KKD gelişimi ile ilişki olduğu rapor edilmiştir (Martin, 2019).

2.3.4.5 Yedinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

SET ve MYDN alanı içeren 3 (SMYD3, Gen ID: 480101) geninin kas kütlesinin belirlenmesine ve iskelet kası büyümesi proseslerine katıldığı rapor edilmiştir (Proserpio, Fittipaldi, Ryall, Sartorelli, & Caretti, 2013). Genin 0,5 mb akış yukarında bulunan bir TNP'nin (BICF2G630558239) KKD ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Bartolomé vd., 2015).

2.3.4.6 Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Lösin zengini tekrar proteini 1 (LRR1, Gen ID: 490676) geninin 3' UTR ucunda 29.247.021 kromozom pozisyonundaki bir TNP'nin (C>T) (Lavrijsen vd., 2014) ve genin akış aşağısındaki bir başka TNP'nin Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Martin, 2019). LLR1'in kıkırdak gelişiminde rol aldığı ve kondrositlerin proteoglikan sentezleme yolağında bulunan proteinler ile etkileşime girdiği bilinmektedir.

Prostoglandin D2 reseptör (PTGDR, Gen ID: 610845) geninin akış aşağısında 31.496.895 kromozom pozisyonundaki bir TNP (C>T) ve 31.496.910 kromozom pozisyonundaki bir başka TNP (C>T)'nin KKD gelişimi ile ilişkili olduğu, 2 çalışmada rapor edilmiştir (Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019).

Köpek sekizinci kromozomunda intergenik pozisyondaki bir TNP (BICF2P1184132) AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Distl vd., 2013).

2.3.4.7 Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Ficolin 2 (FCN2, Gen ID: 608247) ve Olfaktomedin 1 (OLFM1, Gen ID:480685) genleri arasında bulunan bir TNP'nin, Alman Çoban Köpeklerinde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Fels vd., 2014b).

2.3.4.8 Onuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Protein kinaz C epsilon (PRKCE, Gen ID: 609934) geni, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz ve hayatta kalma dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte görev alan, serin ve treonin spesifik protein kinazlar ailesi üyesidir. Protein kinaz C ailesi ile yapılan çalışmalarda kemik dokunun yeniden şekillendirilmesinde osteoklast aktivitesinin regülasyonundan sorumlu oldukları rapor edilmiştir (Moonga, Stein, Kilb, & Dempster, 1996; C. Wang vd., 2003). PRKCE geninin 30 kb akış yukarısında bulunan bir TNP'nin (BICF2S2452559) KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Bartolomé vd., 2015).

2.3.4.9 On Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Labrador Retriever ırkı köpeklerde, 11. kromozom üzerinde 32.935.770 (BICF2P550340) ve 57.517.597 (BICF2S23432143) nükleotid pozisyonlarındaki 2 integenik TNP'nin KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zhou vd., 2010).

2.3.4.10 On İkinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Köpek kalça displazisi gelişimi ile ilişkilendirilebilecek biyokimyasal yolaklarda görev alan hiçbir genin yakınında bulunmayan bir TNP (BICF2P548082)'nin KKD ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir (Bartolomé vd., 2015). Bu TNP'nin yakınında bulunan genlerin tüm işlevleri bilinmiyor olabilir veya TNP hastalıkla ilişkili olabilecek bir gen üzerindeki TNP ile bağlantı dengesizliğinde (LD) olabilir.

2.3.4.11 On Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Paraoksonaz 2 (PON2, Gen ID: 403855) geninin 183 kb akış yukarısında bulunan bir TNP (BICF2P1089246) ve Kort-aktin bağlayıcı protein 2 (CTTNBP2, GI: 100687879)'nin dokuzuncu intronu üzerindeki bir TNP (BICF2P1282232), Bernese Dağ Köpeklerinde KKD gelişimi ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (Pfahler & Distl, 2012). PON2 geninin iskelet kası gelişimi ile ilişkili olduğu ve iskelet kası yetersizliklerinin KKD'ye neden olabileceği belirtilmişken, CTTNBP2 geninin KKD ile ilişkili belirgin bir yolak üzerinde yer almadığı rapor edilmiştir (Pfahler & Distl, 2012).

2.3.4.12 On Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Üçlü motif içeren protein 2 (TRIM2, Gen ID: 475470) geninden yaklaşık 40 kb uzakta bulunan bir TNP (BICF2S23013075), Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili bulunmuştur (Huang vd., 2017). TRIM2 genindeki mutasyonların, kas güçsüzlüğü, atrofi, duyusal bozukluklar, iskelet deformitesi özellikleri ile karakterize Charcot-Marie-Tooth hastalığına neden olduğu daha önce rapor edilmiştir (Montecchiani vd., 2015). Köpeklerde pektineus ve pelvik kas kütlelerinin az olmasının KKD gelişimi ilişkili olduğu, güçlü pelvik kaslarının kalçanın stabil kalması için önemli olduğu bilinmektedir (Kass, Wallace, & Guffy, 1997).

2.3.4.13 On Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Fibroblast büyüme faktörü 4 (FGF4, Gen ID: 483680) geninin yakınında bulunan bir TNP'nin (BICF2S230609) KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Bartolomé vd., 2015). Fibroblastlar hücre dışı matrisin tüm yapısal bileşenlerini salgılar ve bağ dokuların yapısal bütünlüğünü korur. FGF ailesi üyeleri embriyonik gelişim, morfogenezis ve doku onarımı ile ilişkilidir. Bununla beraber, embriyonik dönemde distal ekstremitelerin morfogenezi ile ilişkilendirilmişlerdir (Boulet, Moon, Arenkiel, & Capecchi, 2004).

2.3.4.14 On Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Aktivin A reseptörü tip 2A (ACVR2A, Gen ID: 476140) geninin 9. intron bölgesindeki bir TNP, AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Distl vd., 2013). Bununla beraber, 35.533 nükleotid pozisyonundaki bir başka TNP (TIGRP2P265674), yine AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Fels & Distl, 2014a)

2.3.4.15 Yirminci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

RAS onkogen ailesi üyesi (RAB7A, Gen ID: 404007) geninin, iskelet büyümesi ve yeniden şekillenmesi sırasında, kemik yıkımından (resorbe edilmesinden) sorumlu olan osteklast hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhao, Laitala-Leinonen, Parikka, & Väänänen, 2001). RAB7A geninin, 50 kb akış yukarısında bulunan bir TNP'nin (BICF2G630227898) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Bartolomé vd., 2015).

Lavrijsen vd. (2014), Labrador Retriever ırkı köpeklerde, KKD ile ilişkili genetik markırları genom çapında araştırdıkları çalışmalarında, yirminci kromozomda bulunan 10 farklı gen üzerindeki 10 TNP'nin KKD ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bunlardan 3 tanesi ekson bölgesindedir; Laktotransferin (LTF, Gen ID: 484787) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 45.260.332, A>G), NACHT ve WD tekrar bölgesi içeren 1 (NWD1, Gen ID: 476678) geni üzerinde bir TNP (KroP: 48.804.130, G>A) ve kalsiyum ve integrin bağlayıcı protein ailesi 1 (CIB3, Gen ID: 610270) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 49.318.725, C>T). 20. kromozomda KKD ile ilişkili 10 TNP'den 2 tanesi ise intron bölgesindedir; PBX homeobox 4 (PBX4, Gen ID:609679) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 46.671.813, C>G) ve Kalsiyum homeostasis endoplazmik retikulum proteini

(CHERP, Gen ID: 610237) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 49.019.261, T>C). 3 tanesi 3' UTR ucundadır; kıkırdak ara tabaka proteini (CILP2, Gen ID: 484804) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 46.706.734, A>G), büyüme ve farklılaşma faktörü 15 (GDF15, Gen ID: 484822) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 47.636.184, G>A) ve UNC13 homolog A (UNC13A, Gen ID: 484833) geni üzerindeki bir TNP (KroP: 48.243.399, G>-). Bir tanesi 5' UTR ucundaki; U6 küçük nüklear RNA (LSM4, Gen ID: 609922) geni üzerindeki TNP (KroP: 47.714.388, G>A). Bir TNP (KroP:48.071.192, G>A) ise insülin benzeri protein 3 (INSL3, Gen ID: 403436) genin akış yukarısında bulunmaktadır.

Lavrijsen vd. (2014)'nin bulgularıyla paralel olarak, Martin (2019)'nin çalışmasında da LSM4 geni üzerindeki 5 TNP KKD ile ilişkili olarak rapor etmiştir. Büyüme hızı ile ilişkili olduğu bilinen LSM4 geninin akış yukarısındaki 3 TNP, intronik 1 TNP ve genin akış aşağısındaki bir TNP'nin tüm köpek ırklarında KKD ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Martin, 2019).

2.3.4.16 Yirmi Birinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Labrador Retriever ırkı köpeklerde, yirmi birinci kromozomda, 43.337.454 kromozom pozisyonundaki bir TNP'nin (BICF2P2429643) KKD gelişimi ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sánchez-Molano vd., 2014b).

2.3.4.17 Yirmi Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Yirmi dördüncü kromozom üzerinde, SRC (SRC proto-onkogen, Gen ID: 485864) geni yakınlarında yer alan, 28.944 nükleotit pozisyonunda bulunan bir TNP (BICF2S2367279), AÇK'larda KKD gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (Fels & Distl, 2014a). SRC geni iskelet yapısının reorganizasyonunda kemik oluşumuna katılır ve osteoklast hücrelerinin sağkalımı ile ilişkilidir. Farelerde SRC geninin nakavt edilmesi, osteoklast hücrelerinin kemiği yıkma aktivitesini azaltmış ve buna bağlı olarak artan kemik yoğunluğu ile karakterize osteopetrosiz (kemiklerin aşırı yoğunlaşması, büyümesi) hastalığı meydana gelmiştir (Miyazaki, Tanaka, Sanjay, & Baron, 2006)

2.3.4.18 Yirmi Beşinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Kollajen uzun kemiklerin uç kısımlarında bulunan, kemiğin uzamasını sağlayan epifiz plağında bulunur. Bununla beraber COL6A3, merozin yokluğuna bağlı doğuştan

kas erimesi ile ilişkili bulunmuştur (Martin, 2019). Tip 6 kollejenin alfa 3 zinciri (COL6A3, Gen ID: 403582) geninin, tüm köpek ırkları için KKD ile ilişkili 13 TNP içerdiği Martin (2019) tarafından rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada (Lavrijsen vd., 2014), COL63A geni üzerindeki 4 TNP'nin Labrador Retriever ırkı köpeklerde, KKD gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu dört TNP'den 3 tanesi ekson bölgesinde (KroP:51.031.100, A>G; KroP:51.040.259, A>G; KroP:51.046.607, G>A) ve 1 tanesi intron bölgesinde (KroP: 51.029.326, G>A) bulunmaktadır.

İnositol polifosfat 5 fosfataz (INPP5D, Gen ID: 100688270) geni, kemik yıkımından sorumlu olan osteoklast hücrelerinin uzun yaşamaları ile ilişkilidir. Birbirinden farklı iki araştırmada, INPP5D geni üzerindeki 8 TNP, KKD gelişimi ile ilişkili olarak rapor edilmiştir (Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019). Gen üzerindeki 5 TNP'nin (3 tanesi intron üzerinde, 2 tanesi ekson üzerinde eş anlamlı), Martin (2019) çalıştığı tüm köpek ırklarında KKD ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Labrador Retriever ırkı köpeklerde, INPP5D geninde yapılan bir başka araştırmada, genin akış yukarısındaki bir TNP (KroP:47.629.272, C>T), ekson üzerindeki eş anlamlı bir TNP (KroP: 47.666.842, G>A) ve intron bölgesindeki bir TNP'nin (KroP: 47.685.188, C>T) KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Lavrijsen vd., 2014)

SH3 domain bağlayıcı protein 4 (SH3BP4, Gen ID: 486172) geni, reseptör (klatrin reseptörü) aracılı endositoz kontrolünde görev alır. Genin akış aşağısındaki bir TNP'nin KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Martin, 2019).

Histon deasetilaz 4 (HDAC4, Gen ID: 607662) geni, Runx2 geninin aktivitesini inhibe ederek, kondrosit hipertrofisini etkiler. Runx2 geni kemik, diş ve kıkırdakların gelişim ve korunmasını sağlayan bir protein kodlar. Bunula beraber HDAC4 geni nakavt edilmiş farelerde, erken kondrosit hipertrofisine bağlı olarak gelişen kemiklerin, erken kemikleşme gösterdiği tespit edilmiştir. Bu gen üzerindeki intronik bir TNP'nin KKD ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir (Martin, 2019).

Lavrijsen vd. (2014), Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili genetik markırları genom çapında araştırdıkları çalışmalarında, yirmi beşinci kromozomda 7 gen üzerindeki 13 TNP'yi KKD gelişimi ilişkili olarak rapor etmişlerdir. INPP5D ve COL6A3 genleri üzerindeki TNP'ler yukarıda açıklanmıştır. Geriye kalan 5 gen ve üzerlerindeki TNP'lerin pozisyonları şu şekildedir; UDP-glukuronozil transferaz 1-9

(LOC100688622, Gen ID: 100688622) geni ekson üzerinde yanlış anlamlı mutasyona neden 1 TNP (KroP: 48.075.297, C>G) ve genin akış aşağısında bir TNP (KroP: 48.076.278, G>A), Salgılanan fosfoprotein 2 (SPP2, Gen ID:610394) geninin intron bölgesindeki bir TNP (KroP: 48.396.330, C>T), Ankirin ve SOCS kutusu tekrarı içeren 18 (ASB18, Gen ID: 486175) geninin akış aşağısındaki 1 TNP (KroP: 50.050.076, G>A), IQ motif içeren AAA Bölgesi 1 (IQCA1, Gen ID: 477415) geninin intron bölgesindeki bir TNP (KroP: 50.228.063, C>G), HES ailesi bHLH transkripsiyon faktörü 6 (HES6, Gen ID: 607298) geninin akış aşağısındaki 1 TNP'dir (KroP: 51.736.576, T>C).

2.3.4.19 Yirmi Altıncı Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Ras 2 proteinin kinaz supresörü 2 (KSR2, Gen ID: 486291) geni yakınlarında, kromozom pozisyonu 17.181. nükleotit olan bir TNP'nin (BICF2P281364) AÇK'larda KKD ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Fels & Distl, 2014a). KSR2'nin, kemik homeostasisinde görev alan proteinlerle ve osteoklast sağ kalımının negatif regülatörü olan proteinlerle etkileşimde oldukları rapor edilmiştir (Adapala vd., 2010).

2.3.4.20 Yirmi Sekizinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

C-terminal bağlayıcı protein 2 (CTBP2, Gen ID; 100684514), kemiğin tekrar şekillenmesinde önemli rol oynayan Wnt (wingless integration site) yolağında, transkripsiyon inhibitörü olarak görev yapar. Wtn yolağı ile etkileşime girerek kemiğin tekrar şekillenmesinde görev alır (Hayward vd., 2016; Huang vd., 2017; Velasco vd., 2010). Bu gen üzerindeki TNP'ler Golden Retriever ve Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili bulunmuşken, AÇK'larda ilişkili bulunmamıştır (Hayward vd., 2016). Labrador Retriever ırkı köpekler ile yapılan bir başka çalışmada, CTBP2 geni üzerindeki TNP'nin KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Huang vd., 2017).

2.3.4.21 Yirmi Dokuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Peroksizomal biyogenez faktörü 2 (PEX2, PXMP3, Gen ID: 487007) geninin 1. intronu üzerindeki bir TNP AÇK'larda KKD ile ilişkili olarak bulunmuştur (Distl vd., 2013).

2.3.4.22 Otuzuncu Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Otuzuncu kromozom üzerindeki, 13.883.057. pozisyonundaki intergenik bir TNP'nin (BICF2P799261) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD gelişimi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Zhou vd., 2010).

2.3.4.23 Otuz İkinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

CDP-diaçilgliserol sentaz (CDS1, Gen ID: 487840) geni, fosfolipid sentezi ile ilişkilidir, fosfolipidler kemik gelişimi sırasında epifiz plağında bulunurlar ve kemikleşme süreci için önemlidirler. Bu gen üzerindeki 13 TNP, Martin (2019) tarafından KKD ile ilişkili olarak bildirilmiştir. TNP'lerin 8 tanesi intronik, 1 tanesi genin akış yukarısında, 3 tanesi akış aşağısında bulunmaktadır. TNP'lerden bir tanesi kodlanan bölgededir ve eş anlamlı mutasyona neden olmaktadır.

İntegrin bağlayıcı sialoprotein (IBSP, Gen ID: 609146) geni, kemik, dentin, sementum ve kalsifiye kıkırdak gibi mineralleşmiş dokularda bulunan, yüksek oranda glikozile edilmiş ve sülfatlanmış bir fosfoprotein olan, kemik sialoproteinini kodlar. Kemik sialoprotein, kemik ve dişlerde mineralleşmenin birincil düzenleyicilerinden biri olduğu düşünülmektedir. Kemik sialoprotein, kemik ve sementumdaki toplam kollajen olmayan proteinlerin % 8-12'sini oluşturur, dentin'de oldukça düşük miktarlarda (% 1) bulunur (Bianco, Fisher, Young, Termine, & Robey, 1991; Fisher & Fedarko, 2003; Ganss, Kim, & Sodek, 1999). 33 kDa'lık kemik sialoproteini, kemik dokunun farklılaşması ve oluşumu sırasında, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilir. Embriyonik gelişim sırasında, ilk olarak kemik oluşumunun başlangıcında saptanabilir ve ekspresyonu primer kemik oluşumunda mineralizasyonun başlaması ile maksimuma ulaşır (Chen, Shapiro, & Sodek, 1992). IBSP geninin 3. intronunda bulunan bir TNP, AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Distl vd., 2013).

Kreatin tip II sitoskeletal 8 pseudogen (LOC487839, Gen ID:487839) geninin akış yukarısındaki bir delesyonun (KroP: 11.265.116, - >T) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Lavrijsen vd., 2014).

2.3.4.24 Otuz Üçüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

EPH reseptör A3 (EPHA3, Gen ID: 487930) genin 5. intronunda, EPH Reseptör A6 (EPHA6, Gen ID: 607935) geninin 3. intronunda ve PEST proteolitik sinyal içeren çekirdek proteini (PCNP, Gen ID: 478546) geninin 2. intronunda bulunan birer TNP'nin Alman Çoban Köpeklerinde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b).

ABI ailesi üyesi 3 bağlayıcı protein (ABI3BP, Gen ID: 478544) genin 3. intronundaki bir TNP, AÇK'larda KKD ile ilişkili bulunmuştur (Distl vd., 2013).

2.3.4.25 Otuz Dördüncü Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Fibroblast büyüme faktörü 12 (FGF12, Gen ID: 478676) geninin 3. intronundaki bir TNP'nin AÇK'larda KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b). Günümüze kadar yapılan araştırmalarda, fibroblast büyüme faktörleri ve reseptörlerinin hem endokondral hem de intra membranöz kemik gelişimi sinyal yolaklarında önemli roller oynadıkları görülmüştür. FGF sinyal yolağının, iskelet gelişimindeki öneminin anlaşılması; FGFR3'ün transmembran bir bölgesini kodlayan DNA dizisinde meydana gelen nokta mutasyonun, insanlarda en sık görülen cücelik türüne (akondroplazi) neden olması ile anlaşılmıştır (Ornitz & Marie, 2002). FGF ailesi üyeleri kıkırdak homeostazisinde rol alırlar (Ellman vd., 2013).

FGF ailesi çeşitli biyolojik faktörlere sahip, yapısal olarak ilişkili 22 polipeptitten oluşur. FGF'ler 7 farklı fibroblast büyüme faktörü reseptörlerine (FGFR) bağlanarak sinyal transdüksiyonu meydana getirirler. FGF ve FGFR'ler kondrojenez, osteojenez, anjiyogenez, yara iyileşmesinde rol oynamalarının yanında çok çeşitli hücre ve dokuların çoğalması ve farklılaşmasında kilit rol oynarlar. Osteogenezde, FGF/FGFR sistemi, osteoblastların proliferasyonunu, olgunlaşmasını ve farklılaşmasını ve ayrıca kemik matriks mineralizasyonunu desteklerler. Bu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar iskelet sisteminin anormal gelişmesine neden olmaktadır (Boles & Dhamcharee, 2012, s.2879).

FGF12 geni, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi proteinlerinden biri olan FGF12 proteinini kodlar. FGF ailesi üyeleri mitojenik ve hücre hayatta kalım

aktivitelerinin yanında, embriyonik gelişim, hücre büyümesi, morfogenez, doku onarımı, tümör büyümesi ve invazyon gibi birçok biyolojik süreçte görev alırlar (NCBI, 2018).

Üçlü rho guanin değişim faktörü (TRIO, Gen ID:478610) geni kıkırdak gelişimi farklılaşması yolağında rol almaktadır. Genin 12. intronu üzerinde bulunan bir TNP'nin AÇK'larda KKD ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bununla beraber yine aynı kromozom üzerinde bulunan, semaforinin 5A (SEMA5A, Gen ID: 478622) geninin 3. intronunda ve çözünür taşıyıcı aile 6 üye 3 (SLC6A3, Gen ID: 609304) geninin 11. intronunda bulunan birer TNP'nin AÇK'larda KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b).

Bir başka çalışmada, yine TRIO geninin 700 kb akış aşağısında, 4.239. kromozom pozisyonundaki bir TNP (BICF2P1086886) AÇK'larda KKD gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Fels & Distl, 2014a).

34. kromozom üzerinde, pozisyonu 39346. nükleotit olan bir TNP (BICF2P355865) AÇK'larda KKD gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (Fels & Distl, 2014a).

2.3.4.26 Otuz Altıncı Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Dipeptidil peptidaz 4 (DPP4, Gen ID; 478767) geninin yaklaşık 50 kb yakınında bulunan bir TNP'nin (BICF2P1242852) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Huang vd., 2017). Kan plazmasında DPP4 miktarındaki değişikliklerin romatoid artrit ve OA ile ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir (Gotoh, Hagihara, Nagatsu, Iwata, & Miura, 1989).

2.3.4.27 Otuz Yedinci Kromozom Üzerinde Tespit Edilen Markırlar

Fibronektin 1 (FN1, GI: 403845) genin 361 kb akış aşağısındaki bir TNP'nin (BICF2S23052396) Bernese dağ köpeklerinde KKD gelişimi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Pfahler & Distl, 2012). Fibronektin 1 geni kıkırdak hücre dışı matriksin bir bileşenidir ve matriks organizasyonunda önemli rolü olduğu öne sürülmüştür. Lezyonlu femur başı kıkırdağındaki fibronektin konsantrasyonları, bu bölgeleri çevreleyen kıkırdaktan daha yüksektir. Bununla beraber, OA riski yüksek olan köpeklerde fibronektin konsantrasyonları, düşük OA riski olan köpeklere kıyasla daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Burton-Wurster, Farese, Todhunter, & Lust, 1999).

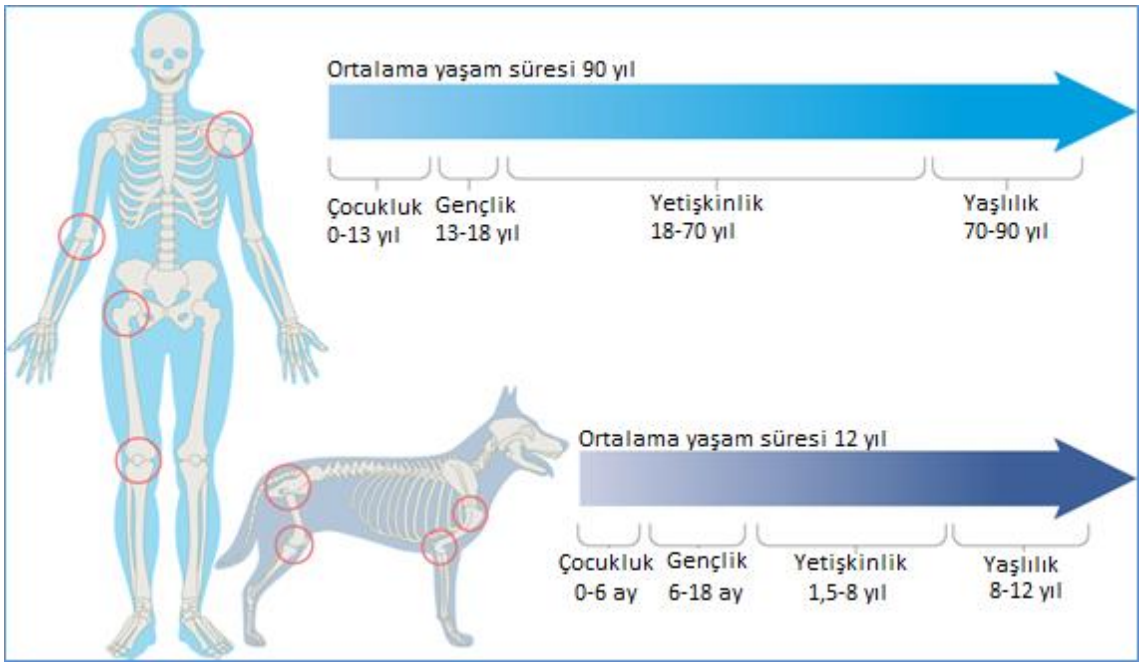
2.4 İnsan ve Köpek Kalça Dispalizisinin Ortak Değerlendirilmesi

Köpek, insanlarda görülen ortopedik hastalıklar ve kanserin daha iyi anlaşılması için kullanılan ve giderek daha da önem kazanan bir model organizmadır (Hayward vd., 2016). Köpeğin mükemmel bir model olarak düşünülmesinin sebeplerinden biri, aynı biyokimyasal yolak ve genlerin neden olduğu 350'den fazla hastalığın, insanlar ile ortak olmasıdır (Shearin & Ostrander, 2010a). Karşılaştırmalı haritalama ile ortak hastalıkların ve karmaşık fenotipik özelliklerin temelinde yatan moleküler genetik mekanizmalar keşfedilebilir (Huang vd., 2017).

İnsanlarda görülen GKD ve sonrasında gelişen osteoartrit, geniş araştırmalara rağmen hala küresel olarak yaygın, tedavi seçenekleri kısıtlı ve masraflı bir hastalıktır (Guo vd., 2011). GKD'nin genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile geliştiği bilinmektedir (Kenanidis vd., 2020). Köpeklerde bu konuda istatistiksel bir bilgi olmasa da, insanlarda gerçekleşen kalça protezlerinin % 82'si osteoartrit tedavisi için uygulanmaktadır (Guo vd., 2011). Hayvan modelleri, hastalığın altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Köpeklerde doğal olarak gelişen KKD ve osteoartrit üzerinde yapılan çalışmalar ve insanlar üzerinde yapılan araştırmaların birleştirilmesi, kemirgen modellerinden veya deneysel olarak indüklenmiş köpek modellerinden elde edilmeyecek kadar zengin bilgiye ulaşılmasını sağlayacaktır (Ahner vd., 2019; Meeson vd., 2019; Shahid vd., 2017).

Kalça displazisi çalışmaları için şimdiye kadar, tavuk, fare, sıçan, tavşan ve köpek gibi çeşitli türler önerilmiştir (Bo, Peng, Xinghong, & Ma, 2012; Ford, Nowlan, Thomopoulos, & Killian, 2017; Nowlan, Chandaria, & Sharpe, 2014; X. Zhang vd., 2015). Bu modellerden köpek dışında kalanları, kendiliğinden hastalığı geliştirmediği için deney başlangıcında bir müdahale veya ameliyat gerekmektedir (Pascual-Garrido vd., 2017). Köpeklerin, aynı insanlarda olduğu gibi, doğal olarak KKD geliştirmesinin yanında, diğer bir önemli özellikleri insanlarınkine benzer şekilde tedavi edilmeleri ve insanlarınkinden çok daha hızlı sürede (1-2 yıl) osteoartrite ilerlemeleridir. Köpeklerin, insanlara göre 5-8 kat daha hızlı yaşlanmaları ve insanlara benzer yaşam evreleri geçirmeleri (Şekil 2.16.), hastalığın doğal seyrinin ve tedavi aşamalarının hızlı şekilde

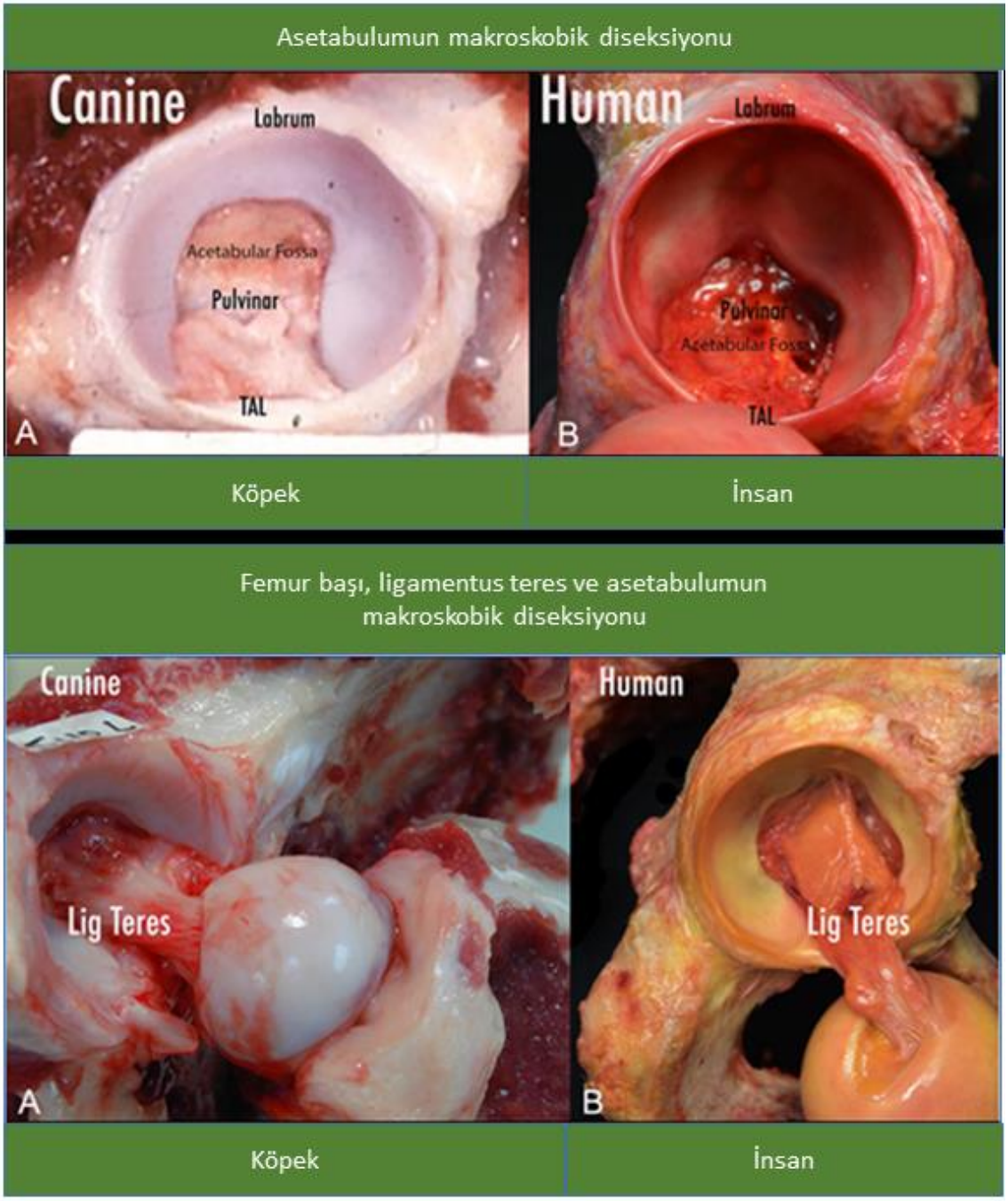
izlenmesi yönünden istisnai bir durum yaratmaktadır (Meeson vd., 2019; Pascual-Garrido vd., 2017).



Şekil 2.16. İnsan ve köpeğin yaşam sürelerinin karşılaştırılması ve sıklıkla osteoartrit geliştirdikleri eklemleri (Meeson vd., 2019).

İnsan kalça eklemi ile köpek kalça eklemi önemli derecede yapısal benzerlik gösterir (Şekil 2.17). Bununla beraber, KKD ve GKD demografik, fenotipik ve klinik özellikleri de paylaşırlar (Çizelge 2.3.) (Pascual-Garrido vd., 2017; Todhunter vd., 2019).

Köpeklerde ve insanlarda kalça displazisinin kalıtsal bileşenleri olduğu bilinmektedir (G. Feldman vd., 2010). GKD, dünya genelinde 1000 doğum başına 1 ile 20 arasında görülmektedir (Kotlarsky, Haber, Bialik, & Eidelman, 2015). Uluslararası Kalça Displazisi Enstitüsüne Göre, insanlarda GKD görülme olasılığı genetik miras ile şu şekilde ilişkilendirilmiştir; GKD hastası bir çocuğa sahip ailenin diğer çocuğunun GKD'li olma olasılığı % 6, ebeveynlerden biri GKD'ye sahipse çocuğun riski % 12, hem bir ebeveyn hem de bir çocuk GKD'ye sahipse yeni çocuğun riski %36'dır (Uluslararası Kalça Displazisi Enstitüsü, 2018). Köpeklerde ise ırka bağlı olarak kalıtım derecesi 0,1-0,83 arasında değişmektedir (E. Leighton, 1997; Loder & Todhunter, 2017; S Wang vd., 2017).



Şekil 2.17. Köpek ve insanda kalça eklemi elemanlarının makroskobik diseksiyonu (Pascual-Garrido vd., 2017).

Çizelge 2.3. Köpek ve insanda kalça displazisinin karşılaştırılması (Pascual-Garrido vd., 2017).

Parametre	KKD	GKD
Kalıtım derecesi	0,1-0,83	Bilinmiyor
İnsidans	Köpek cinsine göre değişir (Labrador %20, St Bernards %50)	1/1000 yeni doğan
Kalça anatomik şekli	Top ve yuva (Ball and socket)	Top ve yuva (Ball and socket)
Cinsiyet	Cinsiyet önemi yok	%80 kadınlarda
Prevalans	Köpek cinsine bağlı olarak %75'e kadar	%20
Kalça ekleminin gevşekliği	Evet	Evet
Hastalığın şiddetli Osteoartrite ilerlemesi	1 yıl	30 yıl
Riski arttıran faktörler	Büyük vücut tipi, hızlı büyüme, obezite	İlk gebelikten doğan bebek, doğumda makat pozisyonunda geliş, amniyon sıvısının az olması
Eklem içinde hastalık meydana gelen bölgeler	Kıkırdak, labrum, lig teres, kapsül	Kıkırdak, labrum, lig teres, kapsül

GKD oluşumu ile ilişkili aday genlerin tespit edilmesi için birçok araştırma yapılmıştır ve çok sayıda gen (CX3CR1, PAPPA2, COL2A1, HOXD9, GDF-5, TGFB1) aday olarak gösterilmiştir (Gkiatas vd., 2019; Kenanidis vd., 2020; Zamborsky vd., 2019). Bu aday genler içerisinden CX3CR1 geni üzerinde bulunan, amino asit değişikliğine neden olan iki TNP'nin farklı popülasyonlarda GKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Basit vd., 2018; G. J. Feldman vd., 2013; L. Li vd., 2017). Köpeklerde ve insanlarda görülen kalça displazisi birçok açıdan yüksek benzerlik göstermesine rağmen, CX3CR1 genin üzerindeki varyasyonların, KKD gelişimi ile ilişkisini rapor eden bir çalışma bulunamamıştır.

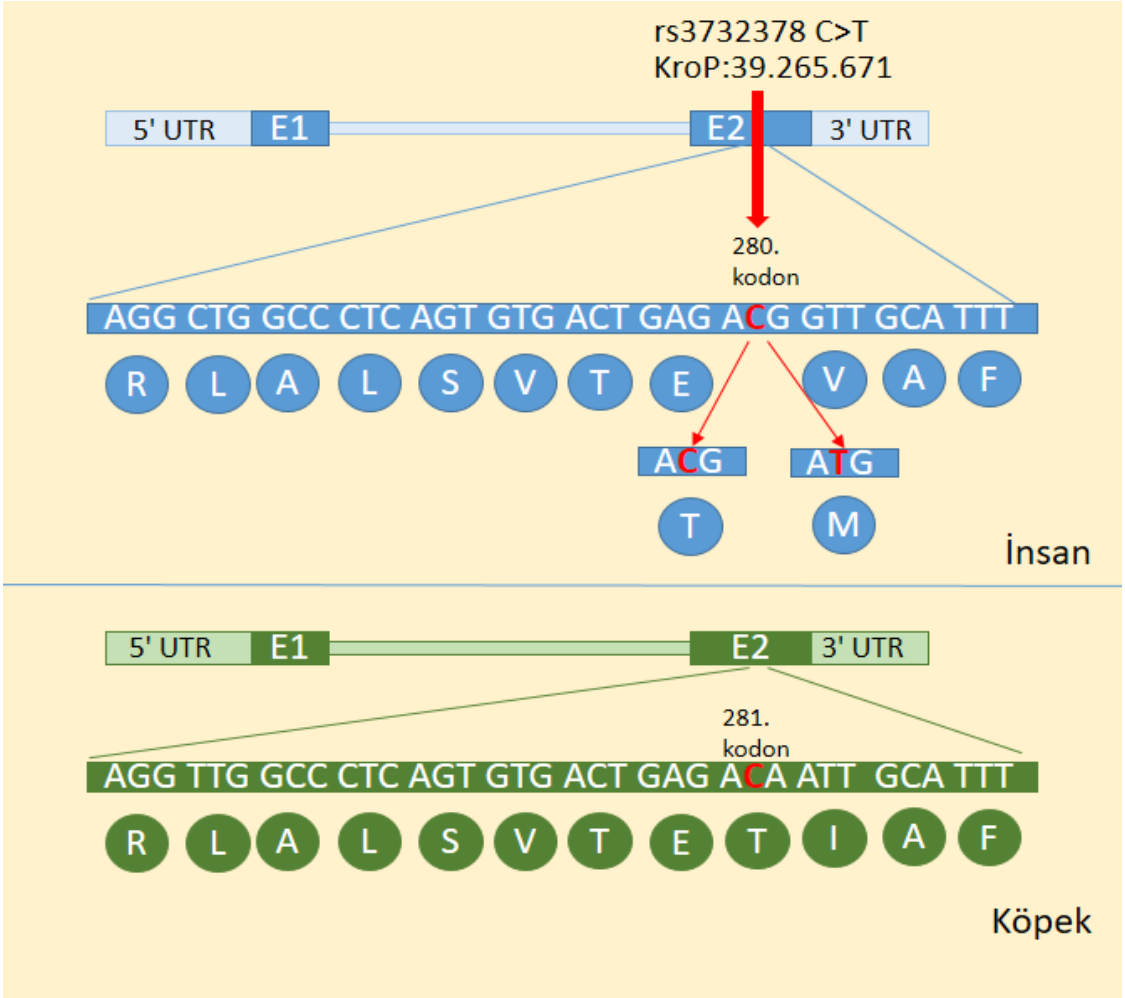
2.4.1 CX3CR1 (C-X3-C Motifli Kemokin Reseptör 1) Geni

CX3CR1 geni, bir kemokin olan C-X3-C Motifli Kemokin Ligand 1 (CX3CL1) proteininin reseptörünü kodlamaktadır. Kemokinler, monositlerin, nötrofillerin, eozinofillerin, lenfositlerin ve fibroblast hücrelerinin göçünü (kemotaksisini) uyaran, düşük molekül ağırlıklı protein ailesidir. CX3CL1'in CX3CR1'e bağlanması hücre göçünü aktive eder. (Wojdasiewicz, Turczyn, Dobies-Krzesniak, Frasunska, & Tarnacka, 2019). Kemokin ailesinin 60 üyesi arasında CX3CL1 ve onun reseptörü CX3CR1 eklem rahatsızlıkları için ilgi çekici bir yolaktır. CX3CR1 geni üzerindeki polimorfizmlerin, CX3CL1'in biyolojik rolünü önemli önemli ölçüde değiştirerek, birçok eklem hastalığına yol açabileceği düşünülmektedir (Wojdasiewicz vd., 2014; Wojdasiewicz vd., 2019).

CX3CL1/CX3CR1 ekseni, mezankimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşması yolağında görev almaktadır. Kondrosit hücresine farklılaşacak mezenkimal kök hücrelerde, CX3CR1 genin yüksek seviyelerde eksprese edildiği bilinmektedir (G. J. Feldman vd., 2013). Dolayısıyla genin hatalı ifadesinin, ileride eklem rahatsızlıklarının etkeni olabilecek, asetabular kıkırdağın sorunlu bir şekilde gelişmesine neden olacağı düşünülmektedir (L. Li vd., 2017). Bununla beraber CX3CR1/CX3CL1 ekseni, kemik dokunun yıkımından sorumlu olan osteoklast hücrelerinin olgunlaşmasında da görev almaktadır (Koizumi vd., 2009; Wojdasiewicz vd., 2019). İskelet sistemi boyunca kemik doku, sürekli olarak yıkılıp yeniden yapılarak reformasyona uğramaktadır. Aynı anda birden fazla bölgede, senkronize olmayan bir şekilde gerçekleşen bu olay, bir taraftan osteoklast hücrelerinin kemik dokuyu yıkması, diğer taraftan osteoblast hücrelerinin kemik doku yapmasıyla dengeli bir şekilde ilerler (Sims & Martin, 2020, s.219). CX3CL1/CX3CR1 eksenin osteoklast hücrelerinin aşırı aktivasyonunda rol alarak, osteoporoza, dolayısıyla eklem rahatsızlıklarına neden olabileceği düşünülmektedir (Wojdasiewicz vd., 2019).

CX3CR1 polipeptid zinciri, hücre membranı boyunca uzanan 7 α-heliks yapısından oluşur. Bu heliks yapıları, hücre dışı, transmembran ve hücre içi olmak üzere 3 gruba ayrılır. Polipeptid zincirinin hücre dışı halkaları CX3CL1 için bağlanama bölgesi oluşturmaktadır (Mizoue, Bazan, Johnson, & Handel, 1999). İnsanlarda CX3CR1 genin, 2. eksonu üzerinde bulunan bir TNP (C>T, rs3732378), CX3CR1 proteinin transmembran domaini üzerinde bulunan 280. aminoasitte, treonin (polar) > metiyonin (nonpolar)

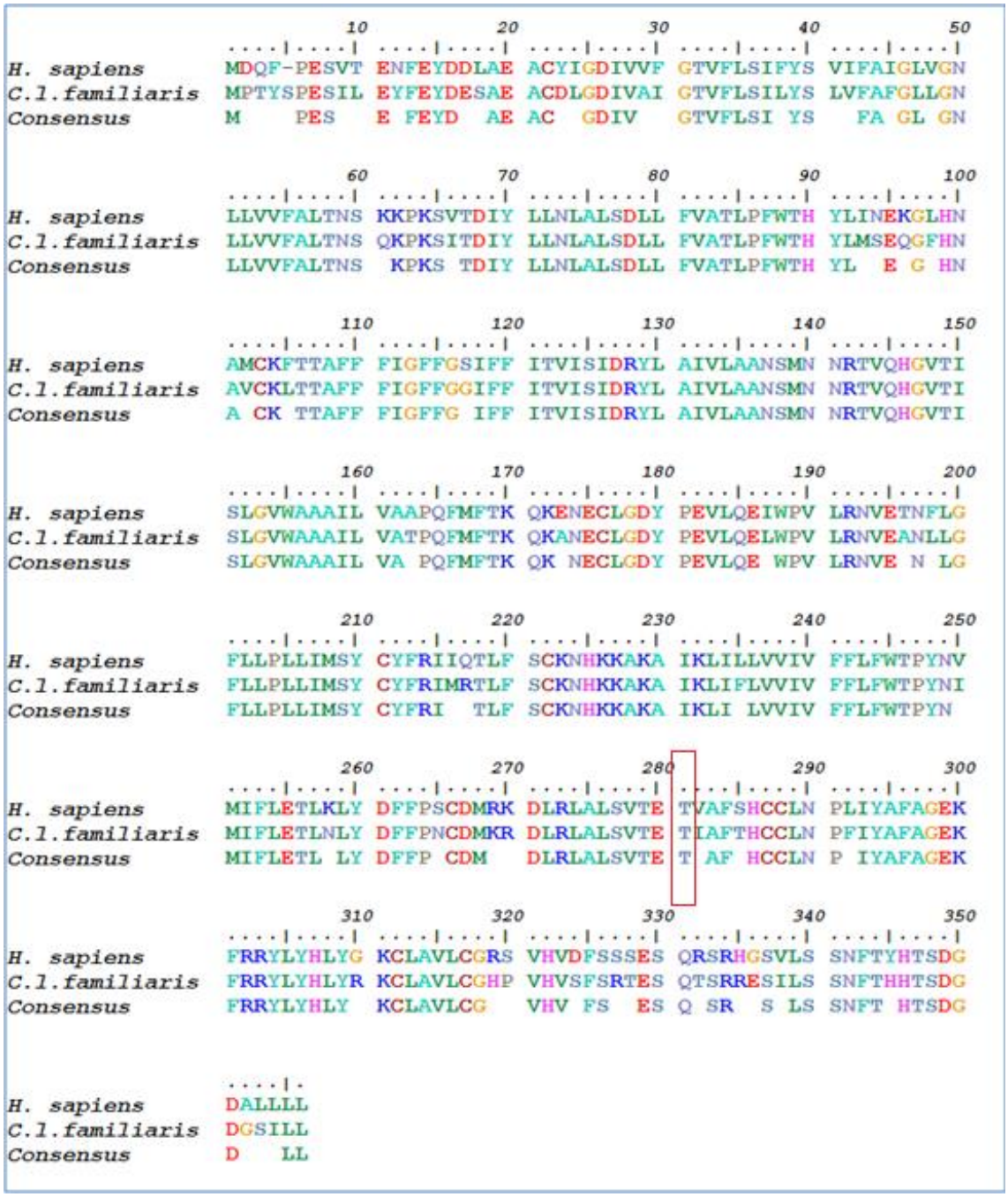
değişimine neden olmaktadır (Şekil 2.18). GKD'li ve sağlıklı insanlar ile yapılan vaka kontrol çalışmalarında bu TNP'nin hastalık ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (G. J. Feldman vd., 2013; L. Li vd., 2017). Bu bölgenin amino asit dizisi köpeklerle benzerlik göstermektedir, köpeklerde de 281. aminoasit treonindir (Şekil 2.19, *Ek 2*).



Şekil 2.18. İnsanlarda GKD'ne duyarlılığı arttırdığı rapor edilen rs3732378 C>T TNP'sinin CXCR1 geni üzerindeki konumu ve aynı bölgenin köpeklerdeki konumu. Amino asit sekanslarının çok yüksek oranda benzer olduğu görülmektedir. T;Treonin, M;Metiyonin, insanlarda GKD için patojen allel T allelidir (G. J. Feldman, Parvizi, Sawan, Erickson, & Peters, 2014)

İnsanlarda ve köpeklerde ortolog olan CXCR1 geni yüksek benzerlik göstermektedir. İnsanda, 3. kromozom üzerinde bulunan, 17.780 nükleotitten oluşan CX3CR1 geni, 2 eksonludur. Köpeklerde ise 17.670 nükleotitten oluşur, 23. kromozom üzerindedir ve yine 2 eksonludur. İnsanlarda 355, köpeklerde ise 356 aminoasit içeren

protein kodlarlar (NCBI, 2018). Amino asit dizileri BioEdit (Hall, 1999) programı ile hizalandığında benzerlikleri %84,9 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. CX3CR1 geninin insan ve köpeklerdeki aminoasit sekansının BioEdit programı ile hizalanmış görüntüsü, %84,9 benzerlik göstermektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Köpek üretim ve eğitim merkezlerinde, hizmet köpeği olarak eğitim alan köpekler bir yaşına geldiklerinde, KKD'ye karşı radyografik olarak taranmaktadır. Kalça displazisine sahip olduğu tespit edilen köpekler, sahiplendirilmeden veya köpek barınaklarına gönderilmeden önce, bir süre bu merkezlerde tutulmaktadır. Vaka örnekleri, kalça displazisi teşhisi konulmuş bu köpeklerden seçildi. Kontrol örnekleri ise, radyografik olarak KKD taramasından geçmiş bir yaşın üzerindeki sağlıklı köpeklerden seçildi. EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer K_2EDTA) toplanan tüm kan örnekleri, moleküler analizler yapılana kadar -18 °C'de saklandı. Örnek sayıları Çizelge 3.1'de verildi.

Araştırma, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığın'nın 16.04.2018 tarih ve 59355200-050.04.04-E.222393 sayılı kararı ile gerçekleştirildi (Ek 3).

Çizelge 3.1. Hasta ve sağlıklı köpeklerden toplanılan örnek sayıları

Irk	Vaka	Kontrol	Toplam
AÇK	24	32	56
Labrador Retriever	17	36	53
Belçika Malinois	14	49	63
		Toplam Örnek Sayısı	172

3.2 DNA Ekstraksiyonu

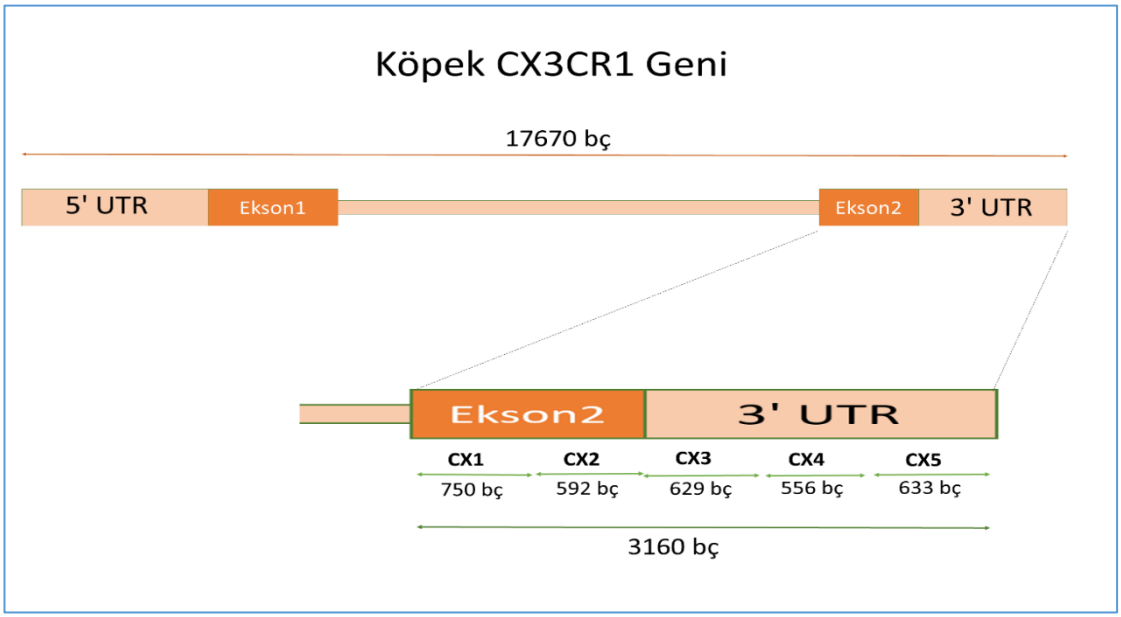
Toplanan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu, kandan DNA ekstraksiyon kiti (GeneMatrix Quck Blood, Eurx) kullanılarak, üreticinin talimatlarına uygun olarak yapıldı. Kısaca, 200 µl kan örneği, 1,5 ml'lik eppendorf tüpü içerisine alındıktan sonra üzerine 10 µl Proteinaz K ve 200 µl Solüsyon T eklendi. 10 dk 70 ºC'de inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl % 70'lik etanol eklendi. Güçlüce vortekslendikten sonra, tüm lizat

DNA bağlama kolonundan geçirildi. DNA bağlama kolonu, 2 defa yıkandıktan sonra membrandaki DNA, elüsyon sıvısı ile koleksiyon tüpüne alındı. Elde edilen elüattan 5 µl alınarak jelde yürütüldü ve DNA ekstraksiyonunun başarısı kontrol edildi. İzole edilen DNA'lar, moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -18 ºC'de saklandı.

3.3 DNA Dizi Analizi Metodu İle CX3CR1 Genindeki Varyasyonların Araştırılması

3.3.1 CX3CR1 Geninin 2. Ekson ve 3' UTR Bölgelerini Çoğaltılacak Primerlerin Tasarlanması

Köpeklerde CX3CR1 geni, 2 eksonludur ve 17670 nükleotidden oluşmaktadır (Ensembl, CX3CR1, 2019). Genin 2. eksonu ve 3' UTR uçlarını kapsayan 3160 bç' lik bölgesini çoğaltacak 5 primer çifti, Primer 3 (Primer-Blast, 2018) programı kullanılarak tasarlandı. Bu primeler ile 750 (CX1), 592 (CX2), 629 (CX3), 556 (CX4), 633 (CX5) baz çifti uzunluğunda DNA fragmentleri çoğaltıldı (Şekil 3.1) (Çizelge 3.2). Çoğaltılan bölgelerinin DNA sekansları CX1, CX2, CX3, CX4 ve CX5 için sırasıyla; *Ek 4, Ek 5, Ek 6, Ek 7 ve Ek 8*' de verildi.



Şekil 3.1. CX3CR1 geninin şematik görüntüsünün altında, 3160 bç' lik bölgenin 5 fragment şeklinde çoğaltıldığı gösterilmiştir. CX3CR1 geninin şeması, Ensembl (Ensembl, CX3CR1, 2019) internet sitesindeki verilerden yararlanılarak çizilmiştir.

Çizelge 3.2. CX3CR1 geninin 2. ekson - 3' UTR bölgelerini çoğaltacak 5 primer çiftinin sekansı ve PCR ürünlerinin boyutları

Primer Kodu	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu (bç)
CX1	F:TACAGGAAAACAGTGTCCGCA	750
	R:TGTGGGACCAAATAGAATCCCAA	
CX2	F:GTTGTTTTTGGGCATTCGGTT	592
	R:CTGCTCCCCCTGCTCATTAT	
CX3	F:AGGTTGGTGGGCATCTCTTG	629
	R:TACCAAAGCCTTGTCCCCAC	
CX4	F:GCTCTGTCAACACTGCTCCT	556
	R:CAAGAGATGCCCACCAACCT	
CX5	F:CCAGAGGATATCATTGAAGAGGAG	633
	R:CTGACCAAGCCCTCCAGTTG	

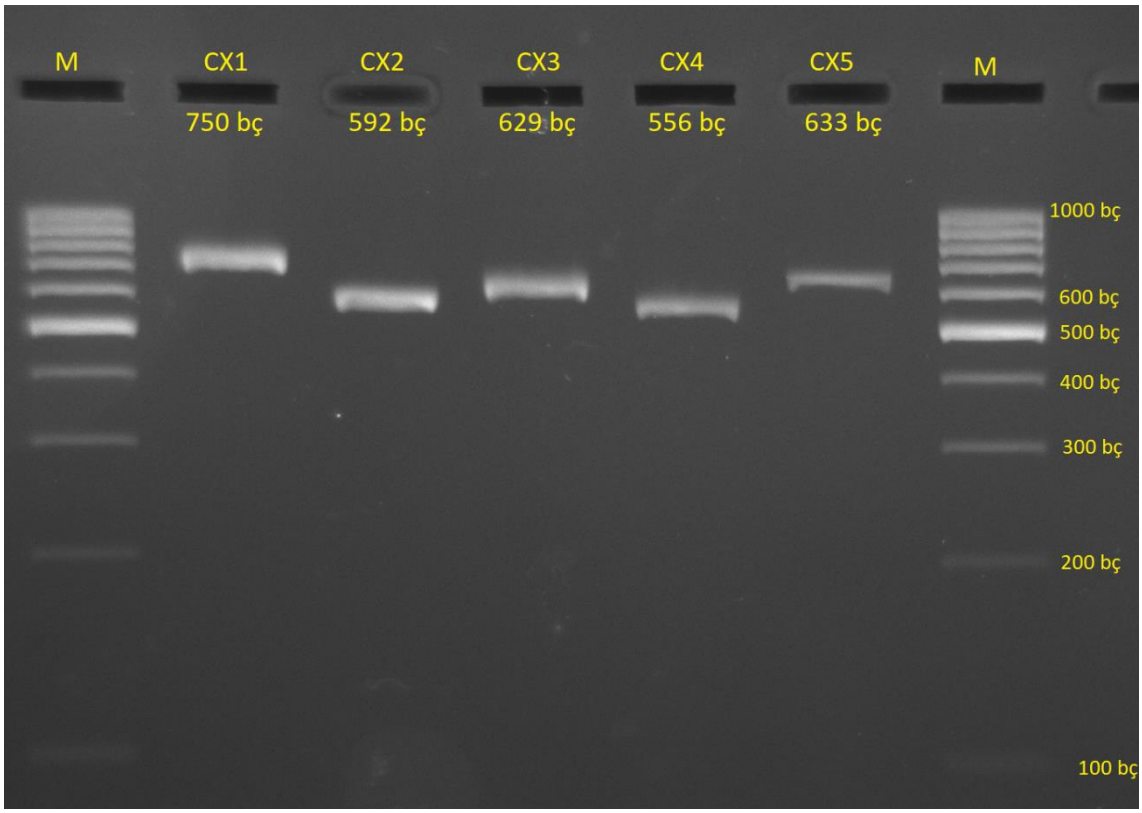
Primerlerin uygun bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek amacıyla gradient PCR yapıldı. Çizelge 3.3'de verilen PCR karışımı kullanılarak, Çizelge 3.4'da verilen PCR protokolüne göre 6 farklı sıcaklıkta çalışıldı. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, DNA bantlarının temizliklerine ve kalınlıklarına bakılarak en uygun bağlanma sıcaklıkları tespit edildi. CX1, CX2, CX3, CX4, CX5 ve CX6 primer çiftleri için sırasıyla 60, 60, 66, 60, 62 °C bağlanma sıcaklığı olarak tespit edildi. Çoğaltılan bölgelerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 3.2'de verildi.

Çizelge 3.3. PCR çalışmasında kullanılan mix içeriği

İçerik	Miktar
Mastermix (K0171, Fermantas)	12,5 µl
Primer F (5 pmol/ µl)	1 µl
Primer R (5 pmol/ µl)	1 µl
Su	7,5 µl
Örnek DNA (50 ng/µl)	3 µl
Toplam Hacim	25 µl

Çizelge 3.4. Gradient çalışmasında kullanılan PCR protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95 ºC	3 dk	1
95 ºC	30 sn	35
56, 58, 60, 62, 64, 66 ºC	30 sn	
95 ºC	45 sn	
95 ºC	5 dk	1



Şekil 3.2. CX3CR1 gen bölgesinde çoğaltılan 5 DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

3.3.2 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen ürünler, PCR ürünü saflaştırma kiti (GeneMatrix, EURx, E3520-02) kullanılarak saflaştırıldı. Kitin kullanım talimatı aşağıdaki gibidir;

- İzolasyon prosedürüne başlamadan önce kolonlar 30 µl "Buffer DX" ile aktif hale getirilir.
- PCR reaksiyon hacminin 2 katı kadar "Orenge DX Buffer" PCR tüplerine eklenir ve vorteks ile karıştırılır.
- Karışım kolonun içerisine aktarılır.
- 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Kolona 500 µl "Wash DX1 Buffer" eklenir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Kolon 600 µl "Wash DX2 Buffer" eklenir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Yıkama tamponlarından kalan atıklardan kurtulmak için kolon boş olarak 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Kolon DNA'nın toplanacağı steril bir tüpe yerleştirilir ve içerisine 100 µl elüsyon tamponu konulur. Oda sıcaklığında 1 dakika beklenildikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen saf DNA -18 ºC'de saklanır.

Saflaştırılan DNA'lar 20 µl saf su ile çözüldükten sonra 2 µl alınarak agaroz jel elektroforezine yüklendi ve 180 voltta 20 dakika yürütüldü. DNA bantları izlenerek, yeterli verimliliğe sahip bantlar veren örneklerin DNA'ları, DNA dizi analizi reaksiyonu kuruluncaya kadar - 18 ºC'de saklandı.

3.3.3 Örneklerin DNA Dizi Analiz Cihazına Yüklenmesi

Örneklerin saf DNA'ları ile Çizelge 3.5'da belirtilen reaksiyon karışımı kullanılarak ve Çizelge 3.6'de belirtilen koşullarda DNA dizi analizi sekans reaksiyonu gerçekleştirildi. Tüm dizileme çalışmaları, Beckman Coulter marka DNA dizi analizi cihazı ve DTCS Quick Start Kit kullanılarak yapıldı.

Çizelge 3.5. DNA dizi analizi sekans reaksiyon içeriği

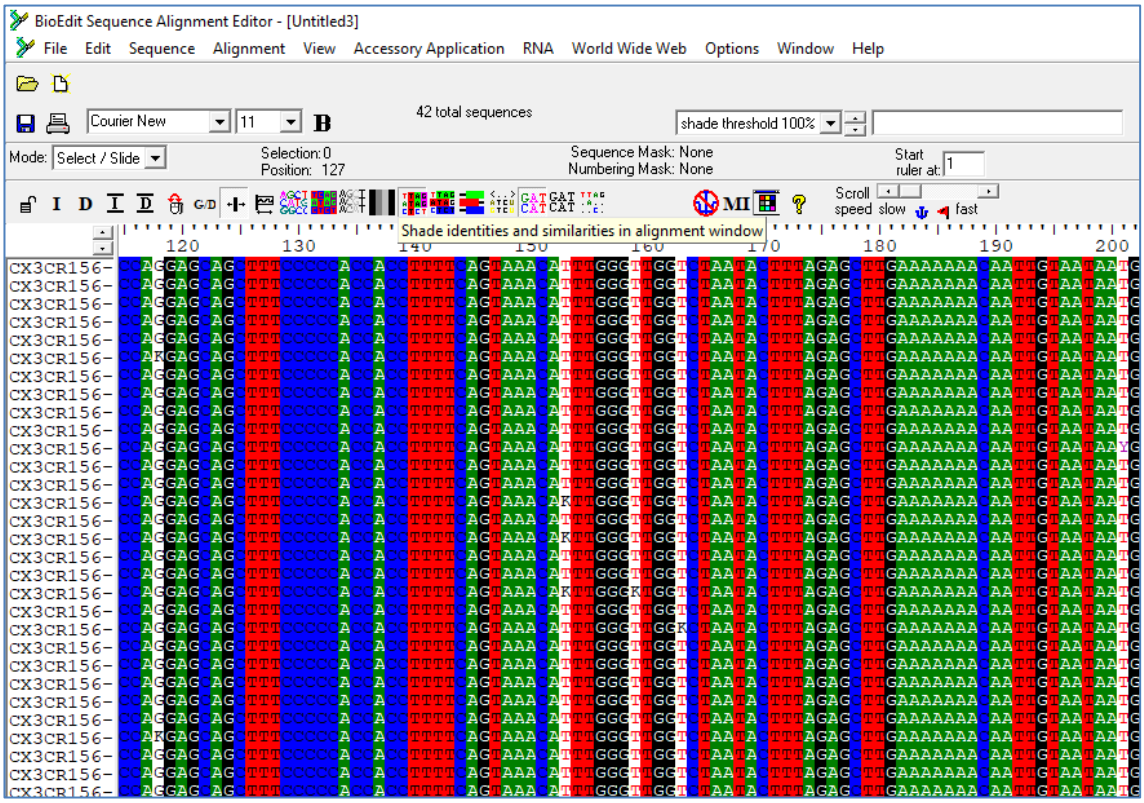
DNA örneği	7 µl
Primer (5 pmol)	0,65 µl
DTCS Quick Start Master Mix	2 µl
Su	0,35 µl

Çizelge 3.6. DNA dizi analizi sekans reaksiyonu sıcaklık koşulları

96 ºC	20 saniye
50 ºC	20 saniye
60 ºC	4 dakika

3.3.4 DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sekans cihazından ".scf" formatında alınan sonuçlar, BioEdit (Hall, 1999) programında açılarak "ClustalW Multiple Alignment" menüsü ile hizalandı. Hizalanan sekanslarda varyasyonların tespit edilmesi için "Shade identities and similarities in alignmet window" menüsü kullanıldı (Şekil 3.3).



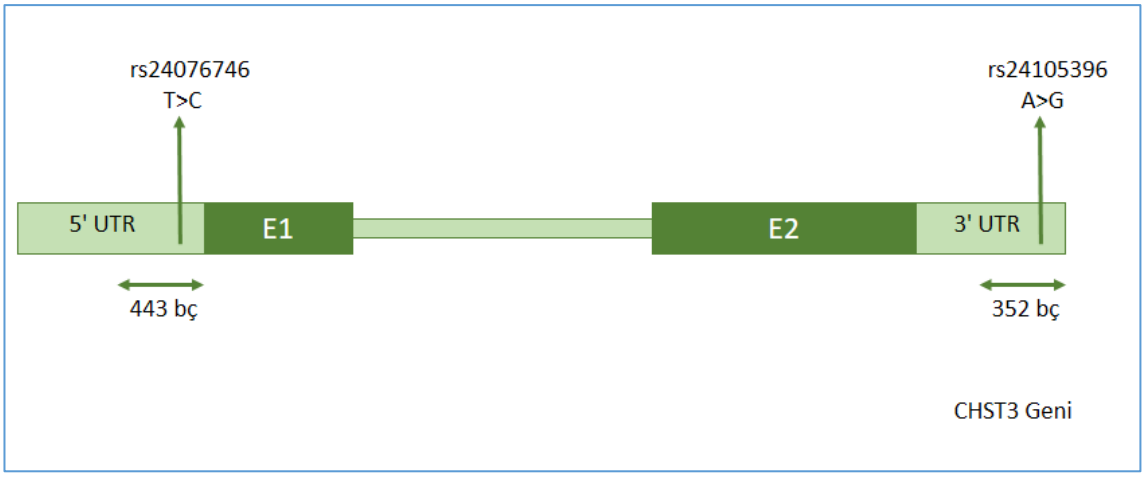
Şekil 3.3. Sekansların BioEdit programı ile hizalanmış görüntüsü, TNP'lerin tespit edilebilmesi için farklı nükleotit içeren sütunlar renklendirilmez.

3.4 PCR-RFLP Metodu İle TNP Araştırılması

TNP'ler restriksiyon endonükleaz enzimleri için farklı kesim bölgeleri oluşturur. PCR-RFLP metodu, restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulan, mutant ve doğal tipteki DNA fragmentlerinden, farklı büyüklüklerde bantlar elde edilmesi esasına dayanır. Enzim ile kesilen DNA fragmentleri, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde koşturularak molekül ağırlıklarına göre ayrılarak değerlendirilir.

3.4.1 CHST3 Geni

CHST3 geninin, 5' UTR bölgesindeki, rs24076746 C>T TNP'si (Şekil 3.4) ve 3' UTR ucunda bulanan rs24105396 A>G TNP'sinin (Şekil 3.4) tespit edilmesi için, PCR-RFLP metodu uygulandı.



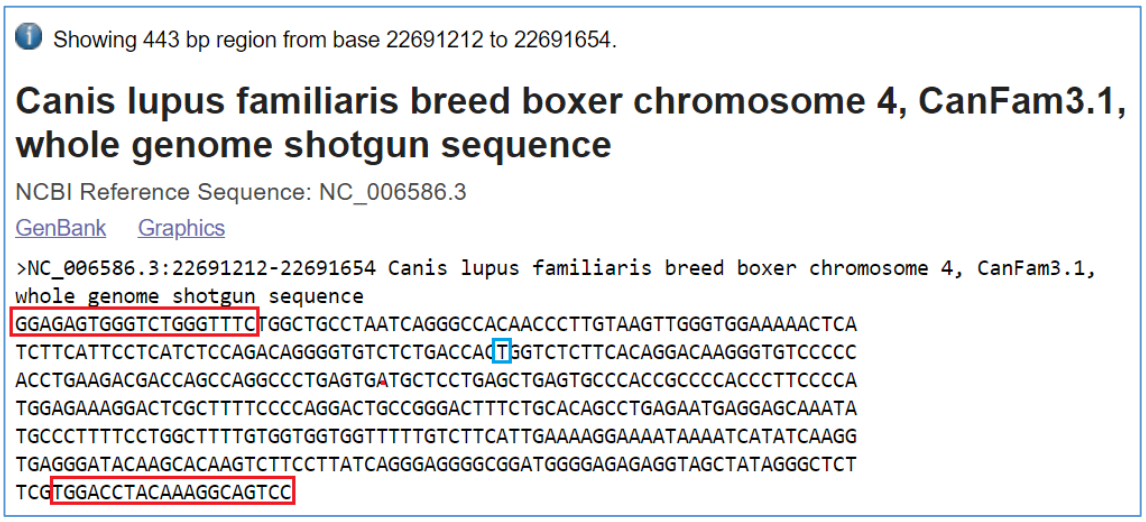
Şekil 3.4. KKD hastalığı ile ilişkilendirilmiş 2 TNP'nin CHST3 geni üzerinde şematik gösterimi. Ensembl (Ensembl, CHST3, 2019) internet sitesindeki verilerden yararlanılarak çizildi.

3.4.1.1 rs24076746 C>T TNP'sinin Bulunduğu Bölgeyi Çoğaltacak Primerlerin Tasarlanması

CHST3 geninin, 5' UTR ucundaki C>T TNP'sinin konumu, 4. kromozom üzerinde 22.691.322'nci nükleotiddir (Ensembl, CHST3, 2019). Primer 3 programı (Primer-Blast, 2018) kullanılarak, C>T TNP'sini içeren gen bölgesini çoğaltacak primerler tasarlandı (Çizelge 3.7.). Primerlerin çoğalttığı gen bölgesinin büyüklüğü 443 bç'dir (Şekil 3.5).

Çizelge 3.7. rs24076746 TNP'sini içeren gen bölgesini çoğaltacak primerler

Primer Kodu	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu
CH1	F:GGAGAGTGGGTCTGGGTTTC	443 bç
	R:TGGACCTACAAAGGCAGTCC	



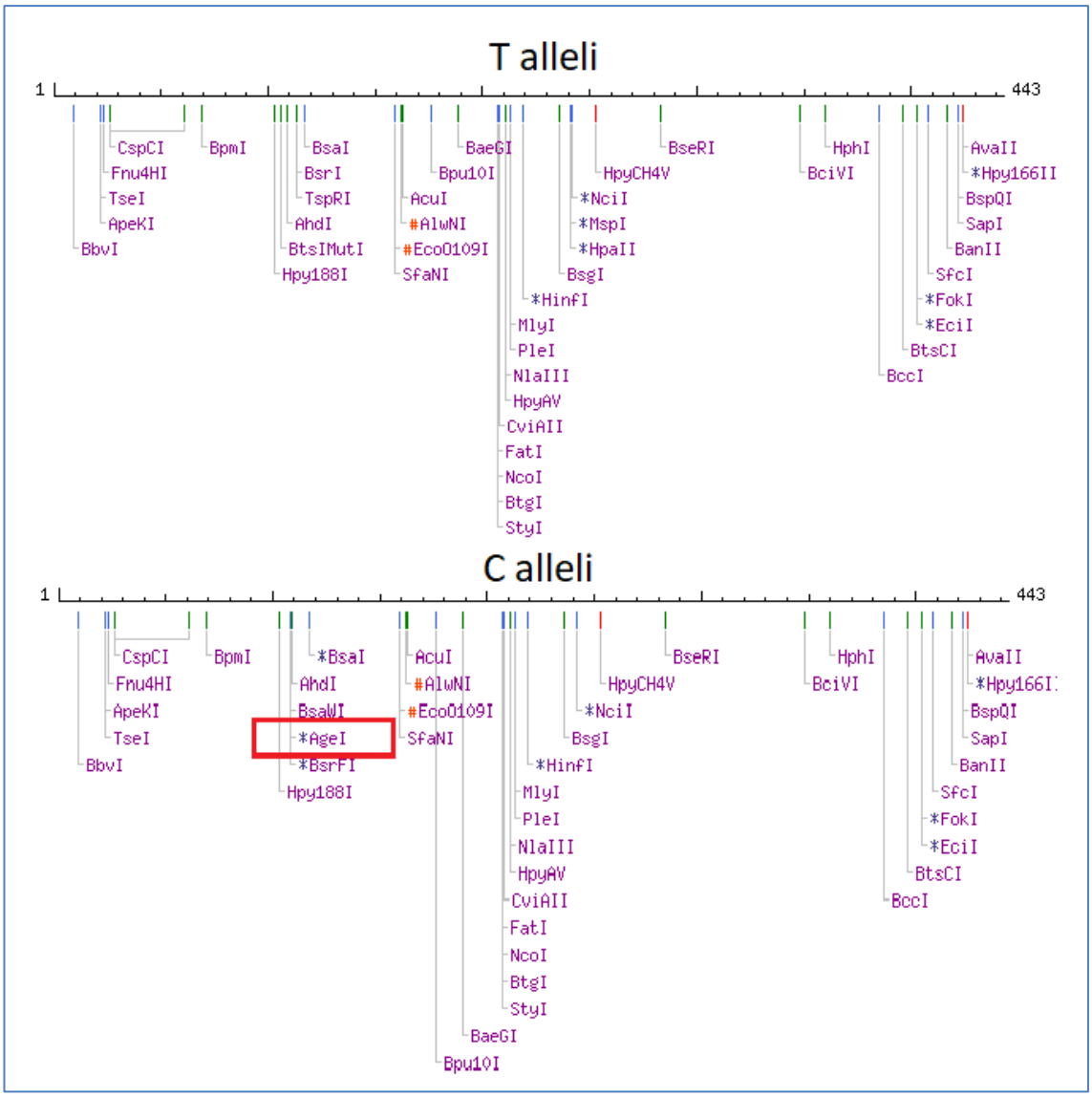
Şekil 3.5. CHST3 geni 5' UTR bölgesinde çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. NCBI (NCBI, CHST3, 2019) internet sitesindeki verilerden uyarlandı.

3.4.1.2 C ve T Allellerini Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Belirlenmesi

Çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı (Şekil 3.5), NEBCutter V2.0 (NEBcutter V2.0, 2018) programına yüklenerek varyasyonları tespit edebilecek restriksiyon endonükleaz enzimi belirlendi (Şekil 3.6). C allelini kesen, T allelini kesmeyen ve bununla beraber, çoğaltılan DNA fragmentini, hedef bölge dışında başka bir yerden kesmeyen "AgeI" restriksiyon endonükleaz enzimin kullanılmasına karar verildi. AgeI enziminin, bu TNP'yi genotiplendirmek için doğru enzim olup olmadığı RestrictionMapper-version 3 programı (Restriction Mapper, 2018) ile kontrol edilerek doğrulandı. Genotiplendirme verileri Çizelge 3.8'te verilmiştir.

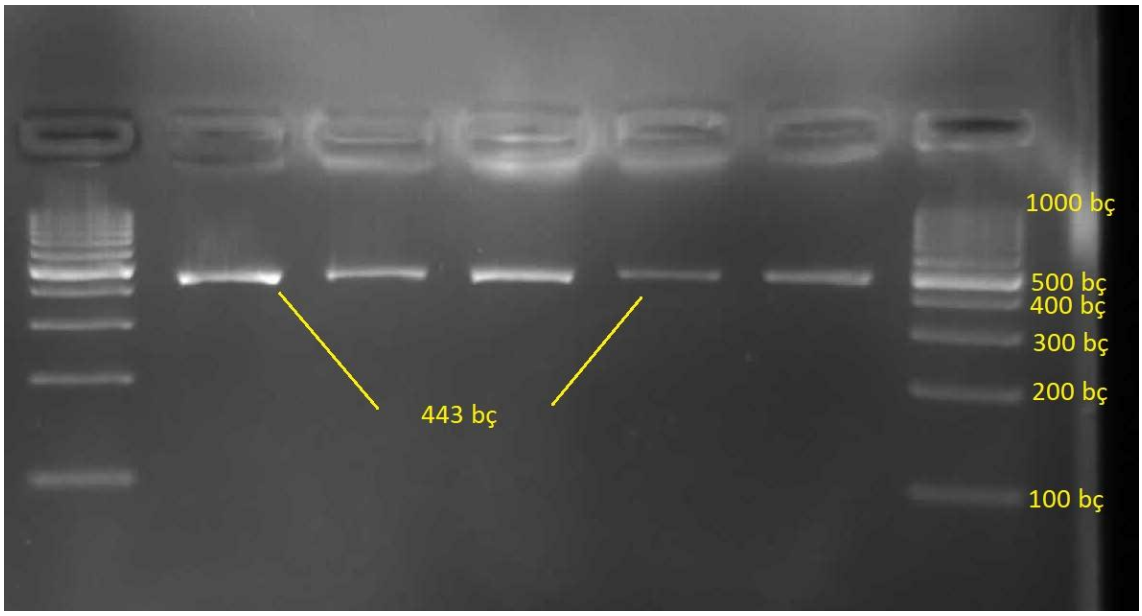
Çizelge 3.8. CHST3 geninin rs24076746 TNP'sini AgeI enzimi ile kesildikten sonra genotiplendirme tablosu

Restriksiyon ürünü (bç)	CC Genotipi	CT Genotipi	TT Genotipi
443		___	___
334	___	___	
109	___	___	

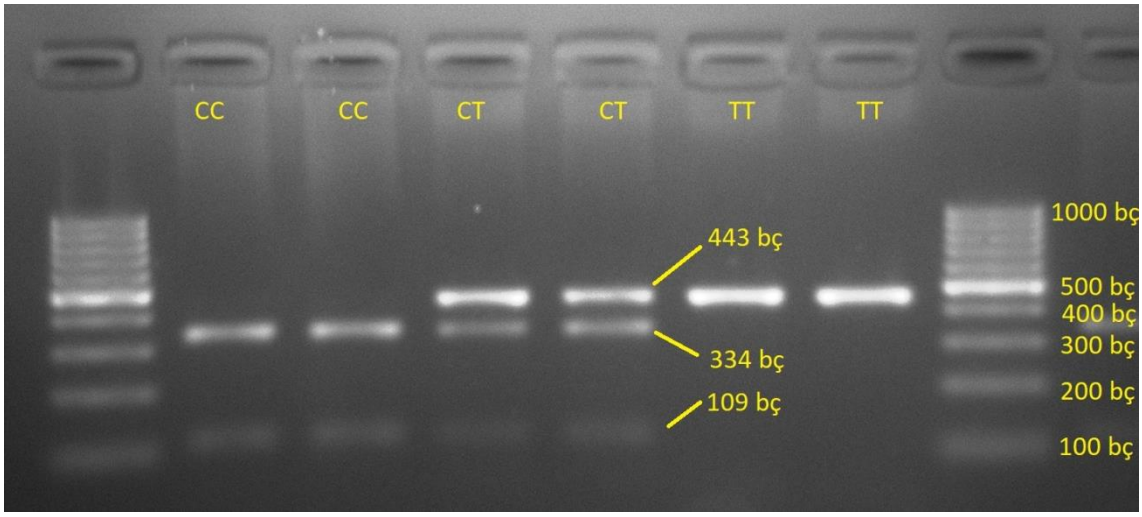


Şekil 3.6. CHST3 geninin rs24076746 TNP'sini belirlemede kullanılacak restriksiyon endonükleaz enziminin NEBcutter programı ile tespit edilmesi. NEBcutter (NEBcutter V2.0, 2018) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.

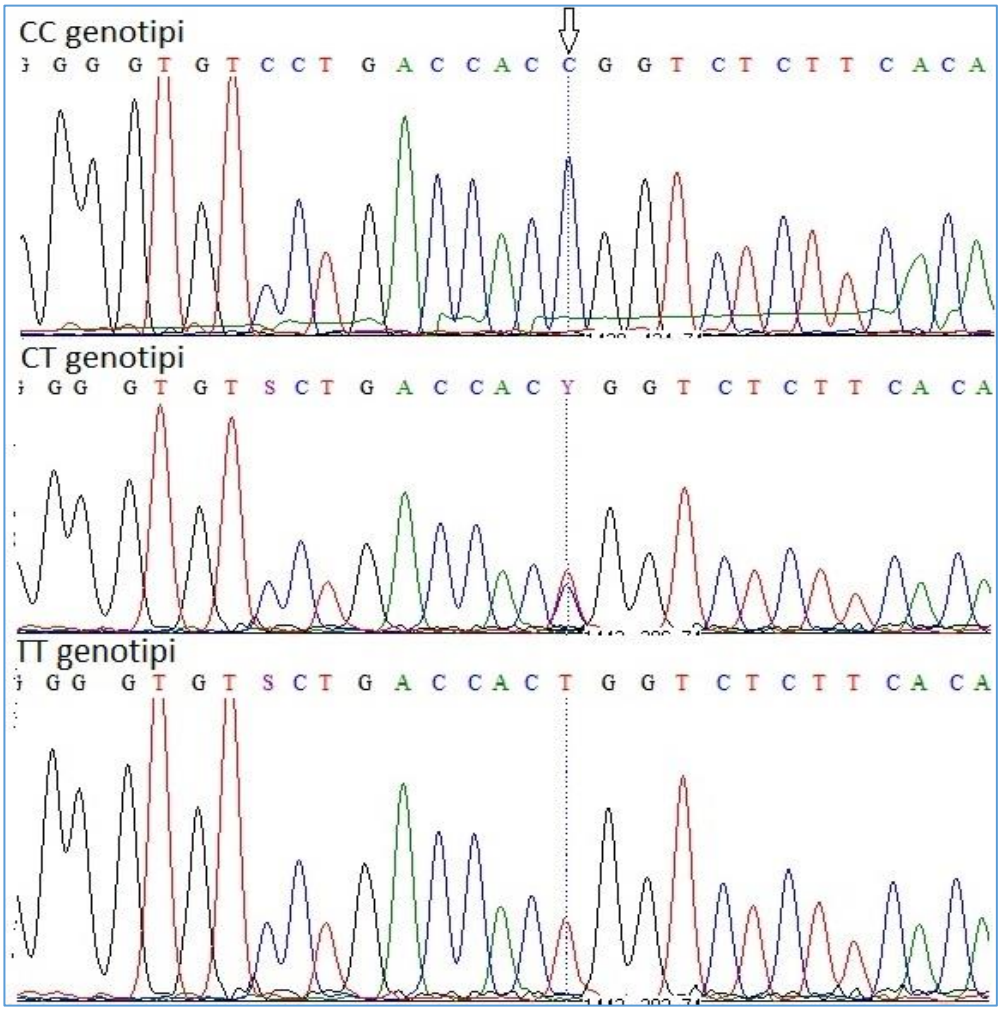
Çizelge 3.7'de verilen primerler ile Çizelge 3.3'deki reaksiyon karışım kullanılarak, Çizelge 3.4 verilen PCR protokolü 66 °C bağlanma sıcaklığı ile kullanılarak çalışıldı ve 443 bç'lik gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 3.7). Elde edilen 443 bç'lik PCR ürünü, AgeI restriksiyon endonükleaz enzimi (R0552l, NewEngland Biolabs) ile kesildi. Reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10 µl PCR ürünü, 5 µl NEBuffer, 10 U AgeI restriksiyon endonükleaz enzimi. Reaksiyon karışımı, 37 C' de 1 saat inkübe edildikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturuldu, sonuçlar DNA görüntüleme sisteminde UV ışık altında değerlendirildi (Şekil 3.8). Genotiplendirme, Çizelge 3.8'e göre yapıldı. RFLP metodu ile tespit edilen genotiplerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi kontrol edildi. Bunun için, her genotipten rastlantısal olarak seçilen 5 örneğin DNA dizi analizi sonuçları (Şekil 3.9), RFLP metodu ile bulunan sonuçları ile karşılaştırıldı.



Şekil 3.7. CHST3 geni 5' UTR bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.8. 443 bç'lik DNA fragmentinin AgeI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir.



Şekil 3.9. rs24076746 C>T TNP'sinin DNA dizi analizi metodu ile doğrulanması.

3.4.1.3 rs24105396 A>G TNP'sinin Bulunduğu Bölgeyi Çoğaltacak Primerlerin Tasarlanması

CHST3 geninin, 3' UTR ucundaki A>G TNP'sinin konumu, 4. kromozom üzerinde 22.695.305'inci nükleotiddir (Ensembl, CHST3, 2019). A>G TNP'sini içeren gen bölgesini çoğaltmak için primerler, Primer 3 programı (Primer-Blast, 2018) kullanılarak tasarlandı (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. rs24105396 TNP'sini içeren gen bölgesini çoğaltacak primerler

Primer Kodu	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu
CH2	F:CACACCCAAAGAGGAGGCTT	352 bç
CH2	R:AAATGGCAGGACTCAGGAGC	

3.4.1.4 A ve G Allellerinin Ayrımını Sağlayacak Restriksiyon Endonükleaz Enziminin Belirlenmesi

Çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı (Şekil 3.10), NEBCutter programına (NEBcutter V2.0, 2018) yüklenerek varyasyonları tespit edebilecek restriksiyon endonükleaz enzimi belirlendi (Şekil 3.11). A allelini kesen, G allelini kesmeyen ve bununla beraber çoğaltılan DNA fragmentini, hedef bölge dışında başka bir yerden kesmeyen tek restriksiyon endonükleaz enzimin "PstI" olduğu tespit edildi. PstI enziminin, bu TNP'yi genotiplendirmek için doğru enzim olup olmadığı RestrictionMapper (version 3) programı (Restriction Mapper, 2018) ile kontrol edilerek doğrulandı. Genotiplendirme verileri Çizelge 3.10'te verilmiştir.

Çizelge 3.10 CHST3 geninin rs24105396 A>G TNP'sini PstI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu

Restriksiyon ürünü (bç)	AA Genotipi	AG Genotipi	GG Genotipi
352		___	___
243	___	___	
109	___	___	

Showing 352 bp region from base 22695063 to 22695414.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 4, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

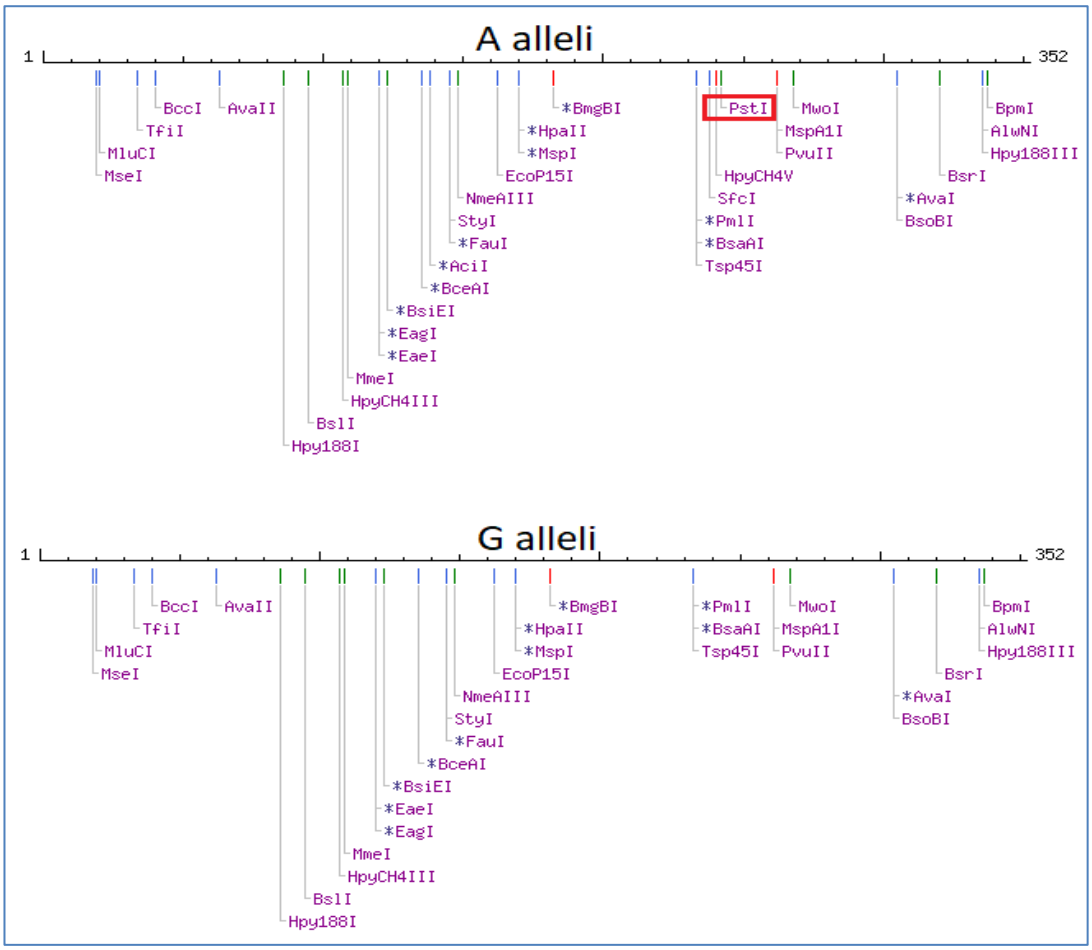
NCBI Reference Sequence: NC_006586.3

GenBank Graphics

>NC_006586.3:22695063-22695414 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 4, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

CACACCCAAAGAGGAGGCTTTAATTACATTTTTAGAATCATTTGGGGATGGGGAAGGAAACATGGTCCCA
GGCCATGACCCCATTCCGACCAGATTTGGGACTGAACGGTAGATACAAAACGGCCGAGTCTGTGGCCCCC
GCCTGCCTTGGTTTCTCCTGGCTACCTCCTCCGGCCCATTCACGTCCTCCCTGCTGGCAGGCAGGATGTT
TTGAAATGGTGGGCCAACTCTCACGTGACTGCACCCAAATGCCCCGTCCCAGCTGGGCTGGCTCCCTGA
GAGCCTGTCCATGTTTGAAGGCTGCCTCGGGCCTGACTGGAGCCAAAAAGCAGCTCCTGAGTCCTGCCAT
TT

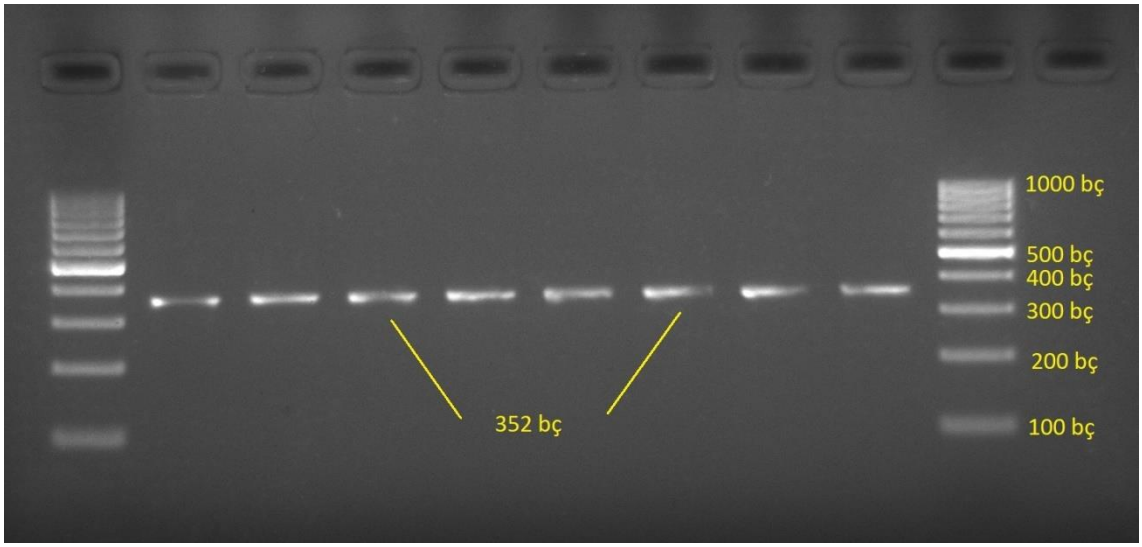
Şekil 3.10. CHST3 geni 3' UTR bölgesinde çoğaltılacak gen bölgesinin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. NCBI (NCBI, CHST3, 2019) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.



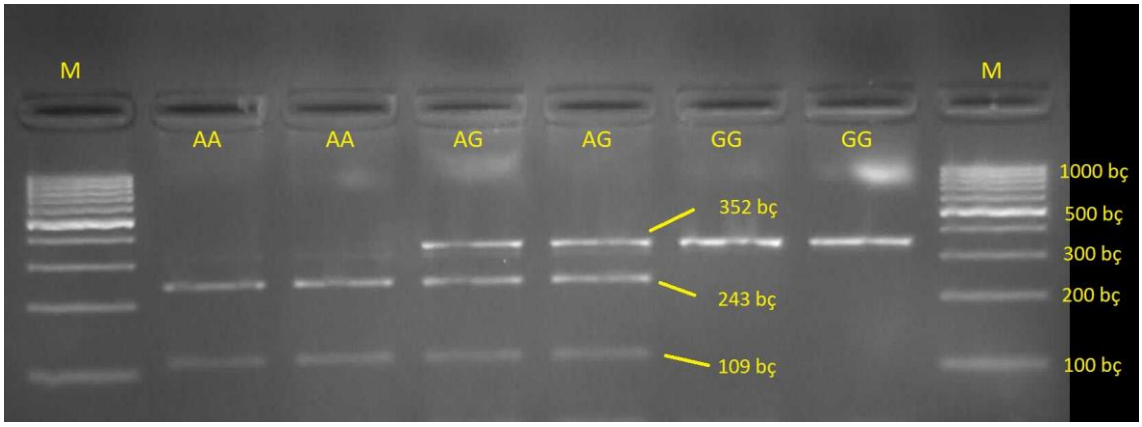
Şekil 3.11. CHST3 geninin rs24105396 TNP'sini belirlemede kullanılacak restriksiyon endonükleaz enziminin NEBcutter programı ile tespit edilmesi. NEBcutter (NEBcutter V2.0, 2018) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.

Çizelge 3.9'de verilen primerler ile Çizelge 3.3'deki reaksiyon karışım kullanılarak, Çizelge 3.4 verilen PCR protokolü 64 °C bağlanma sıcaklığı ile kullanılarak çalışıldı ve 352 bç'lik gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 3.12). Elde edilen 352 bç'lik PCR ürünü PstI restriksiyon enzimi (R01140S, NewEngland Biolabs) ile kesildi. Reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10 µl PCR ürünü, 5 µl NEBuffer, 1µl PstI restriksiyon endonükleaz enzimi. Reaksiyon karışımı 37 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturuldu, sonuçlar DNA görüntüleme sisteminde UV ışık altında değerlendirildi (Şekil 3.13).

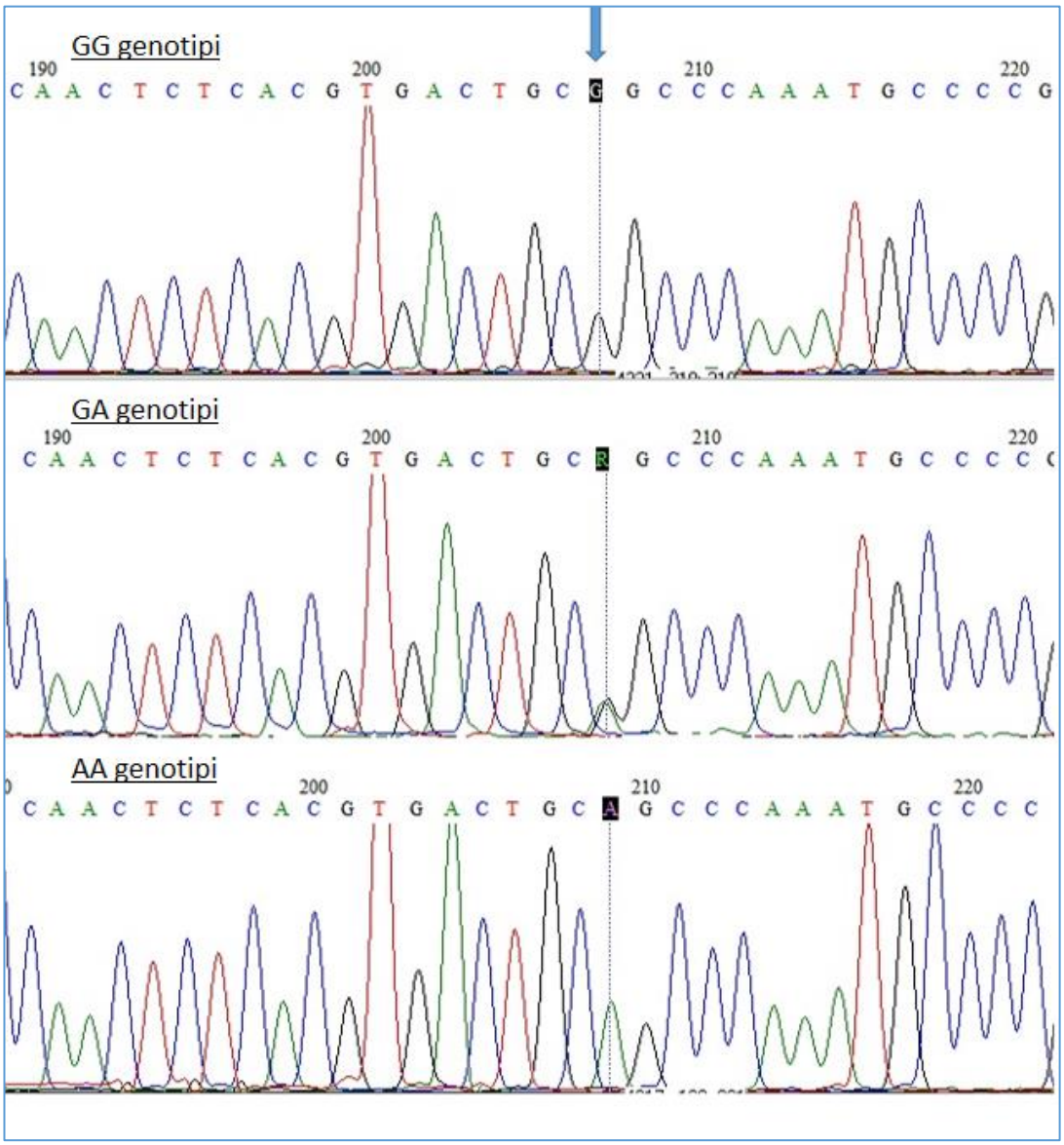
RFLP metodu ile tespit edilen genotiplerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi kontrol edildi. Bunun için, her genotipten rastlantısal olarak seçilen 5 örneğin DNA dizi analizi ile bulunan sonuçları, RFLP metodu ile bulunan sonuçlar ile karşılaştırıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3.12. CHST3 geni 3' UTR bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü



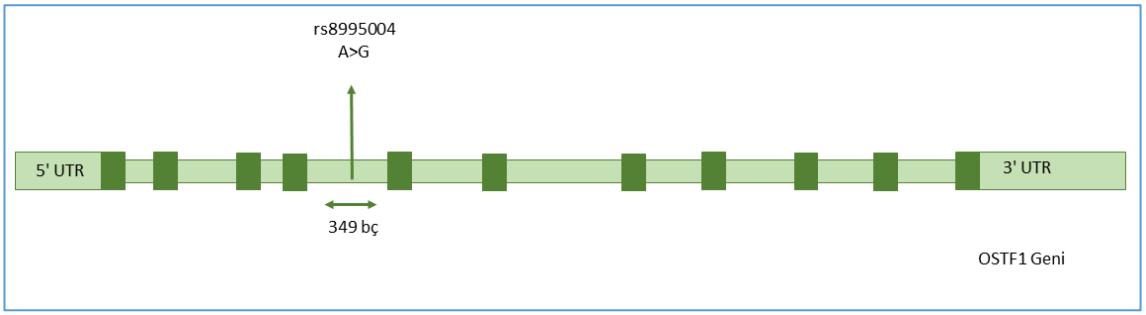
Şekil 3.13. 352 bç'lik DNA fragmentinin PstI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir.



Şekil 3.14. rs24105396 TNP'sinin DNA dizi analizi metodu ile doğrulanması.

3.5 OSTF1 Geni, rs8995004 A>G TNP'sinin RFLP Metodu İle Genotiplendirilmesi

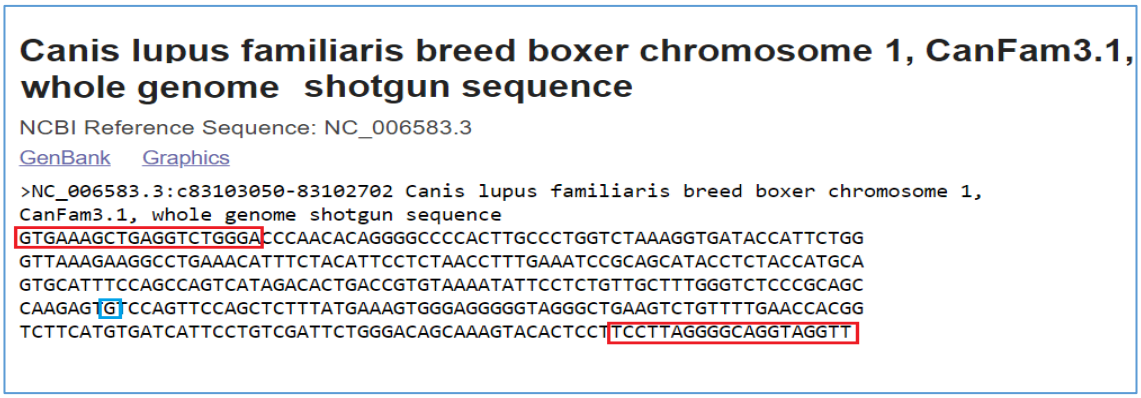
OSTF1 geni, birinci kromozom üzerinde bulunmaktadır ve 11 eksonludur. rs8995004 A>G TNP'si birinci kromozom üzerinde, 83.102.833 nükleotit pozisyonunda ve genin dördüncü intronunda bulunur (Şekil 3.15) (Ensembl, OSTF1, 2019). A>G polimorfizmini içeren gen bölgesini çoğaltmak için kullanılacak primerler, Primer 3 programı (Primer-Blast, 2018) ile tasarlandı (Çizelge 3.11). Çoğaltılan bölgenin sekansı Şekil 3.16'de verilmiştir. Allellerin tespit edilmesi için, daha önce Distl ve ark. (2013) tarafından önerilen BciVI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. BciVI enzimi G allelini içeren DNA fragmentini kesmezken, A allelini kesmektedir.



Şekil 3.15. OSTF1 geninin şematik görünümü ve A>G TNP'sinin gen üzerindeki pozisyonu. Ensebl (Ensembl, OSTF1, 2019) sitesindeki veriler kullanılarak çizilmiştir.

Çizelge 3.11. OSTF1, A>G polimorfizmini içeren 349 bç'lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları

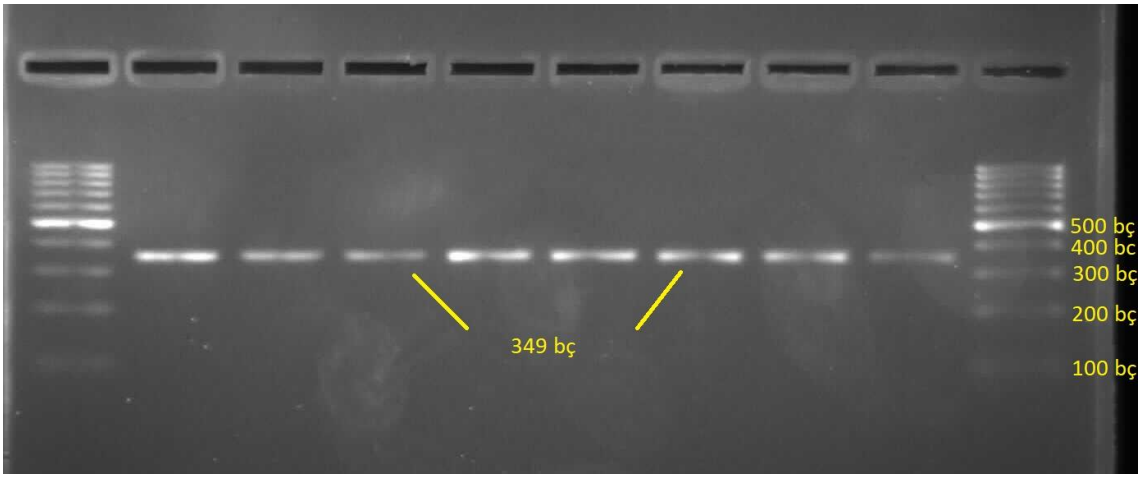
	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu
Forward primer	AACCTACCTGCCCCTAAGGA	349 bç
Reverse primer	GTGAAAGCTGAGGTCTGGGA	



Şekil 3.16. OSTF1 geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. NCBI (NCBI, OSTF1, 2019) sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.

Çizelge 3.11'de verilen primerler ile Çizelge 3.3'deki reaksiyon karışım kullanılarak, Çizelge 3.4 verilen PCR protokolü 62 °C bağlanma sıcaklığı ile kullanılarak çalışıldı ve 349 bç'lik gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 3.17). Elde edilen 349 bç'lik PCR ürünü, BciVI restriksiyon endonükleaz enzimi (R0596L, NewEngland Biolabs) ile kesildi. Reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10 µl PCR ürünü, 5 µl NEBuffer, 10 U BciVI restriksiyon endonükleaz enzimi. Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 18 saat inkübe edildikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturuldu, sonuçlar DNA görüntüleme sisteminde UV ışık altında değerlendirildi (Şekil 3.18). Genotiplendirme, Çizelge 3.12'ye göre yapıldı.

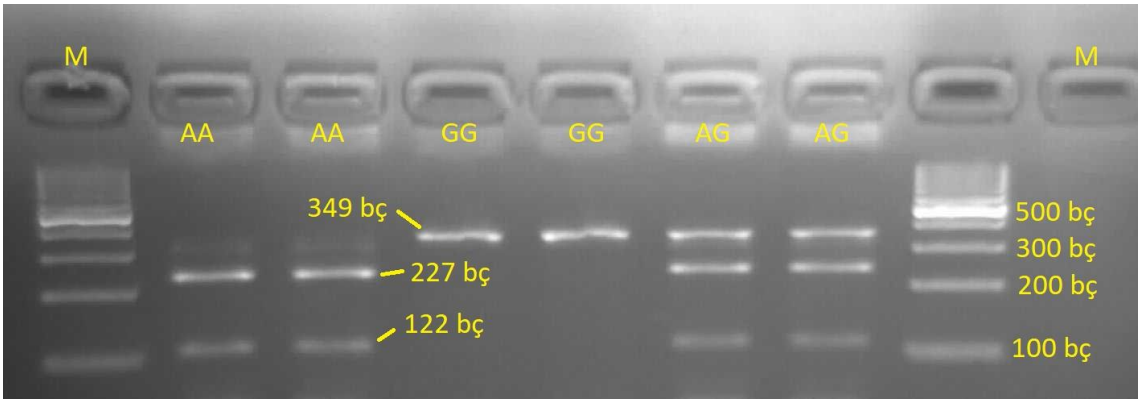
RFLP metodu ile tespit edilen genotiplerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi kontrol edildi. Bunun için, her genotipten rastlantısal olarak seçilen 5 örneğin DNA dizi analizi ile bulunan sonuçları, RFLP metodu ile bulunan sonuçlar ile karşılaştırıldı (Şekil 3.19).



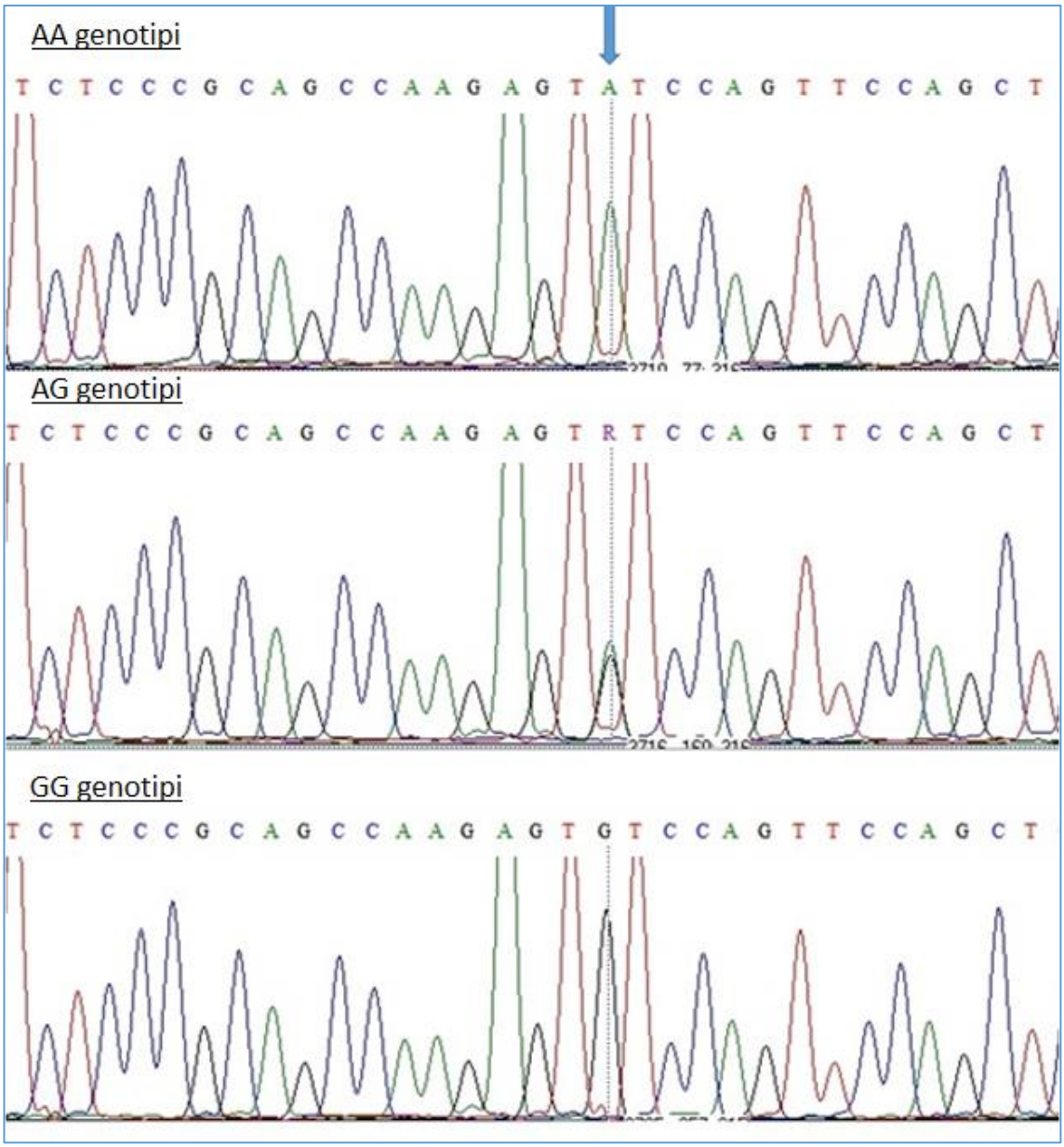
Şekil 3.17. OSTF1 geni 4. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Çizelge 3.12. OSTF1 geninin rs8995004 A>G TNP'sini BciVI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu

Restriksiyon ürünü (bç)	AA Genotipi	AG Genotipi	GG Genotipi
349		___	___
227	___	___	
122	___	___	



Şekil 3.18. 349 bç'lik DNA fragmentinin BciVI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir.

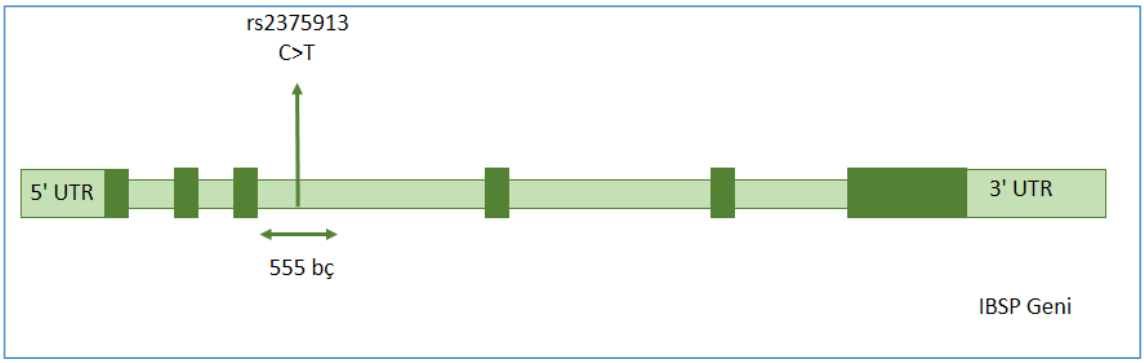


Şekil 3.19. OSTF1 Geni, rs8995004 A>G TNP'sinin DNA dizi analizi metodu ile tespiti

3.6 IBSP Geni, rs23759713 C>T TNP'si

IBSP geni 32. kromozom üzerinde bulunmaktadır ve 6 eksonludur. rs23799713 C>T TNP'si 32. kromozom üzerinde 11.190.388 nükleotit pozisyonunda ve genin 3. intronunda bulunur (Şekil 3.20) (Ensembl, IBSP, 2019). C>T polimorfizmini içeren gen bölgesini çoğaltmak için kullanılacak primerler, Primer 3 programı (Primer-Blast, 2018) ile tasarlandı (Çizelge 3.13). Çoğaltılan bölgenin sekansı Şekil 3.21'de verilmiştir. Allellerin tespit edilmesi için, daha önce Distl ve ark. (2013) tarafından önerilen HphI

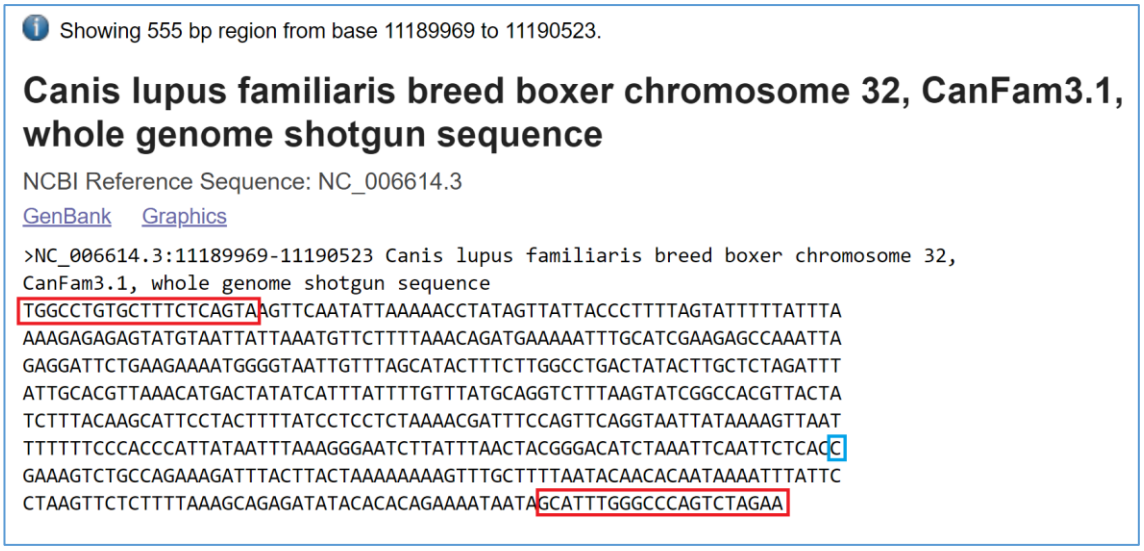
restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. HphI enzimi T allelini içeren DNA fragmentini kesmezken, C allelini kesmektedir.



Şekil 3.20. IBSP geninin şematik görünümü ve C>T TNP'sinin gen üzerindeki konumu

Çizelge 3.13. IBSP, C>T polimorfizmini içeren 555 bç'lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları

	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu
Forward primer	TGGCCTGTGCTTTCTCAGTA	555 bç
Reverse primer	TTCTAGACTGGGCCCAAATGC	


Showing 555 bp region from base 11189969 to 11190523.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 32, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_006614.3

GenBank Graphics

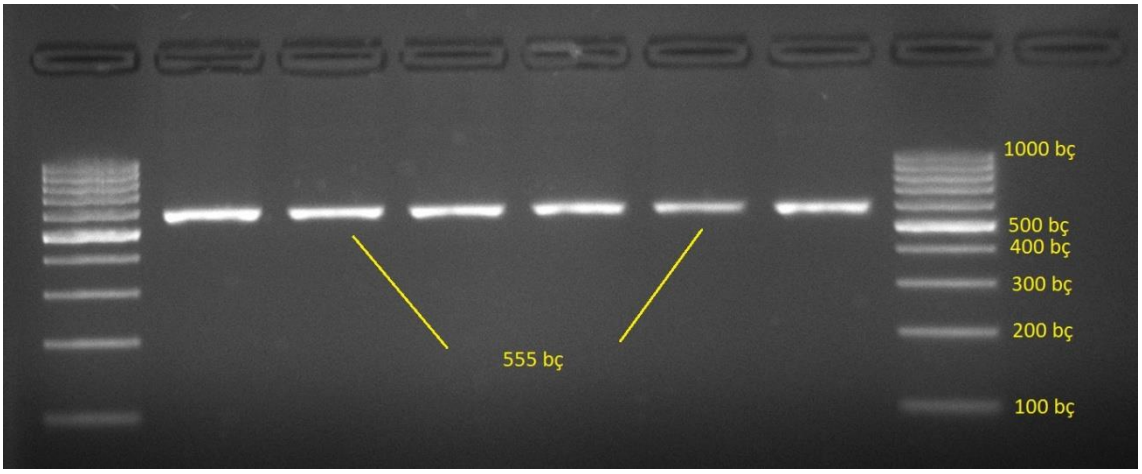
>NC_006614.3:11189969-11190523 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 32, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

TGGCCTGTGCTTTCTCAGTAAGTTCAATATTAAAAACCTATAGTTATTACCCTTTTAGTATTTTTATTTA
AAAGAGAGAGTATGTAATTATTAAATGTTCTTTTAAACAGATGAAAAATTTGCATCGAAGAGCCAAATTA
GAGGATTCTGAAGAAAATGGGGTAATTGTTTAGCATACTTTCTTGGCCTGACTATACTTGCTCTAGATTT
ATTGCACGTTAAACATGACTATATCATTTATTTTGTTTATGCAGGTCTTTAAGTATCGGCCACGTTACTA
TCTTTACAAGCATTCCTACTTTTATCCTCCTCTAAAACGATTTCCAGTTCAGGTAATTATAAAAGTTAAT
TTTTTTCCCACCCATTATAATTTAAAGGGAATCTTATTTAACTACGGGACATCTAAATTCAATTCTCACC
GAAAGTCTGCCAGAAAGATTTACTTACTAAAAAAAAGTTTGCTTTTAATACAACACAATAAAATTTATTC
CTAAGTTCTCTTTTAAAGCAGAGATATACACACAGAAAATAATAGCATTTGGGCCCAGTCTAGAA

Şekil 3.21. IBSP geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. NCBI (NCBI, IBSP, 2019) sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.

Çizelge 3.13'de verilen primerler ile Çizelge 3.3'deki reaksiyon karışım kullanılarak, Çizelge 3.4 verilen PCR protokolü 60 °C bağlanma sıcaklığı ile kullanılarak çalışılmış ve 555 bç'lik gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 3.22). Elde edilen 555 bç'lik PCR ürünü, HphI restriksiyon endonükleaz enzimi (R0158S, NewEngland Biolabs) ile kesildi. Reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10 µl PCR ürünü, 5 µl NEBuffer, 10 U BciVI restriksiyon endonükleaz enzimi. Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturuldu, sonuçlar DNA görüntüleme sisteminde UV ışık altında değerlendirildi (Şekil 3.23). Genotiplendirme, Çizelge 3.14'a göre yapıldı.

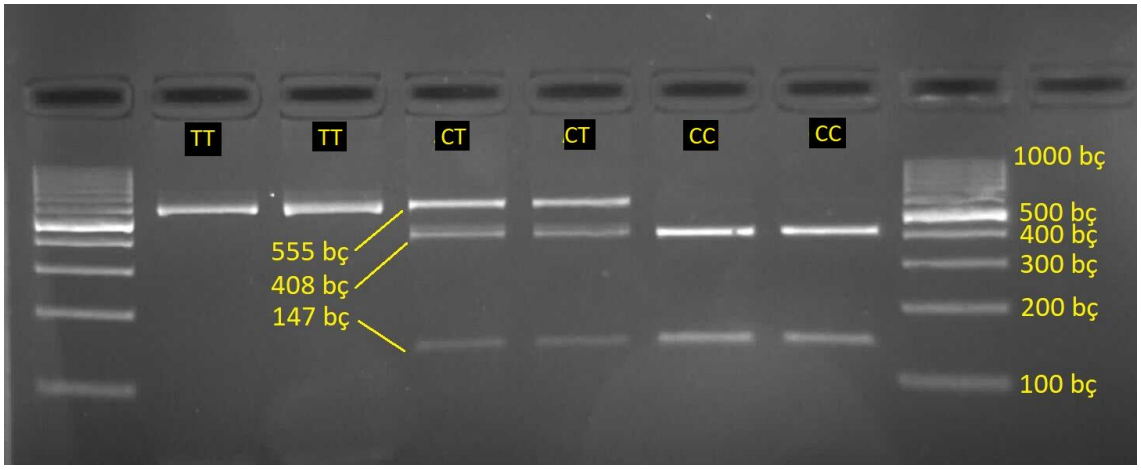
RFLP metodu ile tespit edilen genotiplerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi kontrol edildi. Bunun için, her genotipten rastlantısal olarak seçilen 5 örneğin DNA dizi analizi ile bulunan sonuçları, RFLP metodu ile bulunan sonuçlar ile karşılaştırıldı (Şekil 3.24).



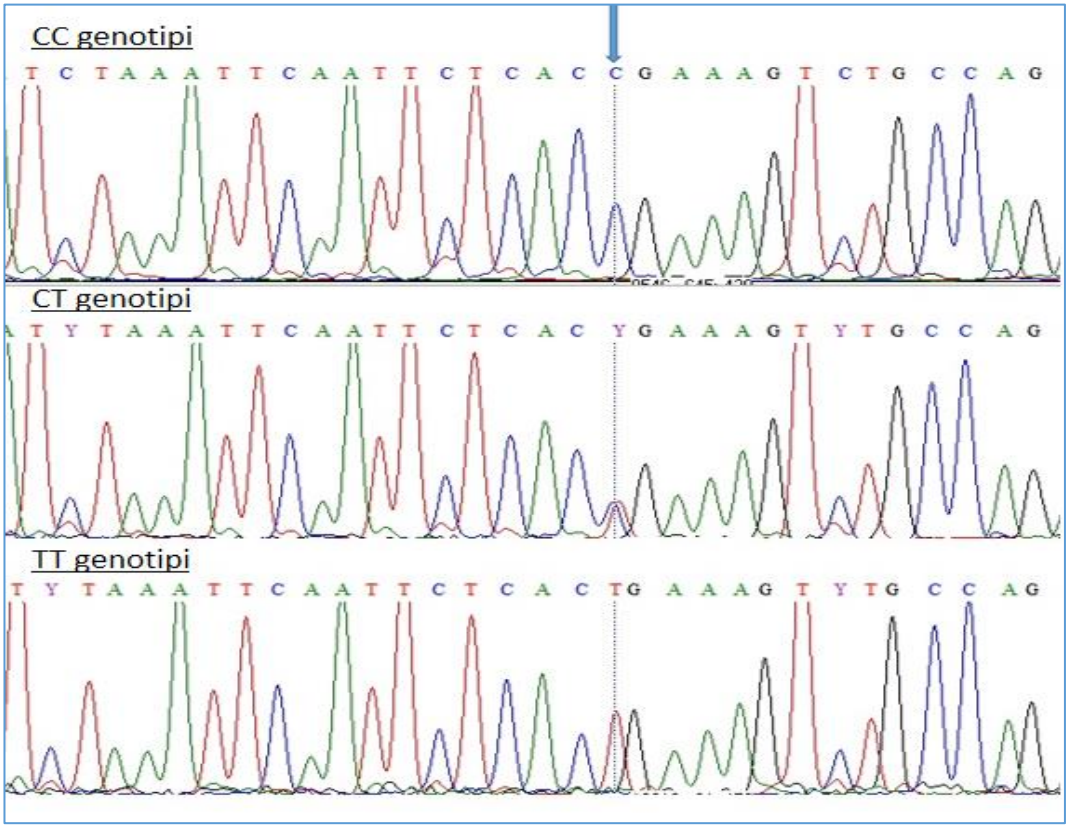
Şekil 3.22. IBSP geni 3. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Çizelge 3.14. IBSP geninin rs23759713 C>T TNP'sini HphI enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu

Restriksiyon ürünü (bç)	CC Genotipi	CT Genotipi	TT Genotipi
555		___	___
408	___	___	
147	___	___	



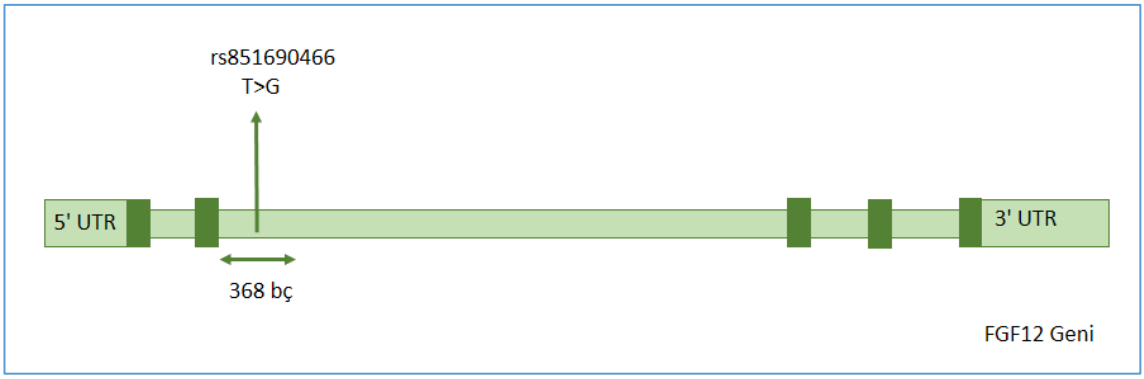
Şekil 3.23. 555 bç'lik DNA fragmentinin HphI enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir.



Şekil 3.24. IBSP Geni, rs23759713 C>T TNP'sinin DNA dizi analizi metodu ile tespiti.

3.7 FGF12 Geni, rs851690466 T>G TNP'si

FGF12 geni 34. kromozom üzerinde bulunur ve 5 eksonludur. rs851690466 T>G TNP'si 34. kromozom üzerinde 24.024.002 nükleotit pozisyonunda ve genin 2. intronunda bulunur (Şekil 3.25) (Ensembl, FGF12, 2019). T>G polimorfizmini içeren gen bölgesini çoğaltmak için kullanılacak primerler, Primer 3 programı (Primer-Blast, 2018) ile tasarlandı (Çizelge 3.15). Çoğaltılan bölgenin sekansı Şekil 3.26'de verilmiştir. Allellerin tespit edilmesi için, daha önce Distl ve ark. (2013) tarafından önerilen Hpy188III restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Hpy188III enzimi G allelini içeren DNA fragmentini kesmezken, T allelini kesmektedir.



Şekil 3.25. FGF12 geninin şematik görünümü ve T>G TNP'sinin gen üzerindeki konumu. Ensembl (Ensembl, FGF12, 2019) internet sitesindeki veriler kullanılarak çizilmiştir.

Çizelge 3.15. FGF12, T>G polimorfizmini içeren 368 bç'lik DNA fragmentini çoğaltacak primerlerin sekansları

	Primer sekansı (5'->3')	Ürün Uzunluğu
Forward primer	CAAACCCTGGGATGGGAGAA	368 bç
Reverse primer	CCCCAGCTGAAGGGAATTGT	

Çizelge 3.15'de verilen primerler ile Çizelge 3.3'deki reaksiyon karışım kullanılarak, Çizelge 3.4 verilen PCR protokolü 64 °C bağlanma sıcaklığı ile kullanılarak çalışıldı ve 368 bç'lik gen bölgesi (Şekil 3.27) çoğaltıldı. Elde edilen 368 bç'lik PCR ürünü, Hpy188III restriksiyon endonükleaz enzimi (R0622L, NewEngland Biolabs) ile kesildi. Reaksiyon karışımı şu şekildedir; 10 µl PCR ürünü, 5 µl NEBuffer, 10 U Hpy188III restriksiyon endonükleaz enzimi. Reaksiyon karışımı, 37 °C'de 2 saat inkübe

edildikten sonra %2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturulmuş, sonuçlar DNA görüntüleme sisteminde UV ışık altında değerlendirildi (Şekil 3.28). Genotiplendirme, Çizelge 3.16'e göre yapıldı.

Showing 368 bp region from base 24023765 to 24024132.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 34, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

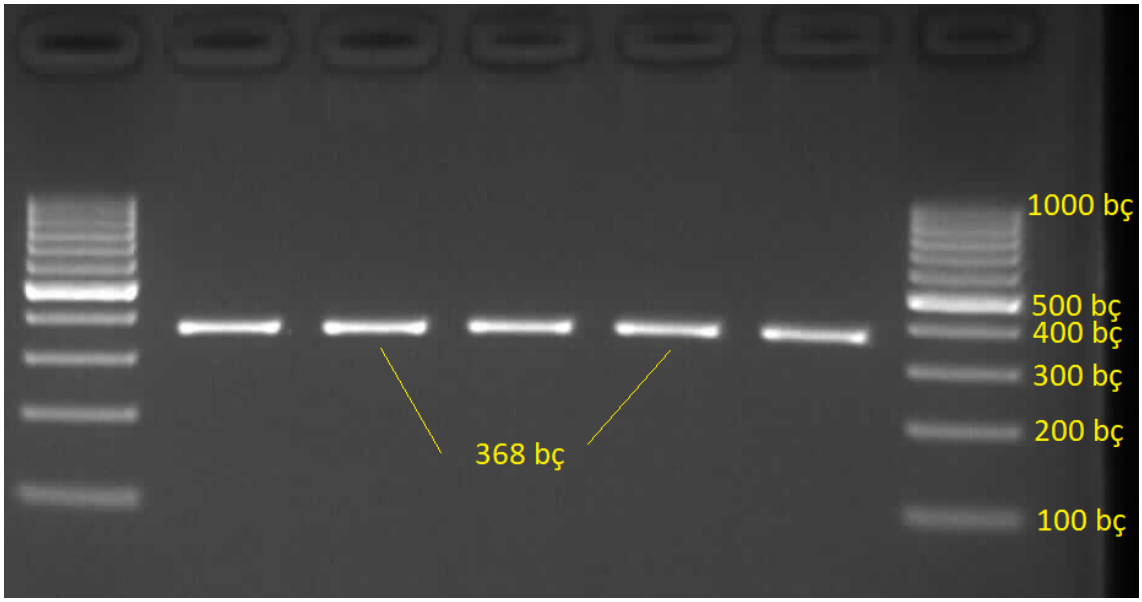
NCBI Reference Sequence: NC_006616.3

GenBank Graphics

>NC_006616.3:24023765-24024132 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 34, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

CAAACCCTGGGATGGGAGAATTTTTTTATCCATTGACTATTTGTAACTCCTTCAAGCCTCCTACCTTCTC
ATTTAGTAGGTTACCTTCCCCAATTGCCTCTTTAACTATAGGGAATTATAGCAAAAAGGATAAAAGACAA
GACATAAGCTTACTAGCAGTTAAATAGTTCAAAAGGCAGCCTGCCCATGTCTTAAGTCTAAGATACATTG
GGCCATACATTTGATCATAATGGTATTTCAGGAAGCTAATGTTCCTTACTGTAGTCACTATTTTCGTCCT
TGGTCCCGTCAATGGTACCATCTGGGTGCATCTGCAGGAAATATCCCTGCTGGCTGAATAACCTTGTCAC
AATTCCCTTCAGCTGGGG

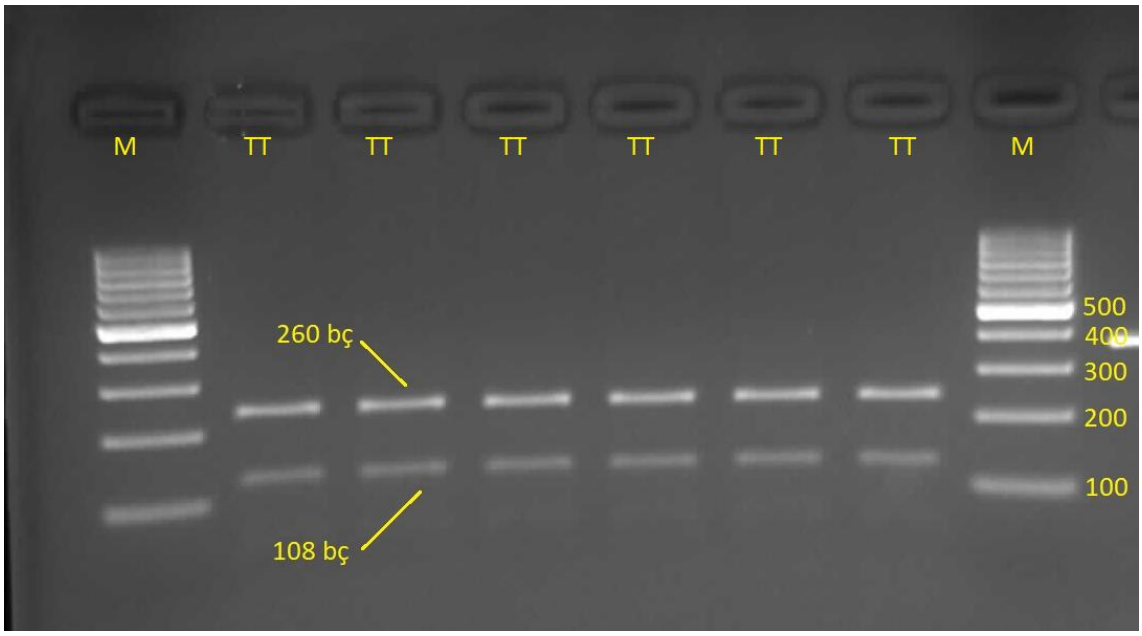
Şekil 3.26. FGF12 geninde çoğaltılan bölgenin sekansı, TNP mavi, primerlerin bağlanma bölgeleri kırmızı çerçeve içerisine alınmıştır. NCBI (NCBI, FGF12, 2019) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır.



Şekil 3.27. FGF12 geni 2. intron bölgesinde çoğaltılan DNA fragmentinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

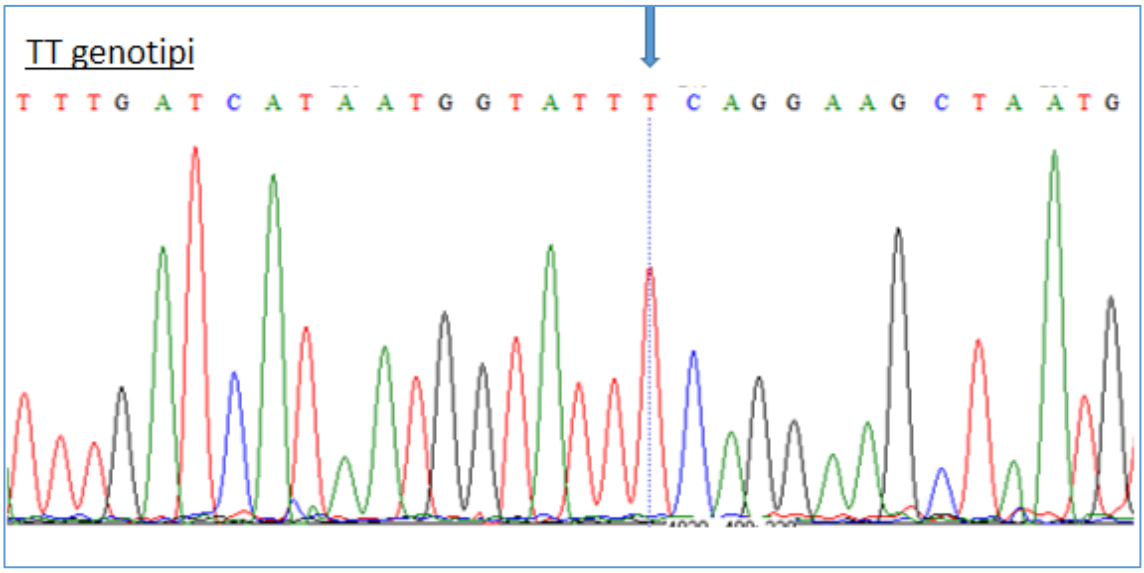
Çizelge 3.16. FGF12 geninin rs851690466 T>G TNP'sini Hpy188III enzimi ile kesimi sonrası genotiplendirme tablosu

Restriksiyon ürünü (bç)	TT Genotipi	TG Genotipi	GG Genotipi
368		___	___
260	___	___	
108	___	___	



Şekil 3.28. 368 bç'lik DNA fragmentinin Hpy188III enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü üzerinden yapılan genotiplendirme gösterilmektedir.

RFLP metodu ile tespit edilen genotiplerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi kontrol edildi. Bunun için, her genotipten rastlantısal olarak seçilen 5 örneğin DNA dizi analizi ile bulunan sonuçları, RFLP metodu ile bulunan sonuçlar ile karşılaştırıldı (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. FGF12 Geni, rs851690466 T>G TNP'sinin DNA dizi analizi metodu ile araştırılması.

3.8 Verilerin İstatiksel Analizi

3.8.1 Hardy Weinberg Dengesi

Her bir TNP için, vaka ve kontrol gruplarının Hardy Weinberg (HW) dengesinde ($p>0,05$) olup olmadıkları, R programı-versiyon 3.6.2. (Team, 2019) HardyWeinberg paketi (Graffelman & Graffelman, 2019) ile hesaplandı. Beklenen değerlerin hepsinin 5'in üzerinde olduğu durumlarda Pearson ki-kare değeri, 5'ten küçük beklenen değer olması durumunda ise Fisher kesinlik testi ile hesaplanan p değerleri dikkate alındı.

Bir TNP'nin vaka-kontrol çalışmalarında değerlendirilmeye alınması için kontrol grubunun HW dengesinde olması gerekmektedir (Anderson vd., 2010). Bu nedenle bir TNP'nin kontrol grubunun, HW dengesinden saptığı tespit edildiğinde ($p<0,05$) bireysel olarak hastalık ile ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi yapılmadı.

3.8.2 Genotiplerin ve Allellerin KKD Hastalığı İle İlişkisinin Araştırılması

Genetik polimorfizmlerin hastalıklar ile ilişkilendirilme çalışmaları, genellikle vaka ve kontrol gruplarının karşılaştırılması ile yapılmaktadır. Allel dağılımı, vaka ve kontrol grupları arasında anlamlı fark gösteriyorsa, o allelin hastalık için duyarlılık veya direnç oluşturduğu söylenebilir. Bununla beraber, genotip frekanslarının dağılımı için de aynı şartlar geçerlidir.

Vaka-kontrol çalışmalarında risk, OR (Odds ratio=Olabilirlik oranı) ile hesaplanmaktadır. İstatistiksel anlamlılığa erişilmediği durumlarda ($p>0,05$) OR değeri hesaplama aşamasına geçilmedi. TNP ile hastalık arasında bir bağlantı bulunmuyorsa, OR değeri yaklaşık 1 bulunacaktır. Bununla beraber TNP ile hastalık arasında bir bağlantı bulunuyorsa, hastalığa neden olan genotip veya allel için OR değeri 1'den yüksek bulunacaktır. Genotip veya allelin koruyucu olduğu durumlarda OR değeri 1'den küçük bulunacaktır (Clarke vd., 2011; Şenocak, 2009, s.3).

Genotiplerin ve allellerin KKD ile ilişkisi, her bir TNP için ayrı ayrı, SPSS (Statistical Packages of Social Sciences, SPSS for Windows, Version 20.0, Chicago, IC, USA) paket programı ve R programı-versiyon 3.6.2. (Team, 2019) SNPassoc paketi-versiyon1.9-2 (González vd., 2007) kullanılarak değerlendirildi. Tüm testlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8.3 Haplotip Bloklarının KKD Hastalığı İle İlişkisinin Araştırılması

İki veya daha fazla lokusta bulunan alleller arasındaki korelasyon veya rastlantısal olmayan ilişki, bağlantı dengesizliği (LD) olarak adlandırılır. Bir başka deyişle, haplotip denilen bu spesifik allel kombinasyonlarının, gelecek nesillere birlikte aktarılması, şans eseri beklenilenden daha sıktır (Clarke vd., 2011).

Haplotiplerin tespit edilmesi ve KKD hastalığı ile ilişkisinin araştırılması HaploView 4.2 (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2004) programı kullanılarak yapıldı. Program, her TNP için ayrı ayrı oluşturulan verileri, kalite kriterlerine göre otomatik olarak değerlendirmekte ve HW dengesine uygunluk testi, p değeri 0,001'den küçük olan TNP'leri ve minör allel frekansı 0,001'den küçük olan TNP'leri hesaplama dışı bırakmaktadır. Haplotip bloklarının tespit edilmesinde, Gebrial vd.'nin (2002) belirlemiş olduğu güven aralığı kriterlerine sadık kalındı.

3.8.4 İki Boyutlu TNP-TNP Etkileşimleri İle İlişki Testi

Çoklu genlerin etkisi altındaki karmaşık hastalıklar, genellikle her biri küçük bir etkiye sahip olan birden fazla TNP'nin etkileşimiyle ortaya çıkmaktadır. Tek bir TNP, bir hastalığın oluşumunda etkili olabilir, bununla beraber tek başına hastalık oluşumuna

etkisi olmayan bir TNP'nin farklı TNP'ler ile oluşturduğu kombinasyonun hastalık oluşumuna güçlü bir etkisi olabilir (P. Li, Guo, Wang, Liu, & Zou, 2014).

Bu araştırmada aynı ve farklı genler üzerinde tespit edilen TNP'lerin, hastalık oluşumu üzerine etkileri (istatistiksel epistazi) R programı-versiyon 3.6.2.(Team, 2019), SNPassoc paketi-versiyon1.9-2 (González vd., 2007) kullanılarak hesaplandı.

3.8.5 miRNA Bağlanma Bölgelerinin Tahmin Edilmesi ve TNP'ler İle İlişkilerinin Araştırılması

Genlerin 3' UTR uçlarında bulunan varyasyonlar, miRNA'ların çekirdek bağlanma bölgeleri üzerinde bulunabilir. Bu tip TNP'ler genin ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirebilirler. CX3CR1 geninin, 3' UTR ucunda bulunan mikroRNA (miRNA) bağlanma bölgeleri, miRDB (miRDB, 2020; Wong & Wang, 2014) ve TargetScan (Agarwal, Bell, Nam, & Bartel, 2015; TargetScan, 2020) online programları kullanılarak tahmin edildi. Bu araştırmada tespit edilen TNP'lerin, miRNA bağlanma bölgeleri üzerinde bulunup bulunmadıkları, Ensembl Varyasyon Tablosu (Ensembl, Variant Table, 2020) ve Avrupa Varyasyon Arşivi, Varyasyon Tarayıcısı (European Variation Archive, Variant Browser, 2020) kullanılarak belirlendi.

BÖLÜM 4

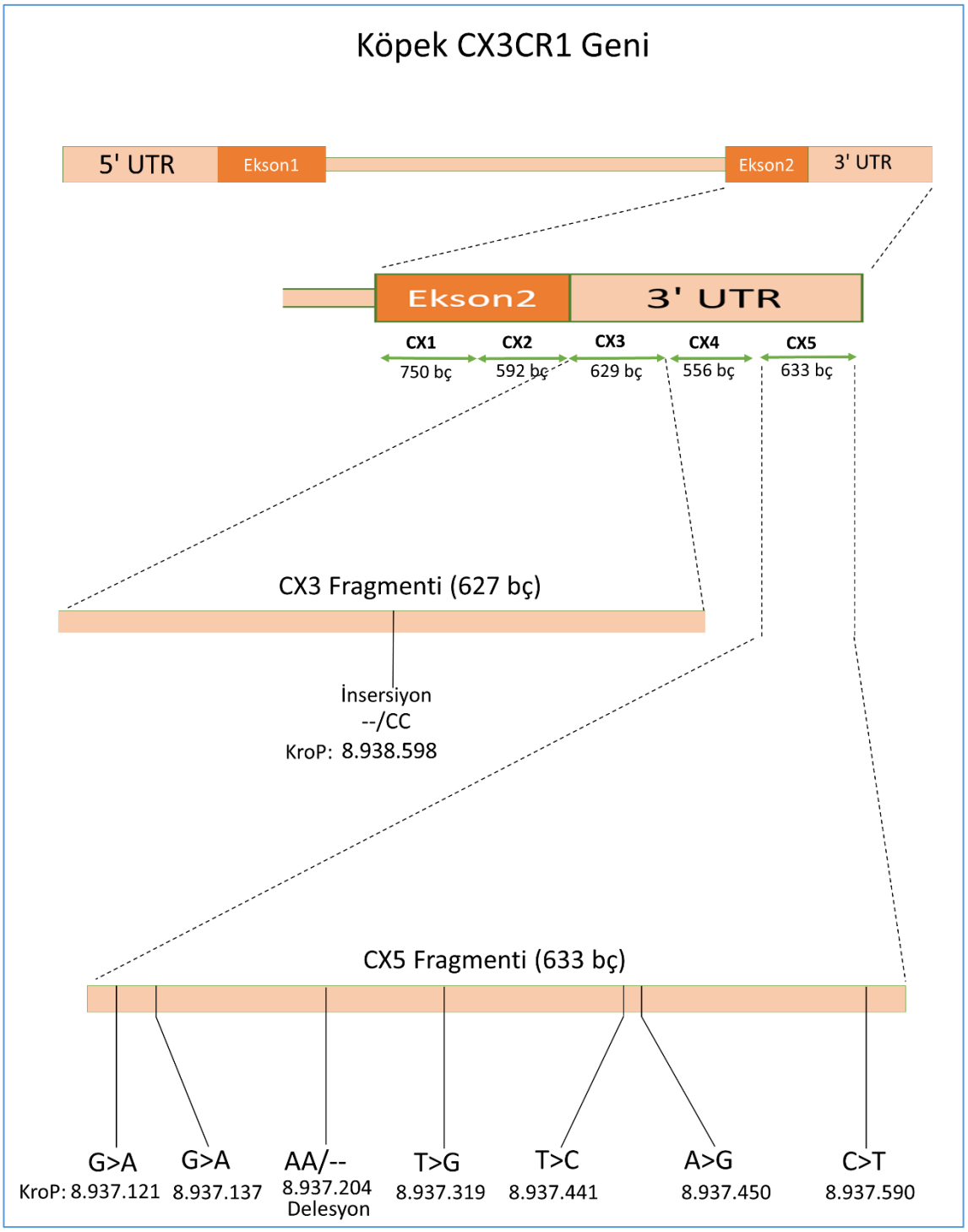
SONUÇLAR

4.1 CX3CR1 Geninde Tespit Edilen Varyasyonlar

CX3R1 geninin 2. ekson ve 3' UTR bölgelerini içeren 3160 bç'lik bölge, 5 fragment olarak çoğaltılmış ve DNA dizi analizi metodu ile varyasyonlar araştırılmıştır. İkinci ekson bölgesini kapsayan CX1 ve CX2 fragmentlerinde herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir. 3' UTR bölgesini kapsayan; CX3, CX4 ve CX5 fragmentlerinden CX3' te bir insersiyon, CX5'te ise 6 TNP ve 1 delesyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. CX3CR1 geninde dizilenen gen bölgeleri ve bulunan varyasyonlar.

Primer Kodu	Gen bölgesi	DNA fragmentinin büyüklüğü (bç)	Tespit edilen varyasyonlar
CX1	2. ekson	750	-
CX2	2.ekson	592	-
CX3	3' UTR	629	1 adet insersiyon
CX4	3' UTR	556	-
CX5	3' UTR	633	6 adet TNP, 1 adet delesyon



Şekil 4.1. CX3CR1 geni üzerinde tespit edilen varyasyonların gen üzerindeki konumu ve kromozom pozisyonlarının (KroP) şematik görünüşü. Genin şeması, Ensembl (Ensembl, CX3CR1, 2019) veri tabanından alınan bilgilerden yararlanılarak çizilmiştir.

4.1.1 Tespit Edilen Polimorfizmlerin Varyasyon Veri Tabanlarında Araştırılması

Araştırmamızda tespit edilen varyasyonların, daha önce tanımlanıp tanımlanmadığını bulmak için, Ensembl internet sitesinin varyasyon veri tabanı (Ensembl, Variant Table, 2020) ve Avrupa Varyasyon Arşivinin veri tabanı (European Variation Archive, Variant Browser, 2020) araştırıldı. 6 TNP'nin ve insersiyonun TNP veri tabanında (dbSNP) bulunduğu ve "referans TNP" (rs) kodu aldıkları tespit edildi. Delesyonun ise dbSNP' ye gönderildiği ancak henüz "gönderilmiş TNP" (submitted SNP; ss) veya rs kodu almadığı görüldü. CX3 ve CX5 bölgelerinde tespit edilen varyasyonların rs kodları Çizelge 4.2'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. CX3CR1 geninde bulunan varyasyonların rs kodları.

23. kromozom üzerindeki pozisyonu	Varyasyon	Gen Bölgesi	rs kodu	DNA Dizi Analizi Sonuç Grafikleri
8.938.598	--/CC	3' UTR	rs851814810	*Ek 9*
8.937.121	G>A	3' UTR	rs9022770	*Ek 10*
8.937.137	G>A	3' UTR	rs9022769	*Ek 11*
8.937.204	AA/--	3' UTR	--	*Ek 12*
8.937.319	T>G	3' UTR	rs852431030	*Ek 13*
8.937.441	T>C	3' UTR	rs852569240	*Ek 14*
8.937.450	A>G	3' UTR	rs851634517	*Ek 15*
8.937.590	C>T	3' UTR	rs853018978	*Ek 16*

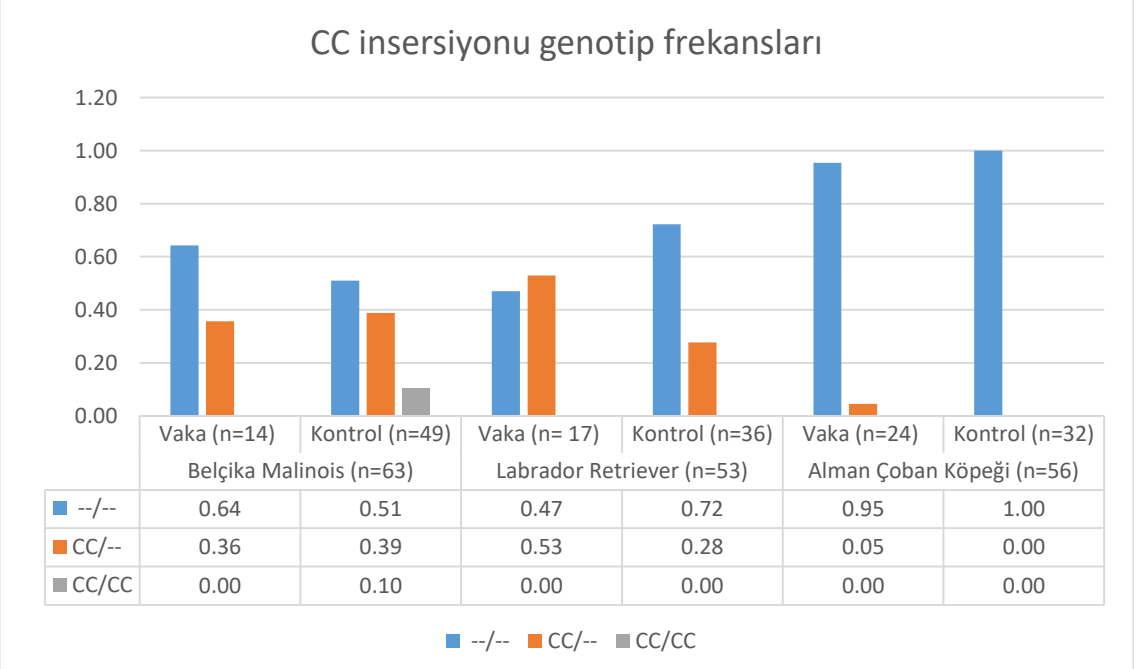
4.1.2 CC/-- İnsersiyonunun (rs851814810) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

CX3CR1 geninin 3' UTR ucunda, 8.938.598 ve 8.938.599 kromozom pozisyonlarında bulunan, 2 nükleotitlik insersiyon üç köpek ırkında da tespit edilmiştir. DNA dizi analizinin sonuç grafikleri *Ek 9*'de verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerde 3 genotip de (--/--, --/CC, CC/CC) tespit edilmişken AÇK'larda ve Labrador Retriever ırkı köpeklerde CC/CC genotipi tespit edilememiştir.

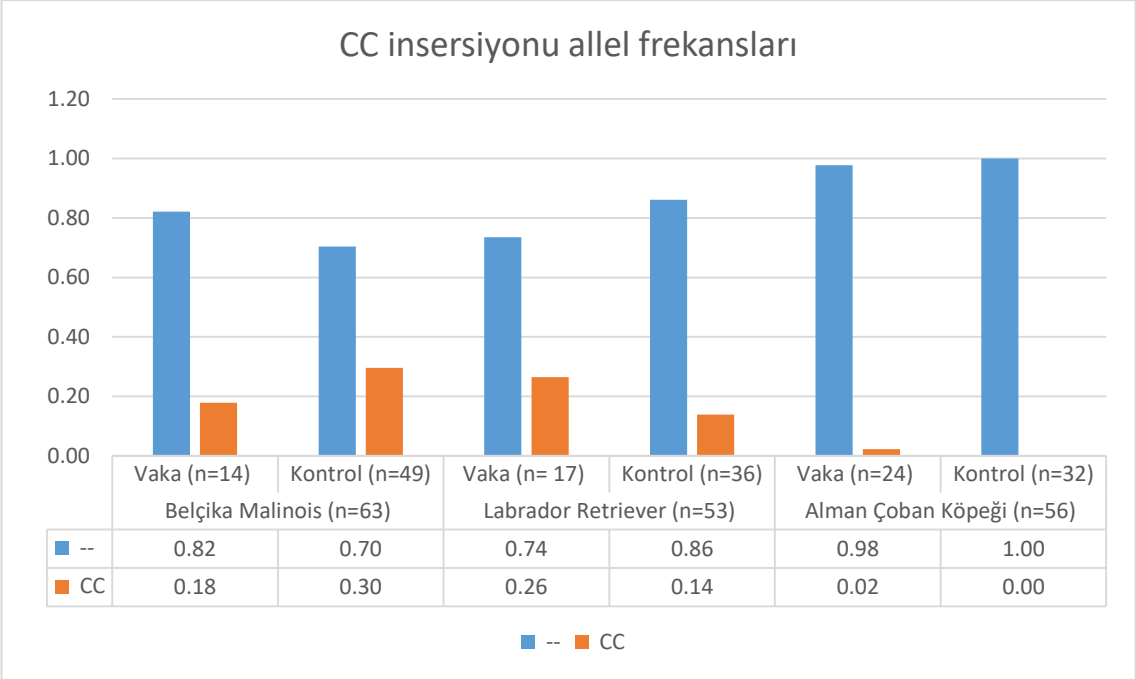
Belçika Malinois ırkı köpeklerde --/--, --/CC, CC/CC genotiplerinin frekansı kontrol grubunda sırasıyla 0,51, 0,39, 0,10, vaka grubunda sırasıyla 0,64, 0,36, 0,00 olarak bulunmuştur. --/-- genotipi vaka ve kontrol gruplarında en yüksek frekansa sahiptir. CC/CC genotipi vaka grubunda tespit edilememiştir, kontrol grubundaki frekansı ise 0,10 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2). -- ve CC allellerinin vaka grubundaki frekansları sırasıyla 0,82, 0,18 ve kontrol grubundaki frekansları ise 0,70, 0,30 bulunmuştur (Şekil 4.3).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka grubunda, --/--, --/CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,47, 0,53, kontrol grubunda ise 0,72, 0,28 olarak tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de CC/CC genotipi bulunamamıştır (Şekil 4.2). -- ve CC allellerinin frekans dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,74, 0,26, kontrol grubunda 0,86, 0,14 bulunmuştur (Şekil 4.3).

AÇK vaka grubunda; --/--, --/CC genotipleri için sırasıyla 0,95, 0,05 frekansları tespit edilmiştir. CC/CC genotipi ise tespit edilememiştir. Kontrol grubunda tüm örnekler --/-- genotipine sahip monomorfiktir (Şekil 4.2). -- ve CC allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,98, 0,02, kontrol grubunda 1,00, 0,00 bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.3. CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.3 CC İnsersiyonun (rs851814810) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=1,000) ve kontrol (p^{a2}=0,730) gruplarının, CC insersiyonu bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Genotiplerin, kontrol ve vaka grupları arasındaki genel dağılımının (p^{b}=0,537) ve bireysel dağılımın (p^{c} =0,622) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,217) allel dağılımının anlamlı fark oluşturmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için, OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. Araştırılan köpek ırklarında, CC insersiyonunun (rs851814810) KKD ile ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** Ki-kare değeri istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. **DY^{1};** kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

--/CC	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
--/--	9	25	1,000*	0,730*	0,537	RG	RG	RG	RG
--/CC	5	19				0,622	-	DY	DY
CC/CC	0	5				-	-	DY	DY
--	23	69	-	-	-	-	0,217	DY	DY
C	5	29							
--/CC	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
--/--	8	26	0,276*	1,00*	0,077	RG	RG	RG	RG
--/CC	9	10				0,079	-	DY	DY
CC/CC	0	0				-	-	DY	DY
--	25	62	-	-	-	-	0,115	DY	DY
C	9	10							
--/CC	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
--/--	21	32	1,00*	-	DY^{1}	DY^{1}	RG	RG	RG
--/CC	1	0				DY^{1}	DY^{1}	-	DY^{1}
CC/CC	0	0				DY^{1}	DY^{1}	-	DY^{1}
--	43	64	-	-	-	-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
CC	1	0							

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=1,00) ve vaka (p^{a1}=0,276) gruplarının, CC insersiyonu bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel genotip dağılımlarının (p^{b}=0,077) ve bireysel olarak genotip dağılımının (p^{c} =0,079) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,115) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Üç test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CX3CR1 geni CC insersiyonunun (rs851814810) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubu, CC insersiyonu bakımından HW dengesinde olmadığı için (Çizelge 4.3.) istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

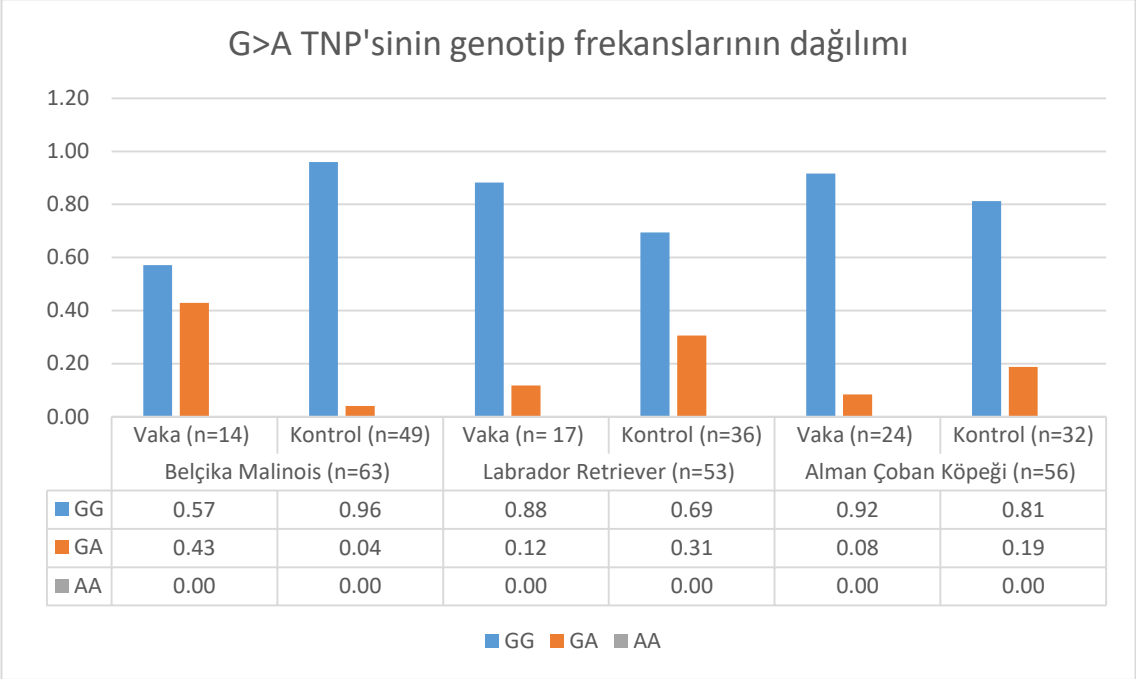
4.1.4 G>A TNP'sinin (rs9022770) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

DNA dizi analizi metodu yapılan çalışma ile G>A TNP'sinin 3 köpek ırkında polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Ancak AA genotipi tespit edilememiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 10*'da verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda GG, GA genotipleri için sırasıyla 0,57, 0,43, frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için sırasıyla 0,96, 0,04 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.4). GG genotipi, vaka ve kontrol gruplarında en yüksek frekansa sahiptir. G ve A allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,79, 0,21 kontrol grubunda 0,98, 0,02 bulunmuştur (Şekil 4.5).

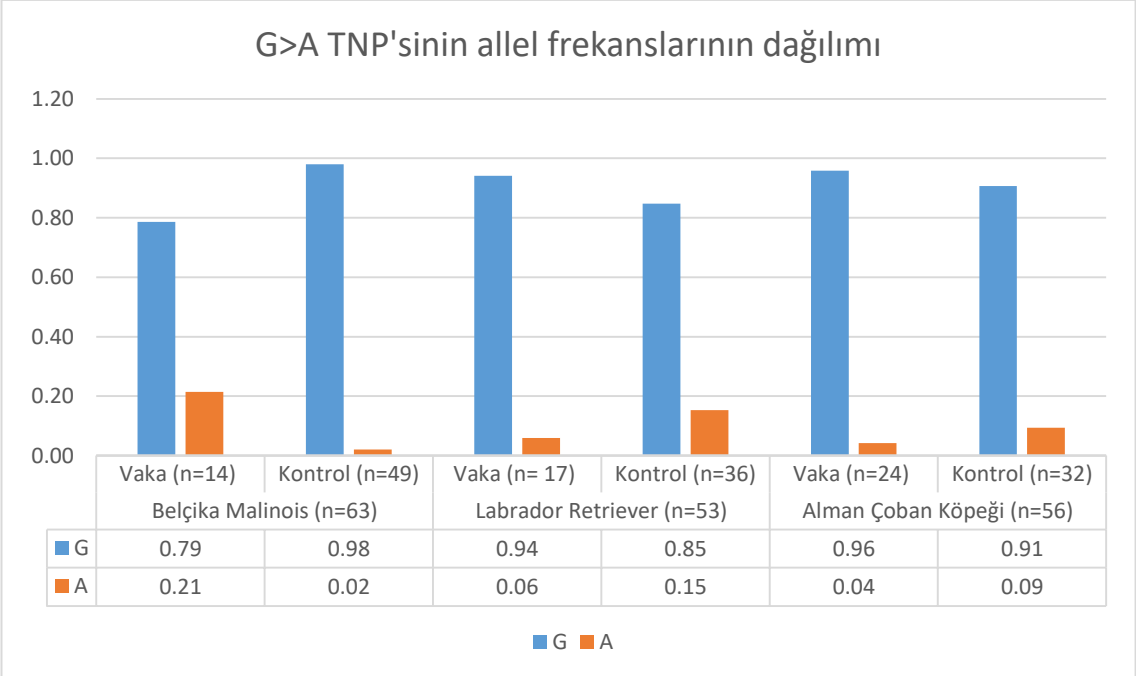
Labrador Retriever vaka grubunda GG, GA genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,88, 0,12 kontrol grubunda ise 0,69, 0,31 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de GG genotipi en yüksek frekansa sahiptir. G ve A allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,94, 0,06 kontrol grubunda 0,85, 0,15 bulunmuştur (Şekil 4.5).

AÇK vaka grubunda GG, GA genotipleri için sırasıyla 0,92, 0,08 frekansları tespit edilmişken kontrol grubu için 0,81, 0,19 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Diğer iki köpek ırkında olduğu gibi, AÇK'larda da GG genotipi en yüksek frekansa sahiptir. A ve

G allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,96, 0,04, kontrol grubunda 0,91, 0,09 bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin (rs9022770) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.5. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin (rs9022770) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.

4.1.5 G>A TNP'sinin (rs9022770) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=1,000) ve vaka (p^{a1}=1,000) gruplarının, G>A TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Genotiplerin, kontrol ve vaka grupları arasındaki genel dağılımının (**p^{b}=0,0005**) istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,05) tespit edilmiştir. GA genotipinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının lojistik regresyon analizi ile hesaplanan ki-kare değerinin (**p^{c}=0,001**) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. OR değeri 17,625 (3,011-103,181, %95 GA) olarak hesaplanmıştır ve Belçika Malinois'lerde KKD için riskli genotip olduğu sonucuna varılmıştır. G ve A allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (**p^{d}=0,002**) çapraz tablo analizi ile bulunmuştur. A allelinin OR değeri, 13,091 (2,474-69,264 %95 GA) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre, A allelinin Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD hastalığı için riskli allel olabileceği sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.4).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=1,000) ve kontrol (p^{a2}=0,569) gruplarının, CX3CR1 G>A TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel genotip dağılımlarının (p^{b}=0,120) ve bireysel olarak genotip dağılımının (p^{c} =0,153) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,217), allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 G>A TNP'sinin (rs9022770) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı kanısına varılmıştır (Çizelge 4.4).

AÇK ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=1,000) ve vaka (p^{a1}=1,000) gruplarının, G>A TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, bireysel ve genel genotip dağılımları arasındaki farkın (p^{b}=0,258, p^{c}=0,282) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,463) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur. Testler sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamsız olduğu için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin (rs9022770) AÇK ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Köpek ırklarında CX3CR1 G>A TNP'sinin (rs9022770) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** Ki-kare değeri istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

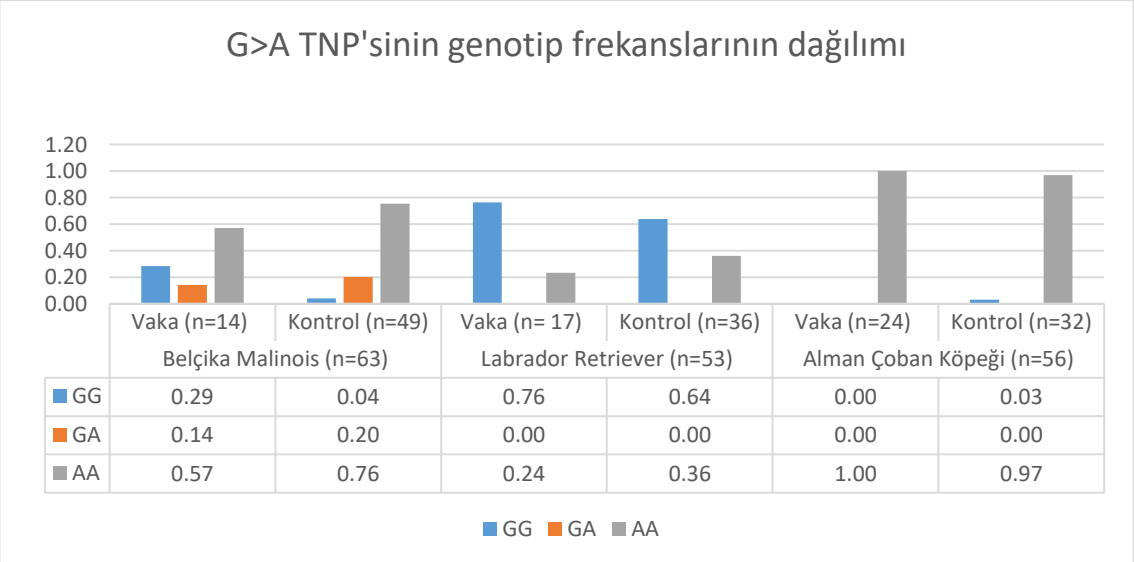
G>A	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
GG	8	47	1,000*	1,000*	**0,0005**	RG	RG	RG	RG
AG	6	2				**0,001**	-	**17,625**	**3,011-103,181**
AA	0	0				-	-	DY	DY
G	22	92	-	-	-	-	**0,002**	**13,091**	**2,474-69,264**
A	6	2							
G>A	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
GG	15	25	1,000*	0,569*	0,120	RG	RG	RG	RG
AG	2	11				0,153	-	DY	DY
AA	0	0				-	-	DY	DY
G	32	61	-	-		-	0,217	DY	DY
A	2	11							
G>A	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
GG	22	26	1,000*	1,000*	0,258	RG	RG	RG	RG
AG	2	6				0,282	-	DY	DY
AA	0	0				-	-	DY	DY
G	46	58	-	-		-	0,463	DY	DY
A	2	6							

4.1.6 G>A TNP'sinin (rs9022769) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

Araştırılan üç köpek ırkı da G>A TNP'si bakımından polimorfik bulunmuştur. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 11*'da verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerde GG, GA, AA genotiplerinin frekansları, vaka grubunda sırasıyla 0,29, 0,14, 0,57, kontrol grubunda 0,04, 0,20, 0,76 olarak tespit edilmiştir. AA genotipi hem vaka hem de kontrol grubunda en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.6). G ve A allellerinin vaka grubundaki frekansları sırasıyla 0,36, 0,64 ve kontrol grubundaki frekansları ise 0,14, 0,86 bulunmuştur (Şekil 4.7).

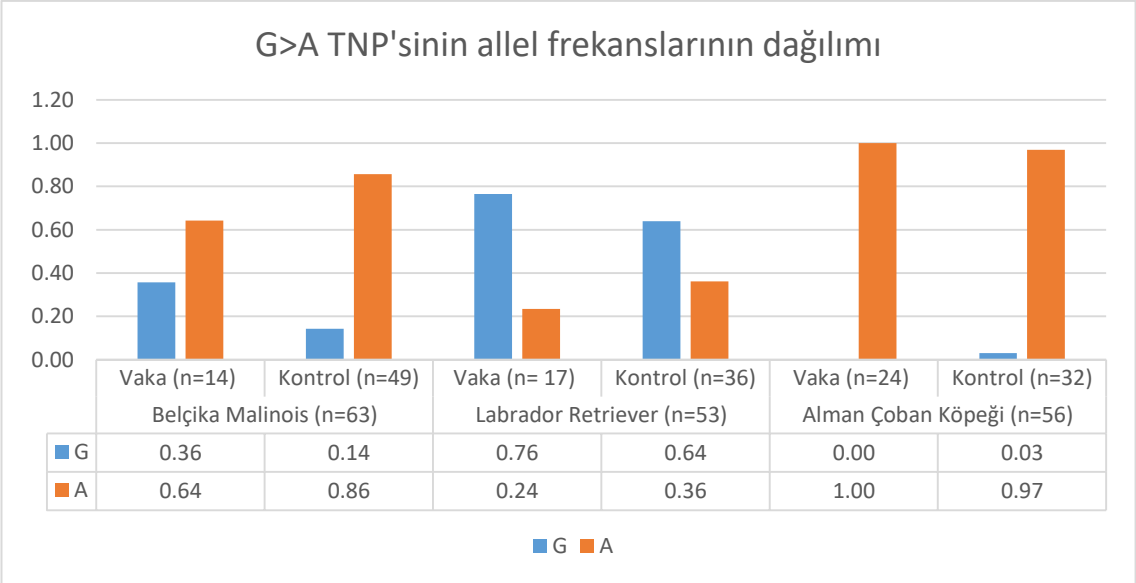
Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka grubunda GG, AA genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,76, 0,24, kontrol grubunda ise 0,64, 0,36 olarak tespit edilmiştir GA genotipi hem vaka hem de kontrol grubunda tespit edilememiştir. GG genotipi her iki grupta da en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.6). G ve A allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,76, 0,24, kontrol grubunda 0,64, 0,36 bulunmuştur (Şekil 4.7).

AÇK vaka grubunda G>A TNP'si bakımından monomorfik bulunmuştur. Tüm örnekler AA genotipine sahiptir. Kontrol grubu ise AA genotipi 0,97, GG genotipi 0,03 frekansa sahip bulunmuştur. GA genotipi bulunamamıştır (Şekil 4.6). G ve A allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,00, 1,00, kontrol grubunda 0,97, 0,03 bulunmuştur (Şekil 4.7).



	Belçika Malinois (n=63)		Labrador Retriever (n=53)		Alman Çoban Köpeği (n=56)	
	Vaka (n=14)	Kontrol (n=49)	Vaka (n= 17)	Kontrol (n=36)	Vaka (n=24)	Kontrol (n=32)
GG	0.29	0.04	0.76	0.64	0.00	0.03
GA	0.14	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00
AA	0.57	0.76	0.24	0.36	1.00	0.97

Şekil 4.6. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin (rs9022769) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.7. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin (rs9022769) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.7 G>A TNP'sinin (rs9022769) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin kontrol grubunun (p^{a2}=0,232) G>A TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) olduğu, vaka grubunun HW dengesinden saptığı (p^{a1}=0,014) tespit edilmiştir. Genotiplerin, kontrol ve vaka grupları arasındaki genel dağılımının (**p^{b}=0,046**) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. GA ve AA genotiplerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının lojistik regresyon analizi ile hesaplanan ki-kare değerleri sırasıyla; **p^{c}=0,048, p^{c}=0,019** olarak bulunmuştur. GA genotipi için OR değeri 0,108 (0,017-0,695, %95 GA), AA genotipi için ise 0,100 (0,010-0,975, %95 GA) olarak hesaplanmıştır. AA ve GA genotiplerinin Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD için koruyucu genotipler olduğu sonucuna varılmıştır. G ve A allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (**p^{d}=0,011**) çapraz tablo analizi ile bulunmuştur. G alleli için OR değeri 3,333 (1,279-8,688 %95 GA), olarak hesaplanmıştır ve G allelinin Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD hastalığı için riskli allel olabileceği sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.5).

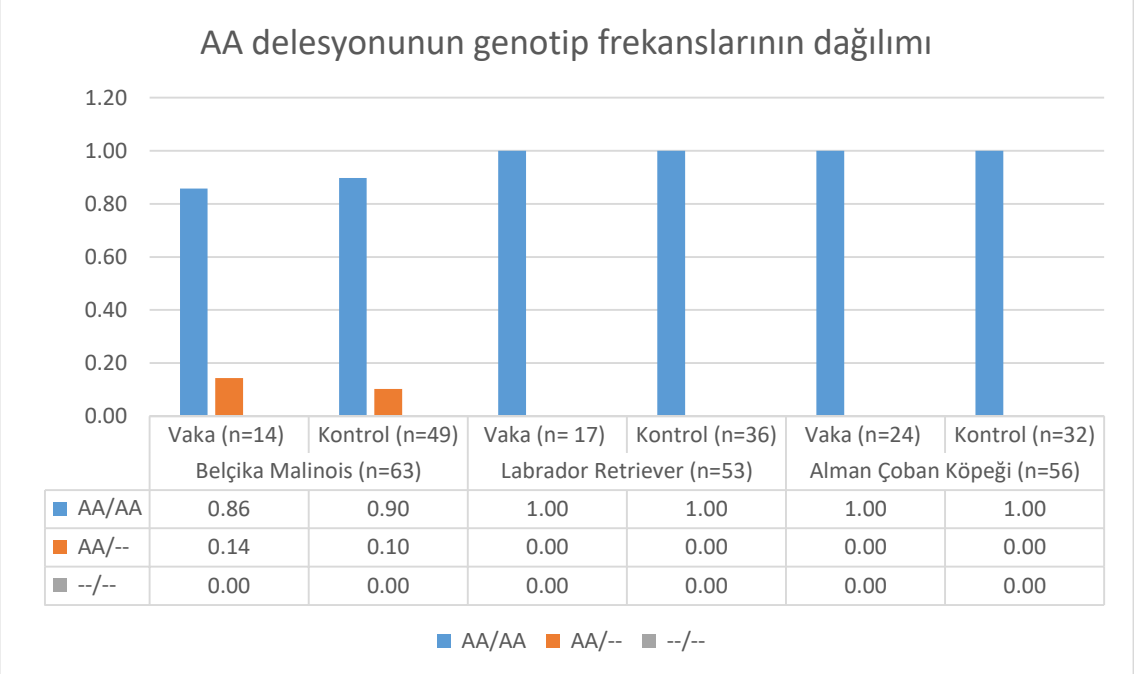
Çizelge 4.5. Köpek ırklarında CX3CR1 G>A (rs9022769) TNP'sinin KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** kontrol grubu HW dengesinde olmadığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

G>A	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
GG	4	2				RG	RG	RG	RG
GA	2	10	**0,014***	0,232*	**0,046**	**0,048**	-	**0,108**	**0,017-0,695**
AA	8	37				**0,019**	-	**0,100**	**0,010-0,975**
G	10	14	-	-	-	-	**0,011**	**3,333**	**1,279-8,688**
A	18	84							
G>A	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
GG	13	23				RG	RG	RG	RG
AG	0	0	**<0,0001***	**<0,0001***	DY	DY	-	DY	DY
AA	4	13				DY	-	DY	DY
G	26	46	-	-	-	-	DY	DY	DY
A	8	26							
G>A	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
GG	0	1				RG	RG	RG	RG
AG	0	0	-	**0,0159***	DY	DY	-	DY	DY
AA	24	31				DY	-	DY	DY
G	0	2	-	-	-	-	DY	DY	DY
A	48	62	-	-	-	-	DY	DY	DY

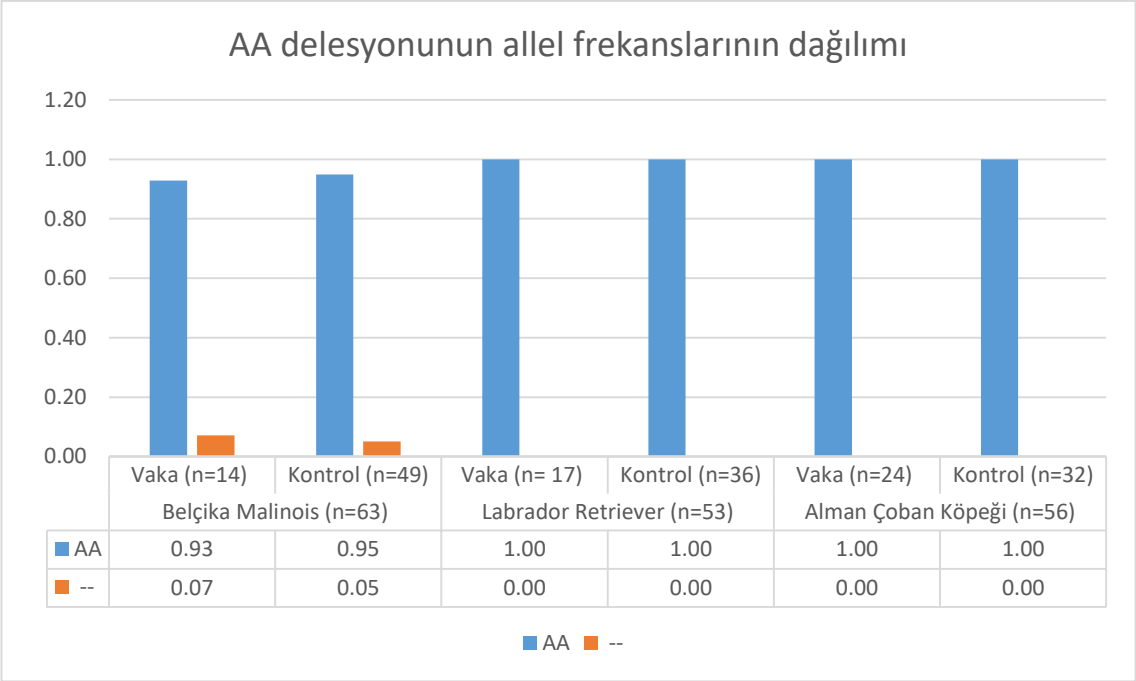
Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerde kontrol gruplarının CX3CR1 G>A TNP'si bakımından HW dengesinden saptığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.). Kontrol grubu köpeklerin, HW dengesinden saptığı durumlarda istatistiksel hesaplamalar güvenilir sonuç vermeyeceğinden değerlendirilmeye alınmamıştır.

4.1.8 AA Delesyonunun Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

CX3CR1 genin 3' UTR ucunda, 8.937.204 nükleotid pozisyonunda AA delesyonu tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 12*'da verilmiştir. Bu iki nükleotidlik delesyon, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerde tespit edilememiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerde ise AA/AA ve AA/-- genotipleri için vaka grubunda sırasıyla 0,86, 0,14, kontrol grubunda ise sırasıyla 0,90, 0,10 frekansları tespit edilmiştir. --/-- genotipi tespit edilememiştir (Şekil 4.8). AA ve --genotiplerinin frekansları sırası ile vaka grubunda sırasıyla 0,93, 0,07 kontrol grubunda sırasıyla 0,95, 0,05 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. CX3CR1 geni AA delesyonunun araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.9. CX3CR1 geni AA delesyonunun araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.9 AA Delesyonunun KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=1,000) ve kontrol (p^{a2}=1,000) gruplarının, AA delesyonu bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Genel ve bireysel genotip dağılımlarının, gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,676, p^{c}=0,670) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,745), allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.6). İstatistiksel olarak anlamlı p değerleri elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 geni AA delesyonunun Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerin AA delesyonu yönünden monomorfik olması nedeniyle (Çizelge 4.6.) istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Çizelge 4.6. Belçika Malinois ırkı köpeklerde CX3CR1 AA delesyonunun KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

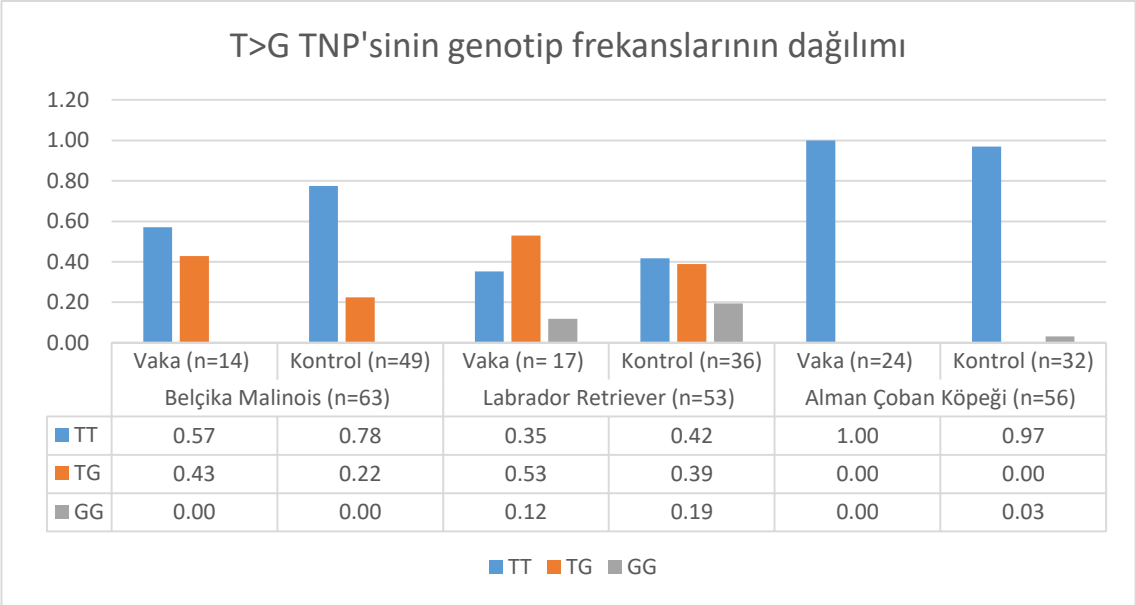
AA/--	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
AA/AA	12	44	1,000*	1,000*	0,676	RG	RG	RG	RG
AA/--	2	5				0,670	-	DY	DY
--/--	0	0				-	-	DY	DY
AA	26	93	-	-	-	-	0,745	DY	DY
--	2	5							

4.1.10 T>G TNP'sinin (rs852431030) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

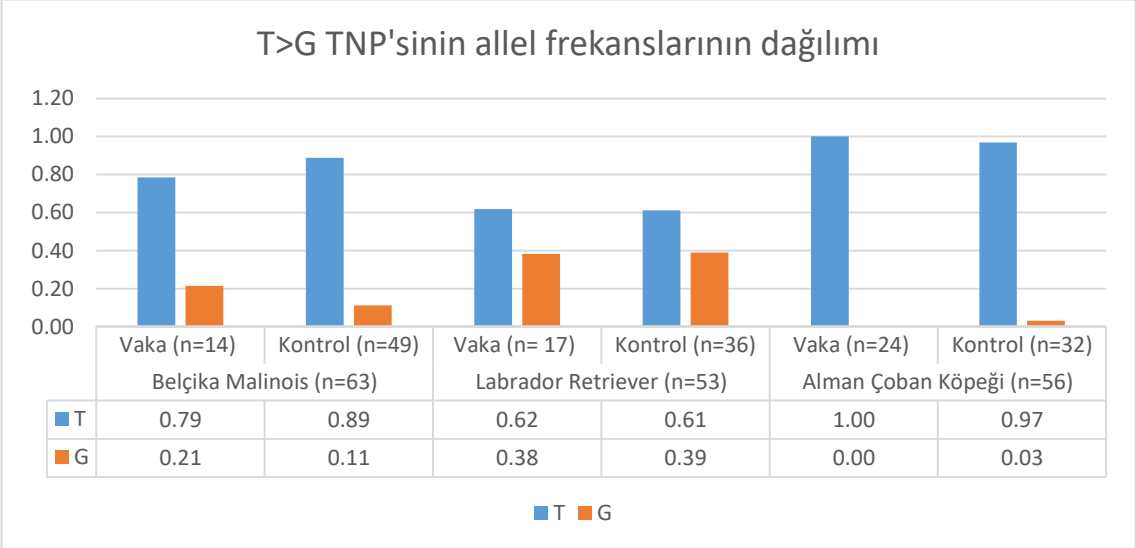
CX3CR1 genin 3' UTR ucunda, 8.937.319 nükleotid pozisyonunda T>G TNP'si üç köpek ırkında da polimorfik olarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 13*'de verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda, TT, TG genotipleri için sırasıyla 0,57, 0,43 frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için 0,78, 0,22 frekansları tespit edilmiştir. GG genotipi her iki grupta da tespit edilememiştir. TT genotipi kontrol ve vaka gruplarında en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.10). T ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,79, 0,21 kontrol grubunda 0,89, 0,11 bulunmuştur (Şekil 4.11).

Labrador Retriever vaka grubunda TT, TG, GG genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,35, 0,53, 0,12, kontrol grubunda ise 0,42, 0,39, 0,19 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Vaka grubunda TG genotipi en yüksek frekansa sahipken, kontrol grubunda TT genotipi en yüksek frekansa sahip bulunmuştur. T ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,62, 0,38 kontrol grubunda 0,61, 0,39 bulunmuştur (Şekil 4.11).

AÇK vaka grubu, T>G TNP'si bakımından monomorfik bulundu, tüm örnekler monomorfik (TT) bulunmuştur. Kontrol grubunda ise TG genotipi tespit edilememiştir. TT, GG genotipleri için sırasıyla 0,97, 0,03 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.10). T ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 1,00, 0,00, kontrol grubunda 0,97, 0,03 bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. CX3CR1 geni T>G TNP'sinin (rs852431030) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.11. CX3CR1 geni T>G TNP'sinin (rs852431030) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.11 T>G TNP'sinin (rs852431030) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=1,000) ve kontrol (p^{a2}=1,000) gruplarının, T>G TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Bireysel ve genel genotip dağılımlarının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,142, p^{c}=0,137) bulunmuştur. Allel dağılımının çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değeri (p^{d} =0,210) istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Çizelge 4.7). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için (p>0,05) OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 geni T>G TNP'sinin (rs852431030) Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=1,000) ve kontrol (p^{a2}=0,275) gruplarının, CX3CR1 T>G TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Genel ve bireysel genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,589, p^{c}=0,462, 0,719) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,949) allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.7). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 T>G TNP'sinin (rs852431030) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubu, HW dengesinde olmadığı için (Çizelge 4.7) istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Çizelge 4.7. Köpek ırklarında CX3CR1 T>G TNP'sinin (rs852431030) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. **DY^{1};** kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. ** p değeri Pearson ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

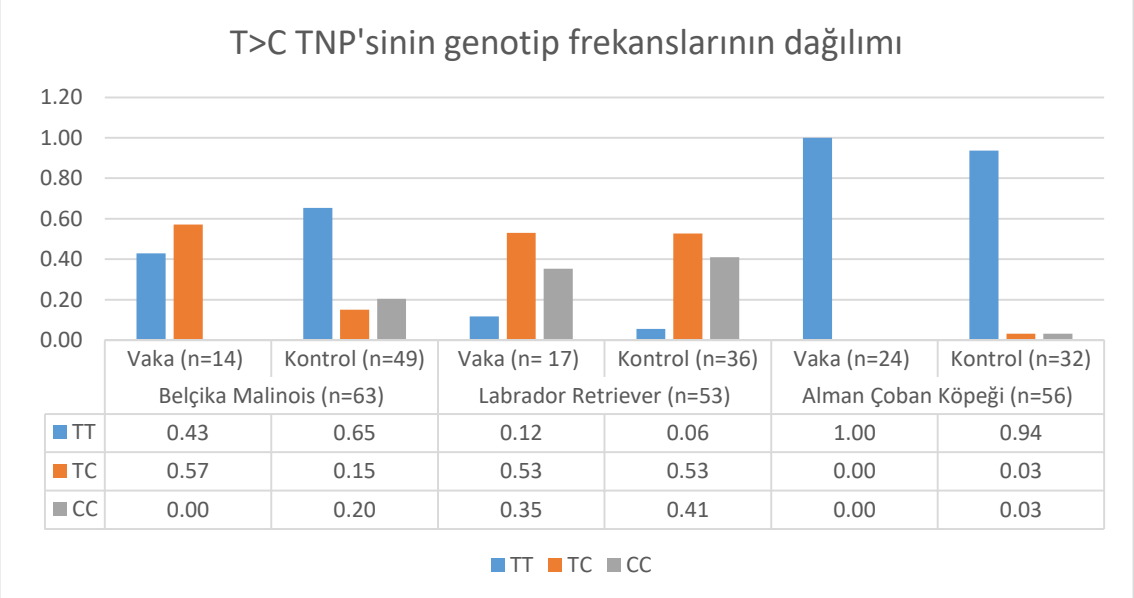
T>G	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
TT	8	38	1,000*	1,000*	0,142	RG	RG	RG	RG
TG	6	11				0,137	-	DY	DY
GG	0	0				-	-	DY	DY
T	22	87	-	-		-	0,210	DY	DY
G	6	11							
T>G	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{d}	p^{c}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
TT	6	15	1,000*	0,275**	0,589	RG	RG	RG	RG
TG	9	14				0,462	-	DY	DY
GG	2	7				0,719	-	DY	DY
T	21	44	-	-		-	0,949	DY	DY
G	13	28							
T>G	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
TT	24	31	-	**0,0159***		RG	RG	RG	RG
TG	0	0				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
GG	0	1				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
T	48	62	-	-		-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
G	0	2							

4.1.12 T>C TNP'sinin (rs852569240) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

CX3CR1 geninin 3' UTR ucunda bulunan T>C TNP'sinin 3 köpek ırkında polimorfik olduğu tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 14*'te verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda TT, TC, CC genotipleri için sırasıyla 0,43, 0,57, 0,00 frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için sırasıyla 0,65, 0,15, 0,20 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.12). T ve C allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,71, 0,29 kontrol grubunda 0,72, 0,28 bulunmuştur (Şekil 4.13).

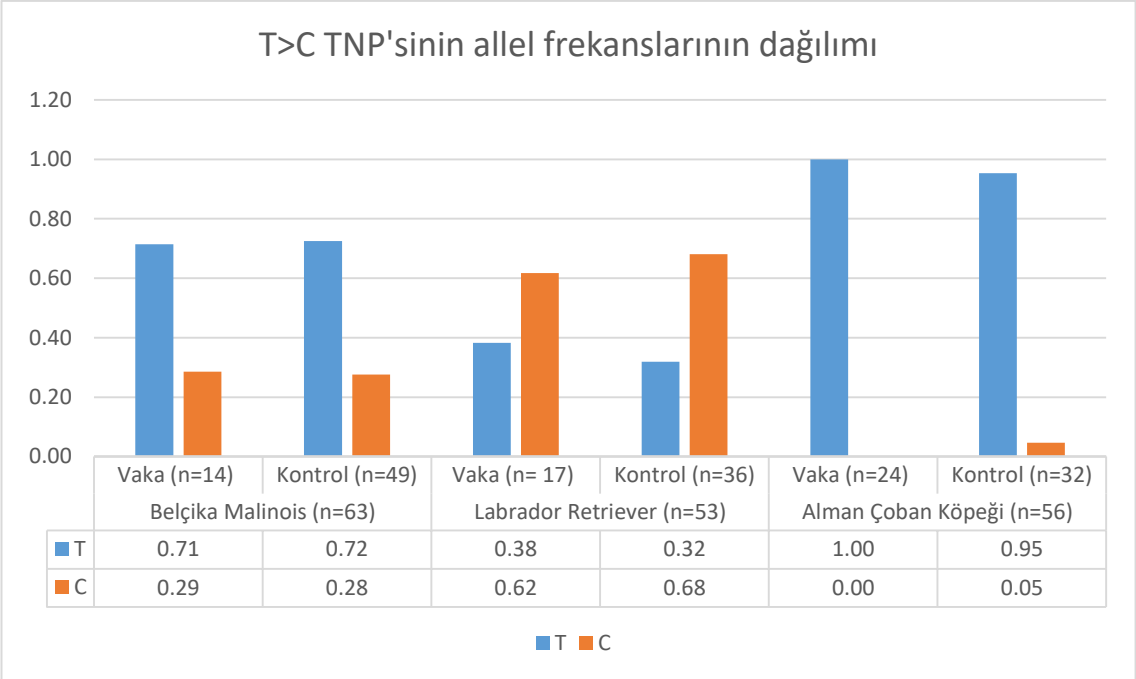
Labrador Retriever vaka grubunda TT, TC, CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,12, 0,53, 0,35 kontrol grubunda ise 0,06, 0,53, 0,41 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de TC genotipi en yüksek frekansa sahiptir. T ve C allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,38, 0,62 kontrol grubunda 0,32, 0,68 bulunmuştur (Şekil 4.13).

AÇK vaka grubu T>C polimorfizmi bakımından monomorfik bulunmuştur. Kontrol grubunda ise TT, TC, CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,94, 0,03, 0,03 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12). T ve C allellerinin kontrol grubunda frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; 0,95, 0,05 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



	Vaka (n=14)	Kontrol (n=49)	Vaka (n= 17)	Kontrol (n=36)	Vaka (n=24)	Kontrol (n=32)
	Belçika Malinois (n=63)		Labrador Retriever (n=53)		Alman Çoban Köpeği (n=56)	
TT	0.43	0.65	0.12	0.06	1.00	0.94
TC	0.57	0.15	0.53	0.53	0.00	0.03
CC	0.00	0.20	0.35	0.41	0.00	0.03

Şekil 4.12. CX3CR1 geni T>C TNP'sinin (rs852569240) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.13. CX3CR1 geni T>C TNP'sinin (rs852569240) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.13 T>C TNP'sinin (rs852569240) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin CX3CR1 geni T>C TNP'si bakımından vaka grubunun HW dengesinde (p^{a1}=0,505) olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ise HW dengesinden saptığı (**p^{a2}=0,000007**) tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Bu durumda, istatistiksel değerlendirme güvenilir sonuç vermeyeceği için analize devam edilmemiştir.

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,276) ve vaka (p^{a1}=1,000) gruplarının, CX3CR1 T>C TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel ve bireysel genotip dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p^{b}=0,715, p^{c}=0,474, 0,400) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,522) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.8). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CX3CR1 T>C TNP'sinin (rs852569240) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubu, CX3CR1 T>C TNP'si bakımından HW dengesinde olmadığı için (Çizelge 4.8) istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Çizelge 4.8 Köpek ırklarında CX3CR1 T>C TNP'sinin (rs852569240) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması, **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY;** Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. **DY^{1}** ; kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. ** p değeri Pearson ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

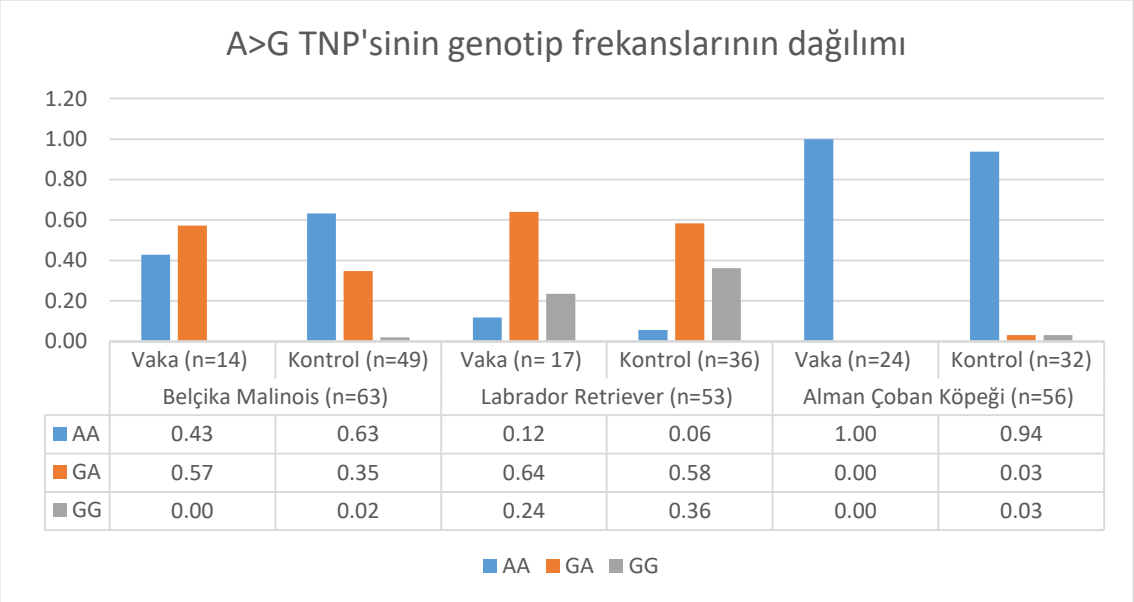
T>C	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
TT	6	32	0,505*	**0,000007****	DY^{1}	RG	RG	RG	RG
CT	8	7				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
CC	0	10				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
T	20	71	-	-	-	-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
C	8	27							
T>C	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
TT	2	2	1,000*	0,276*	0,715	RG	RG	RG	RG
CT	9	19				0,474	-	DY	DY
CC	6	15				0,400	-	DY	DY
C	13	23	-	-	-	-	0,523	DY	DY
T	21	49							
T>C	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
TT	24	30	-	**0,046***	DY^{1}	RG	RG	RG	RG
CT	0	1				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
CC	0	1				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
T	48	61	-	-	-	-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
C	0	3							

4.1.14 A>G TNP'sinin (rs851634517) allel ve genotip frekanslarının dağılımı

CX3CR1 genin 3' UTR ucunda, 8.937.450 nükleotid pozisyonunda A>G TNP'si üç köpek ırkında da polimorfik olarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 15*'te verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda, AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,43, 0,57, 0,00 frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için 0,63, 0,35 ve 0,02 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.14). A ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,71, 0,29 kontrol grubunda 0,81, 0,19 bulunmuştur (Şekil 4.15).

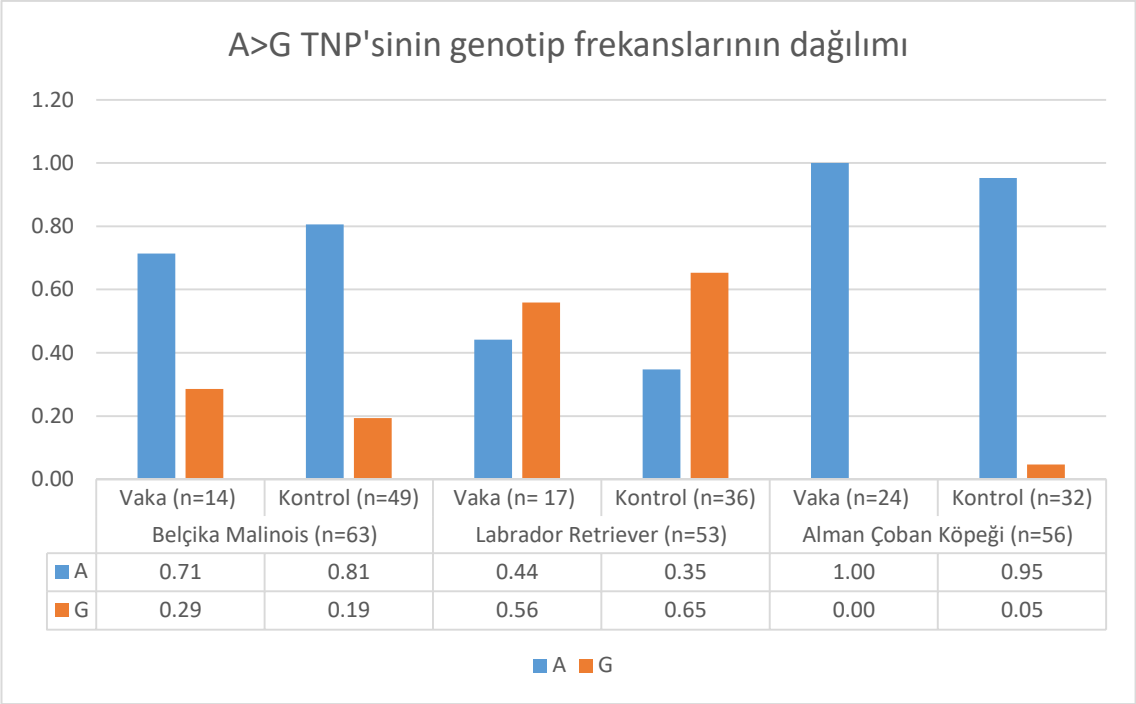
Labrador Retriever vaka grubunda AA, AG, GG genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,12, 0,64, 0,24, kontrol grubunda ise 0,06, 0,58, 0,36 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de AG genotipi en yüksek frekansa sahiptir. A ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,44, 0,56 kontrol grubunda 0,35, 0,65 bulunmuştur (Şekil 4.15).

AÇK kontrol grubunda AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,94, 0,03, 0,03 frekansları tespit edilmişken kontrol grubu AA homozigot bulunmuştur (Şekil 4.14). A ve G allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 1,00, 0,00, kontrol grubunda 0,95, 0,05 bulunmuştur (Şekil 4.15).



	Belçika Malinois (n=63)		Labrador Retriever (n=53)		Alman Çoban Köpeği (n=56)	
	Vaka (n=14)	Kontrol (n=49)	Vaka (n= 17)	Kontrol (n=36)	Vaka (n=24)	Kontrol (n=32)
AA	0.43	0.63	0.12	0.06	1.00	0.94
GA	0.57	0.35	0.64	0.58	0.00	0.03
GG	0.00	0.02	0.24	0.36	0.00	0.03

Şekil 4.14. CX3CR1 geni A>G TNP'sinin (rs851634517) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.15. CX3CR1 geni A>G TNP'sinin (rs851634517) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.15 A>G TNP'sinin (rs851634517) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,666) ve vaka (p^{a1}=0,505) gruplarının, CX3CR1 geni A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel ve bireysel genotip dağılımları arasındaki farkın anlamlı olmadığı (p^{b}=0,390, p^{c}=0,151) bulunmuştur. A ve G allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının anlamlı olmadığı çapraz tablo ki-kare değeri (p^{d}=0,296) ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CX3CR1 geni A>G TNP'sinin (rs851634517) Belçika Malionis ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

Çizelge 4.9. Köpek ırklarında CX3CR1 A>G TNP'sinin (rs851634517) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. **DY^{1}** ; kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

A>G	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
AA	6	31	0,505*	0,666*	0,390	RG	RG	RG	RG
AG	8	17				0,151	-	DY	DY
GG	0	1				-	-	DY	DY
A	20	79	-	-		-	0,296	DY	DY
G	8	19							
A>G	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
AA	2	2	0,342*	0,145*	0,541	RG	RG	RG	RG
AG	11	21				0,545	-	DY	DY
GG	4	13				0,306	-	DY	DY
A	15	25	-	-	-	-	0,352	DY	DY
G	19	47							
A>G	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
AA	24	30	-	**0,046***	DY^{1}	RG	RG	RG	RG
AG	0	1				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
GG	0	1				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
A	48	61	-	-	-	-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
G	0	3	-	-	-	-	DY^{1}	DY1	DY1

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol grubunun (p^{a2}=0,145) ve vaka grubunun (p^{a1}=0,342) CX3CR1 A>G TNP'si bakımından HW dengesinde olduğu tespit edilmiştir. Genel ve bireysel genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,541, p^{c}=0,545, 0,306) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,352) allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.9). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CX3CR1 A>G TNP'sinin (rs851634517) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

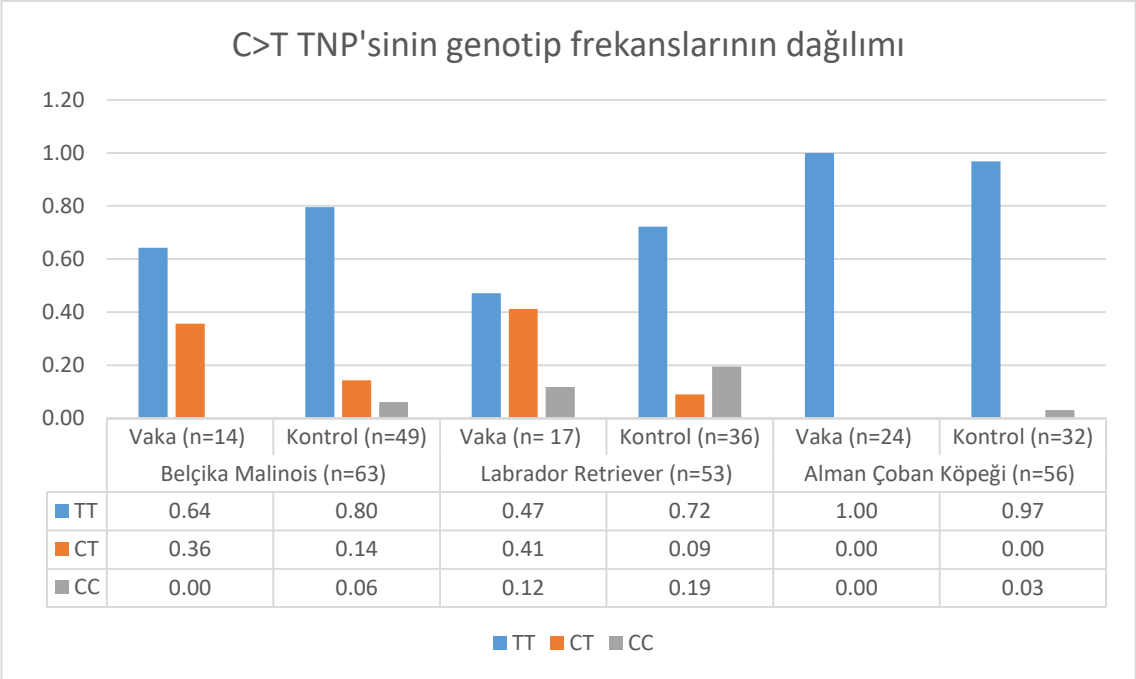
AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubunun CX3CR1 A>G TNP'si bakımından HW dengesinde olmaması nedeniyle (Çizelge 4.9) istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

4.1.16 C>T TNP'sinin (rs853018978) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

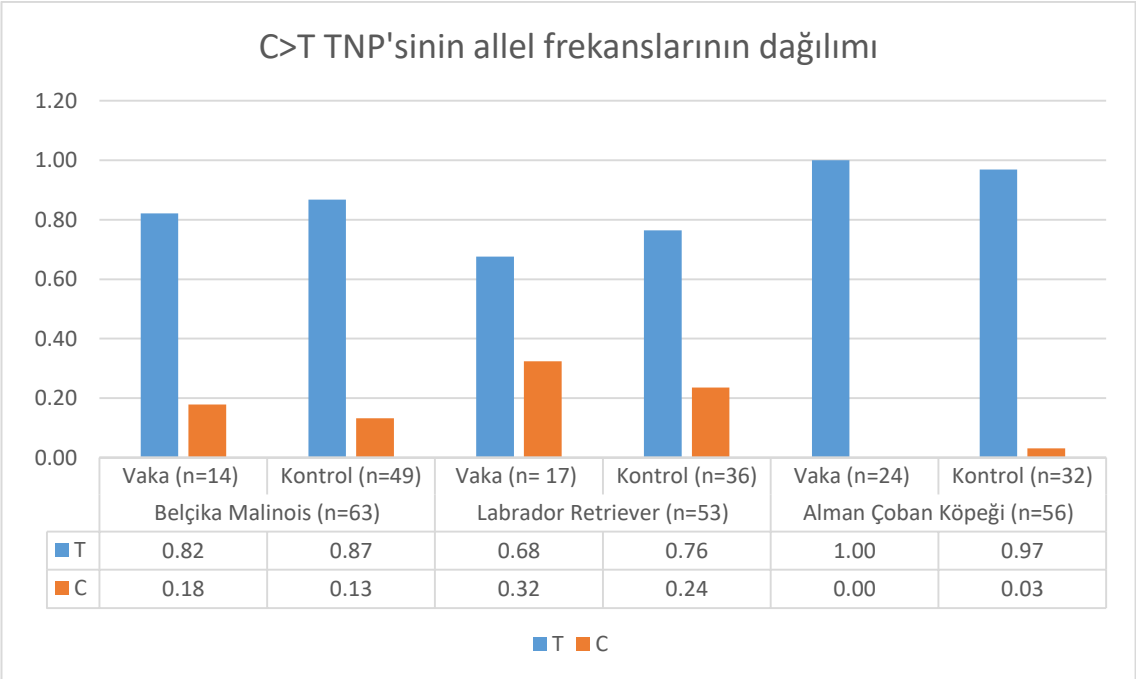
CX3CR1 genin 3' UTR ucunda, 8.937.590 nükleotid pozisyonunda C>T TNP'si üç köpek ırkında da polimorfik olarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonuç grafiği *EK 16*'te verilmiştir. Belçika Malinois ırkı köpeklerde TT, CT, CC genotiplerinin frekansları, vaka grubunda sırasıyla 0,64, 0,36, 0,00, kontrol grubunda 0,80, 0,14, 0,06 olarak tespit edilmiştir. CC genotipi vaka grubunda tespit edilememiştir (Şekil 4.16). T ve C allellerinin vaka grubundaki frekansları sırasıyla 0,82, 0,18 ve kontrol grubundaki frekansları ise 0,87, 0,13 bulunmuştur (Şekil 4.17).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka grubunda TT, CT, CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,47, 0,41, 0,12, kontrol grubunda ise 0,72, 0,09, 0,19 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de TT genotipi en yüksek frekansa sahip bulunmuştur. T ve C allellerinin frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,68, 0,32, kontrol grubunda 0,76, 0,24 bulunmuştur (Şekil 4.17).

AÇK kontrol grubunda TT, CT, CC genotipleri için sırasıyla 0,97, 0,00, 0,03 frekansları tespit edilmiştir, vaka grubu ise TT homozigot olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.16). T ve C allellerinin frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 1,00, 0,00, kontrol grubunda 0,97, 0,03 bulunmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. CX3CR1 geni C>T TNP'sinin (rs853018978) araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.17. CX3CR1 geni C>T TNP'sinin (rs853018978) araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.1.17 C>T TNP'sinin (rs853018978) KKD İle İlişkisi

CX3CR1 C>T TNP'si bakımından, Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grupları HW dengesindeyken (p^{a1}=1,000) kontrol grubu HW dengesinden sapmıştır (**p^{a2}=0,025**) (Çizelge 4.10). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmeye devam edilmemiştir.

Labrador Retriever ırkı vaka grubu köpeklerin CX3CR1 C>T TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları (p^{a1}=1,000) ancak kontrol grubu köpeklerin HW dengesinden saptıkları (**p^{a2}=0,00002**) tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmeye devam edilmemiştir.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubunun CX3CR1 C>T TNP'si bakımından HW dengesinde olmaması (**p^{a2}=0,0159)** nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Köpek ırklarında CX3CR1 C>T TNP'sinin (rs853078978) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.*p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

C>T	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
TT	9	39	1,000*	**0,025***	DY	RG	RG	RG	RG
CT	5	7				DY	-	DY	DY
CC	0	3				DY	-	DY	DY
C	23	85	-	-	-	-	DY	DY	DY
T	5	13							
C>T	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
TT	8	26	1,000*	**0,00002***	DY	RG	RG	RG	RG
CT	7	3				DY	-	DY	DY
CC	2	7				DY	-	DY	DY
C	23	55	-	-	-	-	-	DY	DY
T	11	17							
C>T	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
TT	24	31	-	**0,0159***	DY^{1}	RG	RG	RG	RG
CT	0	0				DY	-	DY	DY
CC	0	1				DY	-	DY	DY
T	48	62	-	-	-	-	DY	DY	DY
C	0	2							

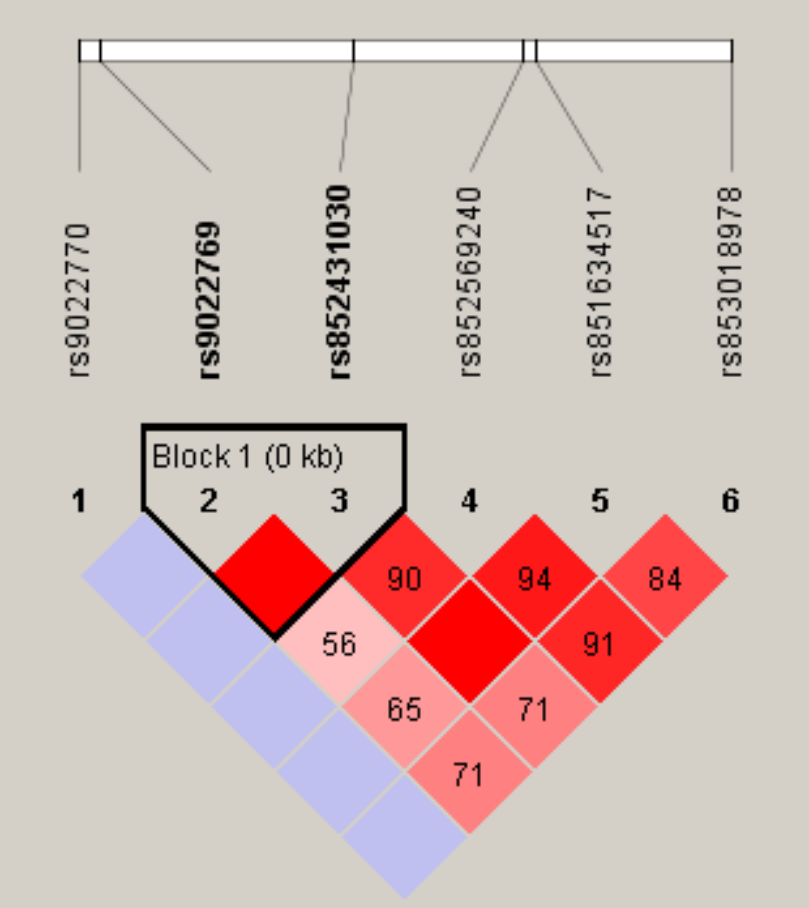
4.2 CX3CR1 Geninde Tespit Edilen TNP'lerin Haplotiplerinin KKD İle İlişkisinin Araştırılması

HoploView programı kullanılarak, her köpek ırkı için ayrı ayrı değerlendirme yapılmıştır. Yüklenen veriler, programın veri değerlendirme kriterlerine göre analiz edilmiş ve uygun olmayan veriler hesaplamalardan hariç tutulmuştur. Buna göre, Labrador Retriever ırkı köpeklerde, tespit edilen 6 TNP'den 2 tanesi (rs9022769 ve rs853018978), HW dengesinde olmamaları nedeniyle değerlendirmeden hariç tutulmuştur. Belçika Malinois ırkı köpeklerde tüm TNP'ler değerlendirmeye alınmıştır. AÇK ırkı köpekler de ise, minör allel frekanslarının düşük olması nedeniyle değerlendirme yapılamamıştır.

4.2.1 Belçika Malinois Irkı Köpeklerde Haplotip Sonuçları

Belçika Malinois ırkı köpeklerde 2 TNP'nin (rs9022769, rs852431030) 3 haplotip bloğu (AT, GG, GT) oluşturdukları tespit edilmiştir (Şekil 4.18). En yüksek frekansa AT (0,810) haplotipi sahiptir, ondan sonra GG (0,135) ve GT (0,056) haplotipleri gelmektedir (Çizelge 4.11).

Tespit edilen haplotiplerin, vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımı, HaploView programının "Haplotype Associations" menüsü ile değerlendirilmiştir. AT (**p=0,011**) ve GT (**p=0,022**) haplotiplerinin p değerleri, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. GG haplotipinin p değeri (0,163) ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. En düşük frekansa sahip olan GT haplotipinin OR değeri 6,222 (%95 GA; 1,280-30,243) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11). GT haplotipinin, KKD hastalığı için riskli genotip olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.18. Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerindeki TNP'lerin oluşturduğu haplotiplerin HaploView programı ile değerlendirilmesi. Her iki TNP'nin kombinasyonu için ayrı ayrı hesaplanan D' değerleri, 100 ile çarpılarak kutular içerisinde verilmiştir. Beyazdan kırmızıya doğru renklendirme, yükselen LD değeri ile ilişkilidir. Üzerinde rakam olmayan kırmızı kutuların D' değeri 1'dir.

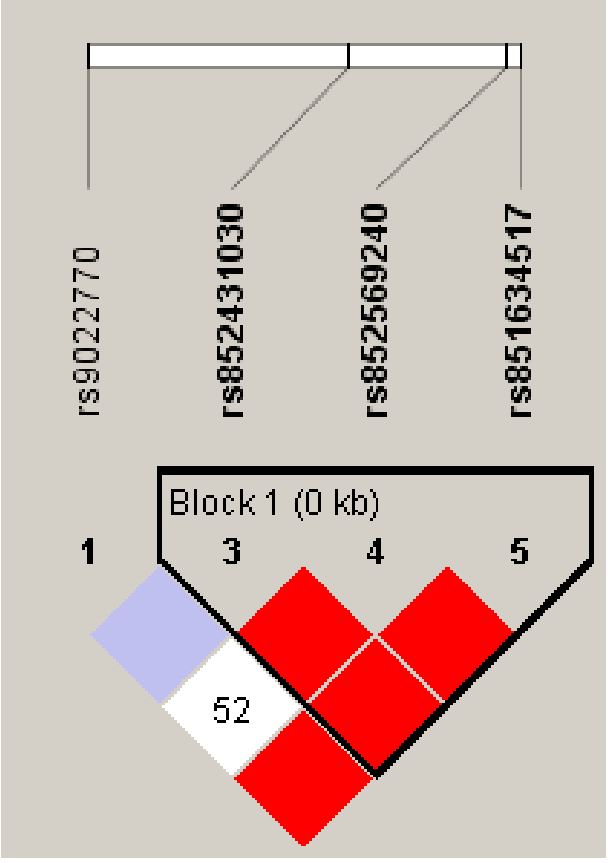
Çizelge 4.11. Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerinde, rs9022769 ve rs852431030 TNP'lerinin oluşturduğu haplotipler ve bu haplotiplerin KKD hastalığı ile ilişkileri verilmiştir. p; haplotiplerin kontrol ve vaka grupları arasındaki dağılımının ki-kare değeri, OR; olabilirlik oranı, GA; Güven aralığı

Haplotip		Vaka	Kontrol	Frekans	p	OR	%95 GA
rs9022769	rs852431030						
A	T	18	84	0,810	**0,011**	RG (1)	RG(1)
G	G	6	11	0,135	0,163	DY	DY
G	T	4	3	0,056	**0,022**	**6,222**	**1,280-30,243**

4.2.2 Labrador Retriever Irkı Köpekler

Labrador Retriever ırkı köpeklerde CX3CR1 geni üzerinde, rs852431030, rs852569240 ve rs851634517 TNP'lerinin oluşturduğu haplotip bloğu (GGG, TAA, TGG, TGA) belirlenmiştir (Şekil 4.19).

GGG, TAA, TGG ve TGA haplotiplerinin frekansları sırasıyla; 0,387, 0340, 0236, 0,038 olarak tespit edilmiştir. Bu haplotiplerin KKD hastalığı ile ilişkileri incelendiğinde vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımlarının istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). En yüksek frekansa sahip olan GGG haplotipi için p değeri 0.949 olarak hesaplanmıştır. En düşün frekansa sahip olan TGA haplotip bloğu için ise p değeri 0,434 olarak hesaplanmıştır. TAA ve TGG haplotipleri için hesaplana p değerleri ise sırasıyla; 0,523 ve 0,322'dir.



Şekil 4.19. Labrador Retriever ırkı köpeklerde, CX3CR1 geni üzerindeki TNP'lerin oluşturduğu haplotiplerin HaploView programı ile değerlendirilmesi. Her iki TNP'nin kombinasyonu için ayrı ayrı hesaplanan D' değerleri, 100 ile çarpılarak kutular içerisinde verilmiştir. Beyazdan kırmızıya doğru renklendirme, yükselen LD değeri ile ilişkilidir. Üzerinde rakam olmayan kırmızı kutuların D' değeri 1'dir.

Çizelge 4.12. Labrador Retriever ırkı köpeklerde CX3CR1 geni üzerinde rs852431030, rs852569240 ve rs851634517 TNP'lerinin oluşturduğu haplotipler ve KKD hastalığı ile ilişkileri. **p;** Haplotiplerin kontrol ve vaka grupları arasındaki dağılımının ki-kare değeri,

Haplotip			Vaka	Kontrol	Frekans	p
rs852431030	rs852569240	rs851634517				
G	G	G	13	28	0,387	0,949
T	A	A	13	23	0,340	0,523
T	G	G	6	19	0,236	0,322
T	G	A	2	2	0,038	0,434

4.3 miRNA Bağlanma Bölgeleri Üzerindeki Varyasyonların KKD İle İlişkisi

miRDB (miRDB, 2020) programı kullanılarak, köpek CX3CR1 geninin 3' UTR bölgesinde, Çizelge 4.13'te listelenen 8 miRNA için hedef oluşturan 17 bağlanma bölgesi olduğu belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'lar ve bağlanma bölgeleri TargetScan (Agarwal vd., 2015; TargetScan, 2020) programı kullanılarak doğrulanmıştır.

Çizelge 4.13. CX3CR1 geninin 3' UTR ucunda bağlanma sekansları olan miRNA'ların listesi. ***** CX3CR1 geninin 1858 bç'lik 3' UTR ucunda, miRNA'ların çekirdek bağlanma bölgelerinin başlangıç nükleotidlerinin konumu verilmiştir. Birden fazla bağlanma bölgesi " ; " ile ayrılmıştır.

miRNA ismi	miRNA Sekansı (5'-3')	17 Çekirdek Bağlanma Bölgesinin Konumu*
cfa-miR-8899	GUUGGGGUCCAUGCGUCUAGGAC	722; 841
cfa-miR-8836	AGGAAAGGAGAAGGGCCACA	825; 1053; 1125; 1300
cfa-miR-1837	UCUCAGAGGGACUGCGACAUCU	350; 367; 764
cfa-miR-8843	UUGUUUUUUUCUCUCGCCCCGCCUG	116; 1460
cfa-miR-589	UGAGAACCAUGUCUGAUCAGAG	1630
cfa-miR-488	CCCAGAUAAUGGCACUCUCAA	1104; 1332
cfa-miR-7180	CUGUGGCCUCUGGGUGUGUACCCU	1620
cfa-miR-8883	UCUGGGUGAGGAUUCGCAGGACUUU	741; 1528

CX3CR1 geninin 3' UTR ucunda tespit edilen 8 varyasyondan biri olan rs853018978 (C>T) TNP'si, cfa-miR-488 miRNA'sının çekirdek bağlanma bölgesi üzerinde bulunmaktadır (Şekil 4.20). C alleli, cfa-miR-488 miRNA'sı için bağlanma bölgesi (7mer-A1) oluştururken, T alleli bu bağlanma bölgesini yok etmektedir. miRNA'ların 5' ucundaki son 8 nükleotidden en az 6 tanesinin mRNA'ya komplementer olması kritiktir. Sonuç olarak, C allelinin bulunduğu durumlarda, cfa-miR-488'in post-transkripsiyonel regülasyonda rol oynayacağı, T allelinin bulunduğu durumlarda ise, miRNA mRNA'ya bağlanamayacağı düşünülmektedir. Ancak, C>T TNP'sinin, KKD hastalığının gelişimine etkisini bulmak için yapılan istatistiksel hesaplamalarda, ilginç bir şekilde, 3 köpek ırkında da kontrol gruplarının HW dengesinde olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.10). Vaka kontrol çalışmalarında, kontrol gruplarının HW dengesinden sapması testin güvenilir sonuçlar vermesini engelleyeceğinden değerlendirme yapılamamıştır.



Şekil 4.20. cfa-miR-488 miRNA'sının, CX3CR1 mRNA'sına bağlanma konumu ve C>T TNP'sinin (rs853018978) konumu

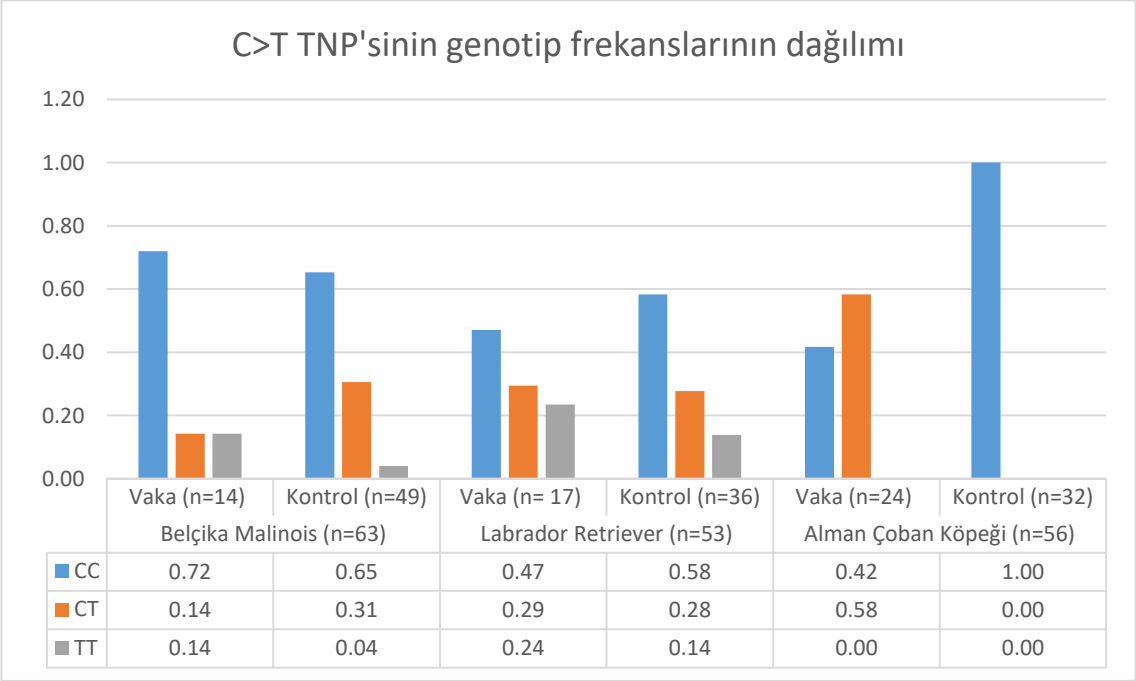
4.4 CHST3 geni C>T TNP'sinin (rs24076746) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

CHST3 geninin 5' UTR ucunda bulunan C>T TNP'si PCR-RFLP metodu ile genotiplendirilmiş ve 3 köpek ırkında da polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Belçika Malinois ve Labrador Retriever ırklarında 3 genotip (CC, CT, TT) tespit edilmişken, AÇK ırkı köpeklerde TT genotipi tespit edilememiştir. Tespit edilen her genotip içerisinden rastgele seçilen örneklerde DNA dizi analizi yapılarak PCR-RFLP sonuçları doğrulanmıştır.

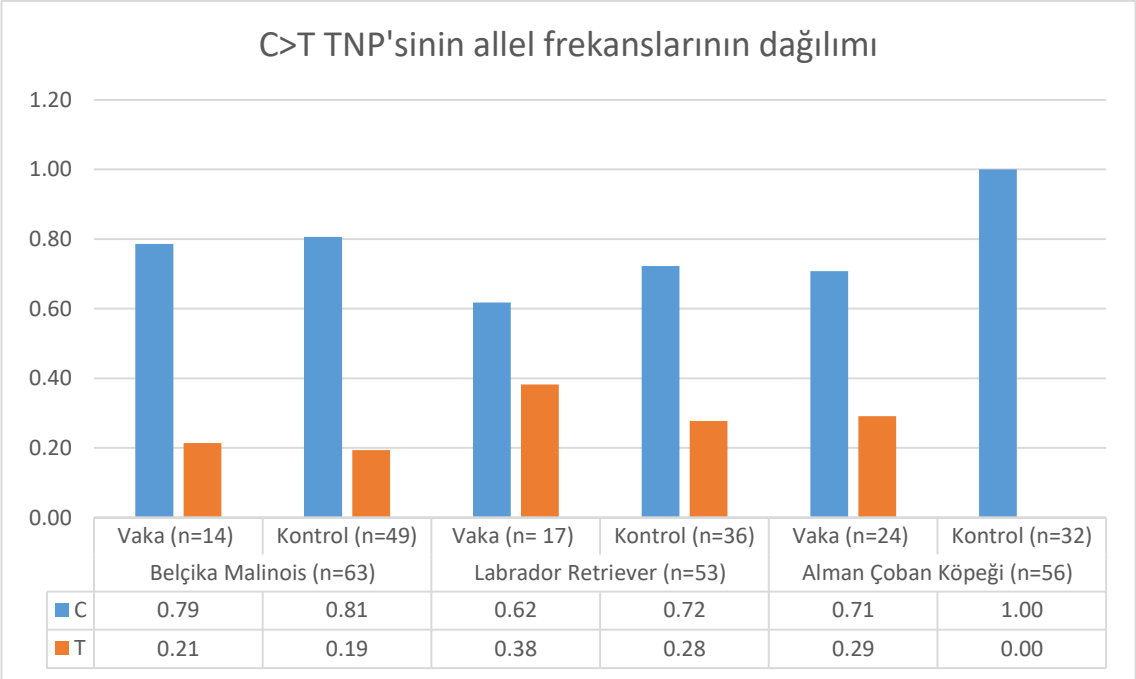
Belçika Malinois ırkı köpeklerde CC, CT, TT genotiplerinin frekansları, vaka grubunda sırasıyla 0,72, 0,14, 0,14, kontrol grubunda 0,65, 0,31, 0,04 olarak tespit edilmiştir. CC genotipi hem vaka hem de kontrol grubunda en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.21). C ve T allellerinin vaka grubundaki frekansları sırasıyla 0,79, 0,21 ve kontrol grubundaki frekansları ise 0,81, 0,19 bulunmuştur (Şekil 4.22).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka grubunda CC, CT, TT genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,47, 0,29, 0,24, kontrol grubunda ise 0,58, 0,28, 0,14 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de CC genotipi en yüksek frekansa sahip bulunmuştur. En düşük frekansa sahip genotip her iki grupta da TT genotipi olarak bulunmuştur. C ve T allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,62, 0,38, kontrol grubunda 0,72, 0,28 bulunmuştur (Şekil 4.22).

AÇK vaka grubunda CC, CT genotipleri için sırasıyla 0,42, 0,58 frekansları tespit edilmiştir. TT genotipi ise tespit edilememiştir. Kontrol grubunda tüm örnekler CC genotipine sahiptir, TT ve CT genotipleri tespit edilememiştir (Şekil 4.21). C ve T allel frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,71, 0,29, kontrol grubunda 1,00, 0,00 bulunmuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. CHST3 geni C>T (rs24076746) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı



Şekil 4.22. CHST3 geni C>T (rs24076746) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı

4.4.1 C>T TNP'sinin (rs24076746) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=0,065) ve kontrol (p^{a2}=1,000) gruplarının, CHST3 C>T TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Bireysel ve genel genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,249, p^{c}=0,308, 0,274) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,811) allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.14). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CHST3 geni C>T TNP'sinin (rs24076746) Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı kanısına varılmıştır.

Çizelge 4.14 Köpek ırklarında CHST3 C>T TNP'sinin (rs24076746) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. **DY^{1};** kontrol grubu HW dengesinden saptığı için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

C>T	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
CC	10	32	0,065*	1,000*	0,249	RG	RG	RG	RG
CT	2	15				0,308	-	DY	DY
TT	2	2				0,274	-	DY	DY
C	22	79	-	-		-	0,811	DY	DY
T	6	19							
A>G	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
CC	8	21	0,060*	0,090*	0,288	RG	RG	RG	RG
CT	5	10				0,692	-	DY	DY
TT	6	5				0,118	-	DY	DY
C	21	52	-	-		-	0,073	DY	DY
T	17	20							
C>T	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
CC	10	32	0,127*	-			RG	RG	RG
CT	14	0				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
TT	0	0				DY^{1}	-	DY^{1}	DY^{1}
C	34	64	-	-		-	DY^{1}	DY^{1}	DY^{1}
T	14	0							

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,090) ve vaka (p^{a1}=0,060) gruplarının, C>T TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, bireysel ve genel genotip dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p^{b}=0,288, p^{c}=0,692, 0,118) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,073) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.14). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CHST3 geni C>T TNP'sinin (rs24076746) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin vaka grubunun (p^{a1}=0,127), C>T TNP'si bakımından HW dengesinde olduğu tespit edilmiştir. Ancak kontrol grubu monomorfik olduğu için (Çizelge 4.14) istatistiksel değerlendirmeye devam edilmemiştir.

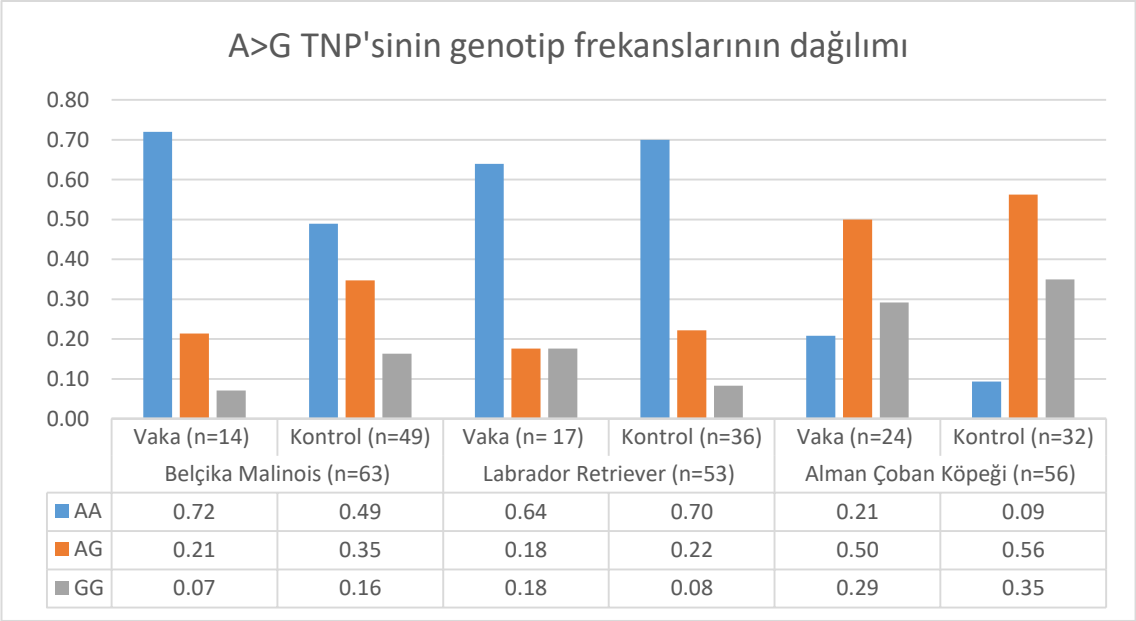
4.5 CHST3 Geni A>G TNP'sinin (rs24105396) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

CHST3 geninin 3' UTR bölgesinde bulunan A>G TNP'si PCR-RFLP metodu ile genotiplendirilmiş ve 3 köpek ırkında da polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen her genotip içerisinden rastlantısal olarak seçilen örnekler, DNA dizi analizi metodu ile de genotiplendirilmiş ve sonuçların doğruluğu gösterilmiştir.

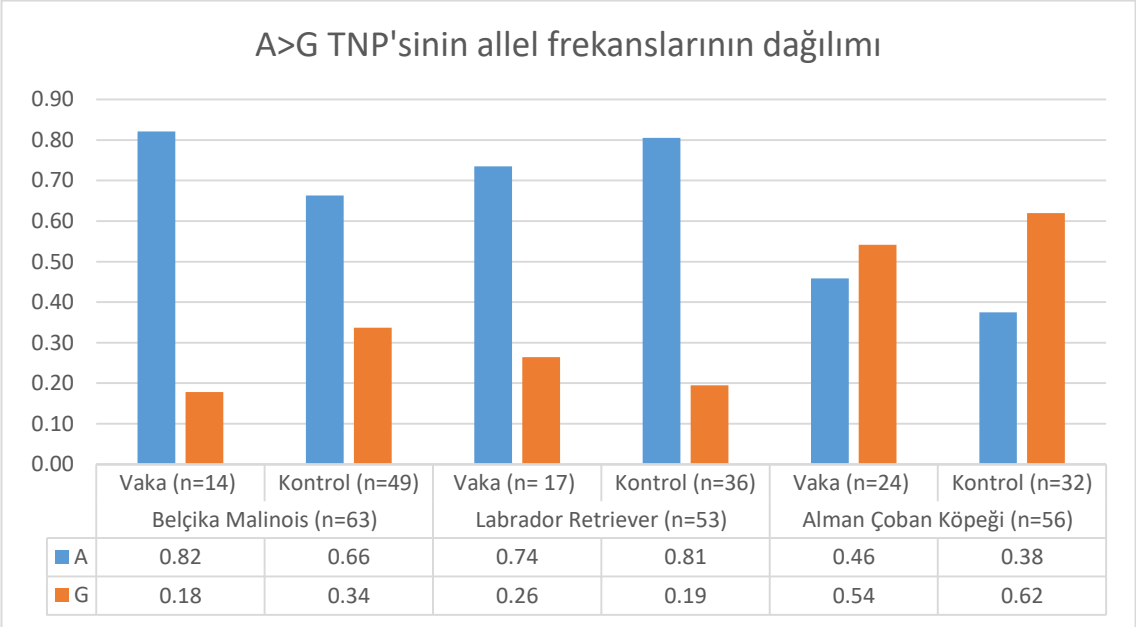
Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda, AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,72, 0,21, 0,07 frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için 0,49, 0,35 ve 0,16 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.23). AA genotipi kontrol ve vaka gruplarında en yüksek frekansa sahipken, GG genotipi en düşük frekansa sahiptir. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,82, 0,18 kontrol grubunda 0,66, 0,34 bulunmuştur (Şekil 4.24).

Labrador Retriever vaka grubunda AA, AG, GG genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,64, 0,18, 0,18, kontrol grubunda ise 0,70, 0,22, 0,08 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de AA genotipi en yüksek frekansa sahiptir. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,74, 0,26 kontrol grubunda 0,81, 0,19 bulunmuştur (Şekil 4.24).

AÇK vaka grubunda AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,21, 0,50, 0,29 frekansları tespit edilmişken kontrol grubu için 0,09, 0,56 ve 0,35 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.23). AG genotipi her iki grupta da en yüksek frekansa sahip olarak bulunmuştur. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,46, 0,54, kontrol grubunda 0,38, 0,62 bulunmuştur (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. CHST3 geni A>G (rs24105396) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.24. CHST3 geni A>G (rs24105396) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.5.1 A>G TNP'sinin (rs24105396) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,118) ve vaka (p^{a1}=0,348) gruplarının, A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel ve bireysel genotip dağılımları arasındaki farkın anlamlı olmadığı (p^{b}=0,307, p^{c}=0,240, 0,285) tespit edilmiştir. A ve G allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının anlamlı olmadığı çapraz tablo ki-kare değeri (p^{d}=0,108) ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CHST3 geni A>G TNP'sinin (rs24105396) Belçika Malionis ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol grubunun (p^{a2}=0,097), CHST3 A>G TNP'si bakımından HW dengesinde olduğu, ancak vaka grubunun (p^{a1}=0,039), HW dengesinden saptığı tespit edilmiştir. Bireysel ve genel genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,611, p^{c}=0,358, 0,835) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,413) allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.15). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, CHST3 geni A>G TNP'sinin (rs24105396) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,450) ve vaka (p^{a1}=0,972) gruplarının, A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genotip dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p^{b}=0,481, p^{c}=0,264, 0,272) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,375) göre de allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı anlaşılmıştır (Çizelge 4.15). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. CHST3 geni A>G TNP'sinin (rs24105396) AÇK ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.15 Köpek ırklarında CHST3 A>G TNP'sinin (rs24105396) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır.*p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. ** p değeri Pearson ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

A>G	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
AA	10	24	0,348*	0,118**	0,307	RG	RG	RG	RG
AG	3	17				0,240	-	DY	DY
GG	1	8				0,285	-	DY	DY
A	23	65	-	-	-	-	0,108	DY	DY
G	5	33							
A>G	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
AA	11	25	**0,039***	0,097*	0,611	RG	RG	RG	RG
AG	3	8				0,835	-	DY	DY
GG	3	3				0,358	-	DY	DY
A	25	58	-	-	-	-	0,413	DY	DY
G	9	14							
A>G	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
AA	5	3	0,972**	0,450*	0,481	RG	RG	RG	RG
AG	12	18				0,264	-	DY	DY
GG	7	11				0,272	-	DY	DY
A	22	24	-	-	-	-	0,375	DY	DY
G	26	40							

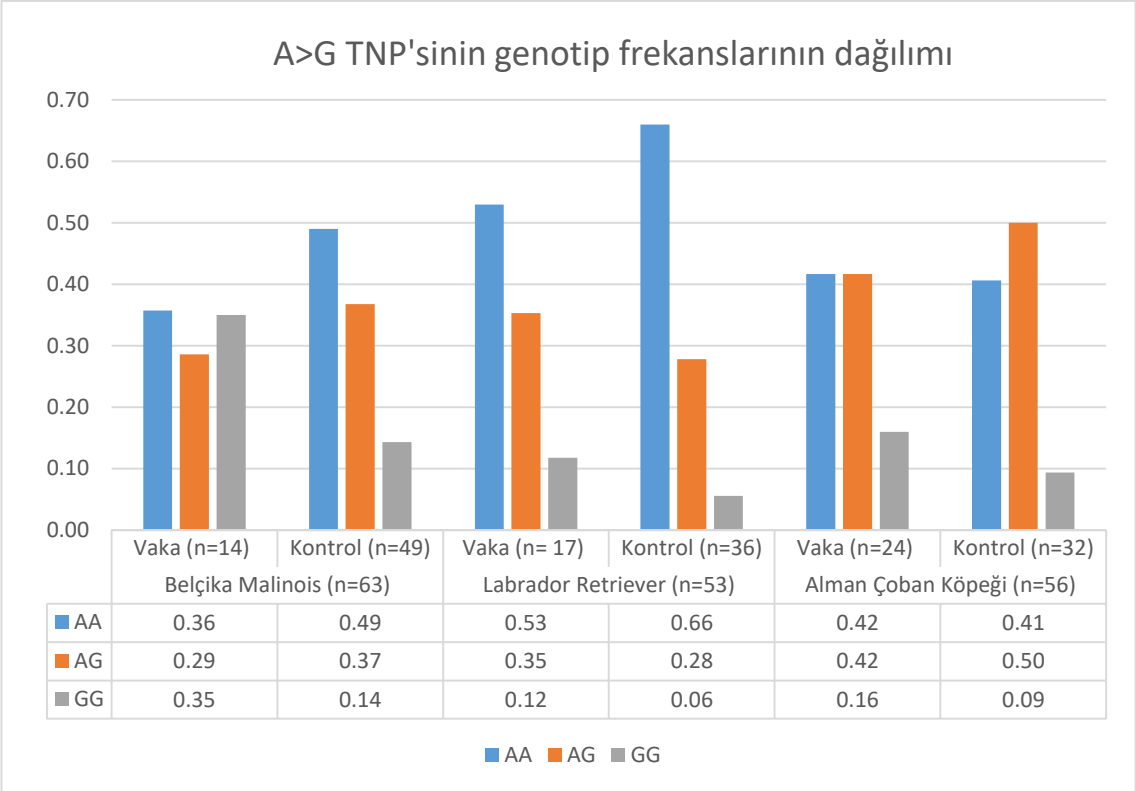
4.6 OSTF1 Geni A>G TNP'sinin (rs8995004) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

OSTF1 geninin 4. intronu üzerinde bulunan A>G TNP'si PCR-RFLP metodu ile genotiplendirilmiş ve 3 köpek ırkında da polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen her genotip içerisinden rastlantısal olarak seçilen örnekler, DNA dizi analizi metodu ile de genotiplendirilmiş ve sonuçların doğruluğu gösterilmiştir.

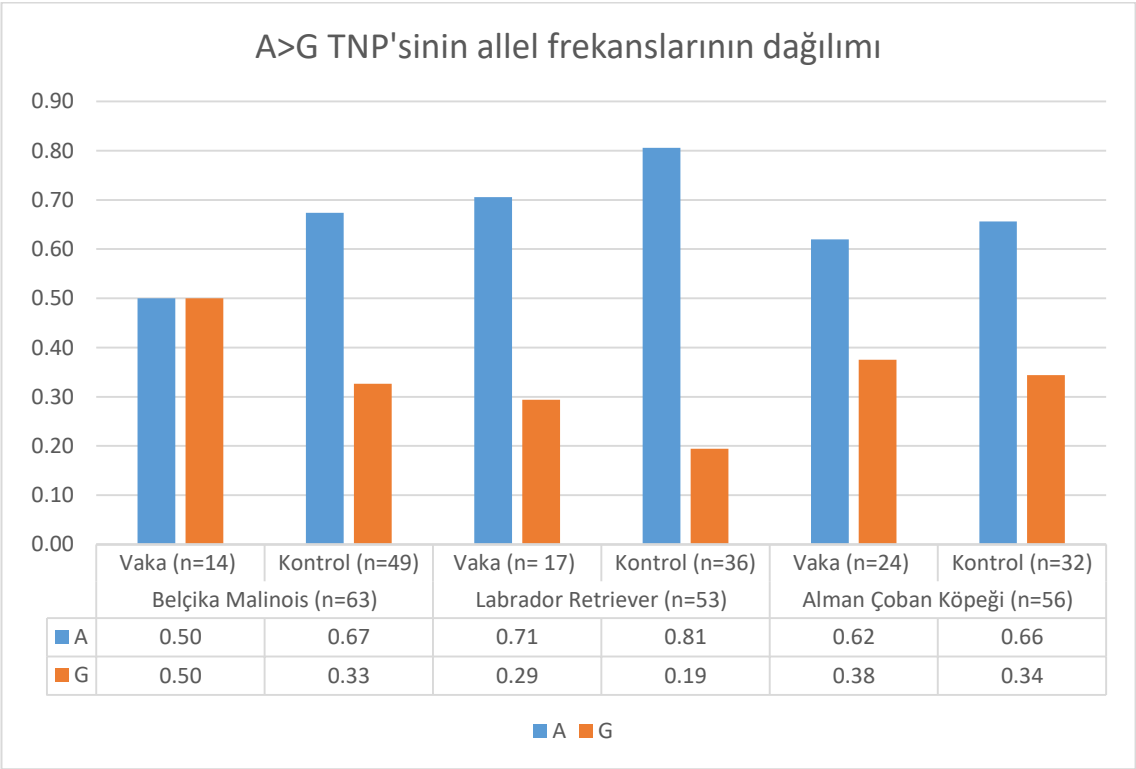
Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka grubunda, AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,36, 0,29, 0,35 frekansları tespit edilmişken, kontrol grubu için 0,49, 0,37 ve 0,14 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.25). AA genotipi kontrol grubunda en yüksek frekansa sahipken, vaka grubunda AA ve GG genotiplerinin frekansları birbirlerine yakındır. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,50, 0,50 kontrol grubunda 0,67, 0,33 bulunmuştur (Şekil 4.26).

Labrador Retriever vaka grubunda AA, AG, GG genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,53, 0,35, 0,12, kontrol grubunda ise 0,66, 0,28, 0,06 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de AA genotipi en yüksek frekansa sahip, GG genotipi en düşük frekansa sahip olarak bulunmuştur. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,71, 0,29 kontrol grubunda 0,81, 0,19 bulunmuştur (Şekil 4.26).

AÇK vaka grubunda AA, AG, GG genotipleri için sırasıyla 0,42, 0,42, 0,16 frekansları tespit edilmişken kontrol grubu için 0,41, 0,50 ve 0,09 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.25). AA ve AG genotiplerinin frekansları vaka grubunda birbirine eşit olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise AG genotipinin frekansı en yüksek olarak belirlenmiştir. A ve G allel frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,62, 0,38, kontrol grubunda 0,66, 0,34 bulunmuştur (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. OSTF1 geni rs8995004 A>G TNP'sinin genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.26. OSTF1 geni rs8995004 A>G TNP'sinin allel frekanslarının dağılımı.

4.6.1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,249) ve vaka (p^{a1}=0,128) gruplarının, A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genel ve bireysel genotip dağılımları arasındaki farkın anlamlı olmadığı (p^{b}=0,232, p^{c}=0,930, 0,107) tespit edilmiştir. A ve G allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının anlamlı olmadığı çapraz tablo ki-kare değeri (p^{d}=0,093) ile tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamsız olduğu için, OR değerleri hesaplanmamıştır. OSTF1 geni A>G TNP'sinin (rs8995004) Belçika Malionis ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=0,573) ve kontrol (p^{a2}=0,588) gruplarının, OSTF1 A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,571, p^{c}=0,468, 0,361) bulunmuştur. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,252) allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.16). İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, OSTF1 geni A>G TNP'sinin (rs8995004) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı kanısına varılmıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,705) ve vaka (p^{a1}=0,667) gruplarının, A>G TNP'si bakımından HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genotip dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p^{b}=0,675, p^{c}=0,722, 0,528) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,733) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.16). Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. OSTF1 geni A>G TNP'sinin (rs8995004) AÇK ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır.

Çizelge 4.16. Köpek ırklarında OSTF1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır.*p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır.

A>G	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
AA	5	24	0,128*	0,249**	0,232	RG	RG	RG	RG
AG	4	18				0,930	-	DY	DY
GG	5	7				0,107	-	DY	DY
A	14	66	-	-		-	0,093	DY	DY
G	14	32							
A>G	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
AA	9	24	0,573*	0,588*	0,571	RG	RG	RG	RG
AG	6	10				0,468	-	DY	DY
GG	2	2				0,361	-	DY	DY
A	24	58	-	-		-	0,252	DY	DY
G	10	14							
A>G	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
AA	10	13	0,667*	0,705*	0,675	RG	RG	RG	RG
AG	10	16				0,722	-	DY	DY
GG	4	3				0,528	-	DY	DY
A	30	42	-	-		-	0,733	DY	DY
G	18	22							

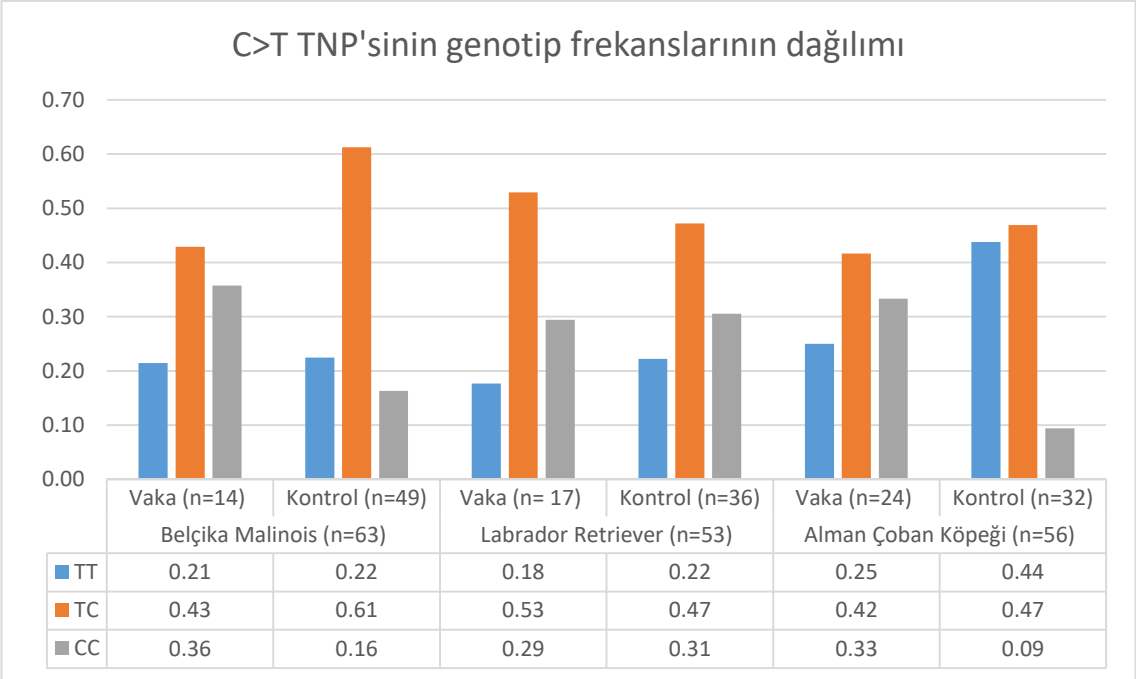
4.7 IBSP Geni C>T TNP'sinin (rs23759713) Allel Ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

IBSP geninin 3. intronunda bulunan C>T TNP'si PCR-RFLP metodu ile genotiplendirilmiş ve 3 köpek ırkında da polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen her genotip içerisinden rastgele seçilen örneklerde DNA dizi analizi yapılarak PCR-RFLP sonuçları doğrulanmıştır.

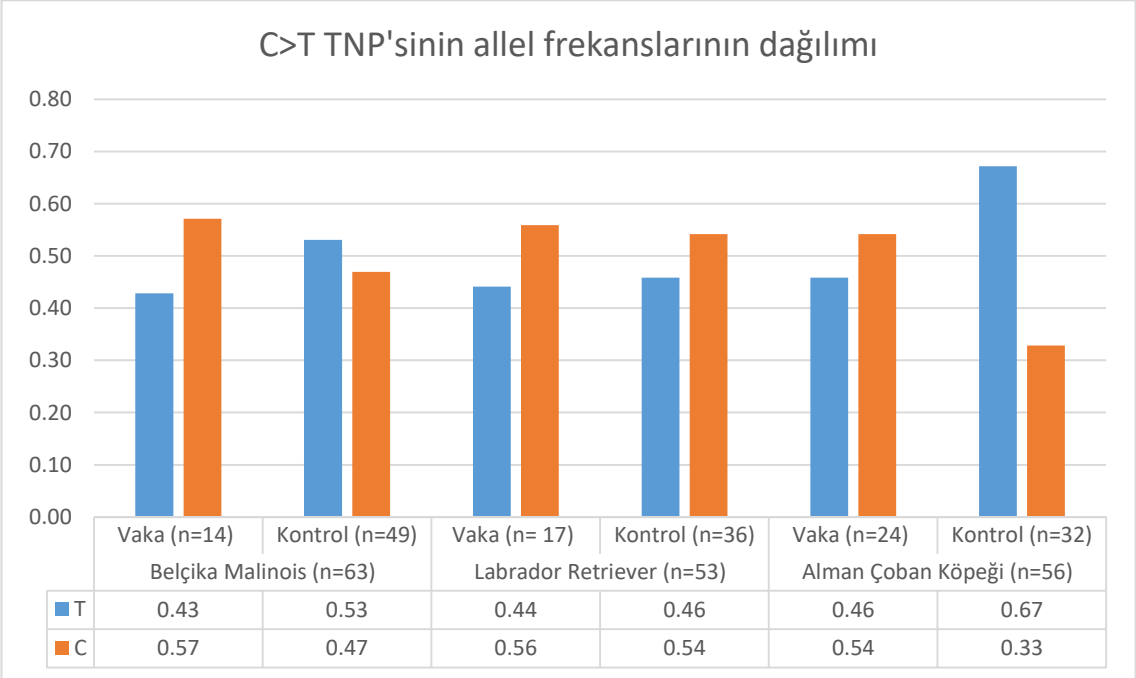
Belçika Malinois ırkı köpeklerde TT, CT, CC genotiplerinin frekansları, vaka grubunda sırasıyla 0,21, 0,43, 0,36, kontrol grubunda 0,22, 0,61, 0,16 olarak tespit edilmiştir. CT genotipi hem vaka hem de kontrol grubunda en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.27). T ve C allellerinin vaka grubundaki frekansları sırasıyla 0,43, 0,57 ve kontrol grubundaki frekansları ise 0,53, 0,47 bulunmuştur (Şekil 4.28).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin vaka grubunda TT, CT, CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0,18, 0,53, 0,29, kontrol grubunda ise 0,22, 0,47, 0,31 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.27). Vaka ve kontrol gruplarının her ikisinde de CT genotipi en yüksek frekansa sahip bulunmuştur. En düşük frekansa sahip genotip vaka ve kontrol grubunda TT olarak bulunmuştur. T ve C allel frekanslarının dağılımı ise vaka grubunda sırasıyla 0,44, 0,56, kontrol grubunda 0,46, 0,54 bulunmuştur (Şekil 4.28).

AÇK vaka grubunda TT, CT, CC genotipleri için sırasıyla 0,25, 0,42, 0,33 frekansları tespit edilmişken kontrol grubu için 0,44, 0,47 ve 0,09 frekansları tespit edilmiştir (Şekil 4.27). Vaka grubunda en düşük frekansa sahip genotip TT, kontrol grubunda ise CC olarak tespit edilmiştir. T ve C allel frekanslarının dağılımı ise sırasıyla; vaka grubunda 0,46, 0,54, kontrol grubunda 0,67, 0,33 bulunmuştur (Şekil 4.28).



Şekil 4.27. IBSP geni C>T (rs23759713) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda genotip frekanslarının dağılımı.



Şekil 4.28. IBSP geni C>T (rs23759713) TNP'sinin araştırılan popülasyonlarda allel frekanslarının dağılımı.

4.7.1 C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD İle İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerin vaka (p^{a1}=0,621) ve kontrol (p^{a2}=0,109) gruplarının, IBSP C>T TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Bireysel ve genel genotip dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturmağı (p^{b}=0,297, p^{c}=0,695, 0,338) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine göre (p^{d} =0,341) allel dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmediği için OR değerleri hesaplanmamıştır. Sonuç olarak, IBSP geni C>T TNP'sinin (rs23759713) Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı kanısına varılmıştır (Çizelge 4.17).

Labrador Retriever ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=0,769) ve vaka (p^{a1}=1,000) gruplarının, C>T TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, genotip dağılımları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p^{b}=0,904, p^{c}=0,664, 0,824) tespit edilmiştir. Çapraz tablo analizi ile hesaplanan ki-kare değerine (p^{d} =0,868) göre allel dağılımının istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı bulunmuştur. Her iki test sonucunda da elde edilen ki-kare değerleri, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için (p>0,05) için, OR değerleri hesaplanmamıştır. IBSP geni C>T TNP'sinin (rs23759713) Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ile ilişkisi olmadığı sonuca varılmıştır (Çizelge 4.17).

AÇK ırkı köpeklerin kontrol (p^{a2}=1,000) ve vaka (p^{a1}=0,431) gruplarının, C>T TNP'si bakımından HW dengesinde (p>0,05) oldukları tespit edilmiştir. Genotiplerin, kontrol ve vaka grupları arasındaki genel dağılımının (p^{b}=0,064) istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edilmiştir. CC genotipinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının lojistik regresyon analizi ile hesaplanan ki-kare değerinin (**p^{c}=0,028**) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. CC genotipinin OR değeri, 1,212-31,937 %95 güven aralığında, 6,222 bulunmuştur. CC genotipinin AÇK'larda KKD için riskli genotip olduğu sonucuna varılmıştır. C ve T allellerinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (**p^{d}=0,026**) çapraz tablo analizi ile bulunmuştur. T allelinin OR değeri, 0,048-0,891 %95 güven aralığında, 0,207 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre T allelinin, AÇK'larda KKD hastalığı için koruyucu allel olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Köpek ırklarında IBSP C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi **p^{a1}**; vaka grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{a2}**; kontrol grubu Hardy-Weinberg dengesi için ki-kare değeri, **p^{b}**; Kontrol ve vaka gruplarında genotiplerin genel dağılımının 3x2 tablo ki-kare testi hesaplanması. **p^{c}**; Genotiplerin bireysel olarak vaka-kontrol gruplarında dağılımının lojistik regresyon analizi ile ki-kare değerinin hesaplanması. **p^{d}**; Çapraz Tablo Analizinde vaka-kontrol gruplarında allel frekans dağılımlarının ki-kare değeri, **OR**; Odds ratio (Olabilirlik oranı), **GA;** %95 Güven Aralığı, **RG;** Referans genotip **DY**; Ki-kare istatistiksel olarak anlamsız olduğu için (p>0,05) değerlendirme yapılmamıştır. *p değeri Fisher exact testi ile hesaplanmıştır. ** p değeri Pearson ki-kare testi ile hesaplanmıştır.

C>T	Vaka (n:14)	Kontrol (n:49)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Belçika Malinois								
TT	3	11	0,621*	0,109*	0,297	RG	RG	RG	RG
CT	6	30				0,695	-	DY	DY
CC	5	8				0,338	-	DY	DY
C	16	46	-	-		-	0,341	DY	DY
T	12	52							
C>T	Vaka (n:17)	Kontrol (n:36)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	Labrador Retriever								
TT	3	8	1,000*	0,769**	0,904	RG	RG	RG	RG
CT	9	17				0,664	-	DY	DY
CC	5	11				0,824	-	DY	DY
C	19	39	-	-		-	0,868	DY	DY
T	15	33							
C>T	Vaka (n:24)	Kontrol (n:32)	p^{a1}	p^{a2}	p^{b}	p^{c}	p^{d}	OR	%95 GA
	AÇK								
TT	6	14	0,431**	1,000*	0,064	RG	RG	1	RG
CT	10	15				0,487	-	1,556	0,447-5,413
CC	8	3				**0,028**	-	**6,222**	1,212-31,937
T	22	43	-	-	-	-	**0,026**	**0,207**	0,048-0,891
C	26	21							

4.8 FGF12 Geni T>G TNP'sinin (rs851690466) Allel ve Genotip Frekanslarının Dağılımı

FGF12 T>G TNP'si Belçika Malinois, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerin tamamında monomorfik bulunmuştur. Tüm örneklerin TT genotipi olduğu tespit edilmiştir. TG ve GG genotipleri bulunamamıştır. Bu nedenle istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

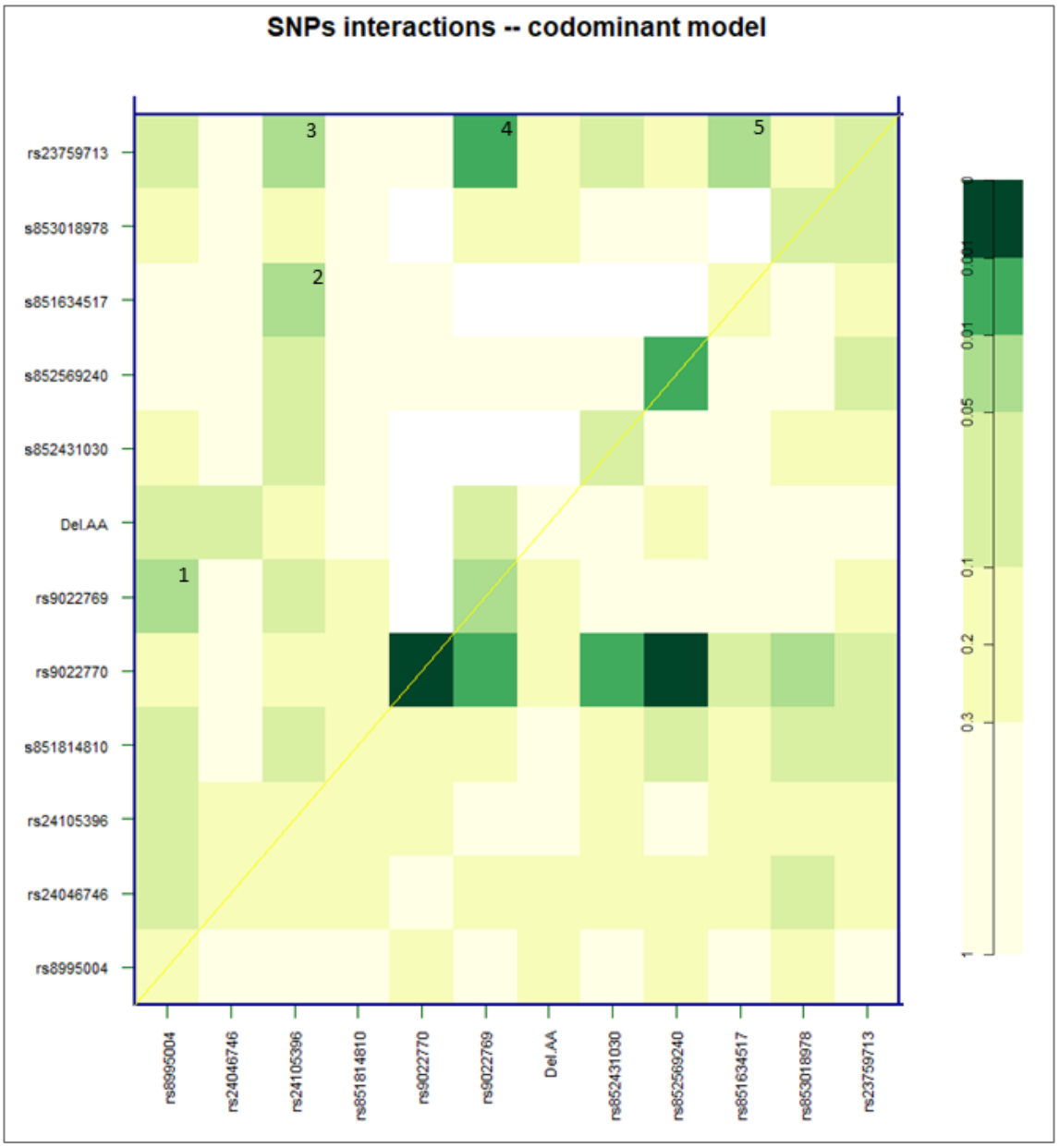
4.9 İki Boyutlu TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı Arasındaki İlişki Analizi

KKD hastalığı ile ilişkisi araştırılan 4 gen üzerinde 10 TNP (CX3CR1=6, CHST3=2, OSTF1=1, IBSP=1), 1 delesyon (CX3CR1) ve 1 insersiyon (CX3CR1) tespit edilmiştir. Bu varyasyonların, birbirleriyle olan etkileşimlerinin KKD hastalığının oluşumuna etkisi, her köpek ırkı için ayrı ayrı, R programı-versiyon 3.6.2. (Team, 2019), SNPassoc paketi-versiyon 1.9-2 (González vd., 2007) ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.29, 4.30, 4.31).

4.9.1 Belçika Malinois Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi

Belçika Malinois ırkı köpeklerde, toplam 12 varyasyonun etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.29'de verilmiştir. Şekil üzerindeki diyagonal çizgide bulunan kareler, TNP'lerin KKD hastalığı ile bireysel ilişkililerinin, olabilirlik oran testi (Likelihood ratio; LR) testi ile değerlendirilmesi ile elde edilen p değerlerine göre renklendirilmiştir. Üst üçgendeki kareler, TNP-TNP etkileşimlerinin, hastalık ile ilişkilerinin LR testi ile değerlendirilmesi ile elde edilen p değerlerine göre renklendirilmiştir. Alt üçgendeki kareler ise, LR testlerinden elde edilen p değerlerinin kıyaslanması ile renklendirilmiştir. Bu kıyaslamada, değerlendirilen iki TNP'nin LR testinden elde edilen p değeri ile bireysel olarak daha güçlü etkiye sahip olan TNP'nin p değeri kullanılır (González vd., 2007). Renklere karşılık gelen p değerleri, şeklin sağ tarafındaki skalada belirtilmiştir. Sarıdan koyu yeşile doğru, istatistiksel anlamlılık giderek artmaktadır. TNP-TNP etkileşimlerinin p değerlerini içeren ayrıntılı tablo *EK 17*'de verilmiştir. KKD hastalığı ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$)

etkileşimde bulunan TNP'lerin kutucukları Şekil 4.29 üzerinde numaralandırılmıştır ve açıklamaları Çizelge 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.29. Belçika Malinois ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği. Üst üçgende istatistiksel olarak anlamlı sonuca sahip ($p<0,05$) kutucuklar, numaralandırılmıştır.

Çizelge 4.18. Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD ilişkili TNP-TNP etkileşimleri ve LR testi p değerleri *(p<0,05)

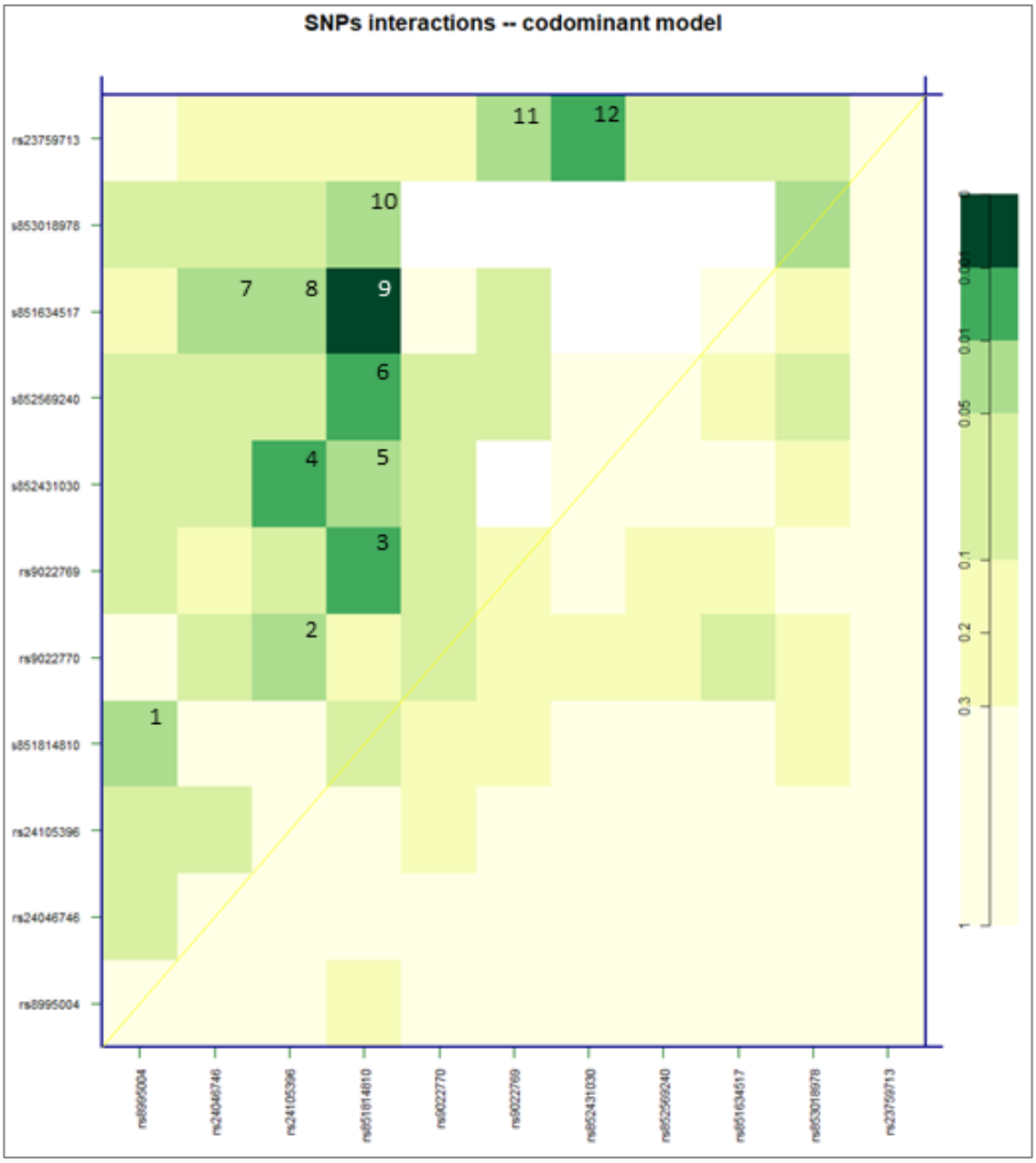
No.	Etkileşimde bulunan TNP'ler (Genler)	LR testi p değeri
1	rs9022769 (CX3CR1) - rs8995004 (OSTF1)	0,032*
2	rs85634517 (CX3CR1) - rs24105396 (CHST3)	0,021*
3	rs23759713 (IBSP) - rs24105396 (CHST3)	0,046*
4	rs23759713 (IBSP) - rs9022769 (CX3CR1)	0,008*
5	rs23759713 (IBSP) - rs85134517 (CX3CR1)	0,031*

4.9.2 Labrador Retriever Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi

Labrador Retriever ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun etkileşimlerinin KKD hastalığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.30'de verilmiştir. Şeklin değerlendirilmesi, bölüm 4.8.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. TNP-TNP etkileşimlerinin p değerlerini içeren ayrıntılı tablo *EK 18*'da verilmiştir. KKD hastalığı ile istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05) etkileşimde bulunan TNP'lerin kutucukları Şekil 4.30 üzerinde numaralandırılmıştır ve açıklamaları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Labrador Retriever ırkı köpeklerde KKD ilişkili TNP-TNP etkileşimleri ve LR testi p değerleri *(p<0,05)

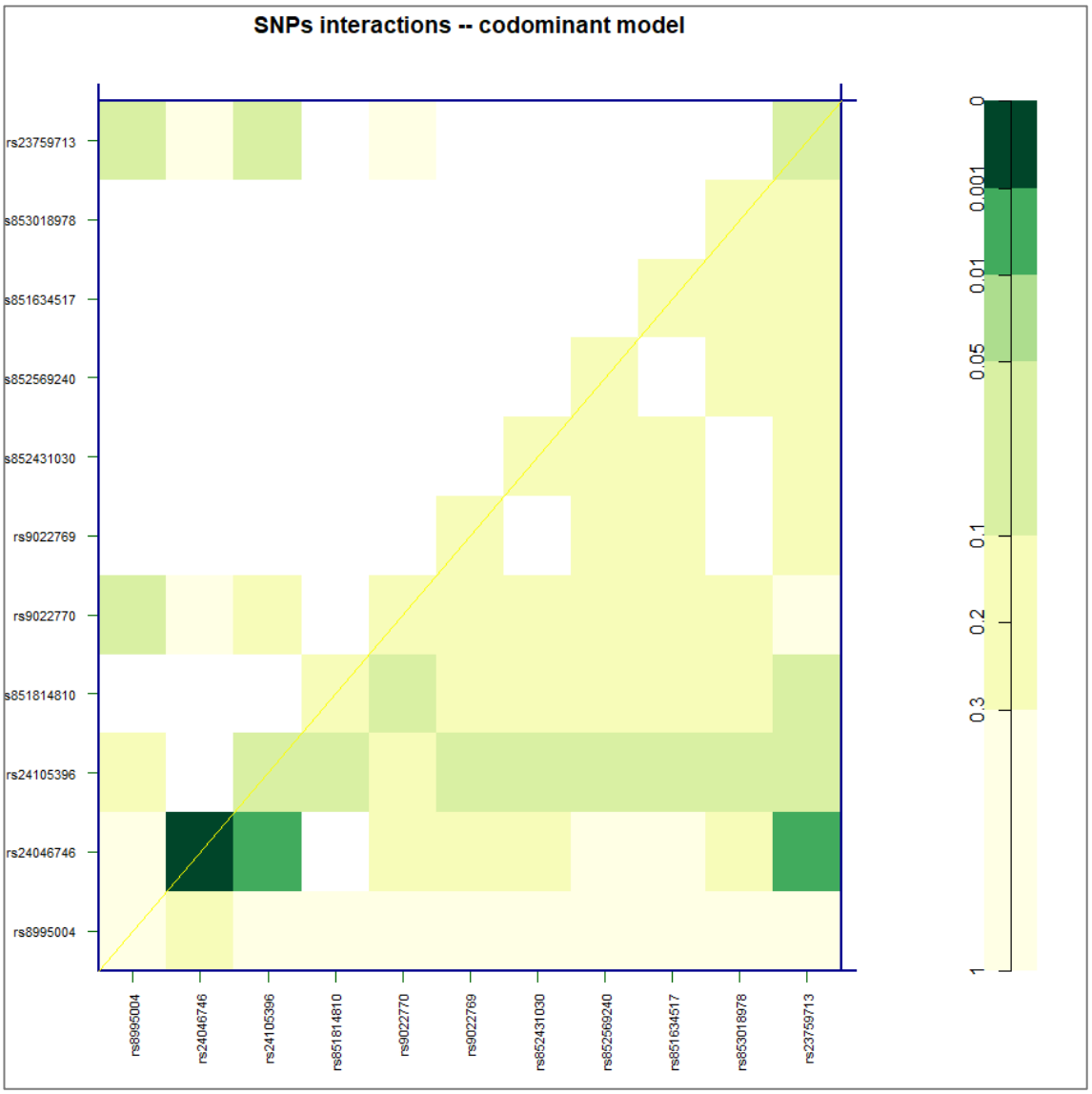
No.	Etkileşimde bulunan TNP'ler (Genler)	LR testi p değeri
1	rs851814810 (CX3CR1) - rs8995004 (OSTF1)	0,012*
2	rs9022770 (CX3CR1) - rs24105396 (CHST3)	0,031*
3	rs9022769 (CX3CR1) - rs851814810 (CX3CR1)	0,003*
4	rs852431030 (CX3CR1) - rs24105396 (CHST3)	0,003*
5	rs852431030 (CX3CR1) - rs851814810 (CX3CR1)	0,013*
6	rs852569240 (CX3CR1) - rs851814810 (CX3CR1)	0,001*
7	rs851634517 (CX3CR1) - rs24076746 (CHST3)	0,044*
8	rs851634517 (CX3CR1) - rs24105396 (CHST3)	0,012*
9	rs851634517 (CX3CR1) - rs851814810 (CX3CR1)	0,0004*
10	rs853018978 (CX3CR1) - rs851814810 (CX3CR1)	0,014*
11	rs23759713 (IBSP) - rs9022769 (CX3CR1)	0,047*
12	rs23759713 (IBSP) - rs852431030 (CX3CR1)	0,002*



Şekil 4.30. Labrador Retriever ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği. Üst üçgende istatistiksel olarak anlamlı sonuca sahip ($p<0,05$) kutucuklar, numaralandırılmıştır.

4.9.3 AÇK Irkı Köpeklerde TNP-TNP Etkileşimleri İle KKD Hastalığı İlişkisi

AÇK ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun etkileşimlerinin KKD hastalığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.31'de verilmiştir. Şeklin değerlendirilmesi, bölüm 4.9.1.'de anlatıldığı gibi (González vd., 2007) göre yapılmıştır. TNP-TNP etkileşimlerinin p değerlerini içeren ayrıntılı tablo *EK 19*'da verilmiştir. KKD hastalığı ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) etkileşimde bulunan TNP bulunamamıştır.



Şekil 4.31. Labrador Retriever ırkı köpeklerde TNP-TNP etkileşimlerinin KKD hastalığı ile ilişki grafiği.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

5.1 CX3CR1 Geni Varyasyonlarının KKD Hastalığı İle İlişkisi

Kalça displazisi ve onun neden olduğu osteoartrit, insanlarda ve köpeklerde yaygın olarak görülmeye devam etmektedir (L. Mikkola vd., 2019a; L. I. Mikkola vd., 2019b). Ancak her iki organizmada da hastalığın genetik arka planı aydınlatılamamıştır. Yaşam kalitesinin, ciddi ölçüde bozulmasına neden olan bu hastalığın teşhisi için, kan örnekleri ile yapılabilecek, kesin sonuç veren bir testin faydalı olacağı düşünülmektedir (Kenanidis vd., 2020). Bu nedenle, KKD gelişimine neden olan genetik lokusların belirlenmesine yönelik çalışmalar araştırmacılar tarafından sürdürülmektedir.

İnsanlar ve köpekler, kalça displazisinin klinik, biyokimyasal ve patoanatomik özelliklerini paylaşmaktadır (Meeson vd., 2019; Pascual-Garrido vd., 2017; Tellegen vd., 2019; Todhunter vd., 2019). 350'den fazla hastalık insanlarda ve köpeklerde benzerlik göstermektedir (Shearin & Ostrander, 2010a) ve birçok kalıtsal hastalığın aynı gen varyantları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tsai, Clark, & Murphy, 2007). Bu nedenle çalışmamızda, insanlarda kalça displazisi ile ilişkili olduğu öne sürülen bir genin, köpek kalça displazisi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Köpeklerde, CX3CR1 geninde bulunan varyasyonlar ile KKD gelişiminin ilişkisini araştıran yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır. Ancak insanlarda yapılan 3 çalışmada, CX3CR1 genin 2. ekson bölgesinde bulunan 2 TNP'nin GKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 24 üyesi GKD'den etkilenmiş, 74 üyeli bir aileden alınan kan örnekleriyle yapılan çalışmada, tüm ekson dizileme metodu kullanmışlar ve CX3CR1 geni üzerindeki rs3732378 referans numaralı C>T TNP'sinin hastalık gelişimi üzerine etkili olduğunu rapor etmişlerdir. C>T TNP'si, Treonin (polar) > Metiyonin (nonpolar) değişikliğine neden olmaktadır. Bu polarite değişikliğinin, proteinin yapı ve fonksiyonuna zarar vererek hastalık üzerine etkili olabileceğini düşünmüşlerdir (G. J. Feldman vd., 2013; G. J. Feldman vd., 2014). 689 vaka ve 689

kontrol örneği ile Çin'de yapılan çalışmada ise, rs3732378 ve rs3732379 referans numaralı TNP'lerin GKD ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. rs3732379 TNP'si C>T nükleotitlerinin ve Valin > İzolösin aminoasitlerinin değişimine neden olmaktadır (L. Li vd., 2017). Son olarak, Suudi Arabistan Krallığı'nda, 4'ü GKD'den etkilemiş 8 üyeli bir ailede yapılan çalışmada ise CX3XR1 geni üzerindeki bir TNP'nin (rs3732379) GKD hastalığı ile ilişkili olduğunu rapor edilmiştir (Basit vd., 2018).

Çalışmamızda, CX3CR1 geninin 2. ekson ve 3' UTR uçlarını kapsayan 3160 bç'lik bölge, DNA dizi analizi metodu ile 3 köpek ırkında da araştırılmıştır. Genin 2. ekson bölgesinde varyasyon bulunamamıştır, ancak 3' UTR ucunda 6 TNP, 1 insersiyon ve 1 delesyon tespit edilmiştir (Çizelge 4.23). Delesyon, sadece Belçika Malinois ırkı köpeklerde bulunmuş, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerde bulunamamıştır.

Tespit edilen tüm varyasyonların KKD hastalığı ilişikisi, istatistiksel metotlar ile değerlendirilmiştir. Bireysel olarak TNP'lerin, KKD hastalığı ile ilişkisi, Belçika Malinois ırkı köpeklerde (rs9022769, rs9022770) tespit edilirken, diğer iki köpek ırkında tespit edilememiştir.

Belçika Malinois ırkı köpeklerde, rs9022769 TNP'sinin (G>A) oluşturduğu genotiplerin, hasta ve vaka grupları arasındaki genel dağılımının, istatistiksel olarak zayıf bir ilişkiyi (p=0,046) işaret ettiği belirlenmiştir. Bununla beraber, GA genotipi p=0,048 anlamlılık düzeyinde KKD'ye karşı koruyucu genotip (OR:0,108, %95 GA: 0,017-0,695), AA genotipi ise p=0,019 anlamlılık düzeyinde KKD'ye karşı koruyucu genotip (OR: 0,100, %95 GA:0,010-0,975) olarak belirlenmiştir. Vaka ve kontrol grupları arasındaki allel dağılımları incelendiğinde ise, G allelinin, p=0,011 anlamlılık düzeyinde hastalık için riskli allel (OR:3,333, %95 GA:1,279-8,688) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Belçika Malinois ırkı köpeklerde, rs9022770 TNP'sinin (G>A) KKD hastalığı ile ilişkisinin rs9022769 TNP'sine göre daha anlamlı (p=0,0005) olduğu tesit edilmiştir. AG genotipi, p=0,001 anlamlılık düzeyinde, KKD için riskli genotip (OR:17,625, %95 GA: 3,011-103,181) olarak belirlenmiştir. A allelinin p=0,002 anlamlılık düzeyinde hastalık için riskli allel (OR:13,091, %95 GA:2,474-69,264) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

rs9022769 ve rs9022770 TNP'lerinin, CX3CR1 genin regülasyonuna etki edebilecek sekanslar üzerinde bulunduğunu düşünmekteyiz. Genlerin 3' UTR uçlarında

bulunan TNP'ler; mRNA stabilitesini etkilerler. Bununla beraber protein-mRNA ve miRNA-mRNA etkileşimi ve poliadenilasyon üzerindeki etkileriyle translasyon üzerinde etkileri bulunmaktadır (Arnold, Ellwanger, Hartsperger, Pfeufer, & Stümpflen, 2012; Landi, Gemignani, & Landi, 2012). miRNA bağlanma bölgelerinin üzerinde bulunan ve bu bölgelerinin etkinliğini değiştiren TNP'lerin gen ekspresyonun regülasyonunda düzensizliklere yol açtıkları ve böylece hastalıklara duyarlılığı artırabildikleri bilinmektedir (Bruno vd., 2012). Bu nedenle tespit edilen TNP'lerin miRNA bağlanma bölgelerinin üzerinde bulunup bulunmadıkları araştırılmıştır. Ancak, KKD hastalığı ile bireysel olarak ilişkili olduğu bulunan iki TNP'nin, bilinen miRNA bağlanma bölgeleri üzerinde olmadığı görülmüştür. Bununla beraber, rs853018978 kodlu TNP'nin bir miRNA'nın (cfa-mir-488) çekirdek bağlanma bölgesi üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

rs853018978-C>T TNP'si, CX3CR1 geninin 3' UTR bölgesini hedefleyen 8 miRNA'dan (Çizelge 4.13) biri için (cfa-mir-488) bağlanma bölgesi oluşurmakta veya bağlanma bölgesini yok etmektedir (Şekil.4.20). C alleli, miRNA için bağlanma bölgesi oluşturuken, T alleli çekirdek bağlanma dizisini bozmaktadır. Belçika Malinois, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerin vaka gruplarında C allelinin frekansı sırasıyla; 0,18, 0,32, 0,00 olarak hesaplanmıştır. Kontrol gruplarındaki frekansı ise aynı sırayla; 0,13, 0,14, 0,03 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17). cfa-miR-488 için hedef oluşturan C allelinin frekansının, her üç köpek ırkında da T alleline göre düşük olduğu görülmektir. Ancak, üç köpek ırkınında da kontrol gruplarının, C>T TNP'si bakımından HW dengesinde olmaması nedeniyle (Çizelge 4.10), güvenilir sonuçlar veremeyeceği için istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır. miRNA'ların çekirdek hedef bölgelerinde yer alan TNP'lerin, gen ekspresyonlarını önemli ölçüde değiştirerek (Lu & Clark, 2012) ekstrem fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olduğu (Clop vd., 2006; Takeda, Charlier, Farnir, & Georges, 2010) ve bazı hastalıkların gelişimi ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Qu vd., 2020; Shasttiri, Rostamian Delavar, Baghi, Dehghani Ashkezari, & Ghaedi, 2019; Yuan & Weidhaas, 2019). rs853018978 TNP'sinin KKD hastalığının gelişimi ile ilişkili olabileceğini, daha büyük örneklemlerde ve farklı köpek popülasyonlarında da çalışılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol gruplarının, CX3CR1 geninde tespit edilen TNP'ler yönünden monomorfik olması ve/veya genel olarak minör allel frekanslarının çok düşük

olması nedeniyle haplotip analizleri yapılamamıştır. Belçika Malinois ırkı köpeklerde ise, rs9022769 ve rs852431030 TNP'lerinin oluşturduğu 3 haplotipten (AT, GG, GT), 2 tanesinin (AT, GT) KKD hastalığının gelişimi üzerine etkili olduğu bulunmuştur. AT haplotipinin frekansı 0,810 olarak hesaplanmıştır ve p=0,011 anlamlılık düzeyinde, KKD hastalığının gelişimine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur. GT haplotipi 0,056 frekasına sahiptir ve p=0,022 anlamlılık düzeyinde hastalığın gelişimi için riskli (OR:6,222, %95 GA:1,280-30,243) haplotip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Bununla beraber, Labrador Retriever ırkı köpeklerde, rs852431030, rs852569240 ve rs851634517 TNP'lerinin oluşturduğu, 4 haplotip bloğu (GGG, TAA, TGG, TGA) tespit edilmesine rağmen, KKD hastalığı ile ilişkileri tespit edilememiştir. GGG, TAA, TGG, TGA haplotiplerinin frekansları sırasıyla; 0,387, 0,340, 0,236, 0,038 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.12).

İki boyutlu TNP-TNP etkileşimlerinin, Belçika Malinois ve Labrador Retriever ırkı köpeklerde, KKD gelişimine istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) katkıda bulundukları belirlenmiştir. Her iki köpek ırkında da CX3CR1 geni üzerindeki TNP'lerin IBSP, CHST3 ve OSTF1 genleri üzerindeki TNP'ler ile etkileşimde bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.18, Çizelge 4.19). Belçika Malinois ırkı köpeklerde, istatistiksel olarak en anlamlı (p=0,008) ilişki IBSP (rs23759713) ve CX3CR1 (rs9022769) varyasyonları arasında tespit edilmiştir. Labrador Retriever ırkı köpeklerde ise istatistiksel olarak en anlamlı ilişki (p=0,0004), CX3CR1 geni üzerindeki iki varyasyon (rs8516341517-rs851814810) arasında tespit edilmiştir. AÇK ırkı köpeklerde, TNP-TNP etkileşimlerinin KKD ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

CX3CR1 proteinin aminoasit (a.a.) sekansı, insanlarda (356 a.a.) ve köpeklerde (355 a.a.) %84,9 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 2.20). Bununla beraber CX3CR1 geni, insanlarda 18.242, köpeklerde ise 17.670 nükleotit uzunluğundadır. İnsanlarda ve köpeklerde ortolog olan CX3CR1 geninin yüksek benzerlik gösterdiği söylenebilir. Ancak yüksek benzerlik, DNA dizisinde tespit edilen genetik varyasyonların sayısında bulunmamaktadır. İnsan CX3CR1 geni 2. ekson bölgesinde şimdiye kadar 326 genetik varyasyon tanımlanmışken (NCBI-dbSNP, 2020), köpeklerde aynı bölgede 1 varyasyon (rs851299957) tanımlanmıştır (Ensembl, Variant Table, 2020). Bu bilgilere paralel olarak çalışmamızda, araştırılan 3 köpek ırkının 2. ekson bölgesinde varyasyon bulunamamıştır. Popülasyonlarda, patojen allel frekanslarının genellikle düşük olduğu

göz önünde bulundurulduğunda, daha çok sayıda örnek ile farklı populasyonlarda çalışmanın hastalıklar ile ilişkili yeni varyasyonların tespit edilmesine imkân tanıyacağını düşünmekteyiz.

5.2 CHST3 Geni Üzerindeki TNP'lerin KKD Hastalığı İle İlişkisi

CHST3 geninin kodladığı Kondroitin 6-Sülfotransferaz 1 (Karbonhidrat Sülfotranferaz 3) enzimi, bir glikozaminoglikan (GAG) olan kondroitin sülfat sentezinde görev almaktadır (Paganini, Costantini, Superti-Furga, & Rossi, 2019). Kondroitin sülfat, eklem kıkırdağına fizyolojik fonksiyonlarını veren GAG'ların % 80'ini oluşturur (Lin vd., 2020). Sülfatlanmış GAG'ların sentezinden sorumlu olan enzimleri kodlayan genler üzerinde meydana gelen mutasyonlar, kemik ve bağ dokuda çeşitli bozukluklar ile ilişkilendirilmiştir. Bu yolakta görev alan 23 gen üzerindeki 27 mutasyonun farklı hastalıkların gelişimine neden olabileceği rapor edilmiştir (Paganini vd., 2019).

CHST3 geni üzerindeki mutasyonlar genellikle iskelet sistemi ve eklemler ile sınırlı olan hastalıklara neden olurlar (Superti-Furga & Unger, 2019). İnsanlarda, kalça ve diz çıkıklarına neden olabilen Larsen Sendromu (Tanteles, Dixit, Dhar, & Suri, 2013), boy kısalığı, skolyoz, eklem ve kemik deformiteleri ile karakterize Spondiloepifizyal displazi hastalıkları ile ilişkili CHST3 mutasyonları tanımlanmıştır (Albuz vd., 2020). Labrador Retriever ırkı köpeklerde ise, CHST3 geni üzerindeki TNP'ler ile KKD gelişiminin ilişki olduğunu rapor eden iki araştırma bulunmaktadır (*Ek 1*) (Bartolomé vd., 2015; Martinez vd., 2013). Bu nedenle araştırmamızda, Belçika Malinois, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerin Türkiye popülasyonlarında, KKD'ye karşı uygulanacak markır destekli ıslah çalışmalarına, CHST3 geni üzerinde bulunan 2 TNP'nin (rs24076746, rs24105396) markır olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda CHST3 geni 5' UTR (rs24076746) ve 3' UTR (rs24105396) uçlarında bulunan 2 TNP, 3 köpek ırkında (Belçika Malinois, Labrador Retriever, AÇK), RFLP metodu ile genotiplendirilmiştir. rs24076746 C>T TNP'si bakımından 3 köpek ırkı da polimorfik bulunmuştur. Labrador Retriever ırkı köpeklerde, Bartolome vd. (2015)'nin sonuçlarına paralel olarak tüm genotipler (CC, CT, TT) tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarınının HW dengesinde oldukları (Çizelge 4.14) ve her iki grupta da en yüksek frekansa sahip genotipin CC (Şekil 4.21), allelin ise C (Şekil 4.22) olduğu belirlenmiştir. Ancak Bartolome vd. (2015) ve Martinez vd. (2013)'nin aksine, rs24076746 C>T

TNP'sinin KKD hastalığının gelişimi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız (p>0,05) bulunmuştur. Martinez vd. (2013) ve Bartolome vd. (2015) çalışmalarında, Labrador Retriever ırkı köpeklerde CC genotipini KKD hastalığının gelişimi yönünden riskli genotip (OR:3,1, %95 GA:1,3-7,5) olarak rapor etmişlerdir. Bununla beraber, Bartolome vd. (2015) çalışmalarında tespit ettikleri 7 TNP'yi (*Ek 1*), Labrador Retriever ırkı köpeklerde, KKD gelişimine yatkınlığı tahmin eden matematiksel bir modelde kullanmışlardır. Bu model, bir test kiti olarak (Dysgen), Bioberica (Barselona/İspanya, www.bioiberica.com) şirketi tarafından ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Ancak Dysgen kitinin veya kitin tahmin modelinde kullanılan TNP'lerin validasyonu, Bartolome vd. (2015)'nin çalışması dışında farklı popülasyonlarda yapılmamıştır. Bir araştırmada (Bank, 2016), Danimarka'daki Labrador Retriever ırkı köpek populasyonunda Dysgen kitinin geçerliliği test edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılamamıştır. Çalışmamızda da bu sonuca paralel olarak, Dysgen kitini oluşturan TNP'lerden biri olan CHST3 C>T TNP'sinin hastalık geşimi ile ilişkisi bulunamamıştır. Ancak tek başına hastalık ile hiçbir ilişkisi olmayan TNP'lerin, diğer TNP'ler ile oluşturduğu kombinasyonların hastalığın gelişimine önemli ölçüde katlı sağlayabileceği bilinmektedir (P. Li vd., 2014). Çalışmamızda TNP etkileşimlerinin hastalık oluşumu ile ilişkisi araştırıldığında; CHST3 C>T polimorfizminin, CX3CR1 A>G (rs851634517) polimorfizmi ile etkileşminin p=0,044 anlamlılık düzeyinde hastalık gelişimine etki edebileceği tahmin edilmiştir (Çizelge 4.19). CHST3 C>T TNP'sinin, Labrador Retriever ırkı köpeklerin farklı popülasyonlarında, daha çok sayıda TNP ile etkileşimlerinin araştırılmasının, KKD gelişimi ile ilişkili markırların tespit edilmesi yönünden faydalı olacağı düşünülmektedir.

Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CHST3 C>T (rs24076746) polimorfizmi için 3 genotip de tespit edilmiştir. Labrador Retriever ırkı köpeklerde olduğu gibi, CC genotipi ve C allelinin frekansı, hem vaka hem de kontrol grubunda en yüksek frekansa sahip olarak bulunmuştur (Şekil 4.21, 4.22). Her iki grup da HW dengesindedir, ancak genotip ve allel dağılımlarının KKD gelişimi ile ilişkisi, istatistiksel olarak anlamsız (p>0,05) bulunmuştur (Çizelge 4.14). C>T TNP'sinin diğer TNP'ler ile etkileşimi değerlendirilmiş ancak KKD gelişimi ile ilişkili istatistiksel olarak anlamlı bir etkileşim tespit edilmemiştir (Şekil 4.29). Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CHST3 C>T TNP'si araştıran, daha önce yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

AÇK ırkı köpeklerin kontrol grubu, 5' UTR CHST3 C>T (rs24076746) TNP'si bakımından homozigot CC olarak tespit edilmiştir. Vaka grubunda ise TT genotipi tespit edilememiş, en yüksek frekansa sahip genotip CT olarak belirlenmiştir. C alleli her iki grupta da en yüksek frekansa sahiptir (Şekil 4.21, 4.22). Kontrol grubu HW dengesinde olmadığı için KKD gelişimi ile ilişkisi araştırılmamıştır (Çizelge 4.14). AÇK ırkı köpeklerde, CHST3 C>T TNP'si araştıran, daha önce yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

CHST3 geninin 3' UTR bölgesi üzerinde bulunan TNP'nin (rs24105396 A>G) Labrador Retriever ırkı köpeklerde, KKD gelişimi ile ilişkili olduğu olduğu rapor edilmiştir (Bartolomé vd., 2015; Martinez vd., 2013). Çalışmamızda 3 köpek ırkı da bu TNP bakımından polimorfik bulunmuştur. Labrador Retriever köpeklerde, kontrol grubunun HW dengesinde olduğu, vaka grubunun ise HW dengesinden saptığı (p=0,039) tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Her iki grupta da AA genotipinin ve A allelinin en yüksek frekansa sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23, 4.24). Genotiplerin ve allellerin gruplar arasındaki dağılımı değerlendirildiğinde, Bartolome vd. (2015) ve Martinez vd. (2013)'nin aksine KKD hastalığının gelişimi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p>0,05) (Çizelge 4.15). Martinez vd. (2013) çalışmalarında G allelinin riskli allel olduğunu (OR=12,6, %95 GA=2,2-73,2) rapor etmişleridir. Bartolome vd. (2015) ise çalışmalarında, G>A TNP'sinin hastalık ile ilişkili olduğunu rapor etmişler ancak istatistiksel değerlendirmeleri paylaşmamışlardır. Çalışmamızda bireysel olarak G>A TNP'sinin KKD hastalığı ile ilişkisi bulunmasa da, TNP etkileşimlerinin hastalık üzerine etkili olabileceği belirlenmiştir. CX3CR1 geni üzerinde bulunan, rs9022770 TNP'si ile p=0,031, rs852431030 TNP'si ile p=0,003 ve rs851634517 TNP'si ile p=0,012 anlamlılık düzeyinde hastalığın gelişimi ile ilişkili olabilecek etkileşimlerde bulunduğu tahmin edilmiştir.

Belçika Maliois ırkı köpekler CHST3 3' UTR A>G TNP'si bakımından polimorfik bulunmuşlardır (Şekil 4.23, 4.24). Kontrol ve vaka gruplarının HW dengesinde oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.15). Her iki grupta da AA genotipinin ve A allelinin en yüksek frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Genotip ve allellerin, vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımı istatistiksel olarak anlamsız (p>0,05) bulunmuştur. Ancak CX3CR1 geni üzerindeki rs85634517 varyasyonu ile p=0,021 ve IBSP geni üzerindeki rs23759713 varyasyonu ile p=0,046 istatistiksel anlamlılık düzeyinde, KKD hastalığının gelişimi ile

ilişkili etkilişimde bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Belçika Malinois ırkı köpeklerde, CHST3 3' UTR A>G TNP'si (rs24105396) araştıran, daha önce yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

AÇK ırkı köpekler CHST3 3' UTR A>G TNP'si bakımından polimorfik bulunmuşlardır. Diğer iki köpek ırkından farklı olarak, AÇK ırkı köpeklerin kontrol ve vaka gruplarında AG genotipinin ve G allelinin en yüksek frekansa sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23, 4.24). Kontrol ve vaka gruplarının HW dengesinde oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.15). A>G TNP'sinin KKD hastalığının gelişimi ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız ($p>0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.15). Bununla beraber, KKD gelişimi ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı bir TNP etkileşimi belirlenememiştir (Şekil 4.31).

5.3 OSTF1 A>G TNP'sinin (rs8995004) KKD Hastalığı İle İlişkisi

Kemikler, ömür boyunca devam eden bir süreçte yıkılıp yapılarak yeniden şekillenir. Bu süreçte en önemli rolü oynayan osteoblast ve osteoklast hücreleridir. Osteoblast hücreleri kemik doku yaparken, osteoklast hücreleri yıkar. OSTF1 geni, osteoklast hücrelerinin oluşum ve aktivasyonunda dolaylı olarak rol alan, kemik yıkımını aktive eden osteoklast uyarıcı faktör 1 proteinini kodlar (An vd., 2014).

OSTF1 geni nakavt edilen farelerin ostepetrozis hastalığının (osteoklastlardaki fonksiyon bozukluğu yüzünden kemiklerde belirgin radyolojik dansite artışı) hafif şiddette seyreden bir formuna maruz kaldıkları daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Vermeren vd., 2017). İnsanlarda, osteoklast ve osteoblast hücre aktivitelerinin osteoklastlar lehine bozulduğu durumlarda; artrite (Bromley & Woolley, 1984), osteoporoza (Hirayama, Danks, Sabokbar, & Athanasou, 2002), Paget hastalığına (Helfrich & Hocking, 2008), kemik metastazına (Roodman, 2004) ve ağrı- kırılmalara (An vd., 2014) neden olabileceği rapor edilmiştir. AÇK ırkı köpeklerde ise, OSTF1 genin 4. intronunda bulunan bir TNP'nin (A>G, rs8995004) KKD hastalığının gelişimine katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir (Distl vd., 2013).

Çalışmamızda, OSTF1 geni 4. intronu üzerindeki A>G polimorfizmi RFLP metodu ile araştırılmış ve 3 köpek ırkında da polimorfik olduğu tespit edilmiştir. AÇK ırkı köpeklerde, vaka grubunda GG genotipinin en düşük frekansa sahip olduğu, AA ve AG

genotip frekanslarının aynı olduğu, kontrol grubunda ise AG genotipinin frekansının en yüksek olduğu, GG genotip frekansının bu grupta en düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Her iki grupta da A allelinin frekansının G alleline göre yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.26). Vaka ve kontrol gruplarının HW dengesinde oldukları tespit edilmiştir. Genotiplerin ve allellerin KKD hastalığı ile ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Distl vd. (2013)'nin aksine istatistiksel olarak anlamsız ($p>0,05$) olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.16). Diğer TNP'ler ile etkileşimlerininde KKD hastalığının gelişimine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.31). Distl vd. (2013) AÇK'lar ile yaptıkları çalışmalarında, GG genotipinin KKD hastalığı için patojen genotip (OR=2,503 %95 GA=1,577-3,971) olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber, Fels vd. (2014b) 129 gen üzerinde yaptıkları çalışmada, AÇK'larda KKD hastalık ile ilişkili olabilecek 37 TNP içerisine, OSTF1 A>G'yi dahil etmişlerdir. Ancak, bu 37 polimorfizm içerisinden istatistiksel olarak daha güçlü ilişkiye sahip 9 tanesinin seçtiklerinde, OSTF1 A>G TNP'sini dışarıda bırakmışlardır.

Distl vd. (2013) OSTF1 A>G TNP'sini KKD hastalığı ile ilişkili olduğunu rapor ettikleri çalışmalarında, 17 polimorfizme dayanan bir algoritmayla köpeklerin KKD'ye karşı genomik damızlık değerini tahmin eden bir patent almışlardır (Avrupa Patent Ofisi, EP 2123777 B1). Bu patente göre, 17 polimorfizmin tamamı KKD hastalığının gelişimi ile ilişkilidir ve farklı sayısal ağırlıklar ile genomik damızlık değerine etki ederler. Patenti alınan bu çalışmanın validasyonu için, AÇK ırkı köpekten toplanan 1000 kan örneği ile bir validasyon çalışması yapılmıştır (Manz vd., 2017). Fakat Manz vd. (2017) yaptıkları çalışmalarının sonucunda, 17 TNP'nin kullanılması ile çalışan patenti alınmış bu algoritmanın, AÇK ırkı köpeklerde KKD hastalığı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içinde bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Belçika Malinois ırkı köpeklerde, OSTF1 A>G TNP'sinin 3 genotipide gözlenmiştir. Kontrol ve vaka gruplarında AA genotipi en yüksek frekansa sahip bulunmuştur. Ancak en düşük frekansa sahip genotipler vaka grubunda AG genotipi, kontrol grubunda ise GG genotipi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25). Vaka grubunda A ve G allelerinin frekansları eşit bulunmuştur, kontrol grubunda ise A allelinin frekansının G alleline göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Her iki grup da HW dengesinden sapma göstermemektedir (Çizelge 4.16). Genotip ve allellerin, vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımın, Belçika Malinois ırkı köpeklerde KKD hastalığının

gelişimi ile ilişkisinin istatistiksel olarak anlamsız (p>0,05) olduğu tespit edilmiştir. Ancak CX3CR1 geni üzerindeki rs9022769 G>A polimorfizmi ile atkileşiminin, p=0,032 istatistiksel anlamlılık düzeyinde KKD hastalığının gelişimine etki edebileceği hesaplanmıştır (Çizelge 4.18). Belçika Malinois ırkı köpeklerde OSTF1 4. intron G>A polimorfizminin KKD hastalığının gelişimine etkisini araştıran yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

Labrador Retriever ırkı köpeklerde, OSTF1 A>G TNP'sinin 3 genotipide gözlenmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında, AA genotipi en yüksek, GG genotipi ise en düşük frekansa sahip olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25). Diğer iki köpek ırkında olduğu gibi Labrador Retriever ırkı köpeklerde de A allelinin G alleline göre frekansı yüksek bulunmuştur (Şekil 4.26). Her iki grubunda HW dengesinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, Labrador Retriever ırkı köpeklerde, OSTF1 A>G TNP'sinin KKD gelişimi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Ancak CX3CR1 geni üzerindeki rs851814810 polimorfizmi ile atkileşiminin, p=0,012 istatistiksel anlamlılık düzeyinde KKD hastalığının gelişimine etki edebileceği hesaplanmıştır (Çizelge 4.19). Labrador Retriever ırkı köpeklerde OSTF1 4. intronu G>A polimorfizminin, KKD hastalığının gelişime etkisini araştıran yayınlanmış bir çalışma bulunamamıştır.

5.4 IBSP C>T TNP'sinin (rs23759713) KKD hastalığı ile ilişkisi

IBSP geni, kemik, dentin, sementum ve kalsifiye kıkırdak gibi mineralleşmiş dokularda bulunan, yüksek oranda glikozile edilmiş ve sülfatlanmış bir fosfoprotein olan, kemik sialoproteinini kodlar. Kemik sialoprotein, kemik ve dişlerde mineralleşmenin birincil düzenleyicilerinden biri olduğu düşünülmektedir (Bianco vd., 1991; Fisher & Fedarko, 2003; Ganss vd., 1999). Embriyonik gelişim sırasında, ilk olarak kemik oluşumunun başlangıcında saptanabilir ve ekspresyonu primer kemik oluşumunda mineralizasyonun başlaması ile maksimuma ulaşır (Chen vd., 1992). IBSP geninin kodladığı, kemik sialoproteinin osteoklast oluşumu ve rezorpsiyonu düzenlediği ve over ekspresyonunda farelerin osteoklast aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir (Valverde, Tu, & Chen, 2005; Valverde vd., 2008). IBSP geni nakavt edilmiş farelerde, yavruların vahşi tipe oranla daha hafif doğduğu, daha geç iskelet mineralizasyonun gerçekleştiği ve daha düşük kemik hacmine sahip olduğu gösterilmiştir (Malaval vd., 2008). AÇK ırkı

köpeklerde ise IBSP geninin 3. intronunda bulunan bir TNP'nin (C>T, rs23759713) KKD hastalığının gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013).

Çalışmamızda IBSP geni 3. intronundaki C>T polimorfizmi RFLP metodu ile genotiplendirilmiş ve 3 köpek ırkında da polimorfik bulunmuştur. AÇK ırkı köpeklerin vaka grubunda, CT genotipi en yüksek, TT genotipi ise en düşük frekansa sahipken, kontrol grubunda TT genotipi en yüksek CC genotipi en düşük frekansa sahip bulunmuştur (Şekil 4.27). T allelinin dağımı ise vaka grubunda en düşük, kontrol grubunda ise en yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28). Her iki grubunda HW dengesinde (p>0,05) olduğu hesaplanılmıştır (Çizelge 4.17). Diğer TNP'ler ile ilişkisinin hastalık oluşumu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı hesaplanmıştır (Şekil 4.31). Genotip dağılımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, CC genotipinin vaka ve kontrol grupları arasındaki dağılımının istatistiksel olarak anlamlı (p=0,028) olduğu tespit edilmiştir. TT genotipi referans olarak alındığında CC genotipinin OR değeri 6,222 (%95 GA=1,212-31,937) olarak hesaplanılmıştır. CC genotipinin AÇK ırkı köpeklerde KKD hastalığının gelişimi için riskli genotip olduğu sonucuna varılmıştır. Allel dağılımları değerlendirildiğinde ise T allelinin, p=0,026 anlamlılık düzeyinde KKD hastalığına karşı koruyucu allel olduğu (OR=0,027, %95 GA= 0,048-0,0891) hesaplanılmıştır (Çizelge 4.17). Bu sonuç, Distl vd. (2013)'nin CC genotipini patojen (OR=1,310, %95 GA=0,756-2,270) olarak tanımladıkları çalışmaları ile örtüşmektedir. Ancak Fels vd. (2014b), IBSP C>T polimorfizminin KKD gelişimi ile güçlü istatistiksel ilişki içinde olmadığını rapor etmişlerdir. Bunula beraber Manz vd. (2017) de çalışmalarında bu TNP'nin KKD hastalığı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içinde olmadığını rapor etmişlerdir. Tüm bu sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, farklı genetik faktörlerin, farklı ırklarda ve hatta aynı ırkın farklı popülasyonları arasında hastalığın gelişimine katkı sağlayabileceği görüşüyle (Lavrijsen et al., 2014) örtüştüğü görülmektedir.

Belçika Malinois ırkı köpeklerde IBSP C>T polimorfizmi yönünden 3 genotipte tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında CT genotipinin frekansı en yüksek olarak bulunmuştur. TT genotipi ise vaka grubunda en düşük, kontrol grubunda en yüksek frekansa sahip olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.27). T alleli vaka grubunda en düşük, kontrol grubunda ise en yüksek allel frekansına sahip olarak bulunmuştur (Şekil 4.28). Her iki grubun da HW dengesinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Yapılan

istatistiksel değerlendirme sonucunda, C>T TNP'si ile KKD hastalığının gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.17). Ancak diğer TNP'ler ile etkileşimlerinin hastalık gelişimi üzerine etkili olabiliceği tespit edilmiştir. CX3CR1 geni üzerinde bulunan, rs9022769 TNP'si ile p=0,008, rs85134517 TNP'si ile p=0,031 ve CHST3 geni üzerinde bulunan rs24105396 TNP'si ile p=0,012 anlamlılık düzeyinde KKD ile ilişkili olabilecek TNP-TNP etkileşimlerinde bulunduğu tahmin edilmiştir (Çizelge 4.19). Günümüze kadar yayınlanan çalışmalar içerisinde, Belçika Malinois ırkı köpeklerde IBSP geni 3. intronundaki C>T polimorfizminin KKD gelişimi ile ilişkisini araştıran bir çalışma bulunamamıştır.

Labrador Retriever ırkı köpeklerde IBSP C>T polimorfizmi yönünden 3 genotipte tespit edilmiştir. Vaka ve kontrol gruplarında CT genotipinin en yüksek frekansa, TT genotipinin ise en düşük frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27). Her iki grupta da C allelinin frekansı T allelinin frekansından yüksek bulunmuştur (Şekil 4.28). Vaka ve kontrol gruplarının HW dengesinden sapmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.29). Genotip ve allel frekanslarının dağılımı istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve KKD hastalığının gelişimi ilişkisi bulunamamıştır (p>0,05). CX3CR1 geni üzerinde bulunan, rs9022769 TNP'si ile p=0,047 ve rs85243103 TNP'si ile p=0,002 anlamlılık düzeyinde KKD ile ilişkili olabilecek TNP-TNP etkileşimlerinde bulunduğu tahmin edilmiştir (Çizelge 4.31). Günümüze kadar yayınlanan çalışmalar içerisinde, Labrador Retriever ırkı köpeklerde IBSP geni 3. intronundaki C>T polimorfizminin KKD gelişimi ile ilişkisini araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle karşılaştırmalar yapılıp tartışılamamıştır.

5.5 FGF12 T>G TNP'sinin (rs851690466) KKD Hastalığı İle İlişkisi

FGF12 geni, fibroblast büyüme faktörü 12 proteinini kodlar. Fibroblastlar hücre dışı matrisin bileşenlerinin öncülerini salgılar ve bağ dokuların yapısal bütünlüğünü korur. Fibroblast büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü sinyal yolağı, kemik gelişimi ve hastalıklarında önemli rol oynar. İnsanlarda, FGF ve FGFR'lerde bulunan yanlış anlamlı mutasyonlar çeşitli konjenital kemik hastalıklarına (kondrodisplazi sendromları, kraniosinositoz sendromları vb.) neden olabileceği rapor edilmiştir (Su, Jin, & Chen, 2014). Birincil bulguları ağrı, haraket sınırlılığı ve eklem

deformitesi olan Kashin-beka hastalığı (KBD) ile FGF12 geni varyasyonları arasında ilişki olabileceği öne sürülmüştür (F. Zhang vd., 2016).

AÇK ırkı köpeklerde FGF12 geninin 3. intronunda bulunan bir TNP'nin (rs851690466) KKD hastalığı gelişimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Distl vd., 2013). Ancak araştırmamızda, rs851690466 TNP'si üç köpek ırkında da monomorfik bulunmuştur. PCR-RFLP metodu ile yapılan çalışma sonucunda sadece TT genotipi tespit edilmiştir (Şekil 3.27). DNA dizi analizi ile elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır (Şekil 3.50). Belçika Malinois, Labrador Retriever ve AÇK ırkı köpeklerin Türkiye popülasyonlarının rs851690466 TNP'si bakımından monomorfik (TT) oldukları sonucuna varılmıştır.

KKD hastalığının gelişimi ile ilişkili genetik markır destekli seleksiyon (GMDS) çalışmaları henüz yeterli olgunluğa ulaşmamıştır. Ancak devam eden araştırmalar ileride KKD'nin gelişiminden sorumlu olan genleri belirleyerek yetiştiricilerin kullanımına sunacaktır. 50 yıldan uzun süredir devam eden, fenotipik değerlendirmelere dayalı seleksiyon çalışmalarının gösteremediği başarının GMDS ile elde edilebileceği düşünülmektedir. GMDS ile yapılan ıslah çalışmaları uygun ebeveynlerin seçimlerini yüksek doğrulukta yapabildiği için genetik ilerlemeyi hızlandırır. Bununla beraber, GMDS fenotipik seleksiyonun aksine ebeveyn seçiminin yapılmasına çok daha erken yaşta yapılmasına imkan tanır (Sánchez-Molano, Woolliams, Blott, & Wiener, 2014a). KKD, çok sayıda genetik ve çevresel faktörün küçük etkileşimlerinden kaynaklanan kompleks bir hastalıktır. Bu tip hastalıkların genetik altyapısının aydınlatılması, tek genin kontrolünde olan hastalıklardan oldukça zordur. Fenotip-genotip ilişkilerinin istatistiksel olarak karşılaştırıldığı çalışmalar bu tip hastalıkların etiyolojisinin anlaşılmasında oldukça faydalıdır (Manz vd., 2017).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, insanlarda yaklaşık 30 gen (Kenanidis vd., 2020), köpeklerde ise 50'den fazla gen (*Ek 1*) kalça displazisinin gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Ancak bunlardan çok azının geçerliliği farklı popülasyonlarda test edilmiştir ve hiçbiri hastalık ile güçlü şekilde bağlantılı değildir (Kenanidis vd., 2020; Manz vd., 2017). Herbiri küçük etkiye sahip birçok varyasyonun, hastalık gelişimine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Araştırmamızın sonucunda, daha önce kalça displazisi gelişimi ile ilişki olduğu rapor edilmiş, 5 polimorfizmden sadece bir tanesinin Türkiye popülasyonunda geçerli olduğu doğrulanmıştır. Bununla beraber, CX3CR1 geni üzerindeki 2 TNP'nin ve 2 haplotipin hastalık gelişimi ile ilişkili markır olabileceği çalışmamızda rapor edilmiştir. Bulgularımız, farklı köpek popülasyonlarında doğrulandıktan sonra, KKD'ye karşı uygulanacak markır destekli seleksiyon programlarına katkı sağlayabilecektir. Böylece, köpek üretiminde ekonomik kayıpların, eğitiminde ise zaman kayıplarının önüne geçilebilecek ve hayvan refahının artması sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

Adapala, N. S., Barbe, M. F., Langdon, W. Y., Nakamura, M. C., Tsygankov, A. Y., & Sanjay, A. (2010). The loss of Cbl-phosphatidylinositol 3-kinase interaction perturbs RANKL-mediated signaling, inhibiting bone resorption and promoting osteoclast survival. *Journal of Biological Chemistry, 285*(47), 36745-36758.

Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife, 4*, e05005. doi:10.7554/eLife.05005

Ahner, C. E., Stoker, A. M., Bozynski, C. C., Cook, C. R., Leary, E. V., Kuroki, K., Cruz, C. N., & Cook, J. L. (2019). Protein biomarkers in serum and urine for determining presence or absence of hip dysplasia in a canine model. *Journal of Orthopaedic Research,* 37(4), 916-920. doi:10.1002/jor.24242

Albuz, B., Çetin, G. O., Özhan, B., Sarikepe, B., Anlas, Ö., Öztürk, M., Zeybek, S., Sabir, N., Bagci, G., & Gündüz, C. N. S. (2020). A novel nonsense mutation in CHST3 in a Turkish patient with spondyloepiphyseal dysplasia, Omani type. *Clinical Dysmorphology, 29*(1), 61-64. doi:10.1097/MCD.0000000000000295

An, E., Narayanan, M., Manes, N. P., & Nita-Lazar, A. (2014). Characterization of functional reprogramming during osteoclast development using quantitative proteomics and mRNA profiling. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp. M113. 034371.

Anderson, C. A., Pettersson, F. H., Clarke, G. M., Cardon, L. R., Morris, A. P., & Zondervan, K. T. (2010). Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature protocols, 5*(9), 1564. doi:10.1038/nprot.2010.116

Archer, C. W., Dowthwaite, G. P., & Francis-West, P. (2003). Development of synovial joints. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 69*(2), 144-155. doi.org/10.1002/bdrc.10015

Arnold, M., Ellwanger, D. C., Hartsperger, M. L., Pfeufer, A., & Stümpflen, V. (2012). Cis-acting polymorphisms affect complex traits through modifications of microRNA regulation pathways. *PloS one, 7*(5), e36694.

Bank, A. (2016). Validation of the Dysgen Hip Dysplasia DNA test in the Danish. *PloS one, 5*, e9410.

Bardens, J. W., & Hardwick, H. (1968). New observations on the diagnosis and cause of hip dysplasia. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC, 63*(3), 238-245.

Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2004). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics, 21*(2), 263-265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457

Bartolomé, N., Segarra, S., Artieda, M., Francino, O., Sánchez, E., Szczypiorska, M., Casellas, J., Tejedor, D., Cerdeira, J., & Martínez, A. (2015). A genetic predictive model for canine hip dysplasia: integration of Genome Wide Association Study (GWAS) and candidate gene approaches. *PloS one, 10*(4), e0122558.

Basit, S., Alharby, E., Albalawi, A. M., & Khoshhal, K. I. (2018). Whole genome SNP genotyping in a family segregating developmental dysplasia of the hip detected runs of homozygosity on chromosomes 15q13. 3 and 19p13. 2. *Congenital anomalies, 58*(2), 56-61. doi:10.1111/cga.12235

Berg-Foels, W. S. V., Schwager, S. J., Todhunter, R. J., & Reeves, A. P. (2011). Femoral head shape differences during development may identify hips at risk of degeneration. *Annals of biomedical engineering, 39*(12), 2955.

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., & Robey, P. G. (1991). Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcified tissue international, 49*(6), 421-426. doi:10.1007/BF02555854

Bilgili, H. (2019), Ders notu, online WEB site: 05.09.2019 tarihinde https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/11473/mod_resource/content/0/1.KALCA%20DISPLAZISI%20NEDIR%20%20KLINIK%20TANI.pdf adresinden erişildi

Bland, S. D. (2015). Canine osteoarthritis and treatments: a review. *Veterinary Science Development*. 5(5931) DOI: 10.4081/vsd.2015.5931

Bo, N., Peng, W., Xinghong, P., & Ma, R. (2012). Early cartilage degeneration in a rat experimental model of developmental dysplasia of the hip. *Connective tissue research, 53*(6), 513-520. doi:10.3109/03008207.2012.700346

Boles, R. G., & Dhamcharee, V. (2012) *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*, https://www.springer.com/gp/book/9781441917942 adresinden erişildi. doi.org/10.1007/978-1-4419-1795-9

Bonnevie, E. D., Galesso, D., Secchieri, C., & Bonassar, L. J. (2018). Degradation alters the lubrication of articular cartilage by high viscosity, hyaluronic acid-based lubricants. *Journal of Orthopaedic Research, 36*(5), 1456-1464. doi:10.1002/jor.23782

Boulet, A. M., Moon, A. M., Arenkiel, B. R., & Capecchi, M. R. (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Developmental biology, 273*(2), 361-372. doi:10.1016/j.ydbio.2004.06.012

Broeckx, B. J., Vezzoni, A., Bogaerts, E., Bertal, M., Bosmans, T., Stock, E., Deforce, D., Peelman, L., & Saunders, J. H. (2018). Comparison of three methods to quantify laxity in the canine hip joint. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 31*(01), 023-029. doi:10.3415/VCOT17-05-0064

Bromley, M., & Woolley, D. E. (1984). Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 27*(9), 968-975.

Bruno, A. E., Li, L., Kalabus, J. L., Pan, Y., Yu, A., & Hu, Z. (2012). miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3' UTRs of human genes. *BMC genomics, 13*(1), 44. doi:10.1186/1471-2164-13-44

Burton-Wurster, N., Farese, J., Todhunter, R., & Lust, G. (1999). Site-specific variation in femoral head cartilage composition in dogs at high and low risk for development of osteoarthritis: insights into cartilage degeneration. *Osteoarthritis and cartilage, 7*(5), 486-497.

Caniglia, R., Fabbri, E., Hulva, P., Bolfíková, B. Č., Jindřichová, M., Stronen, A. V., Dykyy, I., Camatta, A., Carnier, P., & Randi, E. (2018). Wolf outside, dog inside? The genomic make-up of the Czechoslovakian Wolfdog. *BMC genomics, 19*(1), 533. doi:10.1186/s12864-018-4916-2

Chalman, J., & Butler, H. (1985). Coxofemoral joint laxity and the Ortolani sign. *Journal of the American Animal Hospital Association, 21*(5), 671-676.

Chen, J., Shapiro, H. S., & Sodek, J. (1992). Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *Journal of bone and mineral research, 7*(8), 987-997.

Clarke, G. M., Anderson, C. A., Pettersson, F. H., Cardon, L. R., Morris, A. P., & Zondervan, K. T. (2011). Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nature protocols, 6*(2), 121. doi:10.1038/nprot.2010.182

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.-M., & Eychenne, F. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics, 38*(7), 813. doi:10.1038/ng1810

Clutton-Brock, J. (2012). *Animals as domesticates: a world view through history*. Michigan: MSU Press.

Culp, W. T., Kapatkin, A. S., Gregor, T. P., Powers, M. Y., Mckelvie, P. J., & Smith, G. K. (2006). Evaluation of the Norberg angle threshold: a comparison of Norberg angle and distraction index as measures of coxofemoral degenerative joint disease susceptibility in seven breeds of dogs. *Veterinary surgery, 35*(5), 453-459.

Distl, O., Marschall, Y., & Stock, K.-F. (2013). EP 2123777 B1. European Patent Office Bulletin. 02.03.2019 tarihinde https://www.lens.org/lens/patent/185-545-117-139-305/fulltext adresinden erişildi

Dürr, J., Lammi, P., Goodman, S. L., Aigner, T., & von der Mark, K. (1996). Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. *Experimental cell research, 222*(1), 225-233.

Ellman, M., Yan, D., Ahmadinia, K., Chen, D., An, H., & Im, H. (2013). Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis. *Journal of cellular biochemistry, 114*(4), 735-742.

Ensembl, CHST3. (2019), 11.09.2019 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Sequence?db=core;g=ENSCAFG00000014410;r=4:22691336-22694254;t=ENSCAFT00000022886 adresinden erişildi

Ensembl, CX3CR1. (2019), 05.06.2019 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Sequence?db=core;g=ENSCAFG00000031104;r=23:8936791-8952809;t=ENSCAFT00000046656 adresinden erişildi

Ensembl, FGF12. (2019), 16.08.2019 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000031187;r=34:23818640-24066376;t=ENSCAFT00000047448 adresinden erişildi

Ensembl, IBSP. (2019), 22.08.2019 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000009558;r=32:11189932-11200350;t=ENSCAFT00000015179 adresinden erişildi

Ensembl, OSTF1. (2019), 19.08.2019 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000001699;r=1:83085089-83115235 adresinden erişildi

Ensembl, Variant Table. (2020), 08.01.2020 tarihinde http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Gene/Variation_Gene/Table?db=core;g=ENSCAFG00000031104;r=23:8938906-8952808;t=ENSCAFT00000046656 adresinden erişildi

European Variation Archive, Variant Browser. (2020), 08.01.2020 tarihinde https://www.ebi.ac.uk/eva/?Variant-Browser&species=cfamiliaris_31&selectFilter=region&studies=DBSNP.2005.2.4.16.57%2CPRJEB34548%2CPRJEB27789%2CPRJEB24783%2CPRJEB24066%2CPRJEB35134%2CPRJEB24328%2CPRJEB31976%2C2004-ACW&region=1%3A3000000-3100000&annot-vep-version=89&annot-vep-cache-version=91 adresinden erişildi

Farese, J. P., Todhunter, R. J., Lust, G., Williams, A. J., & Dykes, N. L. (1998). Dorsolateral subluxation of hip joints in dogs measured in a weight-bearing position with radiography and computed tomography. *Veterinary surgery*, *27*(5), 393-405. doi:10.1111/j.1532-950x.1998.tb00146.x

Farrell, L. L., Schoenebeck, J. J., Wiener, P., Clements, D. N., & Summers, K. M. (2015). The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. *Canine Genetics and Epidemiology*, *2*(1), 3.

Fealey, M. J., Li, J., Todhunter, R. J., Krotscheck, U., Hayashi, K., McConkey, M. J., Boyko, A. R., Hayward, J. J., & Todhunter, R. J. (2017). Genetic mapping of principal components of canine pelvic morphology. *Canine Genetics and Epidemiology*, *4*(1), 4. doi:10.1186/s40575-017-0043-7

Feldman, G., Dalsey, C., Fertala, K., Azimi, D., Fortina, P., Devoto, M., Pacifici, M., & Parvizi, J. (2010). The Otto Aufranc Award: Identification of a 4 Mb region on chromosome 17q21 linked to developmental dysplasia of the hip in one 18-member, multigeneration family. *Clinical Orthopaedics and Related Research®, 468*(2), 337-344. doi:10.1007/s11999-009-1073-6

Feldman, G., Offemaria, A., Sawan, H., Parvizi, J., & Freeman, T. A. (2017). A murine model for developmental dysplasia of the hip: ablation of CX3CR1 affects

acetabular morphology and gait. *Journal of translational medicine, 15*(1), 233. doi:10.1186/s12967-017-1335-0

Feldman, G. J., Parvizi, J., Levenstien, M., Scott, K., Erickson, J. A., Fortina, P., Devoto, M., & Peters, C. L. (2013). Developmental dysplasia of the hip: linkage mapping and whole exome sequencing identify a shared variant in CX3CR1 in all affected members of a large multigeneration family. *Journal of bone and mineral research, 28*(12), 2540-2549.

Feldman, G. J., Parvizi, J., Sawan, H., Erickson, J. A., & Peters, C. L. (2014). Linkage mapping and whole exome sequencing identify a shared variant in CX3CR1 in a large multi-generation family. *The Journal of arthroplasty, 29*(9), 238-241. doi:10.1016/j.arth.2014.05.014

Fels, L., & Distl, O. (2014a). Identification and validation of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia (CHD) in German shepherd dogs. *PloS one, 9*(5), e96618.

Fels, L., Marschall, Y., Philipp, U., & Distl, O. (2014b). Multiple loci associated with canine hip dysplasia (CHD) in German shepherd dogs. *Mammalian Genome, 25*(5-6), 262-269.

Fisher, L. W., & Fedarko, N. S. (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective tissue research, 44*(1), 33-40.

Flückiger, M. (2007). Scoring radiographs for canine hip dysplasia-The big three organisations in the world. *European Journal of Companion Animal Practice, 17*(2), 135-140.

Ford, C. A., Nowlan, N. C., Thomopoulos, S., & Killian, M. L. (2017). Effects of imbalanced muscle loading on hip joint development and maturation. *Journal of Orthopaedic Research, 35*(5), 1128-1136. doi:10.1002/jor.23361

Freeman, B., Evans, V., & McEwan, N. (2013). Canine hip dysplasia in Irish water spaniels: two decades of gradual improvement. *Veterinary Record, 173*(3), 72-72. doi:10.1136/vr.101152

Fry, T. R., & Clark, D. M. (1992). Canine hip dysplasia: clinical signs and physical diagnosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice, 22*(3), 551-558. doi:10.1016/s0195-5616(92)50055-9

Gagnon, A., Brown, D., Moreau, M., Lussier, B., Otis, C., & Troncy, E. (2017). Therapeutic response analysis in dogs with naturally occurring osteoarthritis. *Veterinary anaesthesia and analgesia, 44*(6), 1373-1381. doi:10.1016/j.vaa.2017.07.008

Ganss, B., Kim, R. H., & Sodek, J. (1999). Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 10*(1), 79-98. doi:10.1177/10454411990100010401

Gaspar, A. R., Hayes, G., Ginja, C., Ginja, M. M., & Todhunter, R. J. (2016). The Norberg angle is not an accurate predictor of canine hip conformation based on the distraction index and the dorsolateral subluxation score. *Preventive veterinary medicine, 135*, 47-52.

Ginja, M., Gaspar, A. R., & Ginja, C. (2015). Emerging insights into the genetic basis of canine hip dysplasia. *Veterinary Medicine: Research and Reports, 6*, 193.

Ginja, M., Silvestre, A., Gonzalo-Orden, J., & Ferreira, A. (2010). Diagnosis, genetic control and preventive management of canine hip dysplasia: a review. *The Veterinary Journal, 184*(3), 269-276. doi:10.1016/j.tvjl.2009.04.009

Ginja, M. M., Ferreira, A. J., Jesus, S. S., Melo-pinto, P., Bulas-cruz, J., Orden, M. A., San-roman, F., Llorens-pena, M. P., & Gonzalo-orden, J. M. (2009). Comparison of clinical, radiographic, computed tomographic, and magnetic resonance imaging methods for early prediction of canine hip laxity and dysplasia. *Veterinary radiology & ultrasound, 50*(2), 135-143. doi:10.1111/j.1740-8261.2009.01506.x

Gkiatas, I., Boptsi, A., Tserga, D., Gelalis, I., Kosmas, D., & Pakos, E. (2019). Developmental dysplasia of the hip: a systematic literature review of the genes related with its occurrence. *EFORT open reviews, 4*(10), 595-601. doi:10.1302/2058-5241.4.190006

González, J. R., Armengol, L., Solé, X., Guinó, E., Mercader, J. M., Estivill, X., & Moreno, V. (2007). SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics, 23*(5), 654-655.

Gotoh, H., Hagihara, M., Nagatsu, T., Iwata, H., & Miura, T. (1989). Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical chemistry, 35*(6), 1016-1018.

Gough, A., Thomas, A., & O'Neill, D. (2018). *Breed predispositions to disease in dogs and cats*. West Sussex: John Wiley & Sons.

Graffelman, J., & Graffelman, M. J. (2019). Package 'HardyWeinberg'. 11.11.2019 tarihinde https://cran.r-project.org/web/packages/HardyWeinberg/index.html adresinden erşildi.

Greenhill, S. (2013). A soldier's best friend: Efforts of 20,000 dogs on the front line in World War I discovered in records that show they carried aid to the wounded and pulled equipment. 29.09.2019 tarihinde, https://www.dailymail.co.uk/news/article-2514593/Efforts-20-000-dogs-line-World-War-I-discovered-records.html adresinden erişildi.

Gugjoo, M. B., Amarpal, A., & Sharma, G. T. (2019). Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of cellular physiology. 234*(10), 16779-16811. doi:10.1002/jcp.28348

Guo, G., Zhou, Z., Wang, Y., Zhao, K., Zhu, L., Lust, G., Hunter, L., Friedenberg, S., Li, J., & Zhang, Y. (2011). Canine hip dysplasia is predictable by genotyping. *Osteoarthritis and cartilage, 19*(4), 420-429.

Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. 20.06.2019 tarihinde https://bioedit.software.informer.com/7.0/ adresinden erişildi.

Hayvanlar İçin Ortopedi Vakfı. (2019), 11.08.2019 tarihinde https://www.ofa.org/diseases/breed-statistics#detail adresinden erişildi

Hayward, J. J., Castelhano, M. G., Oliveira, K. C., Corey, E., Balkman, C., Baxter, T. L., Casal, M. L., Center, S. A., Fang, M., & Garrison, S. J. (2016). Complex disease

and phenotype mapping in the domestic dog. *Nature communications, 7*, 10460. doi:10.1038/ncomms10460

Helfrich, M. H., & Hocking, L. J. (2008). Genetics and aetiology of Pagetic disorders of bone. *Archives of biochemistry and biophysics, 473*(2), 172-182. doi:10.1016/j.abb.2008.02.045

Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, C., & Lambert, C. (2010). Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease, 2*(6), 335-348. doi:10.1177/1759720X10383076

Hindrikson, M., Männil, P., Ozolins, J., Krzywinski, A., & Saarma, U. (2012). Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PloS one, 7*(10), e46465.

Hirayama, T., Danks, L., Sabokbar, A., & Athanasou, N. (2002). Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology, 41*(11), 1232-1239. doi:10.1093/rheumatology/41.11.1232

Horvath, G., Järverud, G. a. K., Järverud, S., & Horváth, I. (2008). Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integrative cancer therapies, 7*(2), 76-80. doi:10.1177/1534735408319058

Hou, Y., Wang, Y., Lust, G., Zhu, L., Zhang, Z., & Todhunter, R. J. (2010). Retrospective analysis for genetic improvement of hip joints of cohort labrador retrievers in the United States: 1970–2007. *PloS one, 5*(2), e9410.

Huang, M., Hayward, J. J., Corey, E., Garrison, S. J., Wagner, G. R., Krotscheck, U., Hayashi, K., Schweitzer, P. A., Lust, G., & Boyko, A. R. (2017). A novel iterative mixed model to remap three complex orthopedic traits in dogs. *PloS one, 12*(6), e0176932. doi:10.1371/journal.pone.0176932

Hunziker, E. B., Lippuner, K., Keel, M., & Shintani, N. (2015). An educational review of cartilage repair: precepts & practice–myths & misconceptions–progress & prospects. *Osteoarthritis and cartilage, 23*(3), 334-350.

Janutta, V., Hamann, H., & Distl, O. (2008). Genetic and phenotypic trends in canine hip dysplasia in the German population of German shepherd dogs. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 121*(3-4), 102-109.

Jones, O. Y., Raschke, S. U., & Riches, P. E. (2018). Inertial properties of the German Shepherd Dog. *PloS one, 13*(10), e0206037. . doi:10.1371/journal.pone.0206037

Kass, P., Wallace, L., & Guffy, M. (1997). Association between pelvic muscle mass and canine hip dysplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 210*(10), 1466-1473.

Kealy, R., Olsson, S., Monti, K., Lawler, D., Biery, D., Helms, R., Lust, G., & Smith, G. (1992). Effects of limited food consumption on the incidence of hip dysplasia in growing dogs. *Journal-American Veterinary Medical Association, 201*, 857-857.

Keller, G. G., Dziuk, E., & Bell, J. S. (2011). How the Orthopedic Foundation for Animals (OFA) is tackling inherited disorders in the USA: Using hip and elbow dysplasia as examples. *The Veterinary Journal, 189*(2), 197-202.

Kenanidis, E., Gkekas, N. K., Karasmani, A., Anagnostis, P., Christofilopoulos, P., & Tsiridis, E. (2020). Genetic Predisposition to Developmental Dysplasia of the Hip. *The Journal of arthroplasty, 35*(1), 291-300. e291. doi:10.1016/j.arth.2019.08.031

King, M. D. (2017). Etiopathogenesis of canine hip dysplasia, prevalence, and genetics. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 47*(4), 753-767. doi:10.1016/j.cvsm.2017.03.001

Koizumi, K., Saitoh, Y., Minami, T., Takeno, N., Tsuneyama, K., Miyahara, T., Nakayama, T., Sakurai, H., Takano, Y., & Nishimura, M. (2009). Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *The Journal of Immunology, 183*(12), 7825-7831. doi:10.4049/jimmunol.0803627

Kotlarsky, P., Haber, R., Bialik, V., & Eidelman, M. (2015). Developmental dysplasia of the hip: What has changed in the last 20 years? *World journal of orthopedics, 6*(11), 886.

Krontveit, R. I., Nødtvedt, A., Sævik, B. K., Ropstad, E., Skogmo, H. K., & Trangerud, C. (2010). A prospective study on canine hip dysplasia and growth in a cohort of four large breeds in Norway (1998–2001). *Preventive veterinary medicine, 97*(3-4), 252-263.

Krontveit, R. I., Nødtvedt, A., Sævik, B. K., Ropstad, E., & Trangerud, C. (2012). Housing-and exercise-related risk factors associated with the development of hip dysplasia as determined by radiographic evaluation in a prospective cohort of Newfoundlands, Labrador Retrievers, Leonbergers, and Irish Wolfhounds in Norway. *American journal of veterinary research, 73*(6), 838-846.

Kyriazis, A. (2016). Canine hip dysplasia. Part I: Aetiopathogenesis & diagnostic approach. *Hellenic J Companion Anim Med, 5*(1), 37.

Landi, D., Gemignani, F., & Landi, S. (2012). Role of variations within microRNA-binding sites in cancer. *Mutagenesis, 27*(2), 205-210.

Lavrijsen, I. C., Leegwater, P. A., Martin, A. J., Harris, S. J., Tryfonidou, M. A., Heuven, H. C., & Hazewinkel, H. A. (2014). Genome wide analysis indicates genes for basement membrane and cartilage matrix proteins as candidates for hip dysplasia in Labrador Retrievers. *PloS one, 9*(1), e87735.

Ledecky, V., Hluchy, M., Liptak, T., & Kuricova, M. (2016). Interobserver Variation in Canine Hip Dysplasia Evaluation. *Folia Veterinaria, 60*(2), 29-33.

Lehman, N., Eisenhawer, A., Hansen, K., Mech, L. D., Peterson, R. O., Gogan, P. J., & Wayne, R. K. (1991). Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. *Evolution, 45*(1), 104-119.

Leighton, E. (1997). Genetics of canine hip dysplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 210*(10), 1474-1479.

Leighton, E. A., Holle, D., Biery, D. N., Gregor, T. P., McDonald-Lynch, M. B., Wallace, M. L., Reagan, J. K., & Smith, G. K. (2019). Genetic improvement of hip-extended scores in 3 breeds of guide dogs using estimated breeding values: Notable progress but more improvement is needed. *PloS one, 14*(2), e0212544.

Leroy, G., Phocas, F., Hedan, B., Verrier, E., & Rognon, X. (2015). Inbreeding impact on litter size and survival in selected canine breeds. *The Veterinary Journal, 203*(1), 74-78. doi:10.1016/j.tvjl.2014.11.008

Lewis, T. W., Blott, S. C., & Woolliams, J. A. (2013). Comparative analyses of genetic trends and prospects for selection against hip and elbow dysplasia in 15 UK dog breeds. *BMC genetics, 14*(1), 16. doi:10.1186/1471-2156-14-16

Li, L., Wang, X., Zhao, Q., Wang, E., Wang, L., Cheng, J., Zhang, L., & Wang, B. (2017). CX3CR1 polymorphisms associated with an increased risk of developmental dysplasia of the hip in human. *Journal of Orthopaedic Research, 35*(2), 377-380. doi:10.1002/jor.23294

Li, P., Guo, M., Wang, C., Liu, X., & Zou, Q. (2014). An overview of SNP interactions in genome-wide association studies. *Briefings in functional genomics, 14*(2), 143-155. doi:10.1093/bfgp/elu036

Lin, T.-S., Hsieh, C.-H., Kuo, C., Juang, Y.-P., Hsieh, Y. S., Chiang, H., Hung, S.-C., Jiang, C.-C., & Liang, P.-H. (2020). Sulfation pattern of chondroitin sulfate in human osteoarthritis cartilages reveals a lower level of chondroitin-4-sulfate. *Carbohydrate Polymers, 229*, 115496.

Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas III, E. J., & Zody, M. C. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature, 438*(7069), 803.

Liu, S., Tian, W., Wang, J., Cheng, L., Jia, J., & Ma, X. (2014). Two single-nucleotide polymorphisms in the DKK1 gene are associated with developmental dysplasia of the hip in the Chinese Han female population. *Genetic testing and molecular biomarkers, 18*(8), 557-561. doi:10.1089/gtmb.2014.0044

Lo Monaco, M., Merckx, G., Ratajczak, J., Gervois, P., Hilkens, P., Clegg, P., Bronckaers, A., Vandeweerd, J.-M., & Lambrichts, I. (2018). Stem cells for cartilage repair: preclinical studies and insights in translational animal models and outcome measures. *Stem cells international, 2018*. doi:10.1155/2018/9079538

Loder, R. T., & Todhunter, R. J. (2017). The demographics of canine hip dysplasia in the United States and Canada. *Journal of veterinary medicine, 2017*. doi:10.1155/2017/5723476

Lopes, L. S., Selmi, A. L., Lins, B. T., & Macedo, A. S. (2018). Clinical and radiographic evaluation of double pelvic osteotomy to treat canine hip dysplasia. *Ciência Rural, 48*(4).

Lopez, M. J., Quinn, M. M., & Markel, M. D. (2006). Associations between canine juvenile weight gain and coxofemoral joint laxity at 16 weeks of age. *Veterinary surgery, 35*(3), 214-218.

Lorenzini, R., Fanelli, R., Grifoni, G., Scholl, F., & Fico, R. (2014). Wolf–dog crossbreeding:“Smelling” a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde, 79*(2), 149-156.

Lu, J., & Clark, A. G. (2012). Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome research, 22*(7), 1243-1254. doi:10.1101/gr.132514.111

Malaval, L., Wade-Guéye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J.-P., Burt-Pichat, B., & Duboeuf, F. (2008). Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *Journal of Experimental Medicine, 205*(5), 1145-1153. doi:10.1084/jem.20071294

Malekipour, F., & Lee, P. V. (2019). Shock absorbing ability in healthy and damaged cartilage-bone under high-rate compression. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 90*, 388-394.

Manley, P. A., Adams, W. M., Danielson, K. C., Dueland, R. T., & Linn, K. A. (2007). Long-term outcome of juvenile pubic symphysiodesis and triple pelvic osteotomy in dogs with hip dysplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 230*(2), 206-210. doi:10.2460/javma.230.2.206

Manz, E., Tellhelm, B., & Krawczak, M. (2017). Prospective evaluation of a patented DNA test for canine hip dysplasia (CHD). *PloS one, 12*(8), e0182093. doi:10.1371/journal.pone.0182093

Martin, A. J. (2019). *Genetic test.* 03.11.2019 tarihinde https://patents.google.com/patent/US20160122822A1/ko adresinden erişildi

Martinez, A., Simon, L., Tejedor, D., Artieda, M., Bartolome, N., Escaich, J., Velasco, A., Selles, M., Chetrit, C., & Martinez, D. (2013). *Markers for joint displasia, osteoarthritis and conditions secondary thereto.* 03.09.2019 tarihinde https://patents.google.com/patent/WO2012038382A2 adresinden erişildi

Meeson, R. L., Todhunter, R. J., Blunn, G., Nuki, G., & Pitsillides, A. A. (2019). Spontaneous dog osteoarthritis—a One Medicine vision. *Nature Reviews Rheumatology*, 15, 273–287. doi:10.1038/s41584-019-0202-1

Mikkola, L., Holopainen, S., Pessa-Morikawa, T., Lappalainen, A. K., Hytönen, M. K., Lohi, H., & Iivanainen, A. (2019a). Genetic dissection of canine hip dysplasia phenotypes and osteoarthritis reveals three novel loci. *BMC genomics, 20*(1), 1027.

Mikkola, L. I., Holopainen, S., Lappalainen, A. K., Pessa-Morikawa, T., Augustine, T. J., Arumilli, M., Hytönen, M. K., Hakosalo, O., Lohi, H., & Iivanainen, A. (2019b). Novel protective and risk loci in hip dysplasia in German Shepherds. *PLoS Genetics, 15*(7), e1008197.

Miklosi, Á. (2014). *Dog behaviour, evolution, and cognition*. Oxford: Oxford University Press

miRDB. (2020), 07.01.2020 tarihinde http://www.mirdb.org/ adresinden erişildi

Miyazaki, T., Tanaka, S., Sanjay, A., & Baron, R. (2006). The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function. *Modern rheumatology, 16*(2), 68-74. doi:10.1007/s10165-006-0460-z

Mizoue, L. S., Bazan, J. F., Johnson, E. C., & Handel, T. M. (1999). Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochemistry, 38*(5), 1402-1414. doi:10.1021/bi9820614

Montecchiani, C., Pedace, L., Lo Giudice, T., Casella, A., Mearini, M., Gaudiello, F., Pedroso, J. L., Terracciano, C., Caltagirone, C., & Massa, R. (2015).

ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot–Marie–Tooth disease. *Brain, 139*(1), 73-85.

Moonga, B., Stein, L., Kilb, J., & Dempster, D. (1996). Effect of diacylglycerols on osteoclastic bone resorption. *Calcified tissue international, 59*(2), 105-108. doi:10.1007/s002239900095

Morey, D. F. (2006). Burying key evidence: the social bond between dogs and people. *Journal of Archaeological Science, 33*(2), 158-175.

NCBI. (2018), 14.08.2019 tarihinde https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins adresinden erişildi

NCBI-dbSNP. (2020),09.01.2020 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=1524&mrna=NM_001171174.1&ctg=NT_022517.19&prot=NP_001164645.1&orien=reverse&refresh=refresh adresinden erişildi

NCBI-Sequence Viewer 3.30.0. (2018), 05.01.2018 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/ adresinden erişildi

NCBI. (2018) 04.01.2018 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ adresinden erişildi

NCBI, CHST3. (2019), 19.08.2019 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9469 adresinden erişildi

NCBI, FGF12. (2019), 27.08.2019 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=fgf12+dog adresinden erişildi

NCBI, IBSP. (2019), 25.08.2019 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=IBSP+dog adresinden erişildi

NCBI, OSTF1. (2019),21.08.2019 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ostf1+dog adresinden erişildi

NEBcutter V2.0. (2018), 04.01.2018 tarihinde http://nc2.neb.com/NEBcutter2/ adresinden erişildi

Nowlan, N. C., Chandaria, V., & Sharpe, J. (2014). Immobilized chicks as a model system for early-onset developmental dysplasia of the hip. *Journal of Orthopaedic Research, 32*(6), 777-785.

Oberbauer, A., Keller, G., & Famula, T. (2017). Long-term genetic selection reduced prevalence of hip and elbow dysplasia in 60 dog breeds. *PloS one, 12*(2), e0172918. doi:10.1371/journal.pone.0172918

Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development, 16*(12), 1446-1465. doi:10.1101/gad.990702

Paganini, C., Costantini, R., Superti-Furga, A., & Rossi, A. (2019). Bone and connective tissue disorders caused by defects in glycosaminoglycan biosynthesis: A panoramic view. *The FEBS journal, 286*(15), 3008-3032. doi:10.1111/febs.14984

Parker, H. G., & Ostrander, E. A. (2005). Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genetics, 1*(5), e58. doi:10.1371/journal.pgen.0010058

Pascual-Garrido, C., Guilak, F., Rai, M. F., Harris, M. D., Lopez, M. J., Todhunter, R. J., & Clohisy, J. C. (2017). Canine Hip Dysplasia: A Natural Animal Model for Human Developmental Dysplasia of the Hip. *Journal of Orthopaedic Research*. doi: 10.1002/jor.23828

PennHIP. (2019), 20.03.2020 tarihinde https://antechimagingservices.com/antechweb/measuring-hip-joint-laxity adresinden erişildi

Pfahler, S., & Distl, O. (2012). Identification of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia and canine elbow dysplasia in Bernese mountain dogs. *PloS one, 7*(11), e49782. doi:10.1371/journal.pone.0049782

Primer-Blast. (2018), 02.01.2018 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ adresinden erişildi

Proserpio, V., Fittipaldi, R., Ryall, J. G., Sartorelli, V., & Caretti, G. (2013). The methyltransferase SMYD3 mediates the recruitment of transcriptional cofactors at the myostatin and c-Met genes and regulates skeletal muscle atrophy. *Genes & development, 27*(11), 1299-1312.

Qu, Y., Zhang, Y., Wang, K., Song, C., Wang, P., Ye, H., Zhang, J., & Dai, L. (2020). Single Nucleotide Polymorphisms in MicroRNA-Binding Site of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway and Susceptibility to Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Digestive Diseases, 38*(1), 1-8. doi:10.1159/000501447

Randi, E., & Lucchini, V. (2002). Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (Canis lupus) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics, 3*(1), 29-43.

Rawson, E. A., Aronsohn, M. G., & Burk, R. L. (2005). Simultaneous bilateral femoral head and neck ostectomy for the treatment of canine hip dysplasia. *Journal of the American Animal Hospital Association, 41*(3), 166-170. doi:10.5326/0410166

Restriction Mapper. (2018), 19.01.2018 tarihinde http://www.restrictionmapper.org/ adresinden erişildi

Richardson, D. C. (1992). The role of nutrition in canine hip dysplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 22*(3), 529-540. doi:10.1016/s0195-5616(92)50053-5

Riser, W. H. (1975). The dog as a model for the study of hip dysplasia. Growth, form, and development of the normal and dysplastic hip joint. *Veterinary pathology, 12*(4), 234-234.

Riser, W. H., & Shirer, J. F. (1967). Correlation between canine hip dysplasia and pelvic muscle mass: a study of 95 dogs. *American journal of veterinary research, 28*(124), 769-777.

Rodriguez-Lopez, J., Pombo-Suarez, M., Loughlin, J., Tsezou, A., Blanco, F., Meulenbelt, I., Slagboom, P., Valdes, A., Spector, T., & Gomez-Reino, J. (2009). Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis and cartilage, 17*(3), 321-327.

Roodman, G. D. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *New England Journal of Medicine, 350*(16), 1655-1664.

Runge, J., Kelly, S., Gregor, T., Kotwal, S., & Smith, G. (2010). Distraction index as a risk factor for osteoarthritis associated with hip dysplasia in four large dog breeds. *Journal of small animal practice, 51*(5), 264-269.

Sánchez-Molano, E., Pong-Wong, R., Clements, D. N., Blott, S. C., Wiener, P., & Woolliams, J. A. (2015). Genomic prediction of traits related to canine hip dysplasia. *Frontiers in genetics, 6*, 97.

Sánchez-Molano, E., Woolliams, J. A., Pong-Wong, R., Clements, D. N., Blott, S. C., & Wiener, P. (2014b). Quantitative trait loci mapping for canine hip dysplasia and its related traits in UK Labrador Retrievers. *BMC genomics, 15*(1), 833.

Sánchez-Molano, E., Woolliams, J., Blott, S., & Wiener, P. (2014a). Assessing the impact of genomic selection against hip dysplasia in the L abrador R etriever dog. *Journal of animal breeding and genetics, 131*(2), 134-145.

Sarierler, M. (2004). Comparison of femoral inclination angle measurements in dysplastic and nondysplastic dogs of different breeds. *Acta Veterinaria Hungarica,* 52(2), 245-252. doi:10.1556/AVet.52.2004.2.13

Sasaki, A., Mizuno, M., Mochizuki, M., & Sekiya, I. (2019). Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in dogs. *World journal of stem cells, 11*(5), 254. doi:10.4252/wjsc.v11.i5.254

Schleidt, W. M., & Shalter, M. D. (2003). Co-evolution of humans and canids. *Evolution and Cognition,* 9(1), 57-72.

Schnelle, G. (1935). Some new diseases in the dog. *American Kennel Gazette, 52*, 25-26.

Scott, R. M., Evans, R., & Conzemius, M. G. (2017). Efficacy of an oral nutraceutical for the treatment of canine osteo arthritis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 30*(05), 318-323.

Serpell, J. (2016). *The domestic dog*. Cambridge: Cambridge University Press.

Shahid, M., Manchi, G., Slunsky, P., Naseer, O., Fatima, A., Leo, B., & Raila, J. (2017). A systemic review of existing serological possibilities to diagnose canine osteoarthritis with a particular focus on extracellular matrix proteoglycans and protein. *Polish journal of veterinary sciences, 20*(1), 189-201.

Shasttiri, A., Rostamian Delavar, M., Baghi, M., Dehghani Ashkezari, M., & Ghaedi, K. (2019). SNP rs10800708 within the KIF14 miRNA binding site is linked with breast cancer. *British journal of biomedical science, 76*(1), 46-48. doi:10.1515/pjvs-2017-0024

Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010a). Leading the way: canine models of genomics and disease. *Disease models & mechanisms, 3*(1-2), 27-34.

Shearin, A. L., & Ostrander, E. A. (2010b). Canine morphology: hunting for genes and tracking mutations. *PLoS biology, 8*(3), e1000310. doi:10.1371/journal.pbio.1000310

Sims, N. A., & Martin, T. J. (2020). *Principles of Bone Biology*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148419000105 adresinden erişilmiştir. doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00010-5

Sloane, C. F. (1955). Dogs in war, police work and on patrol. *J. Crim. L. Criminology & Police Sci., 46*, 385.

Smetanová, M., Bolfíková, B. Č., Randi, E., Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Kutal, M., & Hulva, P. (2015). From wolves to dogs, and back: Genetic composition of the Czechoslovakian wolfdog. *PloS one, 10*(12), e0143807.

Smith, G., Karbe, G., Agnello, K., & McDonald-Lynch, M. (2012). Pathogenesis, diagnosis, and control of canine hip dysplasia. *Veterinary surgery small animal, 1*, 824-848.

Smith, G. K., Paster, E. R., Powers, M. Y., Lawler, D. F., Biery, D. N., Shofer, F. S., McKelvie, P. J., & Kealy, R. D. (2006). Lifelong diet restriction and radiographic evidence of osteoarthritis of the hip joint in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 229*(5), 690-693. doi:10.2460/javma.229.5.690

Su, N., Jin, M., & Chen, L. (2014). Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone research, 2*, 14003. doi:10.1038/boneres.2014.3

Superti - Furga, A., & Unger, S. (2019). CHST3 - Related Skeletal Dysplasia. *GeneReviews*, 17.02.2020 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62112/ adresinden erişildi.

Superveterinary. (2020), 17.02.2020 tarihinde https://superveterinary.com/image-diagnostic-software-superxvue-d-xr/ adresinden erişildi

Syrcle, J. (2017). Hip dysplasia: Clinical signs and physical examination findings. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 47*(4), 769-775. doi:10.1016/j.cvsm.2017.02.001

Şenocak, M. (2009). *Klinik biyoistatistik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri

Takeda, H., Charlier, C., Farnir, F., & Georges, M. (2010). Demonstrating polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vivo: Application to the g+ 6223G→ A mutation of Texel sheep. *Rna, 16*(9), 1854-1863. doi:10.1261/rna.2131110

Tanteles, G. A., Dixit, A., Dhar, S., & Suri, M. (2013). Two Somali half-siblings with CHST3-related chondrodysplasia illustrating the phenotypic spectrum and intrafamilial variability. *American Journal of Medical Genetics Part A, 161*(10), 2588-2593.

TargetScan. (2020), 07.01.2020 tarihinde www.targetscan.org adresinden erişildi

Team, R. C. (2019). *A language and environment for statistical computing.* 20.02.2020 tarihinde *https://www. r-project. org*. adresinden erişildi

Tellegen, A. R., Dessing, A. J., Houben, K., Riemers, F. M., Creemers, L. B., Mastbergen, S. C., Meij, B. P., Miranda-Bedate, A., & Tryfonidou, M. A. (2019). Dog as a Model for Osteoarthritis: The FGF4 Retrogene Insertion May Matter. *Journal of Orthopaedic Research®, 37*(12), 2550-2560.

Tobias, K. M., & Johnston, S. A. (2013). *Veterinary Surgery: Small Animal-E-Book: 2-Volume Set*: Elsevier Health Sciences. https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323320658?role=student adresinden erişildi

Todhunter, R. J., Garrison, S. J., Jordan, J., Hunter, L., Castelhano, M. G., Ash, K., Meyers-Wallen, V., Krotscheck, U., Hayward, J. J., & Grenier, J. (2019). Gene expression in hip soft tissues in incipient canine hip dysplasia and osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research®, 37*(2), 313-324. doi:10.1002/jor.24178

Tsai, K. L., Clark, L. A., & Murphy, K. E. (2007). Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mammalian Genome, 18*(6-7), 444-451.

Uluslararası Kalça Displazisi Enstitüsü. (2018), 09.08.2019 tarihinde https://hipdysplasia.org/developmental-dysplasia-of-the-hip/causes-of-ddh/ adresinden erişildi

Valverde, P., Tu, Q., & Chen, J. (2005). BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically. *Journal of bone and mineral research, 20*(9), 1669-1679. doi:10.1359/JBMR.050511

Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q., & Chen, J. (2008). Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *Journal of bone and mineral research, 23*(11), 1775-1788. doi:10.1359/jbmr.080605

Velasco, J., Zarrabeitia, M., Prieto, J., Perez-Castrillon, J. L., Perez-Aguilar, M., Perez-Nunez, M., Sañudo, C., Hernandez-Elena, J., Calvo, I., & Ortiz, F. (2010). Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporosis international, 21*(1), 109-118. doi:10.1007/s00198-009-0931-0

Vermeren, M., Lyraki, R., Wani, S., Airik, R., Albagha, O., Mort, R., Hildebrandt, F., & Hurd, T. (2017). Osteoclast stimulation factor 1 (Ostf1) KNOCKOUT increases trabecular bone mass in mice. *Mammalian Genome, 28*(11-12), 498-514. doi:10.1007/s00335-017-9718-3

Vezzoni, A., Boiocchi, S., Vezzoni, L., Vanelli, A., & Bronzo, V. (2010). Double pelvic osteotomy for the treatment of hip dysplasia in young dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, 23*(06), 444-452. doi:10.3415/VCOT-10-03-0034

Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., & Wayne, R. K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science, 276*(5319), 1687-1689. doi:10.1126/science.276.5319.1687

Wang, C., Steer, J. H., Joyce, D. A., Yip, K. H., Zheng, M. H., & XU, J. (2003). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL-induced NF-κB activation. *Journal of bone and mineral research, 18*(12), 2159-2168.

Wang, S., Leroy, G., Malm, S., Lewis, T., Viklund, Å., Strandberg, E., & Fikse, W. (2017). Genetic correlations of hip dysplasia scores for Golden retrievers and Labrador retrievers in France, Sweden and the UK. *The Veterinary Journal, 226*, 51-56. doi:10.1016/j.tvjl.2017.07.006

Wang, S., Strandberg, E., Viklund, Å., Windig, J., Malm, S., Lewis, T., Laloë, D., & Leroy, G. (2019). Genetic improvement of canine hip dysplasia through sire selection across countries. *The Veterinary Journal, 248*, 18-24.

Wiener, P., Sánchez-Molano, E., Clements, D. N., Woolliams, J. A., Haskell, M. J., & Blott, S. C. (2017). Genomic data illuminates demography, genetic structure and selection of a popular dog breed. *BMC genomics, 18*(1), 609. doi:10.1186/s12864-017-3933-x

Wilson, B., Nicholas, F. W., & Thomson, P. C. (2011). Selection against canine hip dysplasia: Success or failure? *The Veterinary Journal, 189*(2), 160-168. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.014

Wilson, D. G., Phamluong, K., Lin, W. Y., Barck, K., Carano, R. A., Diehl, L., Peterson, A. S., Martin, F., & Solloway, M. J. (2012). Chondroitin sulfate synthase 1 (Chsy1) is required for bone development and digit patterning. *Developmental biology, 363*(2), 413-425.

Wilson, P. J., Grewal, S., Lawford, I. D., Heal, J. N., Granacki, A. G., Pennock, D., Theberge, J. B., Theberge, M. T., Voigt, D. R., & Waddell, W. (2000). DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. *Canadian journal of Zoology, 78*(12), 2156-2166.

Witsberger, T. H., Villamil, J. A., Schultz, L. G., Hahn, A. W., & Cook, J. L. (2008). Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 232*(12), 1818-1824. doi:10.2460/javma.232.12.1818

Witte, P. G. (2019). Hip dysplasia—understanding the disease. *Companion Animal, 24*(2), 77-81.

Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., Kotela, A., Deszczyński, J., Kotela, I., & Szukiewicz, D. (2014). The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: occurrence and potential role in osteoarthritis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 62*(5), 395-403. doi:10.1007/s00005-014-0275-0

Wojdasiewicz, P., Turczyn, P., Dobies-Krzesniak, B., Frasunska, J., & Tarnacka, B. (2019). Role of CX3CL1/CX3CR1 Signaling Axis Activity in Osteoporosis. *Mediators of inflammation, 2019*, 7570452. doi:10.1155/2019/7570452

Wong, N., & Wang, X. (2014). miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research, 43*(D1), D146-D152. doi:10.1093/nar/gku1104

Wood, J., Lakhani, K., & Dennis, R. (2000). Heritability and epidemiology of canine hip-dysplasia score in flat-coated retrievers and Newfoundlands in the United Kingdom. *Preventive veterinary medicine, 46*(2), 75-86. doi:10.1016/s0167-5877(00)00140-9

Worth, A., Sandford, M., Gibson, B., Stratton, R., Erceg, V., Bridges, J., & Jones, B. (2013). Causes of loss or retirement from active duty for New Zealand police German Shepherd dogs. *Anim Welfare, 22*(2), 166-173.

Worth, A. J., & Cave, N. J. (2018). A veterinary perspective on preventing injuries and other problems that shorten the life of working dogs. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties, 37*(1), 161-169. doi:10.20506/rst.37.1.2749

Xiong, D.-H., Liu, X.-G., Guo, Y.-F., Tan, L.-J., Wang, L., Sha, B.-Y., Tang, Z.-H., Pan, F., Yang, T.-L., & Chen, X.-D. (2009). Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. *The American Journal of Human Genetics, 84*(3), 388-398.

Yeates, J. (2019). *Companion animal care and welfare: The UFAW companion animal handbook*. West Sussex: John Wiley & Sons.

Yuan, Y., & Weidhaas, J. B. (2019). Functional micro RNA binding site variants. *Molecular oncology, 13*(1), 4-8.

Zamborsky, R., Kokavec, M., Harsanyi, S., Attia, D., & Danisovic, L. (2019). Developmental Dysplasia of Hip: Perspectives in Genetic Screening. *Medical Sciences, 7*(4), 59. doi:10.3390/medsci7040059

Zhang, F., Dai, L., Lin, W., Wang, W., Liu, X., Zhang, J., Yang, T., Liu, X., Shen, H., & Chen, X. (2016). Exome sequencing identified FGF12 as a novel candidate gene for Kashin-Beck disease. *Functional & integrative genomics, 16*(1), 13-17.

Zhang, X., Meng, Q., Ma, R., Chen, G., Cheng, L., & Shen, J. (2015). Early acetabular cartilage degeneration in a rabbit model of developmental dysplasia of the hip. *International journal of clinical and experimental medicine, 8*(8), 14505.

Zhao, H., Laitala-Leinonen, T., Parikka, V., & Väänänen, H. K. (2001). Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption. *Journal of Biological Chemistry, 276*(42), 39295-39302. doi:10.1074/jbc.M010999200

Zhou, Z., Sheng, X., Zhang, Z., Zhao, K., Zhu, L., Guo, G., Friedenberg, S. G., Hunter, L. S., Vandenberg-Foels, W. S., & Hornbuckle, W. E. (2010). Differential genetic regulation of canine hip dysplasia and osteoarthritis. *PloS one, 5*(10), e13219. doi:10.1371/journal.pone.0013219

EKLER

Ek 1. KKD gelişimi ile ilişki olarak rapor edilmiş genetik markırlar

S.No.	Gen	NCBI Gen ID	Kromozom	Kromozom Pozisyon	Alleller	Gen Üzerindeki Konumu	TNP Kodu	Referans	Köpek Irkı
1	LAMA2	100683420	1	70997779	A>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
2	LAMA2	100683420	1	70938018	T>A	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
3	LAMA2	100683420	1	70976949	A>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
4	LAMA2	100683420	1	70793904	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
5	LAMA2	100683420	1	70931272	C>A	Ekson (Yanlış anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
6	LAMA2	100683420	1	71093063	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
7	LAMA2	100683420	1	71058059	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar

8	OSTF1	484161	1	83102833	A>G	İntron	rs8995004	Distl vd., 2013	AÇK
9	Belirtilmemiş	-	1	100106009	Belirtilmemiş	İntergenik	BICF2P219706	Sánchez-Molano vd., 2014b	Labrador Retriever
10	Belirtilmemiş	-	1	100138261	Belirtilmemiş	İntergenik	BICF2S2443186	Sánchez-Molano vd., 2014b	Labrador Retriever
11	Belirtilmemiş	-	1	107719908	Belirtilmemiş	İntergenik	BICF2P1285984	Sánchez-Molano vd., 2014b	Labrador Retriever
12	NOX3-ARID1B	484046-484047	1	45382633	C>A	İntergenik	BICF2P468585	L. Mikkola vd., 2019a	AÇK
13	NOX3-ARID1B	484046-484047	1	45161186	G>C	İntergenik	BICF2S23248027	L. Mikkola vd., 2019a	AÇK
14	CHSY1, ADAMTS17	488704 488708	3	40302288	A>G	İntergenik	BICF2G630339806	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
15	PGM2	479116	3	37139132	G>A	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK
16	EVC, EVC2	611166, 611156	3	74720873	G>A	İntergenik	BICF2S2459425	Zhou vd., 2010	Labrador Retriever
17	CHST3	10085559	4	22691322	C>T	5' UTR	rs24076746	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
18	CHST3	10085559	4	22695305	G>A	3' UTR	rs24105396	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
19	MYPN	489013	4	37139232	G>A	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK

20	SKI	489610	5	62010935	A>C	Ekson (Yanlış anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
21	NPHP4	489625	5	62.929.475	C>T	5 UTR	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
22	KLHL17	489607	5	59.194.609	G>-	3 UTR	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
23	SMYD3	480101	7	36171712	A>G	Genin yakınında	BICF2G630558239	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
24	LRR1	490676	8	29247021	T>C	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
25	PTGDR	610845	8	31494277	C>T	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
26	PTGDR	610845	8	31494760	C>A	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
27	-	-	8	-	A>G	İntergenik	BICF2P1184132	Distl vd., 2013	AÇK
28	PTGDR	610845	8	31496895	C>T	Akış aşağısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
29	PTGDR	610845	8	31496910	C>T	Akış aşağısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
30	FCN2-OLFM1	680247-480685	9	3433414	A>G	İntergenik	BICF2S22937555	Fels vd., 2014b	AÇK
31	PRKCE	609934	10	47923623	A>G	Genin yakınında	BICF2S2452559	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever

32	PTPRD	481538	11	32935770	T>A	İntergenik	BICF2P550340	Zhou vd., 2010	Labrador Retriever
33	COL15A1	474778	11	57517597	G>A	İntergenik	BICF2S23432143	Zhou vd., 2010	Labrador Retriever
34	-	-	12	16410934	A>G	-	BICF2P548082	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
35	CTTNBP2	100687879	14	59537633	Belirtil memiş	İntron	BICF2P1282232	Pfahler & Distl, 2012	Bernese Dağ Köpekleri
36	PON2	403855	14	23811133	Belirtil memiş	Genn akış yukarısında	BICF2P1089246	Pfahler & Distl, 2012	Bernese Dağ Köpekleri
37	TRIM2	475470	15	51083415	G>A	İntergenik	BICF2S23013075	Huang vd., 2017	Labrador Retriever
38	FGF4	483680	18	48695616	A>G	İntergenik	BICF2S230609	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
39	ACVR2A	476140	19	13718110	T>G	intron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK
40	DDX18, DPP10	476120, 476121	19	35533	C>T	İntergenik	TIGRP2265674	Fels & Distl, 2014a	AÇK
41	LSM4	609922	20	47714388	G>A	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
42	LSM4	609922	20	48071192	G>A	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar

43	LSM4	609922	20	47714336	G>T	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
44	LSM4	609922	20	47714335	G>T	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
45	LSM4	609922	20	47716669	G>A	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
46	RAB7A	404007	20	2704477	A>G	Genin yakınında	BICF2G630227898	Bartolomé vd., 2015	Labrador Retriever
47	LTF	484787	20	45260332	A>G	Ekson (Yanlış anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
48	PBX4	609679	20	46671813	C>G	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
49	CILP2	484804	20	46706734	A>G	3 UTR	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
50	GDF15	484822	20	47636184	G>A	3 UTR	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
51	UNC13	484833	20	48243399	G>-	3 UTR	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
52	NWD1	476678	20	48804130	G>A	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
53	CHERP	610237	20	49019261	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
54	CIB3	610270	20	49318725	C>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever

55	Belirtilmemiş	-	21	43337454	Belirtilmemiş	İntergenik	BICF2P429643	Sánchez-Molano vd., 2014b	Labrador Retriever
56	MANBAL, SRC	610351, 485684	24	28944	C>G	İntergenik	BICF22367279	Fels & Distl, 2014a	AÇK
57	COL6A3	403582	25	51040259	A>G	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
58	COL6A3	403582	25	51046607	A>G	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
59	COL6A3	403582	25	51031100	A>G	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
60	COL6A3	403582	25	51006290	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
61	COL6A3	403582	25	51028472	G>C	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
62	COL6A3	403582	25	51030165	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
63	COL6A3	403582	25	51063452	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
64	COL6A3	403582	25	51034440	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
65	COL6A3	403582	25	51023068	C>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar

66	COL6A3	403582	25	51038074	C>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
67	COL6A3	403582	25	51029326	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
68	COL6A3	403582	25	51042357	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
69	COL6A3	403582	25	51040505	A>G	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
70	INPP5D	100688270	25	47684060	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
71	INPP5D	100688270	25	47664131	C>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
72	INPP5D	100688270	25	47684091	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
73	INPP5D	100688270	25	47685188	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
74	INPP5D	100688270	25	47666842	A>G	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014; Martin, 2019	Labrador Retriever, Tüm Irklar
75	SH3P4	486172	25	49142073	C>T	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
76	HDAC4	607662	25	52402027	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
77	INPP5D	100688270	25	47629272	C>T	Akış Yukarı	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever

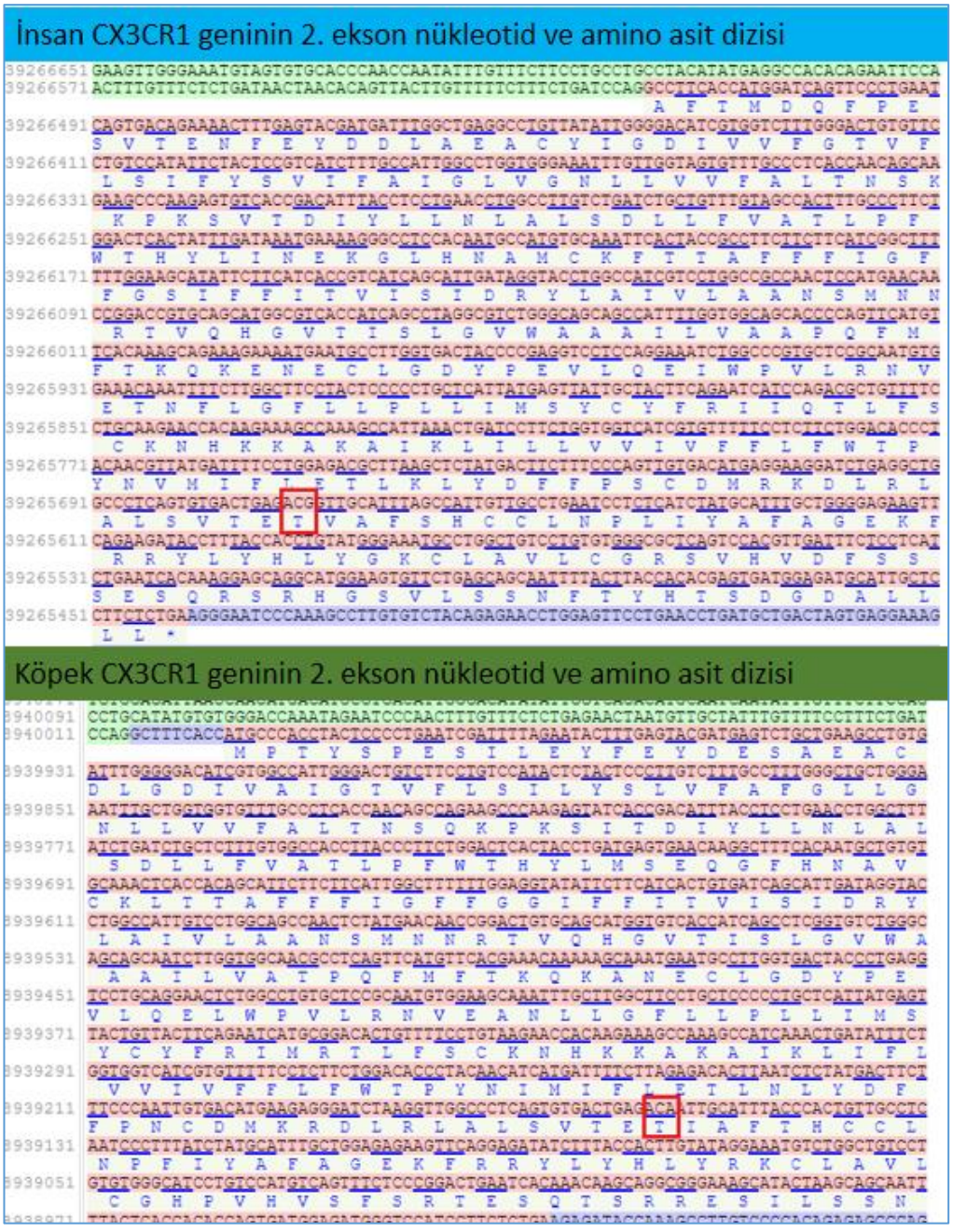
78	LOC100688622	100688622	25	48075297	C>G	Ekson (Yanlış anlamlı)	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
79	LOC100688622	100688622	25	48076278	G>A	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
80	SPP2	610394	25	48396330	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
81	ASB18	486175	25	50050076	G>A	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
82	IQCA1	477415	25	50228063	C>G	İntron	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
83	HES6	607298	25	51736576	T>C	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever
84	KSR2	486291	26	17181	A>G	İntron	BICF2P281364	Fels & Distl, 2014a	AÇK
85	CTBP2	100684514	28	34369342	A>G	İntron	BICF2G630265083	Hayward vd., 2016; Huang vd., 2017,	Golden Retriever, Labrador Retriever
86	PXMP3	487007	29	_	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK
87	MAGP1	-	30	13883057	C>T	İntergenik	BICF2P799261	Zhou vd., 2010,	Labrador Retriever
88	CDS1	487840	32	11331413	A>C	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
89	CDS1	487840	32	11360412	T>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar

90	CDS1	487840	32	11362156	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
91	CDS1	487840	32	11366128	C>T	Ekson (Eş anlamlı)	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
92	CDS1	487840	32	11376468	T>G	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
93	CDS1	487840	32	11376837	T>G	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
94	CDS1	487840	32	12479099	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
95	CDS1	487840	32	11365955	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
96	CDS1	487840	32	11366052	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
97	CDS1	487840	32	11371139	T>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
98	CDS1	487840	32	11365924	C>T	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
99	CDS1	487840	32	11360206	T>G	İntron	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
100	CDS1	487840	32	11378017	A>G	Genin akış aşağısında	Belirtilmememiş	Martin, 2019	Tüm Irklar
101	LOC487836	487839	32	11.265.116	->T	Genin akış yukarısında	Belirtilmememiş	Lavrijsen vd., 2014	Labrador Retriever

102	IBSP	609146	32	29.902.983	C>T	İntron	rs23799713	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK
103	EPHA3	487930	33	973418	T>G	İntron	Belirtilmememiş	Fels vd., 2014b	AÇK
104	EPHA6	607935	33	4052195	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK
105	EPHA3	487930	33	115884	A>C	5 UTR	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK
106	PCNP	478546	33	7967386	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK
107	PCNP	478546	33	7967386	T>C	İntron	Belirtilmememiş	Fels vd., 2014b	AÇK
108	FGF12	478676	34	24.024.002	T>G	İntron	rs851690466	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK
109	TRIO	478610	34	414871	G>A	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013	AÇK
110	TRIO	478610	34	414871	G>A	İntron	Belirtilmememiş	Fels vd., 2014b	AÇK
111	SEMA5A	478622	34	4846215	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK

112	SLC6A3	609304	34	11239992	A>G	İntron	Belirtilmememiş	Distl vd., 2013; Fels vd., 2014b	AÇK
113	DNAH5, CTNND2	606983, 488048	34	4239	C>t	İntergenik	BICF2P1086886	Fels vd., 2014b	AÇK
114	TMEM212, FNDC3B	488168, 488169	34	39346	A>G	intergenik	BICF2P355865	Fels vd., 2014b	AÇK
115	DPP4	478767	36	7366577	G>A	İntergenik	BICF2P1242852	Huang vd., 2017	Labrador Retriever
116	FN1	403845	37	25095511	Belirtil memiş	Genin akış aşağısında	BICF2S3052396	Pfahler & Distl, 2012	Bernese Dağ Köpekleri

Ek 2. İnsanlarda ve köpeklerde CX3CR1 geninin 2. eksonunun nükleotit ve amino asit sekansları.İnsanlarda GKD ile ilişkili olduğu öne sürülen TNP'yi içeren kodon ve köpeklerde karşılık gerdiği yer kırmızı kare içine alınmıştır. NCBI (NCBI-Sequence Viewer 3.30.0, 2018) internet sitesindeki verilerden uyarlanmıştır



Ek 3. Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Kararı

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 59355220-050.04.04 -E.222393 16/04/2018
Konu : Kararlar

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Süleyman KÖK

İlgi: 06.04.2018tarihli dilekçeniz.

"Türkiye'de Üretilen Hizmet Köpeklerinde Kalça Displazisi İle İlişkili Genetik Markırların Araştırılması" isimli projeniz, 15.02.2014 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" çerçevesinde incelemiş olup; Yapılacak çalışma yönetmeliğin 8.maddesi 8.fıkrası k bendinde bahsedilen "Teşhis ve tedavi amaçlı klinik uygulamalar." hükmü gereğince, kapsam dışı olduğundan, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurlundan izin alınmasına gerek yoktur.

Bilgilerinize rica ederim

e-imzalıdır
Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Balkan Yerleşkesi 22030 Edirne
Telefon:2842357641 Faks2842234203
E-Posta:hdek@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://hdek.trakya.edu.tr/
Bilgi için: Enis ULUÇAM
Ünvanı: Başkan

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

Ek 4. CX3CR1 geninde çoğaltılan CX1 fragmentinin DNA sekansı

Showing 750 bp region from base 8939331 to 8940080.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_006605.3

GenBank Graphics

```
>NC_006605.3:8939331-8940080 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1,
whole genome shotgun sequence
TACAGGAAAACAGTGTCCGCATGATTCTGAAGTAACAGTAACTCATAATGAGCAGGGGGAGCAGGAAGCC
AAGCAAATTTGCTTCCACATTGCGGAGCACAGGCCAGAGTTCCTGCAGGACCTCAGGGTAGTCACCAAGG
CATTCATTTGCTTTTTGTTTCGTGAACATGAACTGAGGCGTTGCCACCAAGATTGCTGCTGCCCAGACAC
CGAGGCTGATGGTGACACCATGCTGCACAGTCCGGTTGTTCATAGAGTTGGCTGCCAGGACAATGGCCAG
GTACCTATCAATGCTGATCACAGTGATGAAGAATATACCTCCAAAAAAGCCAATGAAGAAGAATGCTGTG
GTGAGTTTGCACACAGCATTGTGAAAGCCTTGTTCACTCATCAGGTAGTGAGTCCAGAAGGGTAAGGTGG
CCACAAAGAGCAGATCAGATAAAGCCAGGTTCAGGAGGTAAATGTCGGTGATACTCTTGGGCTTCTGGCT
GTTGGTGAGGGCAAACACCACCAGCAAATTTCCCAGCAGCCCAAAGGCAAAGACAAGGGAGTAGAGTATG
GACAGGAAGACAGTCCCAATGGCCACGATGTCCCCCAAATCACAGGCTTCAGCAGACTCATCGTACTCAA
AGTATTCTAAAATCGATTCAGGGGAGTAGGTGGGCATGGTGAAAGCCTGGATCAGAAAGGAAAACAAATA
GCAACATTAGTTCTCAGAGAAACAAAGTTGGGATTCTATTTGGTCCCACA
```

Ek 5. CX3CR1 geninde çoğaltılan CX2 fragmentinin DNA sekansı

Showing 592 bp region from base 8938803 to 8939394.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_006605.3

GenBank Graphics

```
>NC_006605.3:8938803-8939394 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1,
whole genome shotgun sequence
GTTGTTTTTGGGCATTCGGTTCATCATCTCTTATATATAAGAAACAAAAAAGGTCTGTCCTCACTATTCA
GTGTCAGGCTCAGGAACTCTGGGCTCTCTGTGGGGACAAGGCTTTGGTATCTCTTCAGAGAAGGATGGAC
CCATCTCCATCACTGGTGTGGTGAGTAAAATTGCTGCTTAGTATGCTTTCCCGCCTGCTTGTTTGTGATT
CAGTCCGGGAGAAACTGACATGGACAGGATGCCCACACAGGACAGCCAGACATTTCCTATACAAGTGGTA
AAGATATCTCCTGAACTTCTCTCCAGCAAATGCATAGATAAAGGGATTGAGGCAACAGTGGGTAAATGCA
ATTGTCTCAGTCACACTGAGGGCCAACCTTAGATCCCTCTTCATGTCACAATTGGGAAAGAAGTCATAGA
GATTAAGTGTCTCTAAGAAAATCATGATGTTGTAGGGTGTCCAGAAGAGGAAAAACACGATGACCACCAG
AAATATCAGTTTGATGGCTTTGGCTTTCTTGTGGTTCTTACAGGAAAACAGTGTCCGCATGATTCTGAAG
TAACAGTAACTCATAATGAGCAGGGGGAGCAG
```

Ek 6. CX3CR1 geninde çoğaltılan CX3 fragmentinin DNA sekansı

Showing 629 bp region from base 8938293 to 8938921.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_006605.3

GenBank Graphics

```
>NC_006605.3:8938293-8938921 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1,
whole genome shotgun sequence
AGGTTGGTGGGCATCTCTTGTTCTGGCAGGTCAAAACAATACCTGCCCCTTGAGTTTCTTAGAGATATGT
CTTCCTGCATCTCTAACCATGAGATTGGAATGGAAGTTGCCATCTTATCTACTGTCTCTCTGTGGATACA
GCCTGGTCCAGGGATGGACATCTGATTCAAATCTGGCCAATGAGAGCCCTTCCCTGGGAATTTTAACCTT
GGGACCAGTCTCTCACTATTAGCTAAGCTGAGTCTGGGAGCTCTGTCACTACTCAGAGATTTGAGAGCCT
CAGAGAGAGGAAATTCTAGCTGAACGCAAGTTCTAGTTTCTACTTTGAGGGCTTAGCCACTCTCTTGCTC
ATACCACCATGTGAATAATATTCCCCACCTCCTCTTTAGCTAAGCTGGTCTGAGTTTAATCTTTGTCGTT
TGCAAACAAAAAAGCTCTAATATTTGCTGTTAGGGACATGCCTACTCTTTATCAGTCAAATTTTGGGCAGA
ATTCTAAAAAAATGCTTTAGGGTTGTTTTTGGGCATTCGGTTCATCATCTCTTATATATAAGAAACAAAAA
AGGTCTGTCCTCACTATTCAGTGTCAGGCTCAGGAACTCTGGGCTCTCTGTGGGGACAAGGCTTTGGTA
```

Ek 7. CX3CR1 geninde çoğaltılan CX4 fragmentinin DNA sekansı

Showing 556 bp region from base 8937757 to 8938312.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NC_006605.3

GenBank Graphics

```
>NC_006605.3:8937757-8938312 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1,
whole genome shotgun sequence
GCTCTGTCAACACTGCTCCTTTAGCACTGTGCCAGGTGGTGGAAAGCCAAAGTCTGGGAACCAGATAAGA
GAGTTGAGACCTGCAAGAGTTGGTAGTTGGTTCCTCATGCTGGAAAGGATATTCCCTATATGAAAAGTAC
CATTGTGTCCATCCTACAGATAAGGAAGCTGAAGCTGGGCTGGACCCAAGCTACCCAGCAGGCAAGTGAT
GAGCTGGAATTGGAAACCATCCTGGCTCAGTCTGGGCCAGGGTTCTTTCTATATGTCTCCCTGGGCCTGA
TGATGCATAAGTCTGGATGGAAGAGACCTGGATGGCTGAGAGGCTGGATATTTGGGGAATGGAAAGAAAT
GGGGAACCTGTTGGTGTGACTCACCAACAGGAGGGTGGTATGATGGAGGGTCTCAGATTTGAAGCAGTAG
GCACTGGGTGACCATTGTAGGTTTGGGGTATGATAGAAAAGAGTTTAAGGAAGAGGAGGCTGGTAGCATG
TGCTGGCTGGTGTGATCAGTGAGGAGACTGGGCCAGACACATGGTAAGGTTGGTGGGCATCTCTTG
```

Ek 8. CX3CR1 geninde çoğaltılan CX5 fragmentinin DNA sekansı

Showing 633 bp region from base 8937026 to 8937658.

Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

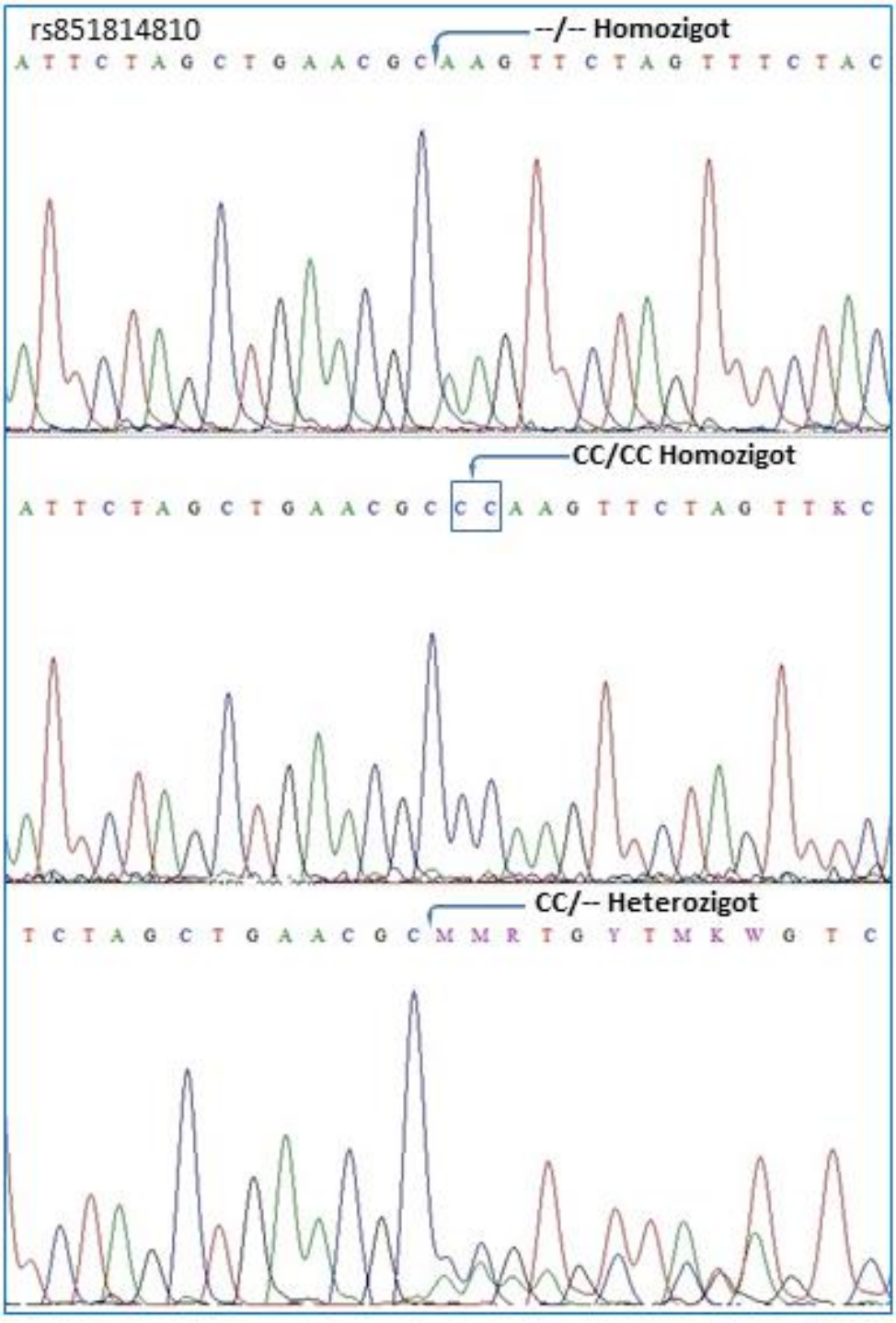
NCBI Reference Sequence: NC_006605.3

GenBank Graphics

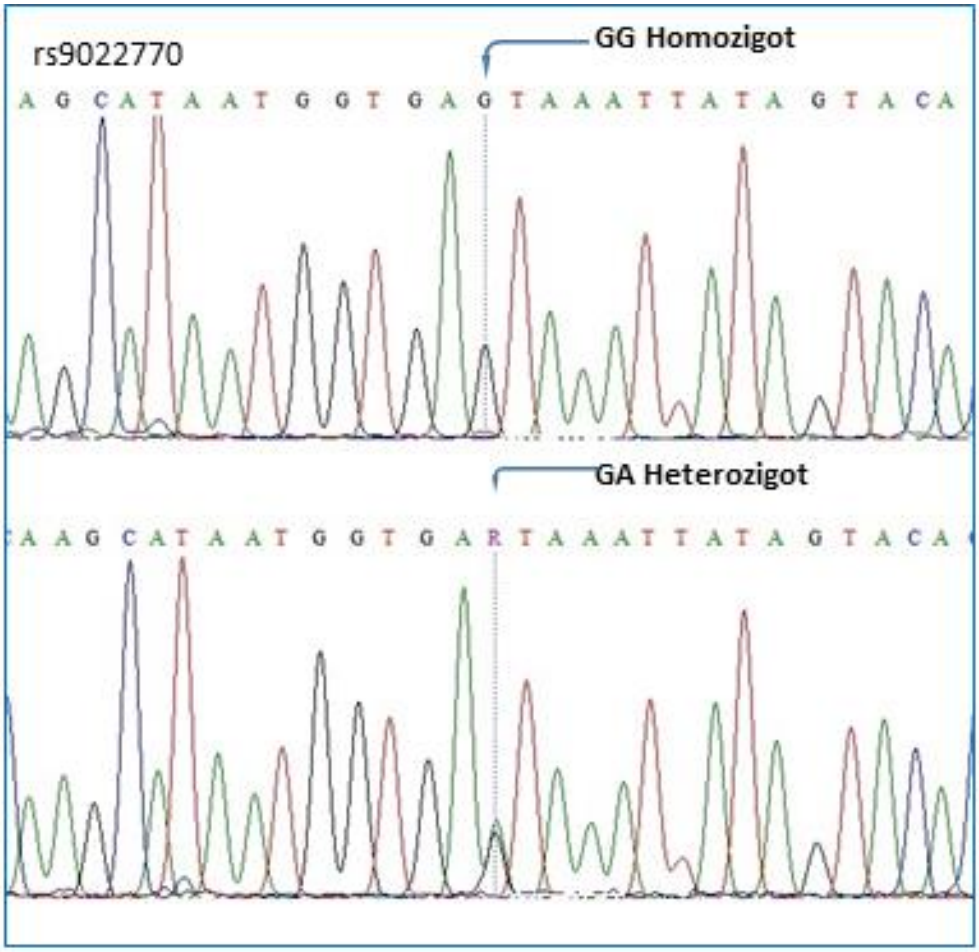
>NC_006605.3:8937026-8937658 Canis lupus familiaris breed boxer chromosome 23, CanFam3.1, whole genome shotgun sequence

CCAGAGGATATCATTGAAGAGGAGAAAGAGAATTACACAGATAGAAGTGCCGTAAAATATGTATTTGCTA
AATAGTGGAACAAGCATAATGGTGAGTAAATTATAGTACACAATCTTAATGGAACATGATTCATTCTCAT
TGATTAAACCAACATATTGACTGCCAAGGAGATGTCAGAAATACAGCAATGAGTCAGATGCCTTCAACAA
GTACACAACCTGGCACATCCTTCTAGAGGGATCATTACAAAACTATACAGAAACAGAGAACCATTTGTGG
CCTAACATTAAGATAAAAATAGCAGATTACAAAACAATCTGTACATGATGCTTTCAAATCTAAACAGTGT
GAAAGTGTGAACATGTTCTGGGTGGGCAAATGAAGGTATTGCATGGTTAGGTTATAGGTGACATTTTCTT
TAGCATTATTACAATTGTTTTTTTCAAGCTCTAAAGTATTAGACCAACCCAAATGTTTACTGAAAAGGTG
GTGGGGGAAAGCTGCTCCTGGGACCCTGGCTCTCCAGGTTGGGCAGGGCCCATAAATGATGGGGCAGGGG
CTCTCCAGATGGGCAGGGCCTGCCATGAAGCAATTGGAAAGGCATATTCAAAGCAACTGGAGGGCTTGGT
CAG

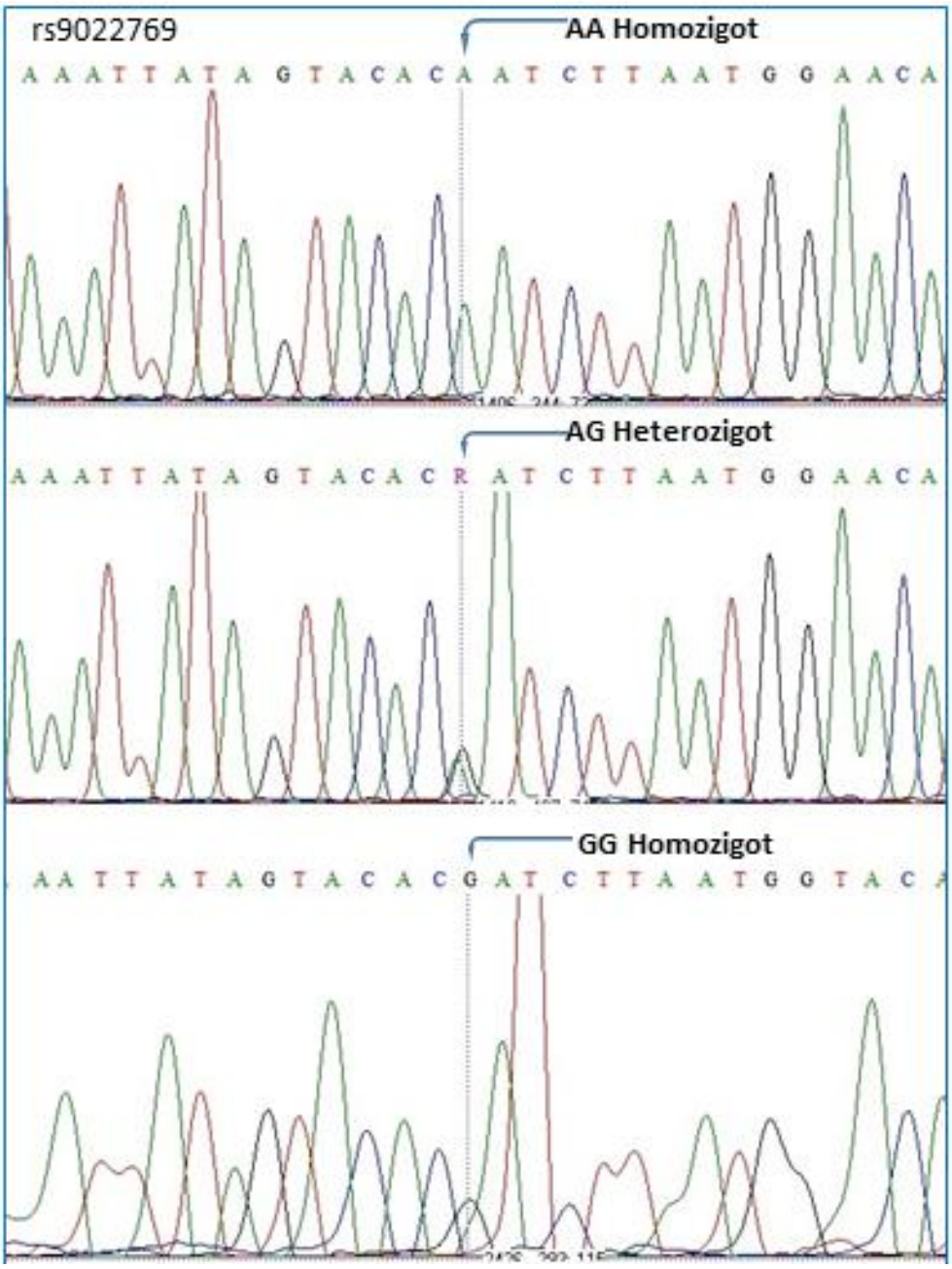
Ek 9 .CX3CR1 genindeki CC insersiyonun DNA dizi analizi grafik sonucu



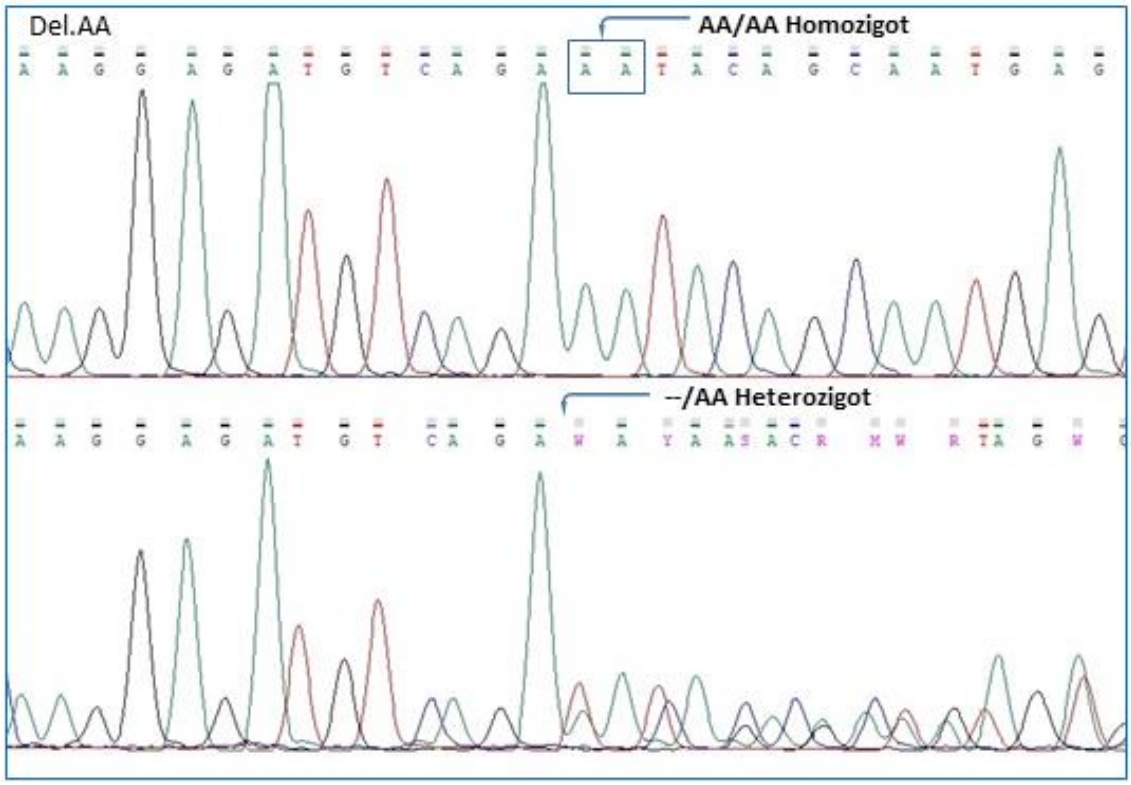
Ek 10. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



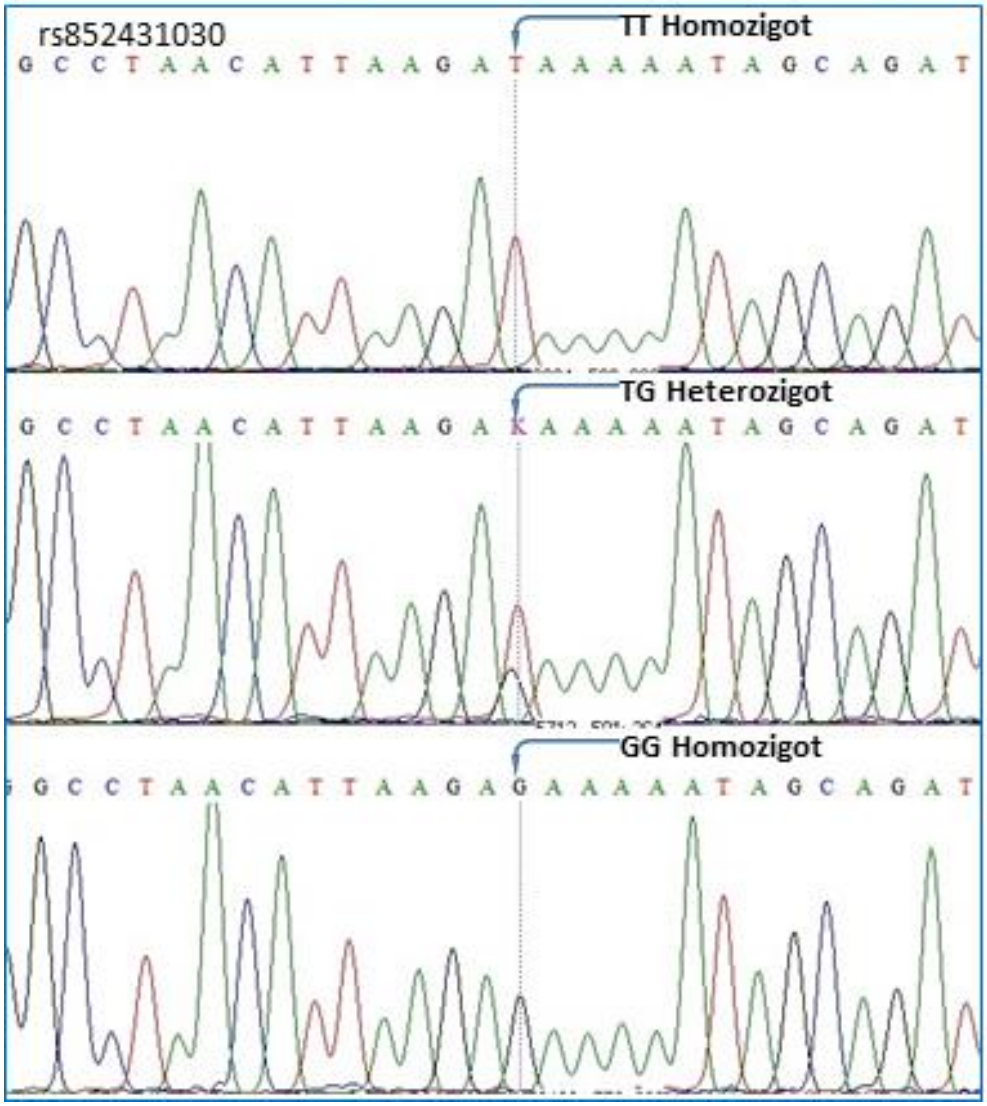
Ek 11. CX3CR1 geni G>A TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



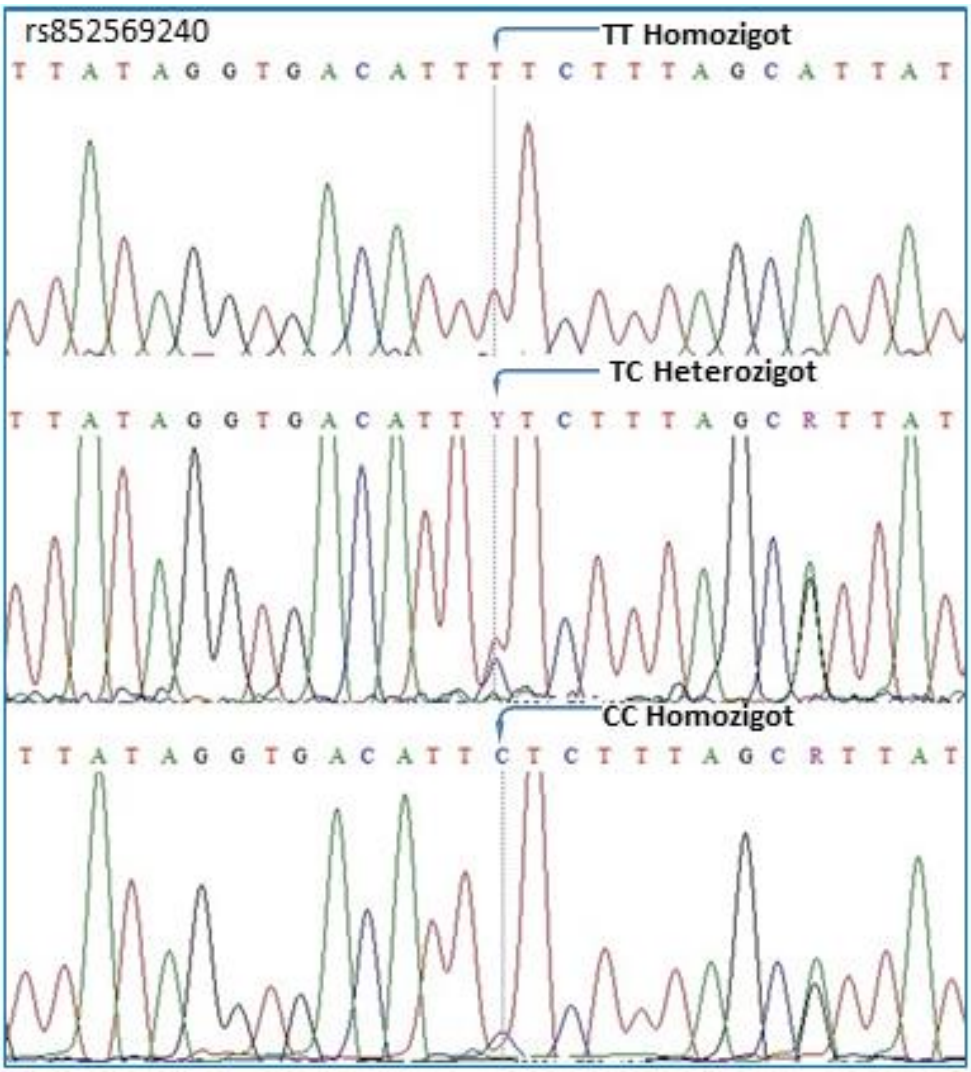
Ek 12. CX3CR1 geni AA delesyonunun DNA dizi analizi grafik sonucu



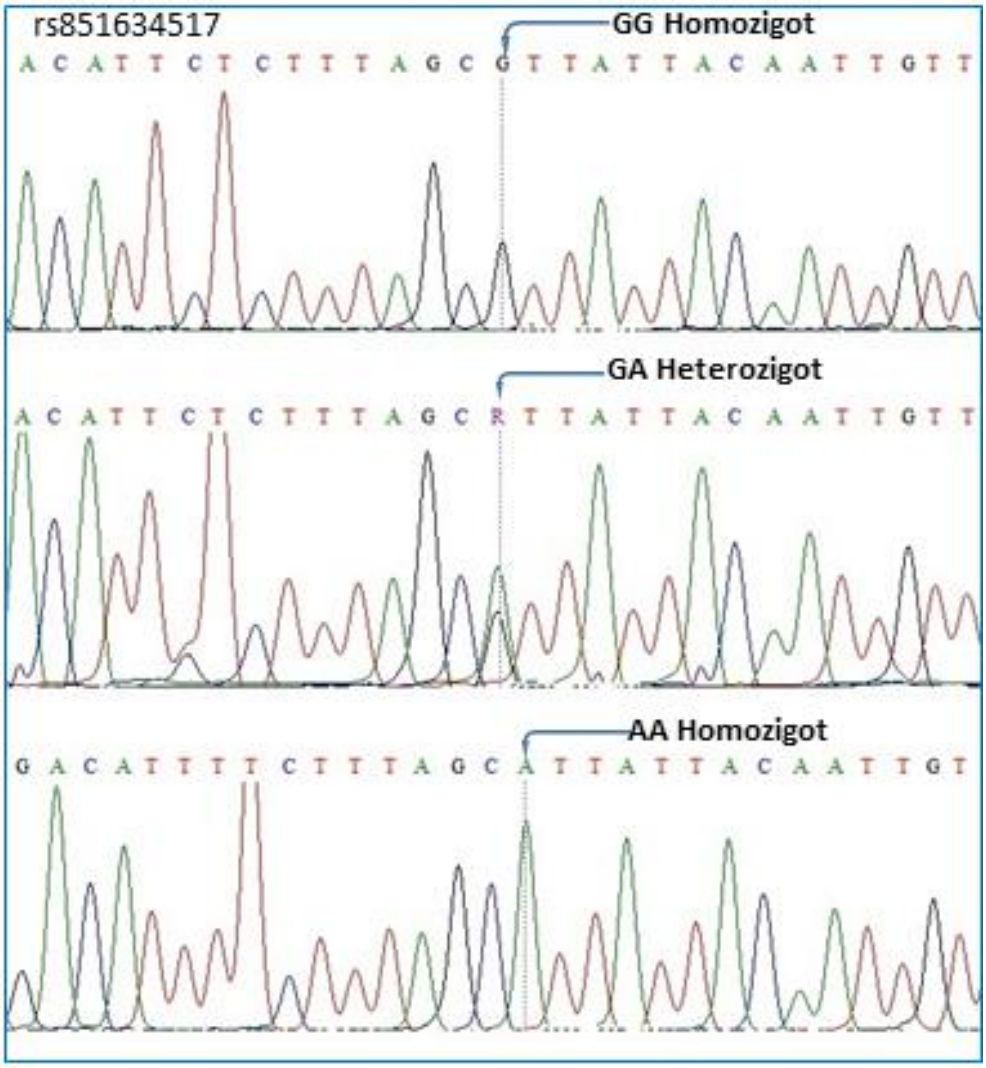
Ek 13. CX3CR1 geni T>G TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



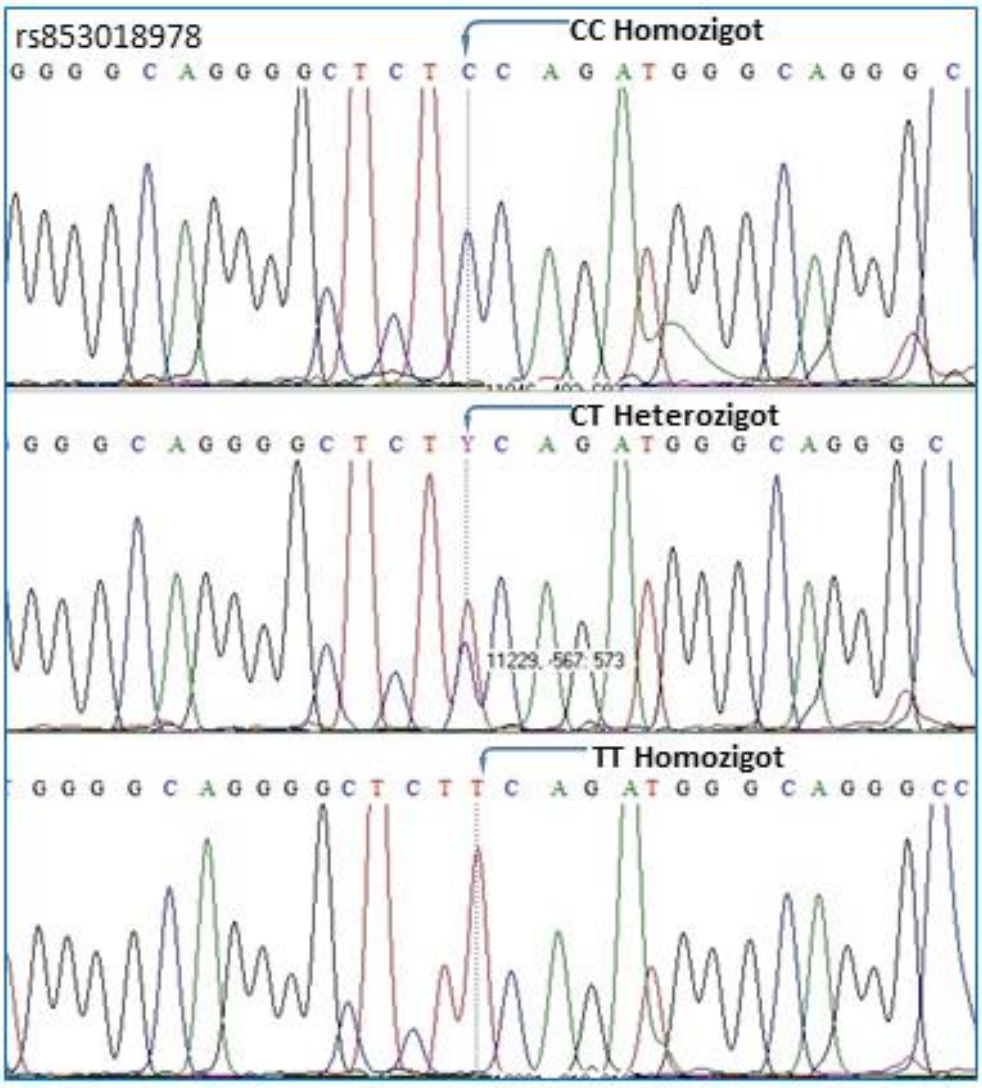
Ek 14. CX3CR1 geni T>C TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



Ek 15. CX3CR1 geni A>G TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



Ek 16. CX3CR1 geni C>T TNP'sinin DNA dizi analizi grafik sonucu



EK 17. Belçika Malinois ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 12 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri

	rs8995004	rs24046746	rs24105396	rs851814810	rs9022770	rs9022769	Del.AA	rs852431030	rs852569240	rs851634517	rs853018978	rs23759713
rs8995004	4.418543e-01	1.968354e-01	1.511980e-01	1.820531e-01	4.611983e-01	**3.241096e-02**	5.692169e-02	3.467057e-01	9.963220e-01	8.434113e-01	3.429048e-01	1.547543e-01
rs24046746	6.109019e-01	2.405050e-01	2.287568e-01	9.967440e-01	6.365725e-01	7.649559e-01	1.802354e-01	6.265701e-01	9.172675e-01	6.118522e-01	9.955544e-01	6.208649e-01
rs24105396	5.685969e-01	3.980044e-01	3.336823e-01	6.802034e-02	2.855532e-01	1.884002e-01	3.312626e-01	7.878249e-02	7.195988e-02	**2.072270e-02**	2.249884e-01	**4.569652e-02**
rs851814810	6.051679e-01	3.916709e-01	4.076145e-01	4.169770e-01	2.169969e-01	4.685861e-01	5.447585e-01	9.879303e-01	6.378466e-01	9.003234e-01	7.990776e-01	5.500276e-01
rs9022770	2.590992e-01	5.549762e-01	3.314527e-01	4.371562e-01	5.808679e-05	-	-	-	7.038216e-01	5.635750e-01	-	8.404063e-01
rs9022769	6.221932e-01	2.405577e-01	5.655949e-01	2.097494e-01	3.013811e-03	2.130275e-02	6.376685e-02	-	8.956249e-01	-	3.009899e-01	**7.647625e-03**
Del.AA	4.845099e-01	4.871340e-01	8.298738e-01	6.778714e-01	2.995938e-01	4.134173e-01	6.742691e-01	-	9.999329e-01	-	4.224227e-01	4.830314e-01
rs852431030	5.895340e-01	2.168850e-01	3.860264e-01	2.571464e-01	5.007657e-03	5.363196e-01	6.253377e-01	1.334439e-01	8.301294e-01	-	9.999736e-01	1.065644e-01
rs852569240	4.366226e-01	3.257334e-01	5.344431e-01	1.569687e-01	9.448906e-04	6.242217e-01	2.013888e-01	9.788520e-01	1.600210e-03	-	8.221645e-01	2.458890e-01
rs851634517	5.274864e-01	2.360724e-01	3.792368e-01	2.736627e-01	6.675257e-02	6.233625e-01	8.176050e-01	7.010235e-01	8.399896e-01	3.056282e-01	-	**3.109221e-02**
rs853018978	3.686389e-01	1.559896e-01	4.446078e-01	1.761093e-01	1.822141e-02	5.115130e-01	6.416054e-01	3.573176e-01	9.991370e-01	7.272815e-01	1.533560e-01	3.446150e-01
rs23759713	5.356666e-01	2.653159e-01	4.055246e-01	1.515854e-01	9.336098e-02	3.235219e-01	8.877403e-01	3.659458e-01	1.130652e-01	2.730967e-01	1.571275e-01	9.621113e-02

EK 18. Labrador Retriever ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri

	rs8995004	rs24046746	rs24105396	rs851814810	rs9022770	rs9022769	rs852431030	rs852569240	rs851634517	rs853018978	rs23759713
rs8995004	0.5763734835	0.1261438767	0.1935789230	**0.0119326090**	0.9944962380	0.0776649048	0.0719846416	0.1399533206	0.4177592156	0.1556575519	0.6208435875
rs24046746	0.6186712601	0.6482236285	0.1257779012	0.7925036488	0.0617228367	0.4663163190	0.1175843323	0.0863743120	**0.0435199439**	0.0812755796	0.2433661699
rs24105396	0.6922535642	0.6560615517	0.6094667396	0.7285896003	**0.0310032338**	0.0521512261	**0.0031958704**	0.1347937081	**0.0118531865**	0.1711653196	0.3915294835
rs851814810	0.3999454807	0.7602586811	0.8036001447	0.0771318259	0.2010427615	**0.0038113901**	**0.0129972628**	**0.0013892791**	**0.0004839271**	**0.0143181306**	0.3323017139
rs9022770	0.6040460588	0.5906506781	0.4758603140	0.2348893701	0.1431613399	0.1490899752	0.1149181957	0.1415846874	0.5346304132	-	0.4936023055
rs9022769	0.5975585992	0.5548093398	0.5276746019	0.4280319442	0.2640715899	0.3693483509	-	0.1200095147	0.0780687462	-	**0.0474877379**
rs852431030	0.7000233005	0.6110219405	0.6736910909	0.6319551805	0.2066773615	0.5425443197	0.6078854362	0.8090909587	-	-	**0.0024622919**
rs852569240	0.6676182046	0.8427258272	0.9035469332	0.7935447010	0.2742936977	0.3975134959	0.5413358810	0.7143770257	-	-	0.0721140219
rs851634517	0.5712184109	0.7388709564	0.8322774626	0.7552066142	0.1046374183	0.3750111329	0.6447442462	0.4913571569	0.5539912056	-	0.1086188755
rs853018978	0.9285361675	0.7850478537	0.7758592639	0.2297658317	0.3679104993	0.9999999327	0.3679104993	0.1555980736	0.4283216922	0.0154537452	0.1532929923
rs23759713	0.8483270233	0.9042362752	0.9267244339	0.7401247785	0.5168803807	0.8032653063	0.9320781126	0.9321475963	0.9586884496	0.9047786680	0.9104797956

EK 19. AÇK ırkı köpeklerde 4 gen üzerinde tespit edilen 11 varyasyonun KKD hastalığının oluşumuna etki etme yönünden birbirleriyle etkileşimleri

	rs8995004	rs24046746	rs24105396	rs851814810	rs9022770	rs9022769	rs852431030	rs852569240	rs851634517	rs853018978	rs23759713	
rs8995004	6.855719e-01	1.000000e+00	4.465392e-01	-	9.660560e-02	-	-	-	-	-	-	1.837687e-01
rs24046746	3.120626e-01	2.033501e-08	-	-	9.999649e-01	-	-	-	-	-	-	1.000000e+00
rs24105396	8.173647e-01	8.426919e-03	1.411372e-01	-	4.868243e-01	-	-	-	-	-	-	1.274665e-01
rs851814810	5.936749e-01	-	1.154998e-01	2.518465e-01	-	-	-	-	-	-	-	-
rs9022770	6.766841e-01	4.973820e-01	4.370402e-01	9.328331e-02	2.786057e-01	-	-	-	-	-	-	7.781476e-01
rs9022769	6.605844e-01	4.577269e-01	1.014516e-01	2.950394e-01	2.646644e-01	3.913945e-01	-	-	-	-	-	-
rs852431030	6.605844e-01	4.577269e-01	1.014516e-01	2.950394e-01	2.646644e-01	-	3.913945e-01	-	-	-	-	-
rs852569240	7.174346e-01	5.715985e-01	1.551187e-01	3.294844e-01	2.828252e-01	2.812562e-01	2.812562e-01	4.740093e-01	-	-	-	-
rs851634517	7.174346e-01	5.715985e-01	1.551187e-01	3.294844e-01	2.828252e-01	2.812562e-01	2.812562e-01	-	4.740093e-01	-	-	-
rs853018978	6.605844e-01	4.577269e-01	1.014516e-01	2.950394e-01	2.646644e-01	-	-	2.812562e-01	2.812562e-01	3.913945e-01	-	-
rs23759713	5.397609e-01	3.477496e-03	9.588646e-02	1.685775e-01	5.016165e-01	3.056669e-01	3.056669e-01	4.096316e-01	4.096316e-01	3.056669e-01	6.663426e-02	

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Gelibolu'da doğdum, ilköğrenim, ortaöğrenim ve lise eğitimimi burada aldıktan sonra, 2001 yılında Ankara Üniversite Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2017 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarında (NABİLTEM) uzman olarak başladığım görevime devam etmekteyim.

Tez Öğrencisine Ait Tez İle İlgili Bilimsel Faaliyetler;

Kök S., Atalay S., Genetic Markers Associated With Canine Hip Dysplasia, *International Agricultural, Biological Life Science Conference* (02.09.2018-05.09.2018).

SCI Expanded Kapsamındaki Yayınları;

Kaplan, S., Atalay, S. (2018). Single Nucleotide Polymorphism of Ovine Leptin and Insulin-Like Growth Factor 1 Gene in Kivircik Crossbred Ewes. *Pakistan Journal of Zoology, 50*(3).

Kök, S., Atalay, S. (2018). The Use of Various SNPs in CAST and CAPN1 Genes to Determine the Meat Tenderness in Turkish Grey Cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 24*(1), 1-8.

Kök, S., Atalay, S., Eken, H. S., & Savasci, M. (2017). The genetic characterization of Turkish grey cattle with regard to UoG Cast, CAPN1 316 and CAPN1 4751 markers. *Pakistan Journal of Zoology, 49*(1).

Arun, Ö. Ö., Ciftcioglu, G., Altunatmaz, S. S., Atalay, S., Savasci, M., & Eken, H. (2014). Effect of processing on PCR detection of animal species in meat products. *Kafkas Univ Vet Fak Derg, 20*(6), 945-950.

Kök, S., Atalay, S., Savaşçı, M., & Eken, H. S. (2013). Characterization of calpastatin gene in purebred and crossbred Turkish Grey Steppe cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg, 19*(2), 203-206.

Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler;

Kök, S., Atalay, S., Vapur, G., & Soysal, M. İ. (2019) Sığırlarda Kalpain ve Kalpastatin Gen Polimorfizmlerinin Et Tekstürünün İyileştirilmesi Çalışmalarında Kullanımı. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 59(2), 87-96.

Kök, S., Atalay, S. (2018). Determination of the fraud of processed meat products by ELISA. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58(2), 95-98.

Kaplan S., Atalay S. (2017) Determination of Calpastatin Gene Polymorphism in Kıvırcık Crossbred Ewes by PCR-RFLP Method, *Selcuk Journal of Agriculture and Food Science*, cilt 31, ss. 147-150.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

Kök, S., Kaplan, S., Atalay, S., 2019. "Anadolu Mandalarının CAPN1 Geni 1. ve 2. Eksonları ile 1. İntron Bölgelerinin Genetik Karakterizasyonlarının Tanımlanması". *12. Dünya Mandacılık Kongresi. 18-20 Eylül, İstanbul. Kongre Özet Kitabı*, s 25. (Eylül 2019)

Kök S., Atalay S., Investigation of genetic markers associated with resistance to infectious diseases in cattle, *International Agricultural, Biological Life Science Conference* (02.09.2018-05.09.2018).

Kök S., Atalay S., Association between GHRH, GHR genes polymorphisms and growth in cattle, *8th Balkan Animal Science Conference* (06.09.2017-08.09.2017)

Kök S., Atalay S., GH1 gene polymorphisms associated economic traits ın cattle, *2nd International Balkan Agriculture Congress* (16.05.2017-18.05.2017).

Atalay S., Kaplan S., Narinç D., Gürkan E. K., Microsatellite Markers Assisted Genetic Studies in Poultry, *International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences* (18.04.2017-21.04.2017).

Atalay S., Kaplan S., Narinç D., Gürkan E. K., Associations between IGF-1 Gene Polymorphisms and Growth Traits in Chicken, *International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences* (18.04.2017-21.04.2017).

Atalay S., Genetic researches on growth traits of Japanese quail, *International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences* (18.04.2017-21.04.2017).

Kaplan S., Atalay S., Narinç D., Gürcan E. K., Using Bioinformatics in Animal Genetics Studies, *International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences* (18.04.2017-21.04.2017).

Kök S., Atalay S., In ghrelin gene of cattle has been determined of rs110968631 SNP with usage of ARMS-PCR and PCR-RFLP methods, *International Bioengineering Conference* (13.10.2016-14.10.2016).

Kök S., Atalay S., Çobanoğlu Ö., Balcı F., Gürcan E. K., Soysal M. İ., A discussion on the buffalo genome example of growth hormone gene, *Asian Buffalo Congress* (21.04.2015-25.04.2015).

Arun Ö. Ö., Çiftçioğlu G. R., Altunalmaz S. S., Atalay S., Savaşçı m., Eken H. s., Pcr Detection Of Meat Species In Heat Processed Meat Products, *8th JointScientific Symposium of Veterinary Faculties* (09.03.2013-12.03.2013).

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

Atalay S., Kök S., Avcıbaşı Y., Et Ürünlerinde Farklı Hayvan Türlerinin ELISA Tekniği İle Tespit Edilmesi, *12. Gıda Kongresi* (05.10.2016-07.10.2016).

Kök S., Atalay S., Sığır Eti Gevrekliğini Belirlemede CAST ve CAPN1 Genlerindeki SNP lerin Kullanımı, *12. Gıda Kongresi* (05.10.2016-07.10.2016).

Kök S., Atalay S., Eken H. S., Savaşçı M., Bozırk Sığır Sürülerinde Akrabalı Yetiştirme Katsayılarının Tartışılması, *Ulusal Tarım Kongresi* (29.10.2015-31.10.2015).

Ulusal Projeler

Türkiye'de Üretilen Hizmet Köpeklerinde Kalça Displazisi İle İlişkili Genetik Markırların Araştırılması. Trakya Üniversitesi Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2018- Devam ediyor.

Japon Bıldırcınlarında Et Kalitesi Özellikleri İle Cast (kalpastatin) Ve Calpain (kalpain) Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişkiler, NKÜ Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı 2018- 2020

Hastalıklara Direnç İle İlişkili Olan TNF, TLR8 ve NOD2 Genlerindeki Polimorfizmlerin Anadolu Mandalarında Araştırılması, Selçuk Üniversitesi Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2018-2019

Kıvırcık Melezi Kuzularda Leptin, Kalpastatin Ve İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu 1 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması, NKÜ Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017-2017.

Türk Boz Irkı sıgırlarda UoG-CAST, CAPN1 316 ve CAPN1 4751 Marker Genotipleri Arastırılması Trakya Üniversitesi Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2013-2015.