



Faculteit Bio - ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014-2015

Variatie in collageen- en collagenase genen bij de hond

Dorien Vergaelen

Promotor: Prof. dr. Frank Coopman, DVM

Tutor: ing. Elien Verelst

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de biowetenschappen: Land- en tuinbouwkunde



Faculteit Bio - ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014-2015

Variatie in collageen- en collagenase genen bij de hond

Dorien Vergaelen

Promotor: Prof. dr. Frank Coopman, DVM

Tutor: ing. Elien Verelst

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de biowetenschappen: Land- en tuinbouwkunde

CONFIDENTIALITEIT – BELANGRIJK – GELIEVE DIT EERST TE LEZEN

Deze masterproef bevat vertrouwelijke informatie en/of vertrouwelijke onderzoeksresultaten die toebehoren aan de Universiteit Gent of aan derden. Deze masterproef of enig onderdeel ervan mag op geen enkele wijze publiek gemaakt worden zonder de uitdrukkelijke schriftelijke voorafgaande toestemming vanwege de Universiteit Gent. Zo mag de masterproef onder geen voorwaarde door derden worden ingekeken of aan derden worden meegedeeld. Het nemen van kopieën of het op eender welke wijze dupliceren van de masterproef is verboden. Het niet respecteren van de vertrouwelijke aard van de masterproef kan onherstelbare schade veroorzaken aan de Universiteit Gent.

CONFIDENTIALITY NOTICE – IMPORTANT – PLEASE READ FIRST

This document may contain confidential information proprietary to the University of Ghent. It is therefore strictly forbidden to publish, cite or make public in any way this document or any part thereof without the express written permission by the University of Ghent. Under no circumstance this document may be communicated to or put at the disposal of third parties; photocopying or duplicating it in any other way is strictly prohibited. Disregarding the confidential nature of this document may cause irremediable damage to the University of Ghent.

Woord vooraf

Deze masterproef zou niet tot stand gekomen zijn zonder de hulp van vele mensen. Eerst en vooral zou ik mijn promotor, prof dr. Frank Coopman, willen bedanken voor het onderwerp, de begeleiding en het deskundig advies bij het schrijven van mijn scriptie. Ing. Elien Verelst wil ik enorm danken voor de hulp bij de staalverzameling, het nalezen van de scriptie, de begeleiding in het laboratorium, de ondersteuning bij het verwerken van de resultaten en haar enthousiasme. Voor de hulp bij de primerontwikkeling en de praktische tips bij het analyseren van de swabs wil ik graag ing. Heleen Brusselmans, Maxime Baert en Gorik Vrancaert bedanken.

Zonder de speekselstalen was er geen onderzoek. Daarom in eerste instantie een welgemeende dankuwel aan alle dierenartsen die mij geholpen hebben bij het gericht zoeken naar patiënten. Ook wil ik graag de vele fokkers en hondeneigenaars bedanken die mij toestemming gaven om een speekselwab af te nemen. Zij hebben mij op alle mogelijke momenten van de dag met open armen ontvangen, waarvoor dank.

Tot slot zou ik graag nog een aantal bijzondere mensen willen bedanken. Eerst en vooral wil ik mijn ouders danken voor het geduld, het geloof in mij en de jarenlange ondersteuning tijdens mijn studies. Ook vrienden en familie stonden altijd klaar om een handje te helpen. En last but not least dank aan mijn broer en zus voor het nalezen van deze scriptie en de onbeschrijflijke vriendschap.

Bedankt!

Samenvatting

Heuplaxiteit is een multifactoriële aandoening die frequent voorkomt bij vele hondenrassen (o.a. de Duitse Herder en de Golden Retriever) en leidt tot vervelende problemen. In een groot aantal gevallen geeft heuplaxiteit aanleiding tot manken en artrose, waarbij in ernstige gevallen zelfs tot euthanasie moet worden overgegaan. Een mogelijke genetische oorzaak van heuplaxiteit ligt op het niveau van collageen of collagenase genen. Zo veroorzaakt een mutatie in het collagenase gen ADAMTS17 primaire lens luxatie bij de hond. Daardoor is het een interessant kandidaatgen om targeted exome resequencing op uit te testen. Uit de Akela database, die 1279 datapunten bevat, werden vier stalen geselecteerd (twee honden met een DI > 0,7 en twee controlehonden met een DI van 0,29/0,23 en 0,34/0,34). Hierop werd een sequentieanalyse van de exonen uitgevoerd. Uit deze analyse is geen genetische variatie naar voor gekomen die geassocieerd kan worden met heuplaxiteit bij honden. Daarnaast heeft de statistische analyse uitgewezen dat de aanwezigheid van heupdysplasie gecorreleerd is met het geslacht en het ras. Het belangrijkste resultaat is het feit dat de genetische sequentieanalyse succesvol is en verder kan uitgewerkt worden als basis voor de zoektocht naar oorzakelijke mutaties van erfelijke kenmerken en aandoeningen. Tot slot wordt de huidige collectiemethode best iets aangepast om het onderzoek meer potentieel te bieden. Hierbij wordt enerzijds het aantal stalen per ras best uitgebreid tot minstens tien en anderzijds is het aan te raden om het aantal deelnemende fokkers te beperken.

Sleutelwoorden Collageen genen – Collagenase genen – Hond – Heuplaxiteit - SNPs

Abstract

Hip laxity is a multifactorial disease which frequently occurs in many dog breeds (i.a. the German Shepherd and the Golden Retriever) and leads to various problems. In most cases it causes lameness and osteoarthritis, but in severe cases owners can even be forced to euthanize their dog. A possible genetic cause of hip laxity is located at the level of collagen or collagenase genes. A mutation in the collagenase gene ADAMTS17 causes primary lens luxation in dogs, which is therefore an interesting gene for targeted exome resequencing. From the Akela database, which contains in total 1279 samples, four samples were chosen to initiate the experiments. On these four selected samples (two dogs with a DI > 0.7, and two control dogs with a DI of 0.29 / 0.23 and 0.34 / 0.34) a sequence analysis of the exons has been performed. As a result of this analysis, no specific genetic variations that can be associated with hip laxity in dogs, has been detected. Further statistical analysis of the database has shown that the presence of hip dysplasia is correlated with gender and breed. With these results, one can conclude that the genetic sequence analysis has been successful throughout this research. In the future, gene sequencing studies will certainly serve as a basis for research concerning causative mutations of hereditary characteristics and disorders. In addition, further optimization of the current collection method will lead to more representative results in the statistical analysis. This optimization can be performed by both extending the number of samples within a specific breed (by a minimum amount of ten) and limiting the number of participating breeders.

Key words Collagen genes - Collagenase genes – Dog – Hip laxity – SNPs

Inhoudsopgave

1	Literatuurstudie	25
1.1	Collageen	25
1.1.1	Overzicht van de verschillende collageen families.....	25
1.1.2	Structuur van collageen.....	27
1.2	Collagenase.....	28
1.2.1	Overzicht van de verschillende collagenase families	28
1.2.2	Structuur van collagenase	31
1.3	Genetische variaties	32
1.3.1	Overzicht van variatie in collageengenen	34
1.3.2	Overzicht van variatie in collagenase genen	44
1.4	Biochemische relatie tussen collageen en collagenase	50
1.5	Heuplaxiteit en mogelijke rol van collageen en collagenase.....	53
2	Materiaal & Methoden.....	59
2.1	Inleiding	59
2.2	Vorbereiden en verzamelen van speekselstalen	59
2.2.1	Selectie van honden.....	59
2.2.2	Verzamelen van speeksel	60
2.2.3	Aanvullen databank.....	61
2.3	Statistische methode voor analyse	61
2.4	Kandidaat gen ADAMTS17	61
2.5	DNA extractie	62
2.5.1	Gebruikte producten.....	62
2.5.2	Methode	62
2.6	Metten concentratie DNA.....	63
2.6.1	Gebruikte producten.....	63
2.6.2	Methode	63
2.7	Optimale condities PCR bepalen	64
2.7.1	Gebruikte producten.....	64
2.7.2	Vorbereiding Primers.....	64
2.7.3	Vorbereiding PCR oplossing	65
2.7.4	De gradiënt PCR	66
2.8	Gel elektroforese	67
2.8.1	Gebruikte producten.....	67
2.8.2	Aanmaken agarose gel	67
2.8.3	Vorbereiding en uitvoering	67

2.9	Zichtbaar maken van het DNA	68
2.9.1	Gebruikte producten.....	68
2.9.2	Methode	68
2.10	PCR en gelelektroforese voor sequenering.....	68
2.10.1	Gebruikte producten.....	68
2.10.2	Methode	69
2.11	Zuiveren van het DNA.....	69
2.11.1	Gebruikte producten.....	69
2.11.2	Methode	69
2.12	Vriesdrogen van het DNA	70
2.12.1	Gebruikte producten.....	70
2.12.2	Methode	70
2.13	Sequentieanalyse	70
2.13.1	Keuze chromatogram	70
2.13.2	Weergave exonen	70
2.13.3	Alignment	71
2.13.4	Effect SNP op aminozuurniveau.....	71
3	Resultaten	73
3.1	Statistische analyse	73
3.1.1	Beschrijvende statistiek.....	73
3.1.2	Steekproef analyse	81
3.2	DNA extractie en bepaling concentraties	85
3.3	PCR en Gel elektroforese	85
3.4	Sequentieanalyse	88
3.4.1	Keuze chromatogram	88
3.4.2	Weergave exonen	90
3.4.3	Alignment	90
3.4.4	Effect SNP op aminozuurniveau.....	93
4	Bespreking	95
5	Algemeen besluit	97
6	Referentielijst.....	99
7	Bijlagen	109

Lijst met gebruikte afkortingen

µl	Microliter
A	Adenine
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ADAMTSL	A disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs-like
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Asparaginezuur
ASTL	Astacin- like metallo- endopeptidase
AZ	Aminozuur
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	Bone morphogenetic protein
BVA/KC	British Veterinary Association/ The Kennel Club
C	Cytosine
CI	Compressie Index
CNV	Copy Number Variations
COL	Collageen
CRD3	Cone Rod Dystrophy 3
Cys	Cysteïne
DI	Distractie Index
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
ECM	Extracellulaire matrix
ED	Elleboogdysplasie
FACIT	Fibrillar – Associated Collagens with Interrupted Triple – Helix
FCI	Fédération Cynologique Internationale
G	Guanine
GBM	Glomulaire Basale Membraan
Glu	Glutaminezuur
Gly	Glycine
HD	Heupdysplasie
His	Histidine
Hpx	Hemopexin
IDT	Integrated DNA Technologies
Ile	Isoleucine
INDEL	Insertie/Deletie
IOP	Intra oculaire druk
KMSH	Koninklijke Maatschappij Sint - Hubertus
Leu	Leucine

LMLN	Leishmanolysinen
Lys	Lysine
MEP	Meprine
MLS	Musladin – Lueke syndroom
MMP	Matrix metalloproteinasen
MSAT	Microsatellites
Multiplexins	Multiple Triple Helix domains with Interruptions
NA	Norberghoek
nM	Nanomolair
NON-SYN	Non-synonymous
OD1	Oculoskeletal Dysplasia 1
OD2	Oculoskeletal Dysplasia 2
OFA	Orthopedic Foundation for Animals
OI	Osteogenesis Imperfecta
ORF	Open Reading Frame
PCAG	Primair gesloten kamerhoek glaucoom
PCG	Primair congenitaal glaucoom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PennHIP	Pennsylvania Hip Improvement Program
PKK	Phosphoribulokinase
PLL	Primaire lens luxatie
POAG	Primair open kamerhoek glaucoom
RDEB	Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa
RNA	Ribonucleïnezuur
SD2	Skeletal Dysplasia 2
SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H, collagen binding proteïn 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRBD1	S1 RNA binding domain 1
SSR	Simple Sequence Repeats
SYN	Synonymous
T	Thymine
Thr	Threonine
TIPLO	Tibia Plateau Leveling Osteotomy
TLL	Taloid- like
Tyr	Tyrosine
v/v	Mengsel volume/volume
Val	Valine

Lijst met figuren

Figuur 1: Structuurformule glycine, proline en hydroxyproline (ChemBioDraw , 2014).	27
Figuur 2: Structuur van collageen (Engel & Bächinger, 2005).	27
Figuur 3: Indeling metalloproteasen (Barrett et al., 2004; Rivera et al., 2010).	29
Figuur 4: Katalytisch domein van de metzincinen (Lancellotti & De Cristofaro, 2011).	31
Figuur 5: Schematische weergave van de structuur van de metzincinen (Sekhon, 2010).	31
Figuur 6: Voorbeeld van een SNP (Seemann, 2013).	32
Figuur 7: Voorbeeld van een synonymous- en non-synonymous mutatie (Seemann, 2013).	33
Figuur 8: Schematische voorstelling van het ossificatiecentrum in de epifyse (Physeal growth plate, s.a.).	50
Figuur 9: pro – MMP1 (Nagase & Visse, 2011).	52
Figuur 10: Ontvouwingmodellen (Nagase & Visse, 2011).	53
Figuur 11: Anatomie van het heupgewricht (Klemm, 2009).	54
Figuur 12: Schematische weergave van de Norberghoek (Kapatkin et al., 2002).	55
Figuur 13: De distractie index (Kapatkin et al., 2002).	57
Figuur 14: Radiografische opnamen pennHIP (Smith G. , s.a.).	58
Figuur 15: Collectie kit Copan eNAT™ (Multiplex PCR, 2013).	60
Figuur 16: Leeftijd (in dagen) in relatie tot de heupstatus.	81
Figuur 17: Overzicht Leeftijdscategorieën in relatie tot HD.	82
Figuur 18: Overzicht van de aanwezigheid van HD bij 28 verschillende rassen.	84
Figuur 19: Testen primers exonen 1, 2, 3, 4, 6, 7 & 8.	85
Figuur 20: Testen primers exonen 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 & 20.	86
Figuur 21: Testen primers exonen 21, 22, 23a & 23b.	86
Figuur 22: Testen primers exonen 23c & 23d.	86
Figuur 23: ADAMTS17 exonen 6, 7, 17 en 21 bij honden 2007, 1616, 1617 en onbekend.	87
Figuur 24: 1617.01 en onbek.01 bij annealing temperatuur 53,8 °C.	87
Figuur 25: Forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.	88
Figuur 26: Close-up forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.	89

Figuur 27: Close-up forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.....	89
Figuur 28: Reverse chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.	89
Figuur 29: Exon 17 Akela blanco	90
Figuur 30: Weergave van de aminozuursequenties van collageen type I (Bella, Eaton, Brodsky, & Berman, 1994).	114
Figuur 31: Katalytisch domein van MMP1 (Guex & Peitsch, 1997).	115

Lijst met tabellen

Tabel 1: Overzicht collageen families bij de hond (Kielty & Grant, 2002; Ricard – Blum et al., 2005; Stevens & Lowe, 2007; Hulmes, 2008).	26
Tabel 2: Overzicht superfamilie van de metzincinen bij de hond (Bode et al., 1993; Borkakoti, 1999; Luen Tang, 2001; Rawlings et al., 2013).	30
Tabel 3: Samenvatting genetische variaties	33
Tabel 4: Overzicht downstream variaties COL1A2 (NCBI: Gene, s.a.).	34
Tabel 5: Overzicht mutagene variaties COL1A2 (1,2 en 3) en SERPINH1 (4) (Campbell et al., 2001; Drögemüller et al., 2009; NCBI: Gene, s.a.).	35
Tabel 6: Overzicht andere variatie COL1A2 (NCBI: Gene, s.a.).	36
Tabel 7: Overzicht van enkele inerte variaties COL4A4 (NCBI: Gene, s.a.).	37
Tabel 8: Overzicht mutagene variaties COL4A4 (Davidson et al., 2007; NCBI: Gene, s.a.).	37
Tabel 9: Overzicht andere variaties COL4A4 (NCBI: Gene, s.a.).	38
Tabel 10: Overzicht inerte variaties COL7A1 (NCBI: Gene, s.a.).	39
Tabel 11: Overzicht mutagene variatie COL7A1 (NCBI: Gene, s.a.).	39
Tabel 12: Overzicht andere variaties COL9A2 (Goldstein et al., 2010).	41
Tabel 13: Overzicht andere variaties COL9A2 (NCBI: Gene, s.a.).	41
Tabel 14: Overzicht mutagene variatie COL9A3 (Goldstein et al., 2010).	42
Tabel 15: Overzicht andere variaties COL9A3 (NCBI: Gene, s.a.).	42
Tabel 16: Overzicht inerte variaties COL11A2 (NCBI: Gene, s.a.).	43
Tabel 17: Overzicht mutagene variaties ADAM9 (NCBI: Gene, s.a.).	44
Tabel 18: Overzicht andere variaties ADAM9 (Goldstein et al., 2010).	45
Tabel 19: Overzicht andere variaties ADAM9 (NCBI: Gene, s.a.).	45
Tabel 20: Overzicht inerte variaties ADAMTS10 (NCBI: Gene, s.a.).	46
Tabel 21: Overzicht mutagene variatie ADAMTS10 en SRBD1 (Kanemaki et al., 2013).	47
Tabel 22: Overzicht inerte variaties ADAMTS17 (NCBI: Gene, s.a.).	47
Tabel 23: Overzicht mutagene variaties ADAMTS17 (Farias et al., 2010; NCBI: Gene, s.a.).	48
Tabel 24: Overzicht inerte variaties ADAMTSL2 (NCBI: Gene, s.a.).	49
Tabel 25: Overzicht mutagene variatie ADAMTSL2 (Bader et al., 2010).	49

Tabel 26: FCI classificatie (Flüeckiger, 2007; Hanssen, s.a.).....	56
Tabel 27: Overzicht pennHIP versus FCI – score (Williams, 2010).....	58
Tabel 28: Overzicht PCR oplossing	65
Tabel 29: Temperatuurcyclus	66
Tabel 30: De PCR.	66
Tabel 31: Overzicht verzamelde stalen per ras.....	73
Tabel 32: Frequentietabel geslacht.....	75
Tabel 33: Frequentie type oorstanden.	75
Tabel 34: Frequentie cryptorchidie.	76
Tabel 35: Frequentie tandtekorten.....	76
Tabel 36: Frequentie tekort per tandtype.	76
Tabel 37: Frequentie polydactylie.....	77
Tabel 38: Frequentie haartype.....	77
Tabel 39: Frequentie voorkomen heuplaxiteit.	78
Tabel 40: Frequentie voorkomen per type HD.	78
Tabel 41: Frequentie DI links.....	79
Tabel 42: Frequentie DI rechts.	79
Tabel 43: Frequentie aanwezigheid elleboogdysplasie (ED).....	79
Tabel 44: Bijkomende informatie ziekten.	80
Tabel 45: Frequentie DNA profiel.	80
Tabel 46: Frequentie aanwezigheid HD i.f.v. het geslacht.	82
Tabel 47: Frequentie aanwezigheid HD i.f.v. het ras	83
Tabel 48: Overzicht onderzochte stalen.	85
Tabel 49: De PCR bij annealing temperatuur van 50.7°C	87
Tabel 50: Sequenties exon 6.....	90
Tabel 51: Sequenties exon 7	91
Tabel 52: Sequenties exon 17	92
Tabel 53: Gedetailleerd overzicht collageen families bij de hond (Kielty & Grant, 2002; Ricard – Blum et al., 2005; Stevens & Lowe, 2007; Hulmes, 2008; Omelyanenko et al., 2014).....	109
Tabel 54: Gedetailleerd overzicht collagenase families bij de hond (Bode et al., 1993; Borkakoti, 1999; Luen Tang, 2001; Rawlings et al., 2013).....	112

Inleiding

Heuplaxiteit is een veel voorkomend probleem bij honden. De mogelijke genetische achtergrond van dit probleem zou kunnen liggen op het niveau van de bindweefselhomeostase. Een eerste onderzoek binnen de onderzoeksgroep dierlijke genetica was gericht op de rol van fibrilline eiwitten, meer specifiek fibrilline-1, -2 en -3. Uit dit onderzoek kwam geen duidelijke aanwijzing dat een mutatie in het fibrilline-2 gen de oorzaak zou zijn voor het al dan niet ontwikkelen van laxiteit. Een hieropvolgend onderzoek richtte zich specifiek op collageeneiwitten via eiwitanalyses. Ook in dit onderzoek werden geen associaties gevonden. In deze masterproef wordt dieper ingegaan op de mogelijke invloeden van variaties in collageen - en collagenase genen. De informatie die hieruit voortvloeit kan van belang zijn voor de ontwikkeling van nieuwe genetische testen en eventueel zelfs behandelingen.

In de literatuurstudie wordt in de eerste plaats een overzicht gegeven over de structuur en indeling van de collageen- en collagenase genen. Daarna volgt een uitgebreide weergave van een aantal belangrijke genetische variaties aanwezig in COL1A2, COL4A4, COL7A1, COL9A2, COL9A3 en COL11A2. Dit wordt gevolgd door de mutaties aanwezig in ADAM9, ADAMTS10, ADAMTS17 en ADAMTSL2. De biochemische relatie tussen deze twee belangrijke eiwitgroepen wordt vervolgens in kaart gebracht aan de hand van de endochondrale ossificatie. Als laatste volgt een bespreking van de mogelijke correlatie tussen heuplaxiteit, collageen en collagenase. Verdere uitgebreide details betreffende heuplaxiteit en collageeneiwitten afzonderlijk kunnen in voorgaande werken teruggevonden worden.

In het tweede deel van deze studie wordt de volledige Akela databank (1279 honden) via statistische methode geanalyseerd. Hierbij wordt er in eerste plaats een overzicht gegeven van de stalen o.b.v. beschrijvende statistiek. Vervolgens wordt een beeld gegeven van de mogelijke correlatie tussen de leeftijd en de heupstatus, de leeftijd en de aanwezigheid van heuplaxiteit, het geslacht en de aanwezigheid van heuplaxiteit en als laatste het ras en de ontwikkeling van heupdysplasie.

Verder wordt het onderzoek naar de genetische variaties van ADAMTS17 uitvoerig besproken. Hierbij wordt er in eerste plaats gezocht naar een mogelijk verband tussen de aanwezigheid van heuplaxiteit en de aanwezige genetische variaties. Om dit onderzoek uit te voeren werden vier stalen geselecteerd uit de databank. Deze werden verder onderzocht op variaties t.h.v. de exonen 6, 7 en 17 van het ADAMTS17 gen.

Ten slotte volgt een uitvoerige bespreking van de bevindingen en een besluit omtrent het gehele onderzoek.

1 Literatuurstudie

1.1 Collageen

Eiwitten zijn verantwoordelijk voor tal van biologische functies in het lichaam. Deze spelen o.a. een belangrijke rol bij de replicatie van desoxyribonucleïnezuur (DNA), de structuur van het cytoskelet, de katalyse van biochemische reacties en het transport van zuurstof in het lichaam (Whitford, 2005). Door de grote variëteit wordt er onderscheid gemaakt tussen eiwitten met een structurele rol en deze met een functionele rol. Collageen is een eiwit dat overwegend een structurele functie vervult in het lichaam (Ball et al., 2011).

Collageen (COL) is een veelvoorkomend eiwit dat voornamelijk gelegen is in de extracellulaire matrix (ECM) (Koide & Nagata, 2005). Deze groep van eiwitten wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van drievoudige helices in hun structuur. Deze vervullen tal van mechanische functies zoals het verlenen van stabiliteit en stevigheid aan weefsels waaronder pezen, ligamenten, huid, hoornvlies en beenderen. De elasticiteit en hardheid van deze weefsels verschillen onderling. Dit blijkt uit de veelzijdigheid van collageen (Fratzl, 2008).

1.1.1 Overzicht van de verschillende collageen families

Bij gewervelde diersoorten, waartoe de hond behoort, zijn er momenteel 28 verschillende soorten collageentypen gekend (Hulmes, 2008). Deze worden elk onderverdeeld in zes families op basis van hun moleculaire en supramoleculaire structuur (Tabel 1 & Bijlage I: Tabel 53) (Koide & Nagata, 2005).

Algemeen wordt collageen opgedeeld in enerzijds fibrilvormend collageen (d.w.z. mogelijkheid tot het vormen van vezels) en anderzijds niet-fibrilvormend collageen. De eerste familie, **fibrilvormend collageen**, bestaat uit zeven typen van collageen en worden gekarakteriseerd door de vorming van fibrillen. Type I, II en III zijn het meest voorkomend en spelen een voorname rol bij de ontwikkeling van bindweefsel. Zo wordt type I voornamelijk teruggevonden in pezen en hoornvlies, terwijl type II voornamelijk een rol speelt t.h.v. kraakbeen structuren. De vezels gevormd door type III komen voor in meer uitzetbare weefsels zoals bloedvaten. Verder bevat deze familie ook collageen type V (aanwezig in elastisch weefsel), type XI (aanwezig in kraakbeen), type XXIV (aanwezig in botweefsel) en type XXVII (aanwezig in hyalien kraakbeen) (Harvey, 2010; Omelyanenko et al., 2014).

De **niet-fibrilvormende collagenen** worden onderverdeeld in vijf families. Het fibrilgeassocieerd collageen met onderbroken drievoudige helices (FACITs) vormt een eerste familie die binden aan het oppervlak van collageenfibrillen. Hierdoor kunnen deze fibrillen samenvoegen met elkaar en met andere componenten binnen de ECM,

waardoor bindweefsel wordt gevormd (Harvey, 2010; Omelyanenko et al., 2014). De voornaamste typen binnen deze familie zijn type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI en XXII, welke voornamelijk teruggevonden worden in kraakbenige structuren (Hulmes, 2008).

De familie van het netwerkvormend collageen bestaat uit twee subfamilies, met name het korte- keten collageen en het basale membraan collageen. Beide groepen worden gekenmerkt door onderbrekingen die aanwezig zijn in de terugkerende aminozuur (AZ)-sequentie van de drievoudige helix. De moleculen van deze typen van collageen (IV, VII, VIII en X) gaan zich integreren en vormen op die manier een vlechtstructuur of netwerk die een groot deel van de basale membranen vormt (Harvey, 2010). Verder wordt dit collageen teruggevonden t.h.v. epitheel-, endotheel-, vet-, spier- en zenuwcellen (Hulmes, 2008; Lethias & Exposito, 2013).

Type XV en XVIII behoren tot de familie van de multiplexinen. Deze macromoleculen hebben een kenmerkende structuur en bezitten een hoog aantal (meer dan tien) onderbroken drievoudige helices. Deze familie van collageen gaat voornamelijk binden op membranen (Lethias & Exposito, 2013).

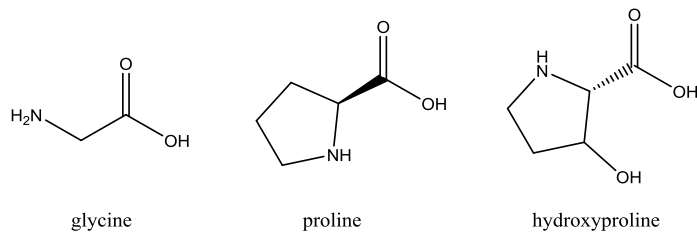
Het transmembraan collageen (typen XIII, XVII, XXIII en XXV) maakt deel uit van de cellulaire membranen. Een deel van deze macromoleculen bevindt zich t.h.v. het cytosol in de cel. De laatste familie bevat de typen collageen dat zich structureert in parelsnoervormige filamenten. Collageen Type VI wordt voornamelijk teruggevonden in microvezels van verschillende weefsels. Type XXVI is gelokaliseerd t.h.v. de voortplantingsorganen en type XXVIII t.h.v. de perifere zenuwen.

Tabel 1: Overzicht collageen families bij de hond (Kielty & Grant, 2002; Ricard – Blum et al., 2005; Stevens & Lowe, 2007; Hulmes, 2008).

Familie	Type collageen
Fibrilvormend collageen	Typen I, II, III, V, XI, XXIV en XXVII
Niet – fibrilvormend collageen	
Fibril – geassocieerd collageen met onderbroken drievoudige helices (FACIT)	Typen IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI en XXII
Netwerkvormend collageen	
<u>Basale membraan collageen</u>	Typen IV en VII
<u>Korte – keten collageen</u>	Typen VIII en X
Multiplexinen	Typen XV en XVIII
Transmembraan collageen	Typen XIII, XVII, XXIII en XXV
Collageen dat zich structureert in parelsnoervormige filamenten	Typen VI, XXVI en XXVIII

1.1.2 Structuur van collageen

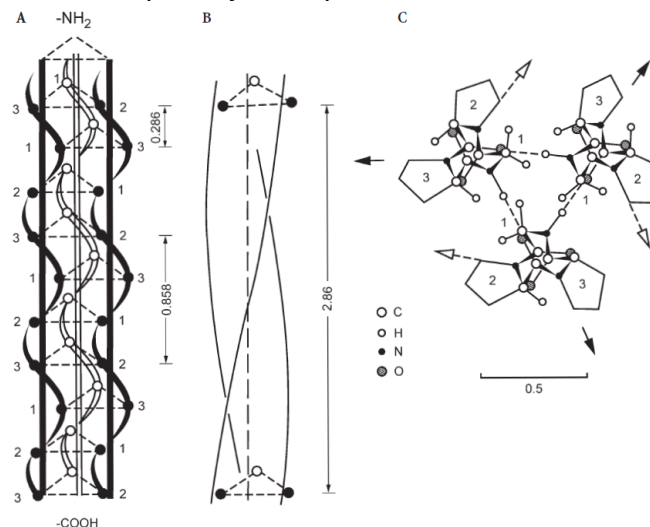
Collageen is rijk aan de AZ proline en glycine (Figuur 1). Deze spelen een belangrijke rol bij de ontwikkeling van de drieboudige helix, het voornaamste kenmerk van deze eiwitten. De helix is opgebouwd uit drie polypeptide ketens (α ketens). Elke keten is



Figuur 1: Structuurformule glycine, proline en hydroxyproline (ChemBioDraw, 2014).

opgebouwd uit één of meerdere vaste AZ-sequenties die gekenmerkt worden door Gly-X-Y. Hierbij is X meestal proline en Y meestal hydroxyproline. De NH-groep van glycine zal waterstofbruggen vormen met de CO-groep van proline. Deze zorgen voor de stabiliteit van de helix (Figuur 2) (Engel & Bächinger, 2005). Het AZ hydroxyproline vereist extra aandacht. Deze is enkel aanwezig in collageeneiwitten en speelt een belangrijke rol bij het stabiliseren van de secundaire structuur d.m.v. waterstofbruggen. Belangrijk is dat hydroxyproline niet zal coderen voor DNA en dus geen rol speelt bij het overbrengen van genetisch materiaal (Omelyanenko et al., 2014).

De α ketens worden op verschillende mogelijke manieren gecombineerd waardoor er 28 typen van collageen ontstaan. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen homo- en heterotrimeren, respectievelijk bestaande uit identieke α ketens en verschillende α ketens. Type I collageen is een heterotrimeer daar deze bestaat uit twee α_1 ketens en een α_2 keten, terwijl type II collageen bestaat uit drie identieke α_1 ketens en dus behoort tot de homotrimeren (Harvey, 2010).



Figuur 2: Structuur van collageen (Engel & Bächinger, 2005).

De structuur wordt weergegeven voor (Gly-Pro-Pro)_n waarbij glycine wordt weergegeven door 1, proline in X positie door 2 en proline in Y positie door 3. A,B zijdelings aanzicht; drie polypeptideketens welke elk afzonderlijk linkshandig zijn opgevouwen. De helix is rechtsdraaiend. C bovenaanzicht; De drie ketens zijn verbonden door waterstofbruggen tussen NH van glycine en CO van proline in de Y positie (Engel & Bächinger, 2005).

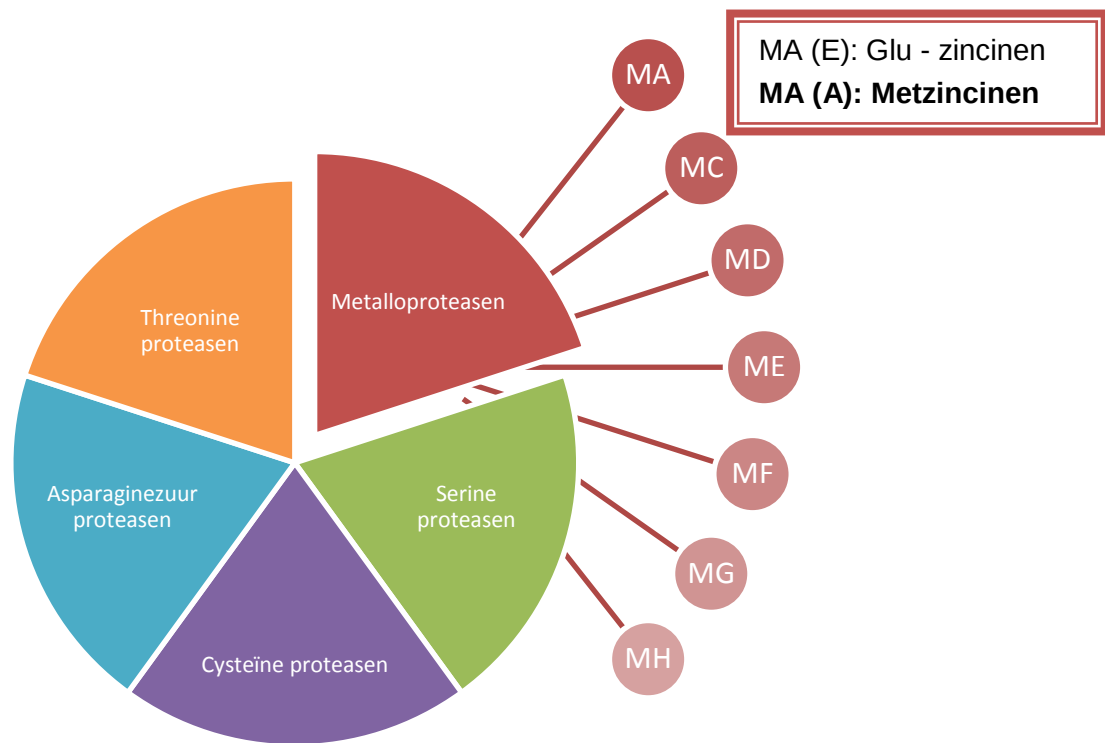
1.2 Collagenase

Enzymen vormen een belangrijk onderdeel van het metabolisme binnen een organisme. Collagenasen zijn peptidasen of enzymen die de peptidebindingen van collageen splitsen. Deze enzymen zijn voornamelijk gelokaliseerd t.h.v. de beenderstructuren, pezen en ligamenten. Daar spelen ze een belangrijke rol bij de endochondrale ossificatie tijdens de embryonale ontwikkeling en de vorming van beenderen postnataal en op latere leeftijd (Krane & Inada, 2008). Verder zijn collagenasen eveneens betrokken in de pathogenese van verschillende aandoeningen die verderop besproken zullen worden.

1.2.1 Overzicht van de verschillende collagenase families

Proteasen werden vroeger ingedeeld in twee grote groepen. Enerzijds de endopeptidasen, die interne peptidebindingen gaan afbreken, en anderzijds de exopeptidasen die hun activiteit uitvoeren op de NH_2 - en COOH - uiteinden van hun substraat. Het nieuwe classificatieschema is gebaseerd op het katalyse mechanisme. Daarbij wordt onderscheid gemaakt door middel van vijf klassen namelijk de cysteïne (Cys)-, threonine (Thr)-, serine (Ser)-, asparaginezuur (Asp)- en metallo- proteasen (Figuur 3). Elk van deze klassen wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een specifiek AZ of chemische groep in het katalytisch domein van het enzym. De eerste drie klassen maken gebruik van een AZ (respectievelijk Cys, Thr of Ser) als nucleofiel terwijl de laatste twee klassen gebruik maken van een geactiveerde watermolecule. Proteasen van deze verschillende klassen kunnen verder onderverdeeld worden in families op basis van de AZ- sequentie. Verder worden deze families gegroepeerd in clans, in functie van de overeenkomstige driedimensionale structuren (Barrett et al., 2004; López-Otín & Bond, 2008; Rivera et al., 2010).

Collagenasen zijn enzymen die behoren tot de klasse van de metalloproteasen. Deze maken op hun beurt deel uit van de superfamilie van de metzincinen. Deze zijn betrokken bij de proteolyse van een groot aantal eiwitten waaronder die van de ECM.



Figuur 3: Indeling metalloproteasen (Barrett et al., 2004; Rivera et al., 2010).

De vijf klassen van proteasen worden onderverdeeld in clans zoals weergegeven voor de klasse van de metalloproteasen, nl. MA, MC, MD, ME, MF, MG, MH. Binnen deze clans volgt een verdere opsplitsing naar superfamilies waaronder de metzincinen. Deze worden als laatste opgedeeld in families (Barrett et al., 2004; Rivera et al., 2010).

Onder de superfamilie van de metzincinen vinden we vijf families terug (Tabel 2 & Bijlage II: Tabel 54). De familie van de leishmanolysinen (LMLN), waaronder LMLN 2 en 3, komt in mindere mate voor en wordt verder niet besproken of aangehaald. De familie van de matrixinen vormt een belangrijke groep van enzymen. Hieronder vinden we vijf groepen terug namelijk de collagenasen (LOC489428, MMP8 en MMP13), de gelatinasen (MMP2 en MMP9), de stromelysinen (MMP3 en MMP11), de membraan typen (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17 en MMMP24) en de overige matrix metalloproteinasen (MMPs) (MMP7, 12, 19, 20, 21, 23B, 26, 27 en 28).

De M12 familie bevat twee subfamilies met name de astacinen en de adamalysinen. Tot deze laatste subfamilie behoren de 'disintegrin and metalloproteinases' (ADAM), de 'disintegrin and metalloproteinases with Thrombospondin Motifs' (ADAMTS) en de 'disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin type I motifs-like' (ADAMTSL) collagenasen. De laatste twee families, cytophagalysinen en archaelysinen, worden zelden besproken in de literatuur en worden ook hier niet verder besproken.

De metalloproteasen zijn hoofdzakelijk verantwoordelijk voor de beschadiging van bindweefsels. Meer specifiek, twee families waaronder de matrixinen (MMP) en de adamalysinen (ADAM, ADAMTS en ADAMTSL) (Bode et al., 1993; Barrett et al., 2004; Rivera et al., 2010).

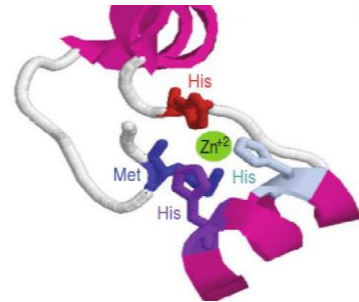
Tabel 2: Overzicht superfamilie van de metzincinen bij de hond (Bode et al., 1993; Borkakoti, 1999; Luen Tang, 2001; Rawlings et al., 2013)

Familie		Type collagenase/ genen
M8 - Leishmanolysinen		LMLN 2 en LMLN 3
M10 – Matrixinen	Collagenase	LOC489428, MMP8 en MMP13
	Gelatinase	MMP2 en MMP9
	Membraan typen	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17 en MMMP24
	Stromelysine	MMP3 en MMP11
	Overige MMPs	MMP7, 12, 19, 20, 21, 23B, 26, 27 en 28
M12		
M12A – Astacinen		ASTL, BMP1, TLL1, TLL2, MEP1A en MEP1B
M12B - Adamalysinen		
	ADAM	ADAM2, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 22, 28, 29, 30, 32 en 33
	ADAMTS en ADAMTSL	ADAMTS1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 en 20 ADAMTSL1, 2, 3, 4 en 5
M43 - Cytophagalysinen		Pappalysine1 en pappalysine2
M54 – Archaelysinen		AMZ1 en AMZ2

1.2.2 Structuur van collagenase

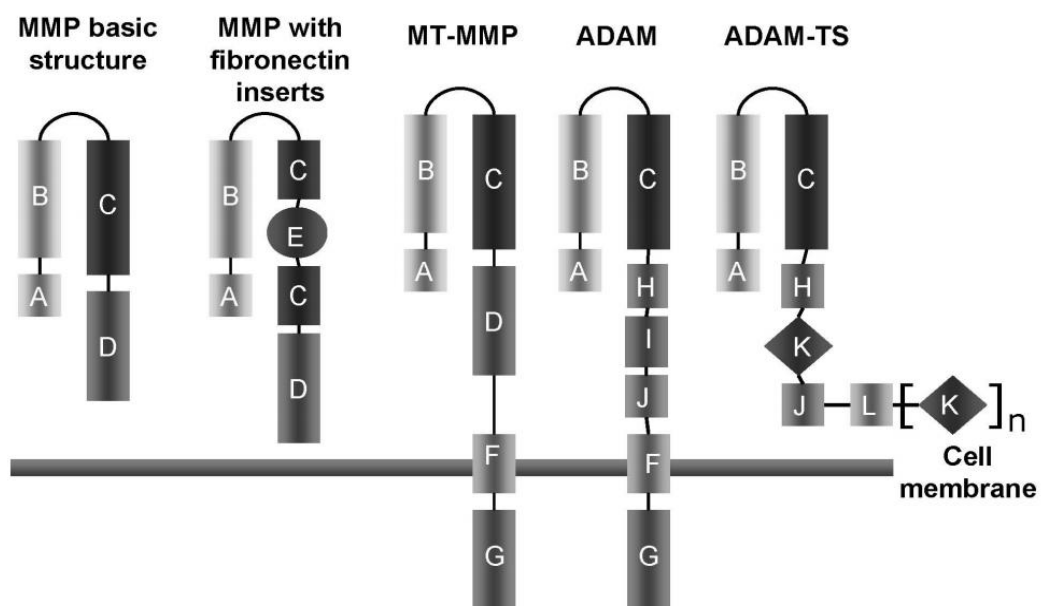
Het meest eenvoudige protease bezit twee subdomeinen (NH₂- en COOH- uiteinden) die van elkaar gescheiden zijn door een actieve site. In de actieve site bevinden zich de residuen die verantwoordelijk zijn voor de katalysereactie. Deze kunnen zowel uit twee als drie delen bestaan en vormen het katalytisch domein. Langs dit domein bevinden zich de binding sites voor het substraat waarin één enkel AZ van het substraat past (Rawlings, 2013).

Collagenasen zijn peptidasen die behoren tot de klasse van de metalloproteasen en de daartoe behorende superfamilie van de **metzincinen**. Zoals de naam doet vermoeden worden deze gekenmerkt door de aanwezigheid van een zink bindende AZ-sequentie HExxHxxGxxH in het katalytisch domein (Figuur 4 en bijlage IV). Deze sequentie bezit drie histidine (H) residuen en een methionine bevattende 1,4-β- binding die een hydrofobe kloof vormt voor het katalytische Zn²⁺-ion (Maskos, 2004; Lancellotti & De Cristofaro, 2011).



Figuur 4: Katalytisch domein van de metzincinen (Lancellotti & De Cristofaro, 2011)

Naast deze gemeenschappelijke sequentie worden de metzincinen verder onderverdeeld in kleinere families die elk karakteristieke kenmerken hebben omtrent de structuur (Figuur 5) (Sekhon, 2010).



Figuur 5: Schematische weergave van de structuur van de metzincinen (Sekhon, 2010).

A: signaal peptide; B: prodomein; C: Katalytisch domein; D: hemopexin domein;
 E: fibronectine; F: transmembraan domein; G: cytoplasmatische staart;
 H: Disintegrin domein; I: cysteine bevattend domein; J: EGF domein;
 K: thrombospondin motief; L: tussen regio (Sekhon, 2010).

1.3 Genetische variaties

Genetische variaties zorgen ervoor dat binnen een populatie een grote verscheidenheid van allelen aanwezig zijn waardoor ieder individu uniek is. Deze variaties (Tabel 3) kunnen zowel spontaan ontstaan als door invloeden van buitenaf (exogene factoren) (The Genetic Variation, 2014). De meest voorkomende variaties in DNA worden 'Single Nucleotide Polymorphisms' (SNPs) of puntmutaties genoemd (Figuur 6). Dit zijn verschillen in de DNA sequentie die veroorzaakt worden door de onderlinge vervanging van één van de basen waaruit DNA is opgebouwd; respectievelijk A, T, C of G (Hinds et al., 2005).

```
Genome 1 | DNA | ATGCTATAGTAAATCTGCGCTAGCT
Genome 2 | DNA | ATGCTATAGTAAATGTGCGCTAGCT
                        |
                        SNP(C=>G)
```

Figuur 6: Voorbeeld van een SNP (Seemann, 2013).

In het DNA kunnen eveneens andere variaties voorkomen zoals bvb. INDELs (insertie/deletie), met als gevolg frameshifts. Dit zijn variaties waarbij één of meerdere basen worden toegevoegd of verwijderd uit de DNA sequentie. 'Microsatellites' (MSAT) of 'simple sequence repeats' (SSR) zijn variaties waarbij herhalingen van 2-4 basen voorkomen. Als laatste kunnen er ook 'copy number variations' (CNV) voorkomen waarbij een volledig gen of een DNA segment gerepliceerd wordt (Stranger et al., 2007).

SNPs kunnen afhankelijk van de plaats binnen het gen zorgen voor intron- of exon-varianties. Intron variaties hebben geen onmiddellijk effect op het gevormde eiwit. Intron regio's binnen een gen worden immers vóór de translatie van RNA naar het respectievelijke eiwit verwijderd (rijpingsproces). Deze variaties kunnen wel zorgen voor een functionele mutatie indien ze invloed hebben op de splicing sites of regulerende regio's welke van belang zijn bij de transcriptie (upstream 3' → 5'). Een SNP in een intron zou m.a.w. wel eens meer gevolgen kunnen hebben dan er vandaag wordt vermoed (Hunt et al., 2009).

Exon variaties kunnen afhankelijk van de soort mutatie wel invloed hebben op het gevormde eiwit. Als eerste zijn 'silent of synonymous' (SYN) mutaties over het algemeen niet-functionele variaties doordat zij ervoor zorgen dat het AZ in de sequentie onveranderd blijft (Figuur 7) (Hunt et al., 2009).

Daarnaast kan er een 'missense of non-synonymous' (NON-SYN) mutatie optreden waarbij het verkregen AZ verschilt van het oude (Figuur 7). Deze mutatie kan enorme gevolgen hebben voor de structuur en functie van het verkregen eiwit. Als laatste kan er ook een 'nonsense' mutatie optreden waarbij de variatie zorgt voor een stopcodon (Hunt et al., 2009; Seemann, 2013).

Genome 1	DNA	ATG	AAA	GTT	GAT	GAC	CAG	CAT	TCC	CCA	TGA
Genome 2	DNA	ATG	AAA	GTC	GAT	GAC	CAG	CAT	TAC	CCA	TGA
				..				..			
				SNP(T=>C)				SNP(C=>A)			
				..				..			
Genome 1	AA	M	K	V	D	D	Q	H	S	P	*
Genome 2	AA	M	K	V	D	D	Q	H	Y	P	*
				SYN				NON-SYN			

Figuur 7: Voorbeeld van een synonymous- en non-synonymous mutatie (Seemann, 2013).

Genetische variatie is van groot belang bij het onderzoek naar erfelijke aandoeningen. Deze variatie is bij honden sterk verminderd als gevolg van selectiedruk, het creëren van aandachtspunten in een specifiek ras en een gesloten populatie. Als gevolg hiervan kunnen recessieve aandoeningen, waarvoor geen genetische tests beschikbaar zijn, zich onzichtbaar verspreiden binnen een populatie (Wade, 2011). Ook is de kans dat ze tot uiting komen verhoogd. Het voordeel van deze verlaagde diversiteit is evenwel dat het vinden van oorzakelijke mutaties gemakkelijker is bij honden, dan bij mensen, die genetisch diverser zijn.

Tabel 3: Samenvatting genetische variaties

Variatie	Gevolg	Kenmerk
SNP	Synonymous of silent	Hetzelfde AZ
	Non-synonymous of missense	Verandering AZ
	Nonsense	Vorming stopcodon
INDEL	Frameshift	Verschuiving reading frame
		Verwijderen/toevoegen van één of meerdere AZ
CNV	Variatie in DNA kwantiteit	Toevoegen gen
SSR	Structurele variatie	Verandering meerdere AZ

Om een beter inzicht te krijgen in de relatie tussen collageen, collagenase en erfelijke aandoeningen worden de belangrijkste variaties in collageengenen (1.3.1) en collagenase genen (1.3.2) beschreven.

1.3.1 Overzicht van variatie in collageengenen

Bij collageenstoornissen is er meestal één collageentype aangetast. Elk type van collageen is opgebouwd uit α ketens die elk afzonderlijk gecodeerd worden door een gen. Wanneer één van beide ketens muteert, treedt er een abnormale productie en associatie van de collageenmolecule op. De benaming van het gen gebeurt op basis van het type collageen en de keten waarvoor deze codeert, bijvoorbeeld het COL1A2-gen codeert voor de α_2 keten van collageen type I. Mutaties in zowel COL1A1 als COL1A2 zullen ervoor zorgen dat collageen type I een abnormale structuur gaat vertonen. Dit betekent niet dat ze identieke veranderingen in de collageenmolecule teweegbrengen. Dit duidt op de enorme verscheidenheid in klinische expressie van de verschillende mutaties (De Coster, 2004).

Hieronder worden de mutaties in COL1A2, COL4A4, COL7A1, COL9A2, COL9A3 en COL11A2 besproken. De variaties worden telkens onderverdeeld in enerzijds de **inerte variaties** of de niet-functionele mutaties en anderzijds de **mutagene variaties** of de functionele mutaties. Deze variaties worden telkens weergegeven in een tabel. Deze tabellen zijn samengesteld aan de hand van gegevens geraadpleegd op 8 november 2014 op de website van National Center for Biotechnology Information (NCBI).

1.3.1.1 COL1A2

COL1A2 is het gen dat codeert voor de α_2 keten van collageen type I. Dit type van collageen is gelokaliseerd t.h.v. huid, beenderen, pezen en ligamenten. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 14. In totaal zijn er 24 genetische variaties beschreven voor dit gen (Hulmes, 2008).

A. Inerte variatie

Voor dit gen zijn er achttien inerte mutaties gekend die te wijten zijn aan intron variaties. Hiervan zijn er zestien te wijten aan een SNP terwijl de overige twee een gevolg zijn van een insertie. Vervolgens bestaan er twee inerte variaties die beschreven staan als 'downstream variant 500B' (Tabel 4). Deze duiden op een variatie die gelegen is aan de 3' (downstream) zijde van het gen (SNP Summary Table Values, 2013; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 4: Overzicht downstream variaties COL1A2 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	CATCAGTATTTTN[C/T]ATCTTATTCCCAA	downstream variant 500B
2	A	C	GCATCAGTATTTT[A/C]NATCTTATTCCCA	downstream variant 500B

B. Mutagene variatie

In onderstaande tabel worden de mutagene variaties van het gen weergegeven (Tabel 5). Er bestaan drie missense mutaties en één frameshift mutatie. Deze laatst genoemde mutatie en één van de missense mutaties vormen de oorzaak van Osteogenesis imperfecta (OI) bij de hond (McKusick, 2014; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 5: Overzicht mutagene variaties COL1A2 (1, 2 en 3) en SERPINH1 (4) (Campbell et al., 2001; Drögemüller et al., 2009; NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	T	AAGTATACTG[G/T]GATTCTCTCA	Missense
2	A	G	AAAGGCT[A/G]TCATTCTGCA	Missense
3	CTGA	TGTCATTGG	[CTGA/TGTCATTGG]	OI (frameshift)
4	Leu	Pro	AlaGlyLeuGly[Leu/Pro]ThrGluAla	OI (missense)

OI: Osteogenesis imperfecta

Osteogenesis imperfecta is een genetische aandoening dat gekenmerkt wordt door een defect in de ontwikkeling van collageen type I. Hierdoor worden verscheidene botstructuren onvoldoende ontwikkeld met als gevolg dat ze dun en broos zijn. De klinische symptomen van deze aandoening uiten zich onder de vorm van verschillende botfracturen, laxiteit van de gewrichten en verstoorde ontwikkeling van de tanden. Verder wordt deze aandoening via autosomale recessieve overerving doorgegeven en wordt het voornamelijk vastgesteld bij Poedels, de Beagle, de Bedlington Terriër en de Duitse Teckel (Campbell et al., 2001; Drögemüller et al., 2009; Eckardt et al., 2013).

De achterliggende oorzaak van deze aandoening kan toegeschreven worden aan verschillende genetische variaties. De ontwikkeling van collageen type I berust namelijk op de samenwerking van verschillende genen. COL1A1 en COL1A2 zijn de genen die coderen voor de twee verschillende subeenheden van collageen type I. De rijping en correcte vouwing van het collageen is een gecompliceerd proces waarbij een groot aantal additionele eiwitten betrokken zijn. Zo codeert SERPINH1 voor chaperones (eiwitten) die verantwoordelijk zijn voor de correcte vouwing van de drievoudige helix van collageen type I. Indien er in één van beide genen een mutatie optreedt kan het collageen type I niet meer correct ontwikkeld worden (Drögemüller et al., 2009).

Zo wordt een frameshift mutatie van de nucleotiden 3991-3994 (CTGA) beschreven in COL1A2. Hierbij worden deze vier nucleotiden verwijderd en vervangen door negen andere nucleotiden namelijk TGTCATTGG. Dit zorgt voor verandering in het open reading frame (ORF) of het gebied dat vertaald wordt naar collageen. Hierdoor zal de

pro-peptide met 51 AZ ingekort worden door de aanwezigheid van een vervroegd stopcodon (Campbell et al., 2001).

Er bestaat anderzijds ook een missense mutatie waarbij leucine vervangen wordt door proline als gevolg van een substitutie (c.977T>C) in exon 5 van het Serpin peptidase inhibitor, clade H, collagen binding proteïn 1 (SERPINH1) gen. De aanwezige AZ-substitutie zal beletten dat het SERPINH1 gen de drievoudige helices gaat binden en stabiliseren. Deze mutatie wordt voornamelijk vastgesteld bij de Duitse Teckel (Drögemüller et al., 2009).

C. Andere variatie

Er bestaat ook een variatie binnen het COL1A2 gen waar geen verdere informatie over gekend is (Tabel 6) (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 6: Overzicht andere variatie COL1A2 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	AGAGAGGACGTGT[C/T]GGTGCCCCTGGTC	Geen info

1.3.1.2 COL4A4

COL4A4 is het gen dat codeert voor de α_4 keten van collageen type IV. Dit type van collageen is onderdeel van verschillende basale membranen. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 25. In totaal zijn voor dit gen 139 genetische variaties beschreven (Hulmes, 2008; NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Voor dit gen bestaan er 134 inerte variaties waarvan 130 te wijten aan intronvariaties. Hierbij zijn 118 variaties een gevolg van een SNP terwijl de overige twaalf intronvariaties een gevolg zijn van een insertie. Daarnaast zijn er twee 'utr-variant-3-prime' mutaties. De eerste is gelokaliseerd t.h.v. nucleotide 5326 en de tweede t.h.v. nucleotide 5525 aan het 3' einde van het gen. Deze brengen eveneens geen verandering teweeg omdat ze niet mee worden vertaald naar het overeenkomstig collageen. Als laatste zijn er ook twee synonymous variaties gekend (Tabel 7) (SNP Summary Table Values, 2013; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 7: Overzicht van enkele inerte variaties COL4A4 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	A	G	CTTAATCTGTCCC[A/G]AACAGAGGGAGGA	utr variant 3 prime
2	C	T	ATTGCTTGACGTG[C/T]TGTTAACCAATGA	utr variant 3 prime
3	A	G	TGGACCCTGGCACTCC[A/G]GAAGGACCTC TCT	synonymous
4	C	T	AGTAGGACCGGTCGTT[C/T]CTCCGGGCGT AGT	synonymous

B. Mutagene variatie

In onderstaande tabel worden de vijf mutagene variaties van COL4A4 weergegeven (Tabel 8). Er bestaan twee missense mutaties en twee frameshift mutaties. Daarnaast is er een mutagene variatie van COL4A4 gekend die de oorzaak is van Nefropathie bij honden (McKusick, 2014; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 8: Overzicht mutagene variaties COL4A4 (Davidson et al., 2007; NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	T	CCATCCCGACCAT[G/T]TTGTCCCTGTTGT	Missense
2	C	T	GGTGTGCCATTGC[C/T]TTCCTGAAAAGG	Missense
3	-	G	CAGGTGGTCCAAC[-/G]GGACCCCATTCT	Frameshift
4	-	A	TTCCTTTCTGACC[-/A]TTTGCTCCACGAG	Frameshift
5	C	T	CCAGGCCCGAAGGGACCC[C/T]AG	Nefropathie

Nefropathie is een autosomale recessieve aandoening t.h.v. de nieren. Deze aandoening veroorzaakt een defect t.h.v. het glomulaire basale membraan (GBM). Dit membraan speelt een cruciale rol bij de filtratie van afvalstoffen uit het bloed en is voornamelijk samengesteld uit heterotrimeren en type IV collageen. Defecten in de genen die coderen voor de collageen ketens kunnen ervoor zorgen dat er een afwijkende ontwikkeling van het GBM plaatsvindt (Khoshnoodi et al., 2008). Als gevolg hiervan ontstaat een progressieve nierziekte op een leeftijd van 6 - 24 maanden. Deze ziekte zal zich verder chronisch uitbreiden waardoor de klinische symptomen pas in een later stadium tot uiting komen (Nowend et al., 2012).

De symptomen uiten zich onder de vorm van proteïnurie of het verlies van eiwitten in de urine. Dit is meestal zichtbaar onder de vorm van schuimvorming. Vervolgens treden ook andere symptomen op als gevolg van de nierfalen. Hierbij gaan honden

plots overmatig drinken en veel urineren (verdunde urine) met incontinentie tot gevolg. Naarmate de ziekte vordert, is er verlies van eetlust, gewichtsverlies, verhoogde concentratie van afvalstoffen in het bloed en uiteindelijk algemene verzwakking (Chronic Kidney Disease and Failure, 2009).

Davidson et al. (2007) stelt dat de SNP variatie, die nefropathie veroorzaakt, gelokaliseerd is t.h.v. base 115. Hierbij wordt een vervroegd stopcodon gevormd in exon 3. Deze mutatie werd vastgesteld bij 39 Engelse Cocker Spaniëls (Davidson et al., 2007). Volgens Nowend et al. (2012) is de genetische variatie bij de Engelse Springer Spaniël te wijten aan een SNP variatie t.h.v. nucleotide 2806. Hierbij wordt er een vervroegd stopcodon gevormd in exon 30 (Tabel 8).

C. Andere variatie

Bij dit gen zijn er eveneens zeven variaties bekend waarvan geen verdere informatie gekend is (Tabel 9) (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 9: Overzicht andere variaties COL4A4 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	AGGAAGTCCATCC[C/T]GACCATTTGTCC	Geen info
2	C	T	TACCCGGTCCACC[C/T]GGTAAATCAGTGT	Geen info
3	C	T	CCATTGGGGACCC[C/T]GGGCCCAGAGGGT	Geen info
4	A	C	CATCCTCATGACC[A/C]CCCTGGGAATGGG	Geen info
5	C	T	GTGTCTTAAGATG[C/T]ATTTGGCAAGCTT	Geen info
6	A	G	TCAGAGGGTGAGC[A/G]TCTTGCCTTTGGC	Geen info
7	A	G	ATGGCATCAGTAA[A/G]GTGTTCATTCAGG	Geen info

1.3.1.3 COL7A1

COL7A1 is het gen dat codeert voor de α_1 keten van collageen type VII. Dit type van collageen is gelokaliseerd t.h.v. de grenslaag tussen de dermis en de epidermis onder de vorm van verankerende filamenten. Het gen is gelegen op chromosoom 38. In totaal zijn er 39 genetische variaties beschreven voor dit gen (Hulmes, 2008; NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Van de 39 variaties binnen het gen zijn er 37 inert. Hierbij zijn 29 variaties te wijten aan SNP intronvariaties terwijl de overige twee intronvariaties een gevolg zijn van een insertie. Daarnaast zijn er twee synonymous variaties gekend. Als laatste zijn er vier 'upstream variant 2KB' varianten bekend (Tabel 10). Deze zijn gelokaliseerd t.h.v. de 5' zijde van het gen en brengen eveneens geen fenotypische variatie teweeg (SNP Summary Table Values, 2013; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 10: Overzicht inerte variaties COL7A1 (NCBI: Gene, s.a.)

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	G	GAAACACAGACTC[C/G]GCAGAAATACGGG	synonymous
2	C	T	AGGATGGACGAAA[C/T]GTGAGTCCTGACC	synonymous
3	A	T	TGGGATGCGGCTA[A/T]GAGGACCATGACC	upstream variant 2KB
4	C	T	AACATGGATGGTC[C/T]TCATTGCCTCCAG	upstream variant 2KB
5	A	C	GACTCACCTCCTC[A/C]GTACAGCACTCGT	upstream variant 2KB
6	C	T	CAGCCACAGG[C/T]GGACCCTAAGAGC	upstream variant 2KB

B. Mutagene variatie

Er zijn voor dit gen twee missense mutaties gekend die hieronder worden weergegeven (Tabel 11). Eén ervan is een mutagene variatie die aanleiding geeft tot de ontwikkeling van recessieve dystrofische epidermolysis bullosa (RDEB) (McKusick, 2014; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 11: Overzicht mutagene variatie COL7A1 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	A	G	TGTGGATGAGCCA[A/G]GTCCTGGACTCTC	missense
2	G	A	[G/A]GC	missense (RDEB)

RDEB is een autosomaal recessieve aandoening van de huid. De symptomen uiten zich in extreme kwetsbaarheid van de huid en slijmvliezen waarbij er continu blaren en littekens gevormd worden. Verder treedt wondvorming op t.h.v. het gezicht, voetzolen, genitaliën, oren en zelfs in de mond. Hierop zal het lichaam reageren door continue wondheling (Gache et al., 2011).

Zoals eerder vermeld, is deze aandoening een gevolg van een variatie in het COL7A1 gen. In dit gen treedt een missense mutatie op t.h.v. nucleotide 5716 waarbij de nucleotide glycine vervangen wordt door adenine (5716G>A). Als gevolg hiervan treedt er een substitutie op t.h.v. AZ- positie 1906 waarbij het codon (**GGC**) voor glycine wordt vervangen door het codon (**AGC**) voor serine (Magnol et al., 2005; Baldeschi et al., 2003).

1.3.1.4 COL9A2

COL9A2 is het gen dat codeert voor de α_2 keten van collageen type IX. Dit type van collageen is gelokaliseerd t.h.v. het hyalien kraakbeen, het glasachtig lichaam en in de nucleus pulposus van de tussenwervelschijf. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 15. In totaal zijn er twaalf genetische variaties beschreven voor dit gen (Hulmes, 2008; NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Voor dit gen bestaan er geen gekende inerte variaties (NCBI: Gene, s.a.).

B. Mutagene variatie

Er is één mutagene variatie gekend waarbij, als gevolg van een deletie (DEL) t.h.v. COL9A2, oculoskeletal dysplasia 2 (OD2) ontstaat. Dit is een autosomale recessieve aandoening die vastgesteld wordt bij o.a. de Labrador retriever en Samojeed (Goldstein et al., 2010; McKusick, 2014).

De klinische symptomen worden zichtbaar na een leeftijd van vier tot zes weken (Goldstein et al., 2010). Hierbij gaan getroffen honden dwerggroei vertonen. De voorste ledematen zijn het sterkst aangetast wat zich uit in een verkorte radius en ulna. Geassocieerde oogheeskundige afwijkingen omvatten het loslaten van het netvlies en de ontwikkeling van katarakt (Meyers et al., 1983).

Volgens Goldstein et al. (2010) treedt er een deletie op van 1,267-bp aan het 5' uiteinde van het gen waarbij het volledige exon 1 wordt verwijderd en een deel van intron 1 (Tabel 12). Daarnaast wordt deze variatie gekoppeld aan dwerggroei en het retina dysplasie (drd2)-gen dat zich bevindt op hetzelfde chromosoom. Dit zorgt ervoor dat de nakomelingen beide genen overerven (Goldstein et al., 2010; Stroyan, s.a.).

Tabel 12: Overzicht andere variaties COL9A2 (Goldstein et al., 2010).

De schuine letters geven de sequentie weer die verwijderd wordt bij honden die getroffen zijn met OD2. Daarnaast zijn er nog een hele reeks nucleotiden die verwijderd worden in intron 1.

SNP	Sequentie	Gevolg
1	ATG GCCGCCG CCCGCCGCCT CCTGCTGCTG CTCCAGGGGC TCGCGCTCGC CCTGGCGCAG ATCGTAAGTG CCGCGGCCGC CGCGCGGGGT CGGGGTGCGG GGGGCGGGGG CGGGGACGGG TCGGGGTGCG GGCCTCGGCG CTTCCCTCG GCGGGGCGCA CAGCGGGCGC GTCCGGGCGC	OD2

C. Andere variatie

Voor dit gen bestaan er verschillende variaties waarover geen verdere informatie gekend is (Tabel 13). Het is nog niet duidelijk of het hierbij gaat om inerte of mutagene variaties. Eén variatie is een gevolg van een insertie terwijl de overige tien het gevolg zijn van een SNP (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 13: Overzicht andere variaties COL9A2 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	G	GCAATCTGGGACA [C/G] TTGTCCCCCACTC	Geen info
2	A	T	CCTTCCATCCTCA [A/T] CAGCCACTGCCCC	Geen info
3	A	C	AGGCCTTTGCAGG [A/C] GCTGCTGCTTGGA	Geen info
4	A	G	AATTGCCTGGACC [A/G] AATGTGGTGACAT	Geen info
5	C	G	ATAGCCTGCTTGC [C/G] TGTTGACAGCACC	Geen info
6	A	G	TTTTGGGGGGGGG [A/G] GTTGGGGGGGAAG	Geen info
7	A	G	GCCCCACAGACTG [A/G] GCCCACCAGGCGC	Geen info
8	C	G	ACTTCCTGCCTTG [C/G] GAACGATTGGATC	Geen info
9	C	T	CCCCATATTACCC [C/T] CCCACCGGGGCAA	Geen info
10	A	G	AGCCACCCATGCC [A/G] CCAGGAGGGAGTG	Geen info
11	-	C	CCCCTCTTTGGGA [-C] CCCATGTGCCTGC	Geen info

1.3.1.5 COL9A3

COL9A3 is het gen dat codeert voor de α_3 keten van collageen type IX. Dit type van collageen is, net zoals COL9A2, gelokaliseerd t.h.v. hyalien kraakbeen, glasachtig lichaam en in de nucleus pulposus van de tussenwervelschijf. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 24. In totaal zijn er zeventien genetische variaties beschreven voor dit gen (Hulmes, 2008; NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Voor dit gen bestaan er geen gekende inerte variaties (NCBI: Gene, s.a.).

B. Mutagene variatie

Voor het COL9A3 gen bestaat er één gekende mutagene variatie die aanleiding geeft tot de ontwikkeling van oculoskeletal dysplasia 1 (OD1) (Tabel 14). Dit is een autosomale recessieve aandoening die vastgesteld wordt bij o.a. de Labrador retriever (Goldstein et al., 2010; McKusick, 2014). De klinische symptomen werden ook al beschreven bij COL9A2.

Bij dit gen treedt een mutatie op waarbij guanine wordt toegevoegd aan exon 1. Op die manier krijgt men te maken met een vervroegd stopcodon die aanleiding geeft tot de ontwikkeling van OD1. Deze mutatie wordt gekoppeld aan het drd1-gen (zie 1.3.1.4) (Goldstein et al., 2010).

Tabel 14: Overzicht mutagene variatie COL9A3 (Goldstein et al., 2010).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	-	G	ATGGCCGGGG[- G]CCCCACGCTGGCCCTGC	OD1

C. Andere variatie

Voor dit gen bestaan er verschillende variaties waarover geen verdere informatie gekend is. Het is nog niet duidelijk of het hierbij gaat om inerte of mutagene variaties. Wel geweten is dat drie variaties een gevolg zijn van een insertie terwijl de overige dertien het gevolg zijn van een SNP (Tabel 15) (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 15: Overzicht andere variaties COL9A3 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	T	CCCGGCCTCAGGC[G/T]TCTGTAAGGCAGC	Geen info
2	G	T	GCAGGGCCTCTGG[G/T]GCACAGGGGCTGC	Geen info
3	C	T	TCACCCTGCGTCC[C/T]GCGGCCTGGCCAG	Geen info
4	G	T	GGCGGCCCTCCTC[G/T]CCCCAGGGGACAC	Geen info
5	A	G	TTGCAGGAAGAAA[A/G]GNCTGACTTCCCA	Geen info
6	A	G	TGCCCAGGTCTCAC[A/G]GGGCCGCTGCCCCG	Geen info
7	C	T	AGCCCGGCAGAGG[C/T]GTCTGGAAGGGCT	Geen info
8	A	G	GGGGGCTTTGCTG[A/G]AAGCCGGGCTGTG	Geen info
9	C	T	NCTGCCTAGCTGC[C/T]TGGCGGTGCCCCG	Geen info

10	A	G	GGGCTGCTCCTCA[A/G]CTGCCTAGCTGCN	Geen info
11	C	G	GTTCTGTCCCTG[C/G]AGAGGGGCTGACC	Geen info
12	_	A	CCGAGCCTCCCAT[-/A]CCCTGGGGGCTG	Geen info
13	A	C	GGTGGGAAGTCAG[A/C]CNTTTCTTCCTGC	Geen info
14	_	C	GGCCCCAAACAGA[-/C]CCCTGCAGGGAAA	Geen info
15	G	T	CGGTCACCTTCTC[G/T]CCGTCCTTGCCGA	Geen info
16	_	G	GCCAGCGCCGCCC[-/G]GGGCCTGTCCCCC	Geen info

1.3.1.6 COL11A2

COL11A2 is het gen dat codeert voor de α_2 keten van collageen type XI. Dit type van collageen is gelokaliseerd t.h.v. het hyalien kraakbeen en het glasachtig lichaam. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 12. In totaal zijn er zeventien genetische variaties beschreven voor dit gen (Hulmes, 2008; NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Het aantal inerte variaties voor COL11A2 bedraagt zestien. Hiervan zijn er dertien te wijten aan een intron mutatie. Er is geweten dat deze een gevolg zijn van elf SNP variaties en twee insertie mutaties. Daarnaast zijn er drie synonymous variaties gekend waarvan één mutatie eveneens aanwezig is in een intron regio (Tabel 16) (SNP Summary Table Values, 2013; NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 16: Overzicht inerte variaties COL11A2 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	T	CTCGGGGTCC[G/T]CGGGCAGCCTGAA	synonymous
2	C	T	GGGCTGTCTC[C/T]GCAGACAAGGCAG	synonymous (intron)
3	A	G	GCTCTCCAGG[A/G]GGTCCTGGGGGCC	synonymous

B. Mutagene variatie

De mutatie in het COL11A2 gen geeft aanleiding tot de ontwikkeling van skelet dysplasie 2 (SD2). Dit is een monogenetische autosomale recessieve aandoening die vastgesteld wordt bij o.a. de Labrador retriever (McKusick, 2014).

Het fenotype van SD2 wordt gekenmerkt door verkorte ledematen in combinatie met een normale verhouding tussen lichaamslengte en -breedte. In de meeste gevallen zijn de voorste ledematen meer aangetast in vergelijking met de achterste ledematen. Dit zorgt ervoor dat de schofthoogte van deze honden gereduceerd wordt met ongeveer

zes centimeter. Verder zijn deze honden niet gevoelig voor secundaire gezondheidsproblemen (Frischknecht et al., 2013).

Recent onderzoek van Frischknecht et al. (2013) heeft aangewezen dat deze genetische aandoening geassocieerd wordt met 143 G>C. Dit wil zeggen dat op nucleotide 143 een substitutie plaatsvindt van glycine naar cysteïne. In tabel 17 wordt de substitutie weergegeven op AZ- niveau van proline naar arginine (R48P).

Tabel 17: Overzicht mutagene variaties ADAM9 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	C	AspGlyVal[Arg/Pro]ArgAlaArg	SD2

1.3.2 Overzicht van variatie in collagenase genen

Hieronder worden de mutaties van de volgende collagenase genen besproken: ADAM9, ADAMTS10, ADAMTS17 en ADAMTSL2. De variaties worden ook hier telkens onderverdeeld in enerzijds de inerte variaties of de niet-functionele variaties en anderzijds de mutagene variaties. Deze variaties worden telkens weergegeven in een tabel.

1.3.2.1 ADAM9

Disintegrin and metalloproteinase domain - containing protein 9 is een enzym dat behoort tot de familie van de adamalysinen en wordt gecodeerd door het gen ADAM9. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 16. In totaal zijn er 161 genetische variaties beschreven voor dit gen (NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Er bestaan 124 SNP intronvariaties voor ADAM9. Daarnaast staan er 31 INDEL intronvariaties beschreven (NCBI: Gene, s.a.).

B. Mutagene variatie

Als gevolg van een mutagene variatie in het ADAM9 gen kunnen honden getroffen worden door cone rod dystrophy 3 (CRD3). Dit is een autosomaal recessieve aandoening aan het oognetvlies. Hierbij treedt primaire disfunctie en verlies van kegeltjes op. Deze fotoreceptoren zijn verantwoordelijk voor het ontvangen van licht waardoor kleurwaarnemingen mogelijk zijn. Hierop volgend of gelijktijdig worden ook de staafjes, de fotoreceptoren die de lichtintensiteit detecteren, afgebroken (Goldstein et al., 2010). Deze aandoening wordt vastgesteld bij de Glen- of Imaalterriër (Kropatsch et al., 2010).

CRD3 is een gevolg van de deletie van exon 15 en 16 van het ADAM9 gen (Tabel 18). Dit leidt tot variatie in het ORF met als gevolg de vorming van een vervroegd stopcodon (Kropatsch et al., 2010). Volgens Goldstein et al. (2010), gaat het om een 23.221 bp deletie in het gen dat net als voorgaande bron leidt tot het verlies van exon 15 en 16.

Tabel 18: Overzicht andere variaties ADAM9 (Goldstein et al., 2010). De schuine letters geven de sequentie weer die verwijderd wordt bij honden die getroffen zijn met CRD3.

SNP	Sequentie				Gevolg
1	GGCTCAA[AAG	CCAAGGC	TGCCCCAAG	AGATTGTTT	CRD3
	CATTGATGTGA	ATTCTAAA	GGTGACAGA	TTTGGCAAT	
	TGTGGTTTCTC	TGGCAAT	GAATACAAG	AAGTGTGC	
	CACTGGGAATG	CATTGTGT	GGCAAGCTT	CAGTGTGA	
	GAATGTACAAG	ACATGCCT	GTATTTGGAA	TCGTGCCTG	
	CTATTATTCAG	ACTCCCA	GTAAAGGCA	CCAAATGTT	
	GGGGTGTGGAT	TTCCAGCT	AGGATCAGA	TGTTCCAGA	
	TCCTGGGATGG	TGAATGA	AGGCACAAG	ATGTGACA	
	ATGGAAAG]AT	CTGTAGAA	ACT		

C. Andere Variatie

Voor dit gen zijn er ook vijf variaties waarover geen verdere informatie gekend is (Tabel 19) (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 19: Overzicht andere variaties ADAM9 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	A	G	TTTCTTTGAAAAC[A/G]TTAGTGTCAATGG	Geen info
2	A	G	AAGGACAGGACAC[A/G]TCTCCTTCAGGTA	Geen info
3	A	G	CTCTCATTCTCCC[A/G]TCCTTCCCCAACC	Geen info
4	G	T	CAACTCCTGGTTT[G/T]GTTGATCTGTTCT	Geen info
5	C	T	TGGTAATTTGTGG[C/T]TTTCCAGAAATGC	Geen info

1.3.2.2 ADAMTS10

ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10 (ADAMTS10) is een gen dat codeert voor het gelijknamige enzym dat behoort tot de familie van de adamalysinen. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 20. In totaal zijn er tien genetische variaties beschreven voor dit gen (NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Voor dit gen zijn er zes SNP intronvariaties gekend. Daarnaast is één intronvariatie te wijten aan een insertie. Als laatste zijn er ook twee synonymous variaties beschreven voor dit gen, die teruggevonden kunnen worden in tabel 20 (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 20: Overzicht inerte variaties ADAMTS10 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	A	G	CCTTCTCCTCGGC[A/G]GCTGACACGC	synonymous
2	A	G	GCTGCCCGATGCC[A/G]CACTGCGCGG	synonymous

B. Mutagene variatie

Er is één mutagene variatie gekend voor het ADAMTS10 gen dat leidt tot de ontwikkeling van primair open kamerhoek glaucoom (POAG) (McKusick, 2014). Deze aandoening is autosomaal recessief en wordt voornamelijk vastgesteld bij de Beagle, Shiba-Inu en Shih-Tzu.

Glaucoom of groene staar is een degeneratieve optische neuropathie. Het omvat verschillende aandoeningen aan het oog waaronder verlies van gezichtsveld, verlies van zenuwcellen t.h.v. het netvlies en degeneratie van de optische zenuwen. Verder wordt het vaak geassocieerd met verhoogde intra-oculaire druk (IOP) (Bell & Hampton, 2014; Stades, s.a.). Glaucoom wordt geclassificeerd in drie verschillende types namelijk POAG, primair gesloten kamerhoek glaucoom (PCAG) en primair congenitaal glaucoom (PCG). POAG is de meest voorkomende vorm (Kanemaki et al., 2013). Het is een primaire aandoening waarbij andere oog-aandoeningen gelijktijdig of voorafgaand optreden. Bij deze vorm wordt voornamelijk een verhoogde IOP vastgesteld. Deze verhoogde IOP wordt veroorzaakt door een foute balans tussen de in- en uitstroom van oogvocht naar de voorste oogkamer (Petersen & Alward, 2013). Door de open iridocorneale hoek (toename uitstroom) neemt deze druk steeds toe en kan dit leiden tot luxatie van de ooglens (Kuchtey et al., 2013).

Volgens Kuchtey et al. (2011), is de variatie te wijten aan een substitutie in het exon 17 van het ADAMTS10 gen waar, t.h.v. nucleotide 661, glycine wordt omgezet naar arginine (Gly661Arg) (Tabel 21). Deze verandering in AZ- samenstelling heeft een zeer nadelige invloed op de eiwitfunctie met gevolgen op de ontwikkeling van de huid, de ooglens en het hart. Deze bevindingen worden bevestigd door Kuchtey et al. (2013), waarbij de mutatie als oorzaak wordt aanzien voor POAG bij een populatie van Beagles. Bij de Shiba-Inu wordt het glaucoom geassocieerd met een synonymous SNP (C>T) in exon 4 van het S1 RNA binding domain 1 (SRBD1) gen (Tabel 21). Bij de Shih-Tzu ligt de variatie eveneens bij het SRBD1 gen maar in intron 1 (A>G) (Tabel 21) (Kanemaki et al., 2013; NCBI: Gene, s.a.).

De biochemische relatie tussen ADAMTS10 en SRBD1 is nog niet volledig duidelijk. Dit doordat de functie van het SRBD1 gen niet gekend is. Anderzijds is ook het mechanisme ongekend waarbij variaties in dit gen ervoor zorgen dat er een verhoogd risico is op de ontwikkeling van POAG. Doch heeft het enzym een vermoedelijke invloed op de eiwitsynthese, groei en apoptose van retinale ganglioncellen (Fingert, 2011).

Over het ADAMTS10 gen is er reeds meer geweten, zo wordt het overvloedig tot expressie gebracht ter hoogte van het trabeculaire netwerk van het oog. Deze bevindt zich in de hoek tussen de iris en het hoornvlies. De voornaamste functie bestaat eruit het kamervocht te laten wegvloeien waardoor de IOP niet te hoog oploopt (Kuchtey et al., 2013).

Tabel 21: Overzicht mutagene variatie ADAMTS10 en SRBD1 (Kanemaki et al., 2013).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	G	A	GTAGTGGAC[G/A]GGACACCCTGC	POAG ADAMTS10
2	C	T	ATTCTTCATCAATTT[C/T]AGCTTTTTGAT	POAG SRBD1 exon 4
3	A	G	TAGAAAGGTAGGTG[A/G]GGGTCAGTT	POAG SRBD1 intron 1

1.3.2.3 ADAMTS17

ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17 is een enzym dat behoort tot de familie van de adamalysinen. Het ADAMTS17 gen codeert voor dit enzym en is gelokaliseerd op chromosoom 3. Het gen kent in totaal 255 genetische variaties (NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Het aantal inerte variaties voor het ADAMTS17 gen bedraagt 252. Hierbij zijn 197 intronvariaties te wijten aan een SNP en 53 aan een insertie. Verder zijn er eveneens twee synonymous variaties beschreven voor dit gen (Tabel 22) (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 22: Overzicht inerte variaties ADAMTS17 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	CCGACCTCTGTGTGCA[C/T]GGCAAGTGCC	synonymous
2	C	T	GAGCAGAGGAGGTGTG[C/T]GAGGACTATT	synonymous

B. Mutagene variatie

In tabel 23 worden de mutagene variaties van het gen weergegeven. Er bestaat één missense mutatie en één frameshift mutatie (NCBI: Gene, s.a.). Daarnaast zorgt een mutagene variatie in het ADAMTS17 voor de ontwikkeling van lens luxatie. Dit is een autosomale recessieve aandoening van het oog (McKusick, 2014).

Primaire lens luxatie (PLL) is een aandoening waarbij een spontane verplaatsing van de ooglens optreedt als gevolg van ruptuur van de zonula ciliaris. Dit zijn vezels die de lens verbinden met de nabij gelegen ciliaire spier (Curtis & Barnett, 1980; Farias et al., 2010). De luxatie kan volledig of gedeeltelijk optreden waarbij de lens naar voren of naar achteren verschuift. Dit wordt waargenomen op een leeftijd van 2-6 jaar en werd al vastgesteld in 45 hondenrassen (Sargan et al., 2007).

De aandoening kan veroorzaakt worden door trauma of verschillende condities die de normale anatomie van het oog verstoren zoals o.a. katarakt en glaucoom (Farias et al., 2010). De symptomen van deze aandoening, ongeacht de oorzaak, uiten zich in zichtbare tekenen van oog irritatie zoals continue productie van traanvocht, wazig worden van de lens, ongecontroleerd samentrekkende beweging en langdurig knipperen. Bij langdurige luxatie kan gezichtsverlies optreden (Dislocated Eye Lens in Dogs, s.a.).

Volgens Farias et al. (2010), is de erfelijke vorm van deze ontwikkelingsstoornis te wijten aan de vervanging van de base guanine naar adenine in het gen ADAMTS17: 1473+1 (Tabel 23). Hierdoor zal de herkenningssite van de splitsingsdonor vernietigd worden in intron 10. Vervolgens zal tijdens de splicing exon 10 overgeslagen worden waardoor er een frameshift ontstaat die aanleiding geeft tot een vervroegde stopcodon (Gould et al., 2011).

Tabel 23: Overzicht mutagene variaties ADAMTS17 (Farias et al., 2010; NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	-	T	TGCCAGGACATGC[-/T]GGTGGTACCAGCG	frameshift
2	C	T	AGAGCAGAGGAGG[C/T]GTGCGAGGACTAT	missense
3	G	A	AACATGGAG[G/A]TAAGCAGCC	PLL

1.3.2.4 ADAMTSL2

ADAMTS-like 2 (ADAMTSL2) is een gen dat codeert voor het ADAMTS-like 2 enzym. Ook dit enzym behoort tot de familie van de adamalysinen. Het gen is gelokaliseerd op chromosoom 9. In totaal zijn er 77 genetische variaties beschreven voor dit gen (NCBI: Gene, s.a.).

A. Inerte variatie

Het aantal inerte variaties voor het ADAMTSL2 gen bedraagt 76. Hierbij zijn 68 intronvariaties te wijten aan een SNP en zes zijn te wijten aan een insertie. Verder zijn er eveneens twee synonymous variaties beschreven voor dit gen, die weergegeven worden in tabel 24 (NCBI: Gene, s.a.).

Tabel 24: Overzicht inerte variaties ADAMTSL2 (NCBI: Gene, s.a.).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	TCTCCCCATCAGA[C/T]GACTATGTCCACA	synonymous
2	C	T	CCTGCAAGCTCAC[C/T]GACCTGCGAG	synonymous

B. Mutagene variatie

Genetisch onderzoek heeft uitgewezen dat één enkele variatie t.h.v. exon 7 van het ADAMTSL2 gen aan de basis ligt van het Musladin-Lueke syndroom (MLS) (Bader et al., 2010). Het Musladin-Lueke syndroom is een autosomaal recessieve aandoening die zich manifesteert onder de vorm van fibrose t.h.v. de huid en gewrichten (Bader et al., 2010; McKusick, 2014). De mutatie 660C>T duidt op een non-synonymous variatie waarbij het AZ arginine wordt vervangen door cysteine t.h.v. codon 221 (R221C) (Tabel 25). Deze aandoening wordt vastgesteld bij de Beagle en heeft voornamelijk een negatieve invloed op de structuur en ontwikkeling van bindweefsel structuren in o.a. beenderen, huid, hart en spieren (Bader et al., 2010).

Beagles die getroffen zijn door MLS (twee defecte allelen) vertonen een afgeplatte schedel, spleetogen en een dichte vacht. De poten kunnen misvormd zijn waardoor deze honden op de toppen van hun tenen lopen. Daarnaast kunnen honden, die drager zijn van het recessieve allel, eveneens subtiele symptomen vertonen maar niet te maken krijgen met voorgaande gezondheidsgerelateerde defecten (Musladin-Leuke Syndrome (MLS), s.a.).

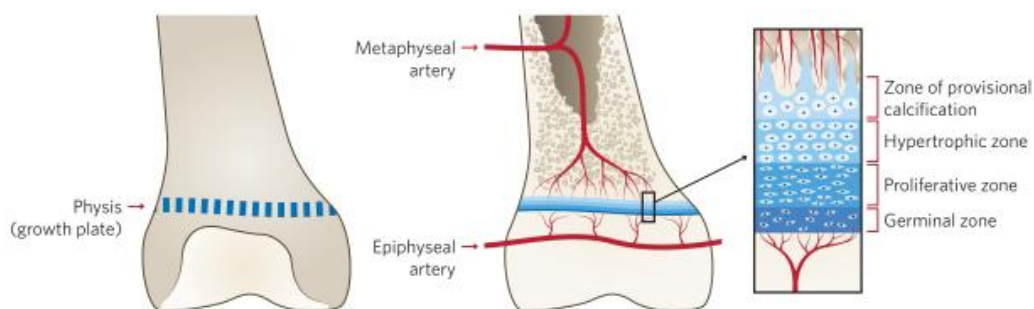
Tabel 25: Overzicht mutagene variatie ADAMTSL2 (Bader et al., 2010).

SNP	Allel1	Allel2	Sequentie	Gevolg
1	C	T	HisValThrGlyAsnTyr[Arg/Cys]LysGlyAsnAla	MLS

1.4 Biochemische relatie tussen collageen en collagenase

Collageen zorgt in het algemeen voor de opbouw van kraakbeen in botstructuren. Het is ook een belangrijk onderdeel van huid en bloedvaten en is ook aanwezig in spieren. Naast een overwegend mechanische functie worden collageen fibrillen teruggevonden t.h.v. het hoornvlies in het oog waar deze zorgen voor transparantie en mechanische stabiliteit (Fratzl, 2008). De werking van collagenasen steunt op het onderbreken van de drievoudige helix die aanwezig is in collageen. Deze biochemische activiteit is van belang voor de embryonale ontwikkeling, het vormen van de organen en de herstructurering en het herstel van weefsels. Daarnaast kan collagenolyse (afbraak van collageen) zorgen voor aandoeningen zoals artritis, kanker, fibrose en arteriosclerose (aderverkalking). Bij gewervelde dieren wordt dit proces voornamelijk geïnitieerd door collagenasen van de MMP familie (Chung et al., 2004). In de volgende paragraaf wordt zowel het centrale proces in de endochondrale botvorming besproken als één van de meest voorkomende aandoeningen, nl. artrose.

Het centrale proces in de endochondrale botvorming is de differentiatie van de chondrocyten of kraakbeencellen t.h.v. de groeiplaat (Figuur 8). Deze staat in voor de lengtegroei van de beenderen. De chondrocyten zorgen voor de productie van de ECM moleculen, waaronder collageen type II en proteoglycanen, en produceren eveneens collagenasen (MMP13) die deze opruimen. Hierbij wordt de vernieuwing en de mineralisatie van kraakbeen op gang gebracht wat uiteindelijk leidt tot de vorming van het latere botweefsel. De groeiplaat van zoogdieren wordt onderverdeeld in verschillende zones, respectievelijk de rust-, proliferatieve-, hypertrofische- en verkalkingszone. De rustzone vertoont weinig celdeling. Daar tegenover bevat de proliferatieve zone actieve cellen die de ECM gaan vormen. De ruimte die nodig is voor de nieuw gevormde cellen wordt gegenereerd door matrix- afbrekende eiwitten waaronder MMP13. In het onderste gedeelte van de hypertrofische zone treedt mineralisatie op van de groeiplaat. Als laatste, t.h.v. de verkalkingszone, gaan de chondrocyten degenereren en treedt er calcificatie of verkalking op van de matrix (Mackie et al., 2011).



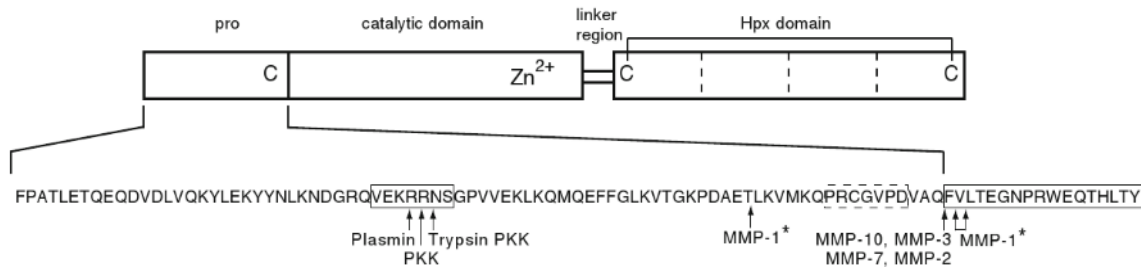
Figuur 8: Schematische voorstelling van het ossificatiecentrum in de epifyse (Physeal growth plate, s.a.).

Voorbeeld: Artrose als een van de meest voorkomende aandoeningen bij de hond

Bij artrose treedt verhoogde expressie van MMP op waarbij het collageen aanwezig in de hypertrofe zone van de groeiplaat wordt afgebroken (Tchetina, 2010). Artrose is de meest voorkomende aandoening die zorgt voor afbraak van het gewrichtskraakbeen. Dit door de geleidelijke afbraak van de ECM dat voornamelijk is opgebouwd uit collageen type II en proteoglycanen. Het verlies van grote hoeveelheden proteoglycanen gaat gepaard met afnemende samenhang van het kraakbeenweefsel en veroorzaakt schade aan het collageen netwerk. Deze laatste is verantwoordelijk voor de elasticiteit van het weefsel. De degradatie van deze twee moleculen wordt geassocieerd met ADAMTS en MMP (Nagase & Kashiwagi, 2003). In het bijzonder zal de splitsing van collageen type II veroorzaakt worden door de activiteit van MMP13 (Wu et al., 2002). De splitsing van collageen door collagenase wordt verder verduidelijkt aan de hand van collageen type I en MMPI.

Collageen type I is een heterotrimeer dat bestaat uit twee identieke $\alpha 1$ ketens en een derde $\alpha 2$ keten (Hulmes, 2008). Elk van deze ketens bestaat uit herhalende triplets van Gly-X-Y, waarin X en Y vaak als proline en hydroxyproline worden aangegeven. Wanneer deze ketens met elkaar verweven, vormen ze een drievoudige helix die bestendig is tegen de meeste proteïnasen. Collagenasen van de MMP familie splitsen deze ketens op een specifieke site die gekarakteriseerd wordt door de tripeptide sequentie Gly - [Ile/Leu] - [Ala/Leu] welke gelokaliseerd is op $\frac{3}{4}$ van het N- uiteinde van het collageen (Bijlage III: Figuur 30) (Clark & Cawston, 1989; Fields, 1991).

MMP1 (collagenase 1) wordt gesecreteerd onder de vorm van een pro- enzym bestaande uit een propeptide, een katalytisch domein, een korte bindingsregio die rijk is aan proline en een C- eindstandig hemopexin (Hpx) domein. Dit laatste domein is het belangrijkste voor de splitsing van collageen (Figuur 9) (Clark & Cawston, 1989). De activatie van het pro-enzym is een belangrijke stap voor de collagenolyse. Deze stap wordt geïnitieerd door de werking van een aantal plasma of weefsel proteïnasen o.a. phosphoribulokinase (PKK), plasmine en trypsine die in het midden van het propeptide knippen. Dit activeert gedeeltelijk het pro- collagenase. Uiteindelijk wordt het propeptide volledig weggeknipt d.m.v. MMP3, MMP2, MMP7 of MMP10. Dit is afhankelijk van de beschikbaarheid van deze enzymen in de lokale weefsels (Nagase & Visse, 2011).

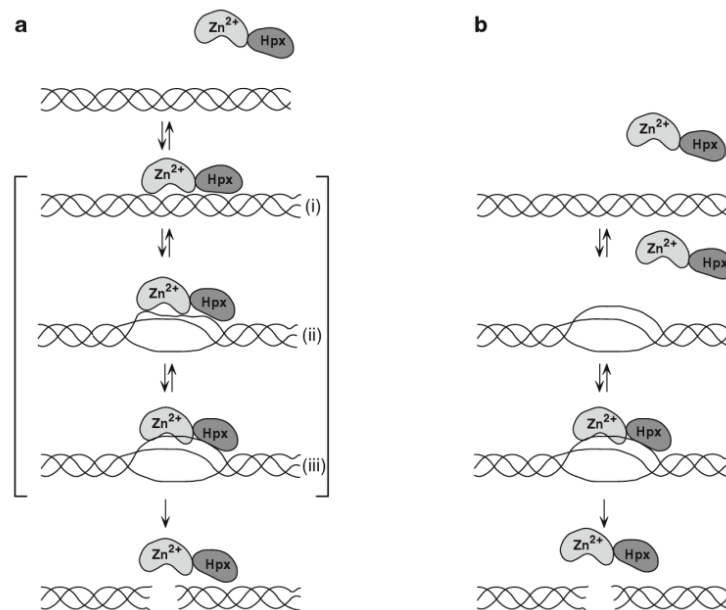


Figuur 9: pro – MMP1 (Nagase & Visse, 2011).
Weergave splitsingssites tijdens de activatie van het enzym.

MMP1 bezit een bindingsplaats waarin het katalytische zink- ion gelokaliseerd is. Deze plaats is slechts groot genoeg voor een enkele polypeptideketen (Bijlage IV: Figuur 31). Dit wil zeggen dat MMP1 in de eerste plaats ervoor zal moeten zorgen dat collageen type I wordt ontvouwen alvorens het enzym de afzonderlijke α ketens kan hydroliseren (Chung et al., 2004; Nerenberg et al., 2008). Uit onderzoek van Han et al. (2010) blijkt dat de homotrimeren zoals COL1A2 resistenter zijn tegen de enzymatische activiteit van MMP1 dan de heterotrimeren, dit door het minder efficiënte verloop van de collagenolyse bij COL1A2.

De manier waarop de collagenasen ervoor zorgen dat de helix zich ontvouwt, is nog niet helemaal duidelijk. Er zijn twee mogelijke manieren voor dit proces. De eerste manier is een collagenase geïnduceerd ontvouwingproces (Figuur 10a). Hierbij zal in een eerste stap MMP1 binden op de helix door middel van de kloof gevormd tussen het katalytische en Hpx domein (i). Vervolgens zal het collageen gen plaatselijk ontvouwen door het contact met MMP1 (ii). Als laatste zal de keten passen op de actieve bindingsplaats waar het zink- ion zich bevindt (iii). Deze laatste stap wordt gevolgd door het knippen van de drie peptideketens van het collageen gen (Nagase & Visse, 2011; Van Doren, 2011). Deze manier vereist energie onder de vorm van ATP, terwijl de collagenase activiteit in principe geen energie vereist (Voges et al., 1999; Goldberg, 2003).

Bij de tweede manier (Figuur 16b), ook wel de Stultz methode genoemd, wordt ervan uitgegaan dat de binding van de driefoudige helix vrij snel uit elkaar valt en op die manier reeds ontvouwt alvorens er contact gemaakt wordt met collagenase. Wanneer MMP1 hierna bindt op de ketens zullen deze onmiddellijk gesplitst worden (Stultz, 2002).



Figuur 10: Ontvouwingmodellen (Nagase & Visse, 2011).
 (a) collagenase geïnduceerd ontvouwingmodel; (b) Stultz – model

1.5 Heuplaxiteit en mogelijke rol van collageen en collagenase

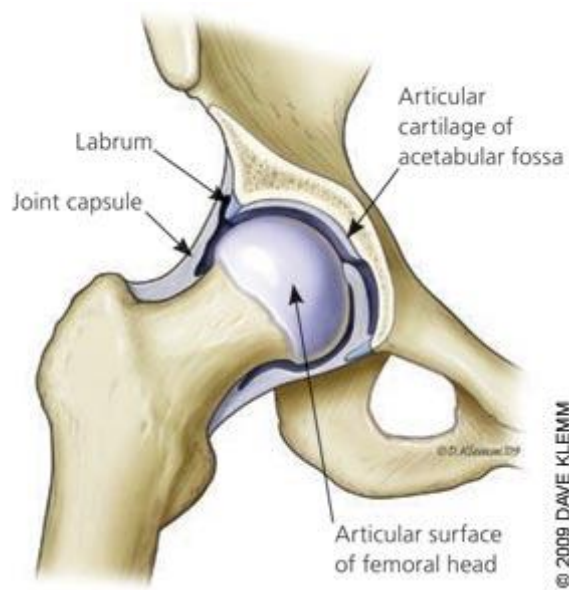
Heupdysplasie (HD) wijst op een abnormale ontwikkeling van het heupgewricht met als gevolg secundaire gewrichtsaandoeningen (artrose, artritis) en klinische symptomen zoals pijn en kreupelheid. Deze orthopedische aandoening wordt voornamelijk gekarakteriseerd door heuplaxiteit. Dit duidt op de abnormale bewegingsvrijheid van de femurkop t.o.v. de heupkom met subluxatie tot gevolg. Anderzijds worden ook ossificatiestoornissen vastgesteld bij honden met HD. Hierbij vertonen de beenderen geen glad en rond oppervlak, zoals bij een gezond heupgewricht. Door deze instabiliteit ontstaat er meer wrijving met beschadigingen van het gewrichtskraakbeen tot gevolg. Dit kan aanleiding geven tot de ontwikkeling van artrose, een chronische ontsteking t.h.v. het heupgewricht (Fries & Remedios, 1995; Todhunter & Lust, 2003).

HD is een multifactoriële aandoening die onder andere afhankelijk is van omgevingsfactoren en de genetische achtergrond van de hond (Flüeckiger, 2007). Het is eveneens een polygenetische aandoening die veroorzaakt wordt door de interactie van mogelijk tot honderden genen. Minstens één van de genen is recessief, maar er is nog geen onderzoek dat aanwijzing geeft naar dit specifieke gen. Verder bepaalt het genotype van elk individu de spieraanleg, innervatie, vorm en grootte van de heup (Alexander, 1992).

De mate van expressie van genen is afhankelijk van omgevingsinvloeden zoals beweging en voeding. Ze vormen m.a.w. geen primaire oorzaak van HD maar bepalen wel de ernst ervan. De erfelijkheidsindex wordt bepaald door de samenwerking van genen en de omgevingsfactoren. De erfelijkheidsgraad voor HD varieert tussen 0,2 en 0,6 met een overgrote meerderheid van de gevallen gelegen tussen 0,4 en 0,5 (Mackenzie et al., 1985; Brass, 1989; Lingaas & Klemetsdal, 1990). Deze aandoening wordt voornamelijk vastgesteld bij grote en middelgrote hondenrassen zoals Saint Bernard, Labrador Retriever, Duitse Herder, Golden Retriever, Bordercollies en Rottweilers (Smith et al., 2001; Zhu et al., 2012).

Het gewrichtskapsel (Figuur 11) en de vorming van kraakbeen- en botweefsel zijn de twee hoofdcomponenten die bijdragen tot de stabiliteit van het heupgewricht. De sterkte van het kapsel wordt overwegend bepaald door de aanwezigheid van fibrilvormend collageen. Anderzijds wordt de elasticiteit bepaald door de samenstelling van de ECM die opgebouwd is uit collageen, proteoglycanen, water en elastine (Todhunter & Lust, 2003).

De stijfheid van het bindweefsel varieert afhankelijk van de samenstelling en de ouderdom van het weefsel. Om een idee te geven is in een normaal gewrichtskapsel van het rund 83 % collageen type I aanwezig. Voor de hond zijn hierover geen eenduidige cijfers gekend (Kleftogiannis et al., 1994). Verder wordt in het gewrichtskapsel eveneens type III collageen waargenomen. Tijdens de groei zal de verhouding van type III op type I collageen toenemen in de ligamenten en afnemen t.h.v. de pezen (Vingsbo-Lundberg et al., 1998). Volgens Madsen et al. (1994), bevat het heupkapsel van een dysplastische heup een hoger ratio type III op type I collageen ten opzichte van het gewrichtskapsel van een normale heup van de Greyhound.



Figuur 11: Anatomie van het heupgewricht (Klemm, 2009).

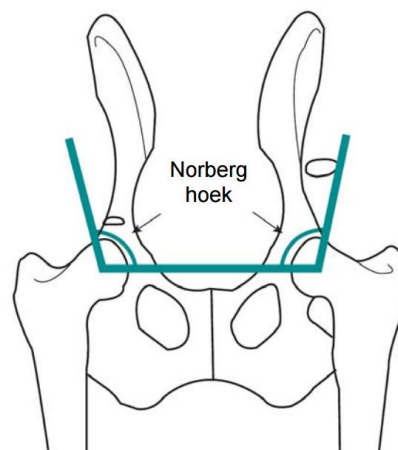
De kop van de femur en de binnenkant van het acetabulum is bekleed met kraakbeenweefsel. Rondom het gewricht zit het kapsel welke bijkomend verstevigd wordt door ligamenten. Het labrum is een ring van vezelig kraakbeen dat zorgt voor verdieping van de heupkom.

Verder wordt eveneens een verhoogd gehalte aan collageen type III eindstandige propeptide waargenomen in de gewrichtsvloeistof en het serum van honden die leiden

aan HD. Dit als gevolg van een letsel aan het gewrichtskapsel. Een verhoogd gehalte aan collageen type III wordt namelijk vastgesteld na weefselschade (Madsen et al., 1994; Madsen, 1997). Of dit eerder te wijten is aan een letsel of een genetische afwijking is nog onbekend (Todhunter & Lust, 2003).

De diagnose van HD is gebaseerd op radiografische beelden van de heup die genomen worden bij honden met een leeftijd van minimum één jaar. Om vervolgens de ernst van de dysplasie vast te stellen zijn er drie verschillende scores in gebruik. De FCI (Fédération Cynologique Internationale), de OFA (Orthopedic Foundation for Animals), en de BVA / KC (British Veterinary Association / The Kennel Club) (Flüeckiger, 2007). De FCI score is van toepassing in België en wordt hieronder verder verduidelijkt.

De FCI score wordt toegepast in Europa en maakt gebruik van vijf gradaties. Deze worden gedefinieerd o.b.v. de Norberghoek (NA) (Figuur 12), de graad van subluxatie, vorm en diepte van de heupkom en tekenen van secundaire gewrichtsstoornissen. In onderstaande tabel wordt de FCI classificatie weergegeven (Tabel 26).



Figuur 12: Schematische weergave van de Norberghoek (Kapatkin et al., 2002).

Op de dorsoventrale opname van het heupgewricht wordt een lijn getrokken tussen de centra van de femurkoppen. Langs de craniale rand van het acetabulum wordt, langs beide zijden, een lijn getrokken die deze lijn snijdt. De mediale hoek is de Norberghoek (NA).

Tabel 26: FCI classificatie (Flüeckiger, 2007; Hanssen, s.a.).

A Geen teken van heupdysplasie

De heupkom en heupkop zijn congruent, ze passen perfect in elkaar. De articulaire tussenruimte is smal en regelmatig. De rand van de heupkom is goed omschreven en licht overkoepelend. De norberghoek bedraagt ongeveer 105°.

**B Bijna normale heupgewrichten**

De femurkop en heupkom passen niet helemaal in elkaar. De norberghoek bedraagt ongeveer 105°. In het andere geval zijn de femurkop en heupkom nauw aansluitend en hebben een norberghoek van minder dan 105°.

**C Milde vorm van HD**

De femurkop en heupkom passen niet mooi in elkaar, de norberghoek bedraagt ongeveer 100° en/of de heupkom is afgevlakt. Er treden discrete tekenen op van artrose t.h.v. de rand van de heupkom of t.h.v. de femurkop.

**D Gematigde vorm van HD**

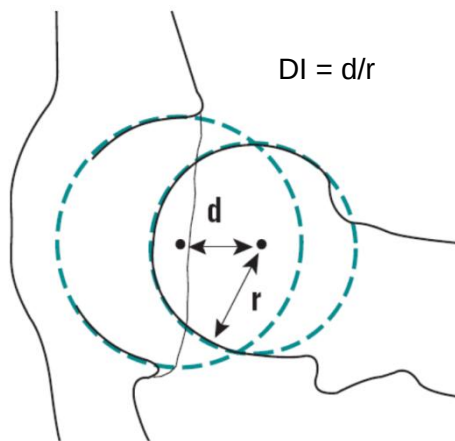
Duidelijke incongruentie tussen femurkop en heupkom. De norberghoek bedraagt meer dan 90°. Teken van afgevlakte heupkom en artrose zijn duidelijk aanwezig.

**E Ernstige vorm van HD**

Luxatie en subluxatie van het heupgewricht zijn duidelijk aanwezig. De norberghoek bedraagt minder dan 90°. Duidelijke afgevlakte heupkom, misvorming van de femurkop en andere tekenen van artrose worden vastgesteld.



Naast bovenstaande methode is er enige tijd geleden (1993) een nieuwe methode ontwikkeld die zich focust op het bepalen van de laxiteit van het heupgewricht. Bij deze methode met name, het Pennsylvania hip Improvement program (PennHIP), wordt er gebruik gemaakt van een kwantitatieve benadering door middel van een distractie index (DI). Deze index is minder gevoelig voor fouten als gevolg van subjectieve meetsystemen (Williams, 2010; Smith, s.a.).



Figuur 13: De distractie index (Kapatkin et al., 2002).

Bij de PennHIP methode worden rond de leeftijd van zestien weken drie verschillende radiografische opnamen gemaakt, namelijk een distractie opname, een compressie opname en een opname met gestrekte heupen (ventrodorsale opname). Op de eerst genoemde opname (Figuur 14: A) wordt de DI berekend, het wordt gebruikt voor een herhaalbare meting met betrekking tot laxiteit en congruentie. Hierbij worden twee cirkels weergegeven op de foto, één die de contour van het heupgewricht volgt en één rond de femurkop. De afstand (d) tussen de centra is

een maat voor de laxiteit van het heupgewricht. De DI wordt tot slot berekend door de afstand d te delen door de straal (r) van de femurkop (Figuur 13).

De DI is gelegen tussen 0 en 1. Honden met een DI- waarde $< 0,3$ hebben strakke heupgewrichten (heupkom en heupkop zijn congruent), terwijl honden met een DI- waarde van $> 0,7$ zeer losse heupgewrichten bezitten. Een index van 0,15 wil zeggen dat de kop van de femur tot 15% uit het heupgewricht kan verplaatsen (strakke heup). Een index van 0,77 duidt op een zeer los heupgewricht. In het algemeen duidt een DI $> 0,70$ op een hoge gevoeligheid voor artrose en een DI $< 0,30$ op een minieme gevoeligheid voor artrose (Verge, 2009; Smith, s.a.; Measuring Hip Joint Laxity, s.a.). Voor bepaalde rassen werden drempelwaarden vastgelegd onder dewelke honden geen risico lopen op het ontwikkelen van artrose. De Duitse Herder heeft een DI-drempelwaarde van 0,28. De DI-drempelwaarde voor de Rottweiler bedraagt daarentegen 0,35. Daardoor is de kans dat een Duitse Herder artrose ontwikkelt bij een DI van 0,70 al 82 %. Terwijl bij de Labrador Retriever, Golden Retriever en Rottweiler deze kans maar 39 % bedraagt, bij deze DI waarde (Smith et al., 2001). De erfelijkheidsgraad van de DI voor de Duitse Herder bedraagt volgens Kapatkin et al. (2002) 0,63. Volgens Leighton et al. (1977) bedraagt de erfelijkheidsgraad van de DI 0,50 voor de Duitse Herder en 0,60 voor de Labrador Retriever.

Op de compressie opname (Figuur 14: B) wordt de compressie index (CI) berekend. De CI wordt op dezelfde manier bekomen als de DI. Deze opname wordt gebruikt voor de bepaling in hoeverre de kop van de femur past in het heupgewricht. Een te hoge CI kan wijzen op nog onzichtbare osteo-artrose. De laatste opname (Figuur 14: C), de ventrodorsale opname, wordt tot slot gebruikt om supplementaire informatie te verkrijgen omtrent de aanwezigheid van artrose ter hoogte van het heupgewricht, deze opname wordt ook bij de conventionele methode gebruikt (Verge, 2009; Smith, s.a.; Measuring Hip Joint Laxity, s.a.).



Figuur 14: Radiografische opnamen pennHIP (Smith G. , s.a.).
A. distractie opname; B. compressie opname; C. ventrodorsale opname.

Tot slot wordt de PennHIP methode vergeleken met het FCI systeem in een samenvattende tabel (Tabel 27).

Tabel 27: Overzicht pennHIP versus FCI – score (Williams, 2010)

	PennHIP	FCI
Anesthesie	Volledige anesthesie	Voldoende tot volledige relaxatie van de spieren is gewenst.
Kosten	€ 200 - € 400	€ 35 + radiografie en dierenartskosten
Minimumleeftijd hond	16 weken	12 maanden voor de meeste rassen, 18 maanden voor grote en reuzenrassen.
Aantal radiografieën	3	1
Score	Kwantitatief: Distractie index 0-1 bepaald door een erkende dierenarts	Kwalitatief: 5 categorieën van excellent tot ernstige aantasting, gebaseerd op de evaluatie van één of meerdere dierenarts(en).

2 Materiaal & Methoden

2.1 Inleiding

Het onderzoek naar de variatie in collageen- en collagenase genen bij de hond kadert binnen het ruimere Akela project. Binnen dit project wordt gezocht naar de genetische variatie die bij honden, katten en paarden de oorzaak is van de verschillende karakteristieken.

Het onderzoek dat verder wordt besproken richt zich voornamelijk op het zoeken naar SNP's in het ADAMTS17 gen die geassocieerd kunnen worden met het type heuplaxiteit dat bij de hond reeds werd vastgesteld. Hierbij worden de verschillende exonsequenties vergeleken tussen honden met een te hoge laxiteit ($DI > 0,7$) en honden met een correcte laxiteit ($DI 0,2-0,4$) die als controle worden gebruikt. Als eerste wordt een overzicht gegeven van hoe tewerk werd gegaan voor het verzamelen en voorbereiden van de speekselstalen gevolgd door een opsomming van de gebruikte statistische methoden. Daarna volgt een korte beschrijving van het kandidaatgen, ADAMTS17. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van de gebruikte protocollen omtrent DNA extractie, Polymerase Chain Reaction (PCR) en gel elektroforese. Tot slot wordt de werkwijze van het zichtbaar maken, zuiveren en vriesdrogen van het DNA besproken gevolgd door de werkwijze van de sequentieanalyse.

2.2 Voorbereiden en verzamelen van speekselstalen

2.2.1 Selectie van honden

Voordat gestart werd met het verzamelen van DNA stalen werd vooreerst een selectie gemaakt van welke honden interessant zouden zijn voor dit onderzoek. Er werd gezocht naar honden waarvan meer informatie gekend was over de heupen. Enerzijds werden stalen genomen van honden met heuplaxiteit. Deze aandoening werd bevestigd door een officiële heupstatus en/of röntgen foto's. Daarnaast werden ook stalen genomen van honden zonder heuplaxiteit (controlegroep) waarvan eveneens een officieel document beschikbaar was. In het ideale geval werden de honden gediagnosticeerd door middel van de pennHIP methode. Deze methode dient uitgevoerd te worden door een dierenarts die hiervoor het nodige certificaat bezit. Als laatste werden ook stalen genomen van honden die behoren tot een tussengroep op vlak van heuplaxiteit.

Daarnaast kwamen niet alle hondenrassen in aanmerking. De swabs werden afgenomen bij verschillende middelgrote- en grote hondenrassen die gepredisponeerd zijn voor de ontwikkeling van heuplaxiteit. Kleine hondenrassen kwamen niet in

aanmerking voor het onderzoek vermits het aantal gevallen van HD en laxiteit ter hoogte van de heupen te beperkt is.

In België zijn er momenteel veertien pennHIP gecertificeerde dierenartsen. Deze werden allemaal gecontacteerd om deel te nemen aan het onderzoek. Slechts twee van hen stemden toe. Daarnaast werden twee dierenartsen gecontacteerd die gespecialiseerd waren in orthopedische aandoeningen bij honden. Zij hebben meteen positief gereageerd op het project. De overige stalen werden voornamelijk verzameld bij erkende fokkers van de Koninklijke Maatschappij Sint- Hubertus (K.M.S.H.). In totaal zijn er zestien fokkers gecontacteerd waarvan er negen hebben deelgenomen. Tot slot werden eveneens 24 hondeneigenaars gecontacteerd en één blindengeleidehondenorganisatie.

2.2.2 Verzamelen van speeksel

Per hond werden telkens twee speekselswabs verzameld. Dit speeksel werd afgenomen met behulp van de collectie kit Copan eNATTM (Figuur 15). Elke kit bestond uit een steriele verpakking met hierin twee componenten. Enerzijds bevatte de verpakking een buisje met schroefdop dat gevuld is met één ml eNATTM transport- en bewaar medium. Dit medium zorgt ervoor dat DNA wordt gestabiliseerd en inactieveert de levensvatbaarheid van microben (o.a. *E. coli*, *S. aureus* en *C. albicans*) binnen 30 minuten. Anderzijds bevatte deze een steriele swab opgebouwd uit zachte nylon vezels. Bij elke staalname werd de swab uit de verpakking gehaald en vervolgens een tiental seconden op het tandvlees en wangslimvlies van de hond geplaatst waarbij een draaiende beweging werd uitgevoerd. De swab werd hierna onmiddellijk in het buisje geplaatst. Het afgenomen staal kan na collectie gedurende een periode van vier weken bewaard worden bij kamertemperatuur of 4 °C of gedurende zes maanden bij - 20 °C (Collection and Preservation System, 2012). Vervolgens werd op elk buisje een sticker gekleefd met informatie van de hond. Dit werd tot slot bewaard in een gelabeld zakje.



Figuur 15: Collectie kit Copan eNATTM (Multiplex PCR, 2013).

Elk monster werd vergezeld van een formulier waarin zowel de informatie van de eigenaar als van de hond vermeld werd (zie bijlage V). Deze informatie omvat de leeftijd, het geslacht, het stamboomnummer, de chipnummer/ tatoeage, of de hond werd gecastreerd/ gesteriliseerd, datum van monsternamen alsook alle informatie omtrent de status van HD en elleboogdysplasie en verdere belangrijke aandoeningen.

Op het einde van elk formulier werd er telkens een schriftelijke toestemming gevraagd aan de eigenaar om het staal te gebruiken en te bewaren in de databank van Akela.

Bij dit formulier werd, indien aanwezig, het DNA profiel van de hond toegevoegd. Op deze manier werd de informatie omtrent negentien verschillende genetische merkers opgeslagen in de databank (AHT121, AHT137, AHTh171, AHTh260, AHTk211, AHTk253, Amelogenin, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, REN162C04, REN169D001, REN169O18, REN247M23 en REN54P11). Indien mogelijk werd ook de onderlinge verwantschap duidelijk vermeld.

2.2.3 Aanvullen databank

Alle gegevens die verzameld werden via het formulier werden vervolgens ingegeven in de reeds bestaande Akela excel databank. Op deze manier werd een overzichtelijk beeld verkregen van elke hond.

2.3 Statistische methode voor analyse

Om een representatiever beeld te verkrijgen werd de statistiek niet alleen uitgevoerd op de genomen stalen voor deze masterproef, maar werd de volledige Akela databank ter beschikking gesteld.

Vooreerst werd op de bekomen informatie van alle honden, die aanwezig zijn in de Akela database, beschrijvende statistiek uitgevoerd. Deze informatie betreft o.a. het ras, de leeftijd en het geslacht van de hond. Daarnaast wordt ook een kort overzicht gegeven van de frequentie van het type van oorstanden gevolgd door de frequentie van het al dan niet voorkomen van beide testikels (cryptorchidie). Ook het voorkomen van tandtekorten wordt weergegeven. De frequentie van de aanwezigheid van polydactylie (sint Hubertus klauw) wordt eveneens vermeld. Daarna volgt een overzicht van de verschillende vachttypes en hun voorkomen. Het medische rapport van de hond omvat de aanwezigheid van HD en de HD status, de aanwezigheid van ED en bijhorende status en een overzicht van eventuele andere problemen. Tot slot wordt de aanwezigheid van een DNA profiel weergegeven. In de verdere analyse wordt er specifiek ingegaan op de heupen via de Kendall's tau en de χ^2 test. Deze laatstgenoemde testen worden uitgevoerd m.b.v. SPSS statistics 21.

2.4 Kandidaat gen ADAMTS17

ADAMTS17 is één van de 29 gekende ADAMTS genen bij zoogdieren. Deze genen coderen voor metalloproteasen die via proteolyse zorgen voor een wijziging van extracellulaire structurele eiwitten. Mutaties in verschillende ADAMTS genen worden geassocieerd met een divers aantal humane ziekten waaronder het Ehlers- Danlos

syndroom (ADAMTS2) en het Weill-Marchesani syndroom (ADAMTS17). Ehlers-Danlos wordt gekarakteriseerd door hyperlaxiteit van de huid en gewrichten. Het Weill-Marchesani syndroom wordt gekenmerkt door een kleine gestalte en een verplaatste ooglens (Farias et al., 2010; Mellersh, 2012). Zoals eerder vermeld werd, is er bij de hond eveneens een variatie gekend in het ADAMTS17 gen die de oorzaak is van primaire lens luxatie. Omwille van de associatie met het fenotype “laxiteit” werd dit gen uitgekozen om te sequencen.

2.5 DNA extractie

2.5.1 Gebruikte producten

- Speekselstalen
- Epjes, spin - filter, 2.0 ml epje en 1.5 ml epje
- Vortex
- Warmwaterbad
- Centrifuge
- Micro pipetten
- Was buffer: 42,9 % (v/v) (catalogusnummer: 1035120200, firma: Stratec Molecular GmbH)
- Lysis buffer G (catalogusnummer: 1035120200, firma: Stratec Molecular GmbH)
- Proteïnase K (catalogusnummer: 1035120200, firma: Stratec Molecular GmbH)
- Binding buffer A: 30 % (v/v) (catalogusnummer: 1035120200, firma: Stratec Molecular GmbH)
- Elutie buffer (catalogusnummer: 1035120200, firma: Stratec Molecular GmbH)

2.5.2 Methode

Om het DNA uit de speekselswabs te extraheren werd gebruik gemaakt van de Invisorb® Spin Swab Kit. In de eerste stap van het gevolgde protocol wordt vooreerst 600 µl lysis buffer G en 20 µl proteïnase K in een epje gebracht. Hierbij wordt vervolgens 200 µl uit het reageerbuisje van de swab toegevoegd. Daarna worden de epjes gedurende 30 minuten in een warmwaterbad van 65 °C geplaatst, dewelke een constante schudbeweging uitvoert.

In een volgende stap worden optimale omstandigheden gecreëerd voor de werking van de toegevoegde enzymen. Hiervoor wordt 300 µl binding buffer A toegevoegd aan het mengsel en wordt vervolgens goed gemengd door het op en neer te pipetteren. Vervolgens wordt deze oplossing in een 2.0 ml epje met spin-filter overgebracht en gedurende twee minuten aan een snelheid van 11.000 rpm gecentrifugeerd. Hierna wordt het filtraat verwijderd uit het epje.

De spin-filter, waarop zich het DNA bevindt, wordt bijgehouden en een aantal keer herhaaldelijk gewassen. Eerst en vooral wordt 700 µl wasbuffer toegevoegd en gedurende één minuut gecentrifugeerd aan 11.000 rpm. Het verkregen filtraat wordt opnieuw verwijderd uit het epje. Dit gehele proces wordt nogmaals herhaald en gevolgd door een laatste maal centrifugeren gedurende vier minuten aan maximale snelheid.

In een laatste stap wordt het eigenlijke DNA geëxtraheerd uit het verkregen substraat. Hiervoor wordt 50 µl voorverwarmde (65 °C) elutie buffer toegevoegd aan de spin-filter. Vervolgens wordt dit gedurende één minuut geïncubeerd bij kamertemperatuur waarna het monster gecentrifugeerd wordt gedurende één minuut aan een snelheid van 11.000 rpm. Vervolgens wordt nogmaals 50 µl voorverwarmde elutie buffer toegevoegd en worden alsook de daaropvolgende stappen herhaald. Tot slot wordt de spin-filter verwijderd. Het filtraat, aanwezig in het epje, wordt behouden en bevat het zuivere DNA (User manuel Invisorb Spin Swab Kit, 2013).

2.6 Meten concentratie DNA

2.6.1 Gebruikte producten

- Epjes
- 20 X TE-buffer (pH 7,5) (firma: Promega)
- Quantifluor® dsDNA Dye, 200 X (firma: Promega)
- Nuclease vrij water
- Micropipetten
- aluminiumfolie
- Promega Quantus™ Fluorometer
- DNA

2.6.2 Methode

Voor het meten van de DNA concentratie werd gebruik gemaakt van de Quantifluor® DNA Sample Kit. Hierbij wordt eerst 99 µl TE-buffer werkoplossing (1x) toegevoegd aan ieder epje. Deze oplossing wordt verkregen door twee milliliter van het TE-concentraat (20 x) te verdunnen met 38 ml nuclease vrij water. Vervolgens wordt aan ieder epje 100 µl 'work solution' toegevoegd en zorgvuldig op en neer gepipetteerd om de oplossing te mengen. De Quantifluor® dsDNA Dye work solution wordt aangemaakt door 10 µl concentraat te verdunnen met 1990 µl TE-buffer (werkoplossing 1 x). Dit product is zeer gevoelig aan licht en wordt dus bewaard in aluminiumfolie. Tot slot wordt 1 µl DNA toegevoegd aan ieder epje waarna de volledige oplossing nog een laatste keer gemengd wordt. De concentratie van elk epje wordt vervolgens gemeten met behulp van de Promega Quantus™ Fluorometer. De minimale gewenste concentratie voor een goed verloop van de PCR bedraagt 1,00 ng/µl (Technical Manual, 2014).

2.7 Optimale condities PCR bepalen

In een eerste fase werden de primers ontwikkeld waarna vervolgens de optimale condities werden vastgesteld. Hierbij werden alle primers (Bijlage VI) van ADAMTS17 getest bij acht verschillende temperaturen.

2.7.1 Gebruikte producten

- Welletjes
- Micro pipetten
- BioRad T100™ Thermal Cycler
- IJsbad
- Primers ADAMTS17 (firma: Integrated DNA Technologies (IDT))
- Groene GoTaq® buffer
- Kleurloze GoTaq® buffer
- DNTPs
- GOTAQ® Polymerase
- MilliQ - water
- MgCl₂

2.7.2 Voorbereiding Primers

Vooreerst werden de sequenties van de verschillende exonen van ADAMTS17 opgezocht op 'Ensembl Genome Browser'. De benodigde primers werden verder ontwikkeld met behulp van 'primer-BLAST'. Op deze site wordt iedere exon sequentie van ADAMTS17 afzonderlijk ingegeven en wordt de grootte van het PCR product ingevuld (500-600 bp). Op basis hiervan stelt het programma alle mogelijke primers voor. Primers moeten voldoen aan de volgende eigenschappen. De lengte van de primers is 18-22 bp (PCR Primer Design Guidelines, 1994) of 20-24 bp volgens Judelson (2006). Daarnaast bedraagt de smelttemperatuur van de primers 52-58 °C. Beide primers hebben eveneens dezelfde smelttemperatuur of maximaal 4 °C verschil, de smelttemperatuur is bij voorkeur gelijk aan (of 2 °C lager dan) de PCR annealing temperatuur, de primers moeten ongeveer 40-60 % GC-nucleotiden bevatten, een G of C base op het 3' einde van de primer is wenselijk, de primers mogen maximaal vier dinucleotiden bevatten (vier herhalingen) en tot slot mogen twee primers geen homologe sequentie bevatten (PCR Primer Design Guidelines, 1994).

Het programma houdt hier rekening mee. Vervolgens wordt het correcte primerpaar zelf geselecteerd op basis van hun lengte. De forward en reverse primer zijn preferentieel even lang. Vervolgens wordt de positie van de primers ten opzichte van de exon sequentie bekeken. Er moeten minstens 60 baseparen tussen de forward primer en het begin van het exon aanwezig zijn. Hetzelfde geldt voor de afstand tussen de reverse primer en het einde van het exon. Hierna wordt de sequentie van elke

primer opgestuurd naar Integrated DNA Technologies (IDT) waar de primers worden gemaakt.

De primers werden gevriesdroogd toegestuurd en werden in oplossing gebracht. Voor het uitvoeren van dit protocol wordt eerst gekeken op het etiket van het primer-buisje. Een buisje kan bijvoorbeeld 24,2 nanomolair (nM) primers bevatten. Deze worden dan door toevoeging van 242 μ l nuclease vrij water verdund. Daarna worden de stalen gemengd d.m.v. een vortex. Elk buisje bevat nu een concentratie van 100 μ M. Deze oplossing is te geconcentreerd waardoor nogmaals 20 x verdund wordt in een nieuw epje. Hierin worden 50 μ l primer en 950 μ l nuclease vrij water gemengd. Dit proces wordt herhaald voor elke primer afzonderlijk. Vervolgens dient elke primer getest te worden aan de hand van een gradiënt PCR.

2.7.3 Voorbereiding PCR oplossing

Iedere PCR reactie wordt uitgevoerd door 2 μ l DNA en 23 μ l oplossing van verschillende reagentia in elk welletje toe te voegen. Elk welletje bevat dus in totaal een mengsel van 25 μ l. De benodigde hoeveelheden van elk reagens wordt in tabel 28 weergegeven. Ter voorbereiding van het onderzoek worden alle 23 exonen van ADAMTS17 getest bij acht verschillende temperaturen.

Ten eerste wordt elk welletje gevuld met 2 μ l DNA. Het welletje wordt na het vullen onmiddellijk terug in een ijsbad gelegd. Daaropvolgend wordt per primerpaar een mix gemaakt van dNTPs, Gotaq[®] buffer (groen), de forward primer, de reverse primer, nuclease vrij water, Gotaq[®] polymerase en magnesiumchloride. Dit mengsel wordt vervolgens toegevoegd aan het DNA.

Tabel 28: Overzicht PCR oplossing

Product	Per welletje (μ l)
DNA	2
Buffer GOTAQ [®] (5x geconcentreerd; groen)	5
DNTPS	1,25
FORWARD PRIMER	1
REVERSE PRIMER	1
GOTAQ [®] POLYMERASE	0,125
MQ (nuclease vrij water)	14,125
MgCl ₂	0,5

2.7.4 De gradiënt PCR

De gradiënt PCR werd gebruikt om de optimale temperatuur voor de verschillende primers vast te stellen. De PCR werd uitgevoerd met de BioRad T100™ Thermal Cycler (Tabel 30). In de eerste stap van de PCR wordt het verkregen DNA gedenuatureerd bij een temperatuur van 95 °C gedurende drie minuten. Vervolgens wordt deze fase in een tweede stap gedurende 30 seconden verder aangehouden.

De hierop volgende annealing fase (stap 3) gebeurt bij acht temperaturen die gelegen zijn tussen 50 en 60 °C (Tabel 29). De annealing stap duurt 30 seconden. Door de langzaam dalende temperatuur hechten de primers zich vast op de twee enkelvoudige DNA-strengen. Door elke primer te testen bij deze acht verschillende temperaturen kan de optimale temperatuur van deze fase voor elk primerpaar bepaald worden.

Tabel 29: Temperatuurcyclus

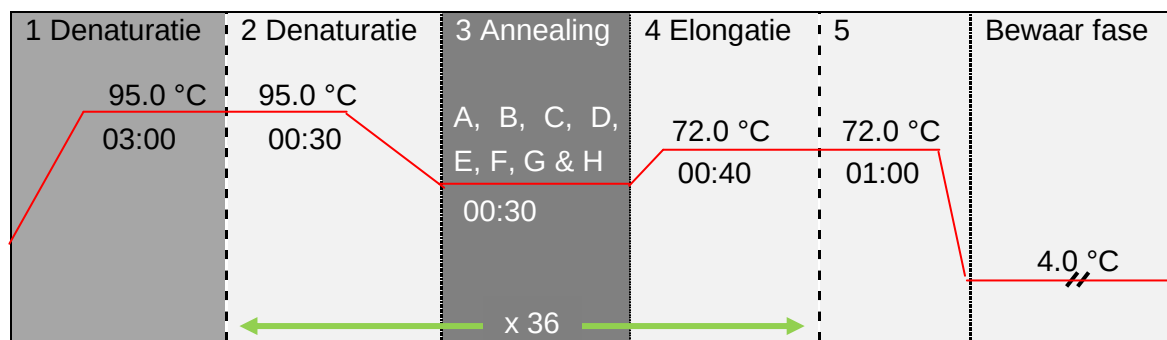
Stap	Temperatuur
A	60,0
B	59,2
C	58,0
D	56,1
E	53,8
F	51,9
G	50,7
H	50,0

In een vierde stap, de elongatie fase, wordt de primer verlengd in de 3' richting door het DNA polymerase. Hierdoor wordt elke DNA streng opnieuw dubbelstrengig. Dit gebeurt bij 72 °C en duurt 40 seconden. De duur van deze fase is afhankelijk van de lengte van de sequentie die dient gekopieerd te worden (hier: 400-600 basen).

De tweede, derde en vierde stap worden 36 keer herhaald waardoor er een exponentiële groei optreedt van het gewenste DNA. De vijfde stap in de PCR, waar de temperatuur eveneens

72 °C (één minuut) bedraagt, is noodzakelijk opdat al het DNA zeker dubbelstrengig is. Op het einde van de PCR wordt de temperatuur teruggebracht naar een bewaartemperatuur van 4 °C. Er werden zo 23 exonen van ADAMTS17 geamplificeerd

Tabel 30: De PCR.



aan de hand van de gradiënt PCR.

2.8 Gel elektroforese

2.8.1 Gebruikte producten

- Microgolfoven
- Koelkast
- Propere glazen plaat met kammetjes
- epjes
- Micro pipetten
- Huishoudfolie
- Aluminiumfolie
- PCR eindproducten
- Grote gel (1,5 % agarose):
 - Gedemineraliseerd water
 - TAE buffer: 2 % (v/v)
 - Agarose
- Ladder: MassRuler DNA ladder mix
- Elektriciteit bron: Consort 600 V – 500 mA E865 electrophoresis power supply

2.8.2 Aanmaken agarose gel

Voor de analyse van de PCR eindproducten wordt een grote gel gebruikt (1,5 % agarose). Vooreerst wordt 2000 ml TAE buffer (1 x) aangemaakt door middel van 40 ml geconcentreerde TAE buffer (50 x) en 1960 ml gedemineraliseerd water. Vervolgens wordt 4,5 g agarose met 300 ml van deze verdunde TAE buffer gemengd. Deze gemaakte oplossing wordt in de microgolfoven opgewarmd. Wanneer de vloeistof kookt wordt deze gezwenkt. Na twee keer goed doorkoken wordt de oplossing afgekoeld gedurende tien minuten waarbij om de drie minuten een zwenkende beweging wordt uitgevoerd. Net voor het uitgieten van de gel wordt de oplossing niet meer geroerd, dit om luchtbelletjes te voorkomen. De agarose-oplossing wordt vervolgens in een vloeiende beweging uitgegoten in een houder met kammetjes. Door deze kammetjes ontstaan, na het opstijven van de gel, welletjes waarin het PCR product kan worden gepipetteerd. Na 20 minuten is de gel voldoende gestold. Deze wordt bewaard in de koelkast in huishoudfolie waarin voldoende TAE buffer wordt toegevoegd om uitdroging te voorkomen.

2.8.3 Voorbereiding en uitvoering

De aangemaakte gel wordt in een bad gelegd met de welletjes aan de rechterkant zodat het DNA naar links kan migreren. Doordat DNA moleculen een negatieve lading hebben zal dit onder invloed van een elektrisch veld naar de positieve pool migreren. In ieder welletje wordt 10 µl PCR product toegevoegd. In het eerste en laatste welletje van iedere rij wordt een standaard (ladder) aangebracht als referentie.

Voor het opstarten van de elektroforese worden de kabels aangesloten. Rood wordt links en zwart rechts verbonden met de gel. Vervolgens laat men de gel lopen gedurende 45 minuten, dewelke onderhevig is aan 170 V, 340 A en 150 W.

2.9 Zichtbaar maken van het DNA

2.9.1 Gebruikte producten

- Ethidiumbromide
- UV- licht: BioRad Molecular Imager® Gel Doc™ XR + Imaging System

2.9.2 Methode

Het DNA is tijdens de gel elektroforese gemigreerd van de negatieve naar de positieve pool. Om het bandenpatroon zichtbaar te maken moeten eveneens een aantal stappen doorlopen worden. De gel wordt gedurende 30 minuten in een ethidiumbromidebad gelegd. Deze stof is uitermate toxisch, mutageen en kankerverwekkend. Het is dus ten strengste aangeraden om beschermingsmaatregelen te nemen wanneer men dit gebruikt. De gel wordt hierna uit het bad genomen en in de BioRad Molecular Imager® Gel Doc™ XR + Imaging System gelegd. Met behulp van UV-licht wordt het DNA zichtbaar gemaakt. Van het verkregen bandenpatroon kan vervolgens een foto worden gemaakt met behulp van het computerprogramma Imagelab. Tot slot kan hieruit een besluit genomen worden omtrent de optimale condities voor de verschillende primers en kan de juiste temperatuur geselecteerd worden voor het onderzoek.

2.10 PCR en gelelektroforese voor sequenceren

2.10.1 Gebruikte producten

- Welletjes
- Micro pipetten
- BioRad T100™ Thermal Cycler
- IJsbad
- Primers ADAMTS17 (firma: Integrated DNA Technologies (IDT))
- Kleurloze GoTaq® buffer
- DNTPs
- GOTAQ® Polymerase
- MilliQ - water
- MgCl₂
- loading dye
- parafilm
- Ethidiumbromide
- UV- licht: BioRad Molecular Imager® Gel Doc™ XR + Imaging System

2.10.2 Methode

Hierna wordt de PCR nogmaals doorlopen bij de optimale temperatuur die afgeleid werd uit de vorige PCR en dit nu met behulp van een kleurloze buffer in plaats van de gekleurde Gotaq[®] buffer. Het principe van de PCR zijn terug te vinden in sectie 2.6.4.

Voor de gelelektroforese wordt nu 5 µl PCR product op een parafilm gepipetteerd waaraan telkens 2 µl loading dye wordt toegevoegd. Dit gehele mengsel wordt vervolgens in de welletjes geladen, waarna de gelelektroforese wordt gestart. En tot slot wordt het DNA zichtbaar gemaakt met behulp van het ethidiumbromidebad en UV-licht (zie 2.8.2).

2.11 Zuiveren van het DNA

2.11.1 Gebruikte producten

- Centrifuge
- Epjes
- 100 % ethanol
- HiBind[®] DNA Mini Columns (catalogusnummer: D6492-01, firma: Omega bio - tek)
- 2 ml epjes (catalogusnummer: D6492-01, firma: Omega bio - tek)
- CP buffer (catalogusnummer: D6492-01, firma: Omega bio - tek)
- Elutie buffer (catalogusnummer: D6492-01, firma: Omega bio - tek)
- DNA was buffer: 25 % (v/v) (catalogusnummer: D6492-01, firma: Omega bio - tek)
- Vortex
- Diepvriezer

2.11.2 Methode

Voor de zuivering van het DNA werd gebruik gemaakt van het E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit Centrifugation Protocol. In een eerste stap worden de stalen overgebracht in een epje van 1,5 ml. Vervolgens worden er vijf volumes CP buffer toegevoegd aan ieder epje. Nadien wordt elk epje één maal gevortext en daaropvolgend gedurende één minuut gecentrifugeerd. Nadien wordt de verkregen oplossing overgebracht in een nieuw epje van 2 ml, voorzien van een HiBind[®] DNA Mini filter. Deze epjes worden gedurende één minuut in de centrifuge geplaatst op maximale snelheid (13.000 rpm). In een volgende stap wordt het filtraat verwijderd en wordt 700 µl Was buffer toegevoegd. Opnieuw wordt de oplossing gedurende één minuut gecentrifugeerd op maximum snelheid. Het bekomen filtraat wordt opnieuw verwijderd waarna de laatste stap herhaald wordt. Daarna worden de epjes droog gecentrifugeerd op maximale snelheid gedurende twee minuten. De filters worden in nieuwe epjes van 1,5 ml overgebracht om vervolgens 50 µl elutie buffer toe te voegen. Deze blijven gedurende twee minuten bij

kamertemperatuur geïncubeerd waarna ze een laatste keer gecentrifugeerd worden bij 13.000 rpm gedurende één minuut. Tot slot wordt het DNA bewaard bij een temperatuur van - 20 °C (E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, 2012).

2.12 Vriesdrogen van het DNA

2.12.1 Gebruikte producten

- Diepvriezer
- Vriesdroger: Christ® Alpha 1-2 LD plus
- forward en reverse primer
- PCR product

2.12.2 Methode

Alvorens de stalen werden opgestuurd voor de sequencer, werden deze gevriesdroogd. Zowel de gezuiverde DNA stalen als 20 µl forward primer en 20 µl reverse primer moeten gevriesdroogd worden. Deze stalen worden ter voorbereiding gedurende een minimumperiode van één uur in de diepvriezer bewaard bij - 80 °C. Ondertussen wordt de motor van de vriesdroger opgewarmd wat ongeveer 20 minuten duurt. De stalen worden uit de diepvriezer gehaald en vervolgens onmiddellijk in de vriesdroger geplaatst. Afhankelijk van de hoeveelheid staal duurt dit proces drie tot 24 uur. Hierna zijn de stalen klaar en kunnen deze opgestuurd worden naar een extern labo, Macrogen Inc., om te worden gesequeneerd.

2.13 Sequentieanalyse

2.13.1 Keuze chromatogram

Na de analyse werd telkens de forward en reverse DNA streng weergegeven m.b.v. een chromatogram. De keuze uit deze twee chromatogrammen is afhankelijk van de mate van betrouwbaarheid; m.a.w., het chromatogram met het minst aantal onzuiverheden werd gekozen. Dit werd vergeleken m.b.v. het programma finchTV versie 1.4.

2.13.2 Weergave exonen

Daarnaast werden de exonen geselecteerd in de forward of reverse DNA streng afhankelijk van de keuze van het chromatogram.

2.13.3 Alignment

Elke verkregen sequentie werd vervolgens vergeleken met de referentie sequentie via NCBI Blast. Hierna werd telkens het percentage overeenkomstige nucleotiden weergegeven alsook het aantal SNPs.

2.13.4 Effect SNP op aminozuurniveau

De SNP's die aanwezig zijn in een gen hebben invloed op de AZ- sequentie. Om deze AZ weer te geven werd de volledige sequentie van het onderzochte ADAMTS17 gen ingegeven op expasy translate tool. Dit werd vervolgens vergeleken met de AZ-sequentie van het referentie gen. Op die manier werden de verschillende SNPs in kaart gebracht op AZ- niveau. Daaruit werd vervolgens geconcludeerd wat de mogelijke gevolgen zouden kunnen zijn voor het eiwit.

3 Resultaten

3.1 Statistische analyse

3.1.1 Beschrijvende statistiek

Ras

In totaal werden voor het Akela- onderzoek 105 bijkomende stalen verzameld. De volledige Akela database telt hierdoor nu 1279 honden. Deze honden vertegenwoordigen 123 verschillende rassen zoals weergegeven in tabel 31.

Tabel 31: Overzicht verzamelde stalen per ras

Ras	Aantal stalen	Ras	Aantal stalen
Japanse Spaniël	2	Dalmatiër	4
Foxhound	2	Hongaarse Windhond	4
Dwergkeeshond	2	Tervuerense Herder	4
Dwergpinscher	2	Australische Herder	5
Greyhound	2	Barzoi	5
Poolse Laaglandherder	2	Sint – Hubertushond	5
Schapendoes	2	Clumberspaniël	5
Miniatuur Bulter	2	Galgo Español	6
Engelse Springerspaniël	2	Dobermann	6
Hovawart	2	Yorkshireterriër	6
Grote Münsterländer	2	Italiaanse windhond	6
Ierse Softcoated Wheaten Terriër	2	Bouvier	7
Drentsche Patrijshond	2	Engelse Cockerspaniël	7
Dobermann Pinscher	2	Rhodesian Ridgeback	7
Tibetaanse terriër	2	Sheltie	7
Tibetaanse Mastiff	2	Newfoundlander	7
Basset Hound	2	Alaska-Malamute	8
Vizsla	2	Bullmastiff	8
Weimarse staande hond	2	Franse Bulldog	8
Spaanse Waterhond	2	Entlebucher sennenhond	9
Cockerspaniël	2	Sint – Bernard	10
Bearded Collie	2	Saluki	12

Beauceron	2	Mechelse Herder	13
Bichon Frisé	2	Cavalier King Charles	14
Cane Corso	3	Maltezer	16
Vlinderhondje	3	Berner Sennenhond	16
Shi-Tzu	3	Afghaanse windhond	18
Shiba	3	Beagle	19
Briard	3	Belgische Mastiff	24
Mopshond	3	Zwitserse Witte Herder	24
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	3	Golden Retriever	30
Oud Duitse Herdershond	3	Whippet	31
Teckel (Dwerg)	3	Duitse Herder	46
Basenji	4	Canis vulgaris	48
Duitse Dog	4	Jack Russel Terriër	60
Flatcoated Retriever	4	Labrador Retriever	62
Ierse Wolfshond	4	Bordercollie	70
Engelse Bulldog	4	Boerboel	239
Boxer	4	Chihuahua	256
Rottweiler	4		

Van 44 rassen werd 1 speekselstaal verzameld (Airedale terriër, Akita, American Bully, Amerikaanse Akita, Amerikaanse Cockerspaniël, Amerikaanse staffordshireterriër, Barbet, Bordeaux Dog, Borderterriër, Bull Terriër, Cairnterriër, Catalaanse Herder, Chowchow, Duitse Staande hond, Dwergpoedel, Dwergschnauzer, Epagneul Breton, Epagneul nain continental, Finse lappenhond, Foxterriër, Franse poedel, Franse dwergpoedel, Griffon Belge, Groenendaeler, Grote Zwitserse sennenhond, Havanezer, Keeshond, Koreaanse jindohond, Laekense Herder, Lhasa Apso, Mastino Napoletano, Naakthond, Podengo Português, Powderpuff, Pyrenese Berghond, Pyrenese Herdershond, Samojeed, Schipperke, Sharpei, Smooth Collie, Spaanse Mastiff, Springerspaniël, Teckel en West Highland Terriër)

Geslacht

In tabel 32 wordt de frequentie alsook het percentage weergegeven van het geslacht van deze honden. Er komen overwegend meer teven voor in de totale databank, namelijk 57,5 %. De reuen vertegenwoordigen 41,7 % van de groep.

Tabel 32: Frequentietabel geslacht.

Geslacht	Frequentie	Percentage
Ongekend	11	0,9
Reu	533	41,7
Gecastreerd	103	8,1
Intact	359	28,0
Ongekend	71	5,6
Teef	735	57,5
Gesteriliseerd	105	8,2
Intact	496	38,8
Ongekend	134	10,5
Totaal	1279	100,0

Oorstanden

In tabel 33 worden de frequenties weergegeven van de verschillende oorstanden. De aanwezigheid van rechtopstaande oren (376 op 1279) is het meest voorkomend. Daarnaast komen afhangende oren ook frequent voor, namelijk in 26,4 % van de gevallen. Rozenoren komen voor bij 35 honden, tiporen bij 53 honden, een rechte oorbasis bij 132 honden en in geen enkel geval werden gecoupeerde oren vastgesteld. Van 27,0 % is hierover geen informatie beschikbaar.

Tabel 33: Frequentie type oorstanden.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	345	27,0
Rechtopstaande oren	376	29,4
Tiporen	53	4,1
Oorbasis recht	132	10,3
Afhangende oren	338	26,4
Rozenoren	35	2,7
Gecoupeerde oren	0	0,0
Totaal	1279	100,0

Cryptorchidie

Al de honden werden gecontroleerd op cryptorchidie. In 4,9 % van de gevallen hadden ze unilaterale cryptorchidie (overwegend links: 1,5 %), 1,7 % bilaterale cryptorchidie, 48,0 % hadden de aandoening niet en van 45,4 % is er niets over geweten (Tabel 34).

Tabel 34: Frequentie cryptorchidie.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	242	45,4
Geen cryptorchidie	256	48,0
Unilaterale cryptorchidie	26	4,9
Rechts niet uitgezakt	4	0,8
Links niet uitgezakt	8	1,5
ongekend	14	2,6
Bilaterale cryptorchidie	9	1,7
Totaal	533	100,0

Tandtekorten

In totaal hadden 50 honden van de 1279 één- of meerdere tandtekorten (Tabel 35). Bij 160 honden waren geen tekorten aanwezig en bij drie honden werden teveel tanden waargenomen. Van 1066 honden is niets geweten over het gebit. Ook waren er enkele honden, waarbij tekorten vastgesteld werden als gevolg van de leeftijd, deze werden aldus buiten beschouwing gelaten. De frequentie van tanden die ontbraken werd weergegeven in tabel 36.

Tabel 35: Frequentie tandtekorten.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	1066	83,3
Geen tandtekorten	160	12,5
Tandtekorten	50	3,9
Teveel tanden	3	0,2
Totaal	1279	100,0

Tabel 36: Frequentie tekort per tandtype.

Tandtekort	Frequentie	Tandtekort	Frequentie
I1 onderaan rechts	2	P2 links boven	2
I1 onderaan links	2	P3 rechts onder	2
I2 onderaan	2	P3 links onder	1
I3 onderaan	2	P3 rechts boven	3
C1 rechts onderaan	2	P3 links boven	2
P1 links onderaan	15	P4 rechts onder	4
P1 rechts onderaan	11	P4 links onder	5
P1 links boven	5	M2 rechts boven	2
P1 rechts boven	7	M2 links boven	2
P2 rechts onder	6	M3 rechts onder	4
P2 links onder	4	M3 links onder	4
P2 rechts boven	4	Teveel tanden	3

Polydactylie

De aanwezigheid van polydactylie werd vastgesteld bij zes honden. In 10,7 % van de gevallen was deze aandoening niet aanwezig en bij de overige 88,8 % is hierover geen informatie gekend (Tabel 37).

Tabel 37: Frequentie polydactylie.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	1136	88,8
Geen polydactylie	137	10,7
Polydactylie	6	0,5
Totaal	1279	100,0

Vachtkleur en haartype

De vachtkleur en neuskleur variëren enorm binnen de groep waardoor hiervan geen duidelijke frequenties zijn genoteerd. De neuskleur werd genoteerd in 79,8 % van de gevallen en de vachtkleur werd genoteerd voor 1134 honden (88,7 %). De frequenties van de verschillende haartypes worden in tabel 38 weergegeven.

Tabel 38: Frequentie haartype.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	254	19,9
Halflang	99	7,7
Halflang –langharig	3	0,2
Kort -, gladhaar	31	2,4
Kort -, stokhaar	593	46,4
Kort -, stokhaar + Halflang aan de oren en staart	6	0,5
Korte bovenvacht met onderwol	3	0,2
Krulhaar	9	0,7
Lange bovenvacht met onderwol	21	1,6
Lange bovenvacht zonder onderwol	5	0,4
Langharig	194	15,2
Middellang gladhaar	2	0,2
Middellang stokhaar	45	3,5
Ruwharig	14	1,1
Totaal	1279	100,0

Heuplaxiteit

Bij 11,7 % van de honden werd geen laxiteit vastgesteld. In 2,7 % van de gevallen werd laxiteit vastgesteld waarbij slechts 46 van deze 150 honden getest werden m.b.v. de pennHIP methode. Daarnaast is bij 85,6 % van de honden niets geweten over het voorkomen van heuplaxiteit (Tabel 39).

Tabel 39: Frequentie voorkomen heuplaxiteit.

Heuplaxiteit	Frequentie	Percentage
Ongekend	1095	85,6
Laxiteit	34	2,7
Geen Laxiteit	150	11,7
Totaal	1279	100,0

De HD status is slechts gekend bij 11,7 % van de honden. Hierbij is het type A het meest voorkomend, namelijk bij 95 honden. Daarnaast zijn de frequenties van vier andere types van HD weergegeven in tabel 40.

Tabel 40: Frequentie voorkomen per type HD.

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	1129	88,3
Excellent	95	7,4
A	67	5,2
A1	12	0,9
A2	16	1,3
Goed	34	2,7
B	20	1,6
B1	10	0,8
B2	4	0,3
Mild beschadigd	11	0,9
C	9	0,7
C1	2	0,2
Gematigd beschadigd		
D	9	0,7
Ernstig beschadigd		
E	1	0,1
Totaal	1279	100,0

DI index

De distractie index werd voor 46 honden genoteerd. Dit komt neer op 3,6 % van de totale databank. Voor één van deze honden is enkel de DI gekend van het linker heupgewricht. Zoals weergegeven in tabel 41 heeft 43,4 % van de honden een DI gelegen tussen 0,3 en 0,4. Voor het rechter heupgewricht heeft eveneens de meerderheid (42,2 %) een DI gelegen tussen 0,3 en 0,4 (Tabel 42).

Tabel 41: Frequentie DI links.

Index	Frequentie	Percentage
< 0,3	4	8,7
[0,3; 0,4]	20	43,4
]0,4; 0,5]	10	21,7
]0,5; 0,6]	5	10,9
]0,6; 0,7]	6	13,0
> 0,7	1	2,2
Totaal	46	100,0

Tabel 42: Frequentie DI rechts.

Index	Frequentie	Percentage
< 0,3	5	11,1
[0,3; 0,4]	19	42,2
]0,4; 0,5]	10	22,2
]0,5; 0,6]	5	11,1
]0,6; 0,7]	4	8,9
> 0,7	2	4,4
Totaal	45	100,0

Elleboogdysplasie

De ED status werd verkregen van 87 honden (Tabel 43). Hiervan hadden 83 honden geen ED en vier honden hadden deze aandoening wel. Van 93,2 % is geen status gekend.

Tabel 43: Frequentie aanwezigheid elleboogdysplasie (ED).

Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	1192	93,2
Geen ED	83	6,5
ED	4	0,3
Totaal	1279	100,0

Bijkomende aandoeningen

In tabel 44 wordt informatie gegeven omtrent de overige meest voorkomende aandoeningen bij deze populatie van honden. Deze gegevens werden ingevuld voor 119 honden. Uit deze tabel blijkt dat 17 honden te kampen hebben met een allergie. Hierbij komen zes types voor waaronder dermatitis, atopie, voedselallergie, huidallergie, allergie voor oordruppels en allergie voor een vlooiënband.

Tabel 44: Bijkomende informatie ziekten.

Probleem	Aantal honden	Probleem	Aantal honden
Longproblemen	1	Oorproblemen	5
Anus	1	Pyometra	5
Bloedgerelateerde aandoening	1	Maag/darmaandoeningen	6
Kanker	2	Hartproblemen	8
Vulva	2	Navelbreuk	8
Zenuwstelsel	2	Gescheurde kruisbanden	9
Pancreasproblemen	2	Tumor	11
OCD	3	Pootproblemen	11
Liesbreuk	3	Oogproblemen	11
Blaasproblemen	4	Patella luxatie	14
Hernia (nek/rug)	5	Gewrichtsproblemen	15
Epilepsie	5	Allergie	17
Totaal	151		

DNA profiel

Tot slot is het DNA profiel gekend bij 13,4 % van de honden. Van 778 honden heeft men hierover geen informatie beschikbaar. De overige 25,8 % hebben geen DNA profiel (Tabel 45).

Tabel 45: Frequentie DNA profiel.

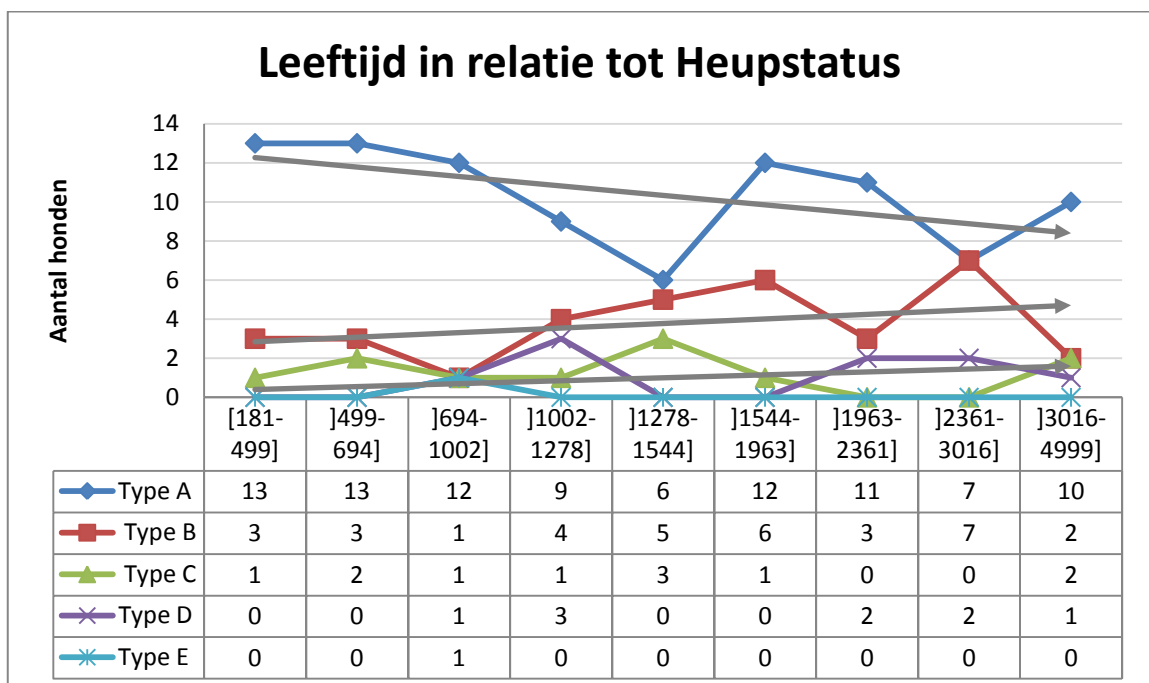
Type	Frequentie	Percentage
Ongekend	778	60,8
Geen DNA profiel	330	25,8
DNA profiel	171	13,4
Totaal	1279	100,0

3.1.2 Steekproef analyse

Bij de statistische analyse werd er gekeken naar een mogelijk verband tussen de leeftijd en de heupstatus enerzijds. Anderzijds werd getest of de aanwezigheid van HD al dan niet afhankelijk zou kunnen zijn van het geslacht. Tot slot werd er onderzocht of er een mogelijk verband bestaat tussen het ras en de aanwezigheid van HD ter hoogte van de heupen.

3.1.2.1 Correlatie tussen de leeftijd en de heupstatus

De Kendall tau test werd uitgevoerd voor een groep van 150 honden. Enkel van deze honden was een heupstatus gekend. Het resultaat van deze test toont aan dat er een relatie bestaat tussen de leeftijd en de heupstatus. In figuur 16 worden de resultaten van het onderzoek grafisch weergegeven.

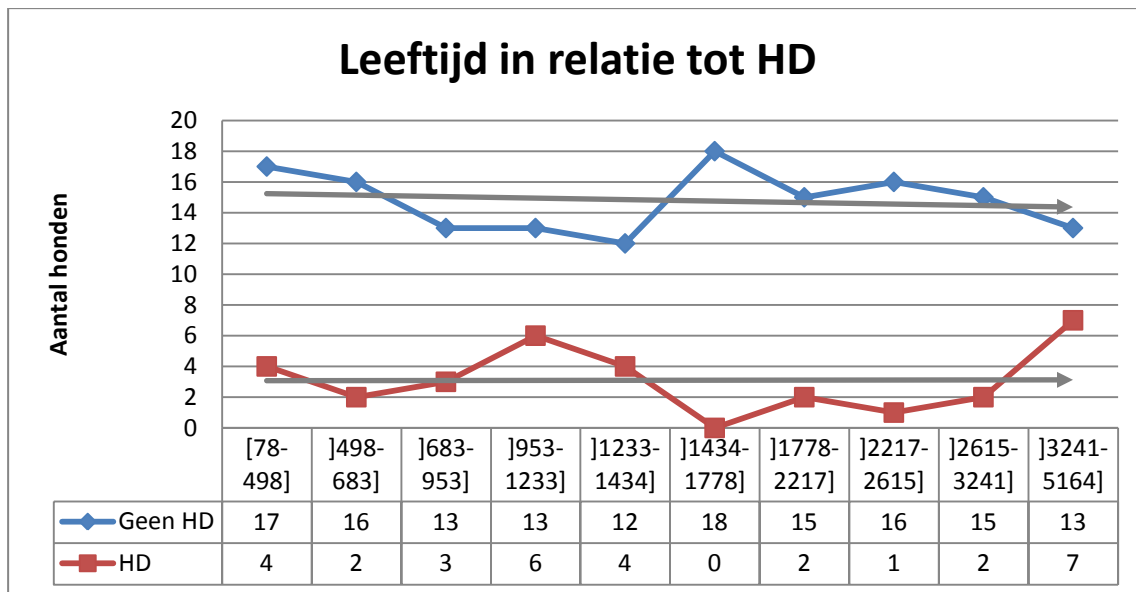


Figuur 16: Leeftijd (in dagen) in relatie tot de heupstatus.

Type A omvat A, A1 en A2; Type B omvat B, B1 en B2 en Type C omvat C en C1. De lineaire trendlijnen worden weergegeven voor type A, B en D.

3.1.2.2 De correlatie tussen de leeftijd en de aanwezigheid van HD

De informatie omtrent de aanwezigheid van HD was enkel aanwezig voor 179 honden. Op deze groep van honden werd de test uitgevoerd. Uit deze test kan besloten worden dat er geen verband bestaat tussen het al dan niet aanwezig zijn van HD en de leeftijd (Figuur 17).



Figuur 17: Overzicht Leeftijdscategorieën (in dagen) in relatie tot HD.
De leeftijd wordt uitgedrukt in aantal dagen. Beide trendlijnen zijn weergegeven in grijs.

3.1.2.3 Aanwezigheid HD afhankelijk van het geslacht

Om na te gaan of de aanwezigheid van HD afhankelijk is van het geslacht werd een Fisher's exact test uitgevoerd voor deze 179 honden. De irrelevante stalen werden eruit gelaten. Dit zijn alle stalen waarvan niet met 100 % zekerheid kon vastgesteld worden of de hond HD heeft en alle honden waarvan het geslacht ongekend is.

Uit deze test blijkt dat HD afhankelijk is van het geslacht. In tabel 46 wordt weergegeven dat 26,5 % van de reuen HD hebben en in 11,7 % van de gevallen gaat het om een teef. Uit deze gegevens wordt besloten dat HD vaker voorkomt bij reuen dan bij teven.

Tabel 46: Frequentie aanwezigheid HD i.f.v. het geslacht.

Ras	Geen HD	HD	Totaal
Teef	98	13	111
	88,3 %	11,7 %	100,0 %
Reu	50	18	68
	73,5 %	26,5 %	100,0 %
Totaal	148	31	179

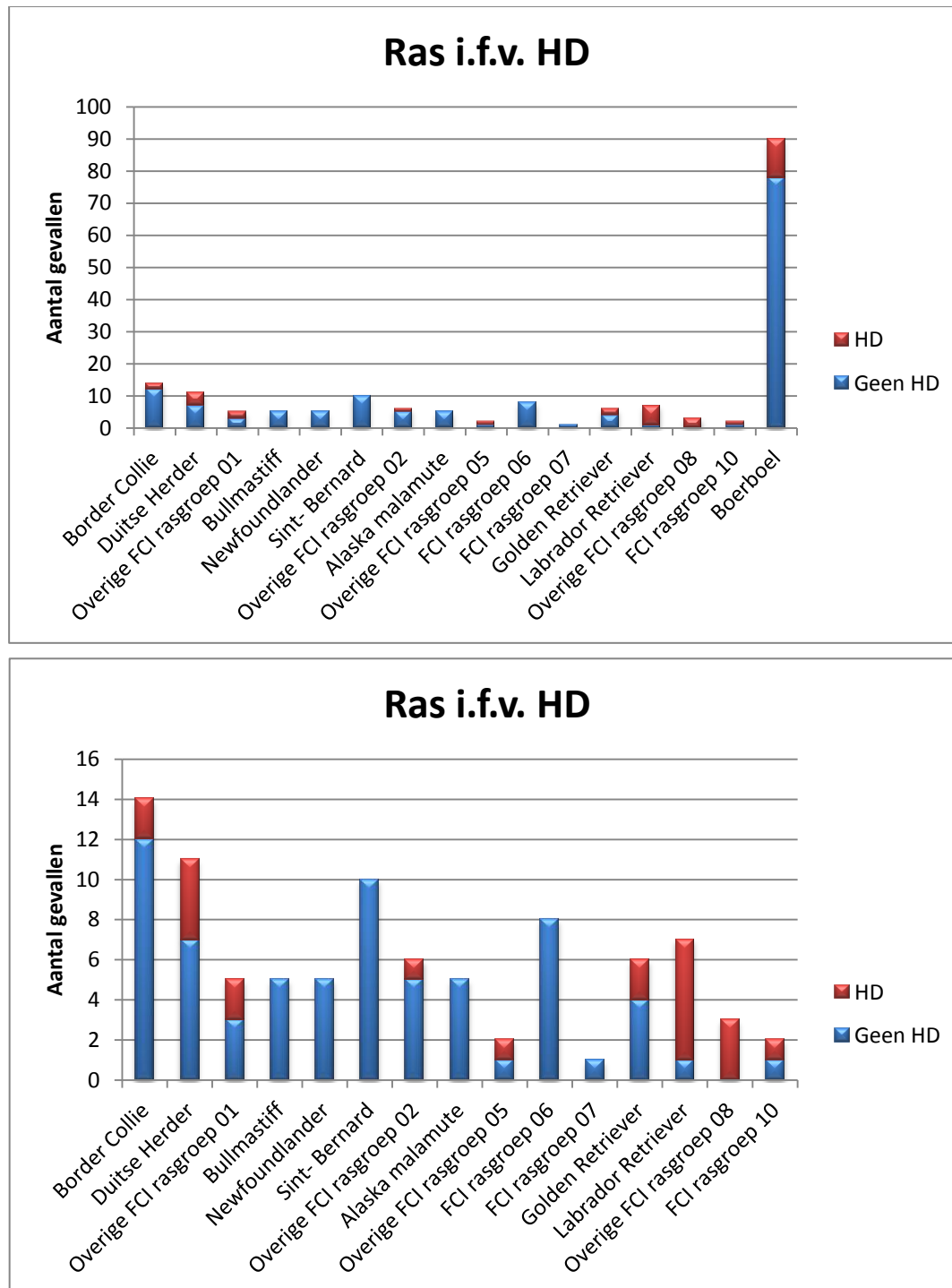
3.1.2.4 Aanwezigheid van HD afhankelijk van het ras

Deze test werd enkel uitgevoerd voor 184 honden verdeeld over 28 verschillende rassen. De irrelevante stalen werden eruit gelaten. Dit zijn alle stalen waarvan niet met 100 % zekerheid kon vastgesteld worden of de hond al dan niet HD heeft. Slechts negen rassen werden behouden, dit zijn rassen waarvan minstens vijf stalen in totaal aanwezig waren. De overige rassen werden toegevoegd aan de overeenkomstige FCI rasgroep.

Uit de Fisher's exact test blijkt dat HD afhankelijk is van het ras. Uit tabel 47 kan afgeleid worden dat HD het meeste voorkomt binnen het ras van de Labrador Retriever, namelijk in 85,7 % van de gevallen. Daarnaast is 36,4 % van de Duitse Herders eveneens getroffen door deze aandoening. In figuur 18 wordt vervolgens een compact overzicht gegeven van de resultaten.

Tabel 47: Frequentie aanwezigheid HD i.f.v. het ras

Ras	Geen HD	HD	Totaal
Bordercollie	12 85,7 %	2 14,3 %	14 100,0 %
Duitse Herder	7 63,6 %	4 36,4 %	11 100,0 %
Overige FCI rasgroep 01: herdershonden en veedrijvers	3 60,0 %	2 40,0 %	5 100,0 %
Bullmastiff	5 100,0 %	0 0,0 %	5 100,0 %
Sint- Bernard	10 100,0 %	0 0,0 %	10 100,0 %
Newfoundlander	5 100,0 %	0 0,0 %	5 100,0 %
Overige FCI rasgroep 02: berg- en sennenhonden	5 83,3 %	1 16,7 %	6 100,0 %
Alaska-Malamute	5 100,0 %	0 0,0 %	5 100,0 %
Overige FCI rasgroep 05: keeshonden en oertypen	1 50,0 %	1 50,0 %	2 100,0 %
FCI rasgroep 06: lopende honden en zweethonden	8 100,0 %	0 0,0 %	8 100,0 %
FCI rasgroep 07: staande honden	1 100,0 %	0 0,0 %	1 100,0 %
Golden Retriever	4 66,7 %	2 33,3 %	6 100,0 %
Labrador Retriever	1 14,3 %	6 85,7 %	7 100,0 %
Overige FCI rasgroep 08: retrievers en waterhonden	0 0,0 %	3 100,0 %	3 100,0 %
FCI rasgroep 10: windhonden	1 50,0 %	1 50,0 %	2 100,0 %
Boerboel	78 86,7 %	12 13,3 %	90 100,0 %
Totaal	150	34	184



Figuur 18: Overzicht van de aanwezigheid van HD bij 28 verschillende rassen.

In de grafiek worden de negen rassen behouden waarvan minstens vijf resultaten aanwezig zijn. De overige 19 rassen worden onderverdeeld in rasgroepen. *Overige FCI rasgroep 01*: Australische Herder, Mechelse Herder, Pyrenese Herdershond en Zwitserse Witte Herder; *Overige FCI rasgroep 02*: Berner Sennenhond, Cane corso, Dobermann en Pyrenese Berghond; *Overige FCI rasgroep 05*: Basenji en Samojeed; *FCI rasgroep 06*: Sint-Hubertushond en Rhodesian Ridgeback; *FCI rasgroep 07*: Drentsche Patrijshond; *Overige FCI rasgroep 08*: Clumberspaniël, Engelse Cockerspaniël en Engelse Springerspaniël; *FCI rasgroep 10*: Barzoi en Galgo Español.

3.2 DNA extractie en bepaling concentraties

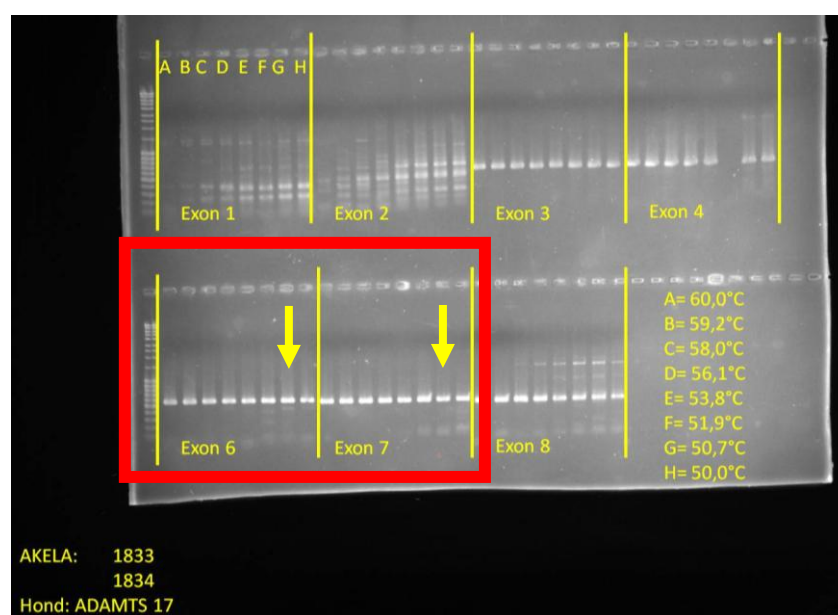
Voor het DNA onderzoek werden vier stalen geselecteerd uit de volledige databank (Tabel 48). Twee honden zijn gezond (staal 1 en 4) en twee honden hebben HD (staal 2 en 3). Beide groepen werden onderzocht m.b.v. pennHIP. De dieren uit de controlegroep hebben een DI (links/rechts) van 0,29/0,23 en 0,34/0,34. De aangetaste honden hebben beiden een DI > 0,7. De verkregen DNA concentraties zijn eveneens terug te vinden in tabel 48.

Tabel 48: Overzicht onderzochte stalen.

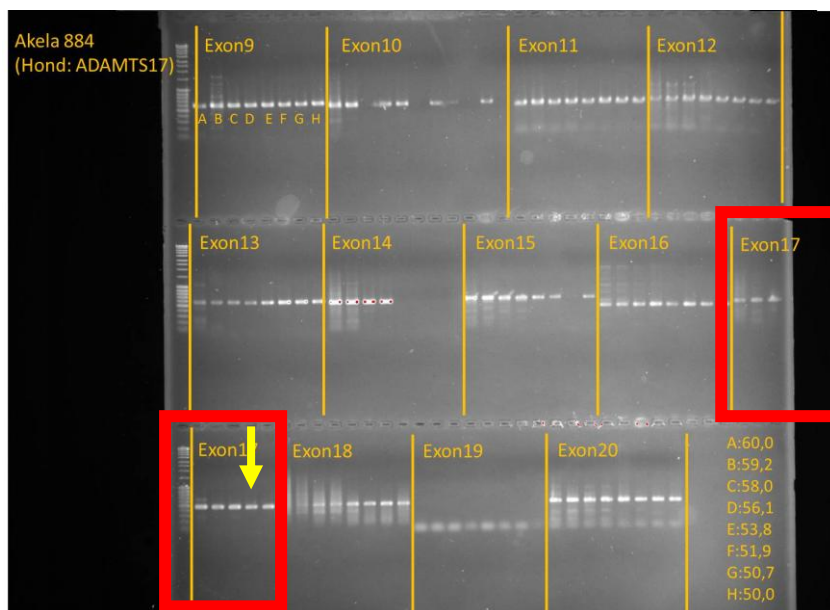
Staalnummer	Akela nummer	Ras	DI links	DI rechts	DNA-concentratie (ng/μl)
1	Akela 2007	Bullmastiff	0,29	0,23	1,47
2	Akela 1616	Duitse Herder	>0,7	>0,7	2,28
3	Akela 1617	Labrador Retriever	>0,7	>0,7	3,34
4	onbekend	Golden Retriever	0,34	0,34	2,50

3.3 PCR en Gel elektroforese

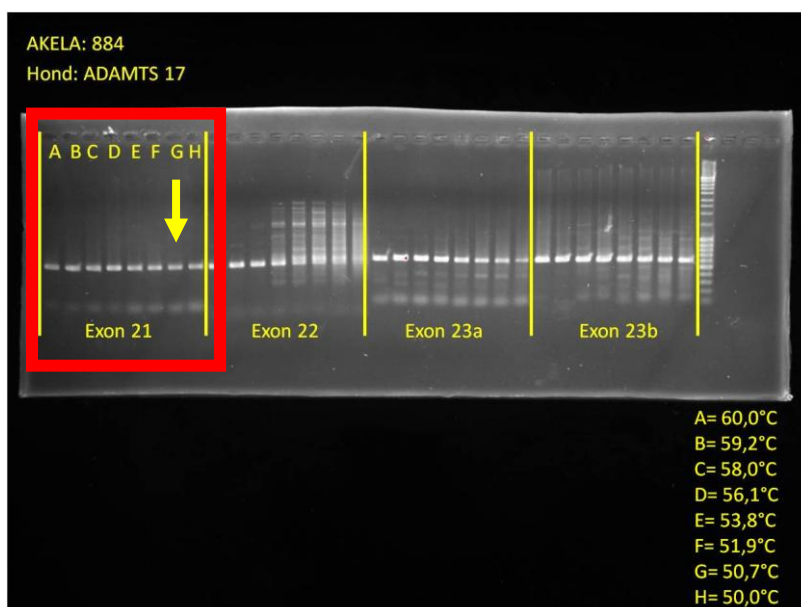
De primers van ADAMTS17 worden weergegeven in bijlage VI. In figuur 19, 20, 21 en 22 worden vervolgens de resultaten weergegeven van de gelelektroforese.



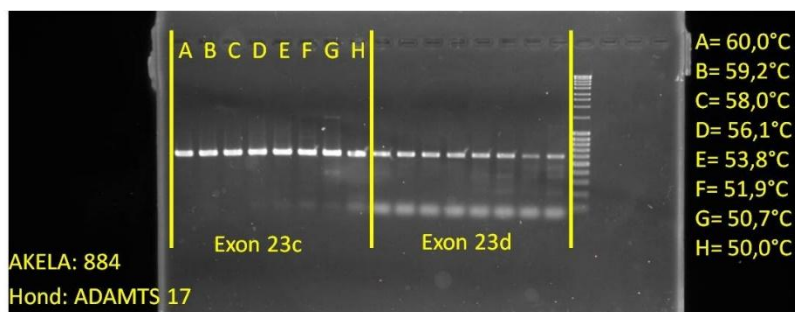
Figuur 19: Testen primers exonen 1, 2, 3, 4, 6, 7 & 8



Figuur 20: Testen primers exonen 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 & 20



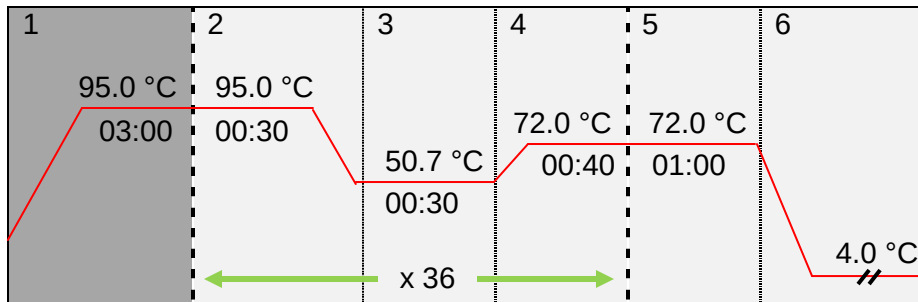
Figuur 21: Testen primers exonen 21, 22, 23a & 23b



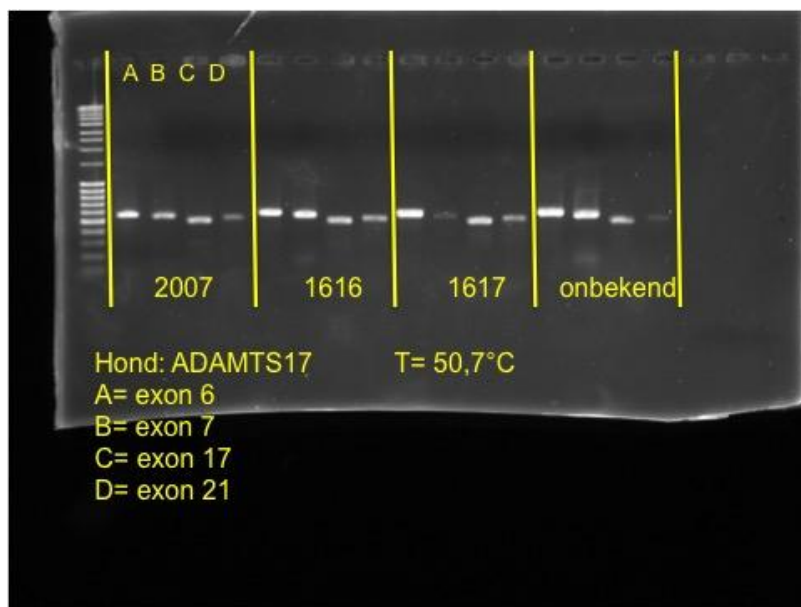
Figuur 22: Testen primers exonen 23c & 23d

Uit dit voorbereidend onderzoek werd geconcludeerd dat de condities voor de primers van exonen 6, 7, 17 en 21 het meest optimaal zijn. Voor deze primers was er telkens één helder bandje zichtbaar en vertoonde het geen aspecifieke binding waarbij meerdere bandjes te zien zouden zijn. De optimale temperatuur voor deze primers bedraagt 50,7 °C. Bij deze temperatuur werd vervolgens de PCR herhaald voor de vier geselecteerde exonen bij alle vier de honden (2007, 1616, 1617 en onbekend) (Tabel 49).

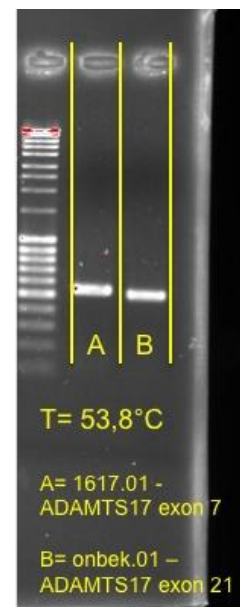
Tabel 49: De PCR bij annealing temperatuur van 50.7°C



Onderstaand bandenpatroon wijst erop dat de DNA amplificatie geslaagd is. Er zal voldoende DNA aanwezig zijn en de primers hebben zich voldoende kunnen binden op het DNA (Figuur 23).



Figuur 23: ADAMTS17 exonen 6, 7, 17 en 21 bij honden 2007, 1616, 1617 en onbekend



Figuur 24: 1617.01 en onbek.01 bij annealing temperatuur 53,8 °C.

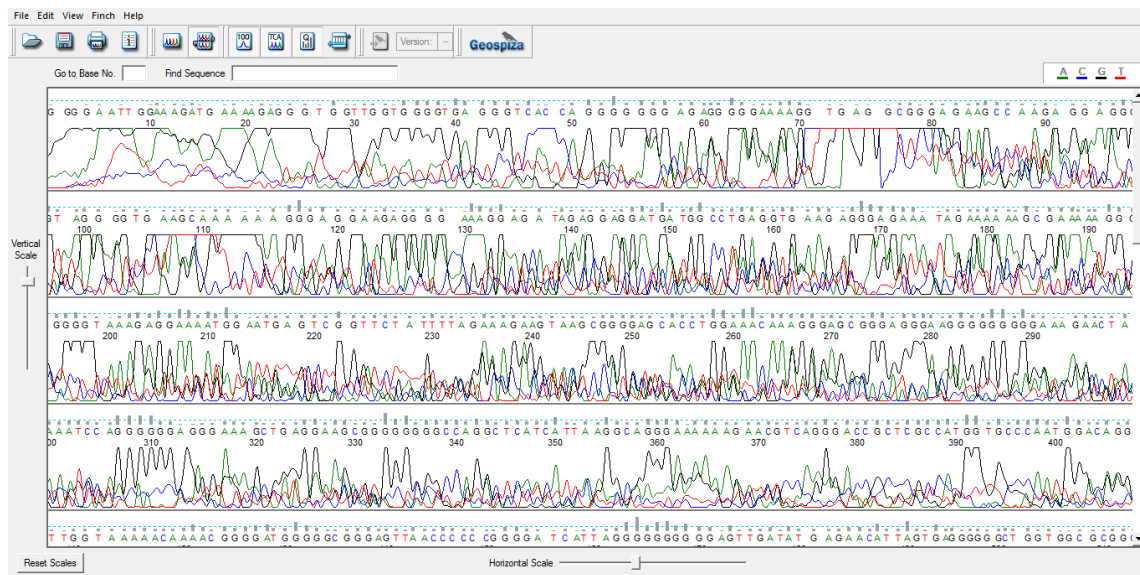
Zoals op figuur 23 te zien is, zijn er twee bandjes die minder zichtbaar zijn. Bij hond 1617 gaat dit om exon 7 en bij het onbekende staal gaat het om exon 21. De PCR werd bij deze exonen opnieuw uitgevoerd maar bij een annealing temperatuur van 53,8 °C (Tabel 49: stap 3). Dit resulteerde in meer specifiek bandjes (Figuur 24).

3.4 Sequentieanalyse

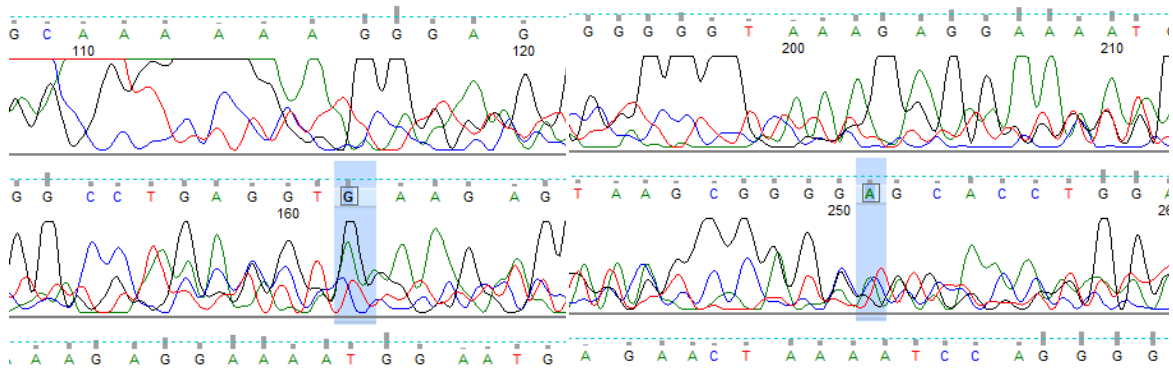
3.4.1 Keuze chromatogram

Voor de verdere analyse van de stalen werd gefocust op drie exonen namelijk exon 6, exon 7 en exon 17. De keuze van het chromatogram wordt vervolgens weergegeven aan de hand van één voorbeeld. De overige uitgekozen chromatogrammen worden weergegeven in bijlage VII.

Uit onderstaande chromatogrammen (Figuur 25 & Figuur 28), exon 6 van akela 2007, werd gekozen voor het reverse chromatogram. Hiervoor werd gekeken naar de zuiverheid van het algemene diagram. In figuur 25 zijn teveel onzuiverheden aanwezig, zo kunnen op eenzelfde plaats pieken voorkomen van verschillende kleuren zoals o.a. te zien is op plaats 162 (Figuur 26). Daarnaast komen ook een aantal plaatsen voor waarbij het onmogelijk is om te bepalen om welk nucleotide het gaat (Figuur 27). Deze onduidelijkheden zijn vaak te wijten aan onzuiverheden die reeds aanwezig zijn in het afgenomen staal als gevolg van contaminatie, de aanwezigheid van teveel/te weinig template DNA, de aanwezigheid van twee of meer verschillende DNA templates, een partieel gefaalde sequentieanalyse en/of verlies van DNA tijdens de voorbereidingen voor transport (Interpretation of Sequencing Chromatograms, s.a.; DNA Sequencing Troubleshooting, 2015).



Figuur 25: Forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.



Figuur 26: Close-up forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.

Ter hoogte van plaats 162 zijn de verschillende pieken geselecteerd.

Figuur 27: Close-up forward chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.

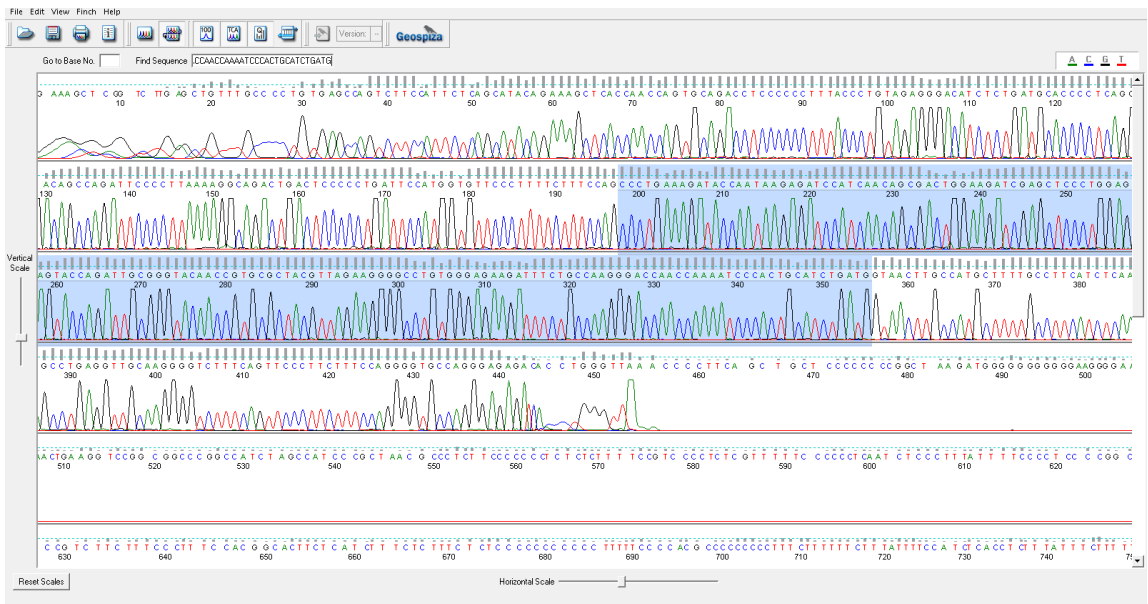
Op plaats 251 zijn de onzuiverheden aangeduid.



Figuur 28: Reverse chromatogram Exon 6 ADAMTS17 van Akela 2007.

3.4.2 Weergave exonen

In figuur 29 wordt exon 17 van akela blanco weergegeven in het chromatogram. De overige chromatogrammen worden weergegeven in bijlage VII. Deze zijn gegroepeerd per exon zodanig dat er een goede vergelijking kan gemaakt worden tussen de vier honden.



Figuur 29: Exon 17 Akela blanco
Forward chromatogram, positie: 198-355

3.4.3 Alignment

Na het vergelijken van de verschillende exon sequenties met het referentie gen zijn er geen SNPs gevonden uitgezonderd één insertie in exon 7 van Akela 2007 (Tabel 50, Tabel 51 & Tabel 52).

Exon 6

Tabel 50: Sequenties exon 6.

Akela 2007

Range 1: 948 to 1105 GenBank Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCCAAGTTGTCCATTGGGACCATGGCGAGCGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG			
Sbjct 948	GCCAAGTTGTCCATTGGGACCATGGCGAGCGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG			
Query 61	AATGAGGAGTATGGAGGACACGGTACCTTGGCAATACAGTTCCAGGAGGGAAGAT			
Sbjct 1008	AATGAGGAGTATGGAGGACACGGTACCTTGGCAATACAGTTCCAGGAGGGAAGAT			
Query 121	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA			
Sbjct 1068	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA			

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela 1616

Range 1: 948 to 1105 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Pn
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	60			
Sbjct 948	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	1007			
Query 61	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	120			
Sbjct 1008	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	1067			
Query 121	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	158			
Sbjct 1068	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	1105			

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela 1617

Range 1: 948 to 1105 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Pn
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	60			
Sbjct 948	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	1007			
Query 61	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	120			
Sbjct 1008	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	1067			
Query 121	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	158			
Sbjct 1068	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	1105			

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela blanco

Range 1: 948 to 1105 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Pn
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	60			
Sbjct 948	GCCAAGTTGTCCATTGGGCACCATGGCGAGCGGTCCCTGGAGAGCTTTTGTCACTGGCAG	1007			
Query 61	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	120			
Sbjct 1008	AATGAGGAGTATGGAGGAGCACGGTACCTTGGCAATAATCAGGTTCCAGGAGGGAAGGAT	1067			
Query 121	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	158			
Sbjct 1068	GATACACCCCCCGTGGATGCGGCTGTGTTTGTACCA	1105			

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Exon 7

Tabel 51: Sequenties exon 7

Akela 2007

Range 1: 1106 to 1149 GenBank Graphics				▼ Next
Score	Expect	Identities	Gaps	
73.8 bits(37)	1e-10	44/45(98%)	1/45(2%)	
Query 1	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	45		
Sbjct 1106	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	1149		

Eén SNP aanwezig, namelijk een insertie van één nucleotide tussen plaats 1135-1136. 98 % overeenkomst met het referentie gen. De gevolgen van deze insertie worden weergegeven in sectie 3.4.4.

Akela 1616

Range 1: 1106 to 1149 GenBank Graphics				▼ Next
Score	Expect	Identities	Gaps	
87.7 bits(44)	8e-15	44/44(100%)	0/44(0%)	
Query 1	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	44		
Sbjct 1106	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	1149		

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela 1617

Range 1: 1106 to 1149 GenBank Graphics				▼ Next
Score	Expect	Identities	Gaps	
87.7 bits(44)	8e-15	44/44(100%)	0/44(0%)	
Query 1	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	44		
Sbjct 1106	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	1149		

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela blanco

Range 1: 1106 to 1149 GenBank Graphics ▼ Next				
Score	Expect	Identities	Gaps	
87.7 bits(44)	8e-15	44/44(100%)	0/44(0%)	
Query	1	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	44	
Sbjct	1106	GACCGATTTCTGCGTACACAAAGATGAACCATGTGACACGGTTG	1149	

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Exon 17

Tabel 52: Sequenties exon 17

Akela 2007

Range 1: 2212 to 2369 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus
Query	1	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	60	
Sbjct	2212	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	2271	
Query	61	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	120	
Sbjct	2272	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	2331	
Query	121	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	158	
Sbjct	2332	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	2369	

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela 1616

Range 1: 2212 to 2369 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus
Query	1	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	60	
Sbjct	2212	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	2271	
Query	61	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	120	
Sbjct	2272	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	2331	
Query	121	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	158	
Sbjct	2332	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	2369	

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela 1617

Range 1: 2212 to 2369 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus
Query	1	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	60	
Sbjct	2212	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	2271	
Query	61	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	120	
Sbjct	2272	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	2331	
Query	121	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	158	
Sbjct	2332	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	2369	

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

Akela blanco

Range 1: 2212 to 2369 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
292 bits(158)	8e-76	158/158(100%)	0/158(0%)	Plus/Plus
Query	1	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	60	
Sbjct	2212	CCCTGAAAGATACCAATAAGAGATCCATCAACAGCGACTGGAAGATCGAGCTCCCTGGAG	2271	
Query	61	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	120	
Sbjct	2272	AGTACCAGATTGCGGGTACAACCGTGCCTACGTTAGAAGGGGCCCTGTGGGAGAAGATTT	2331	
Query	121	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	158	
Sbjct	2332	CTGCCAAGGGACCAACCAAAATCCCACCTGCATCTGATG	2369	

Geen SNPs aanwezig.
100 % overeenkomst met het referentie gen.

3.4.4 Effect SNP op aminozuurniveau

Uit voorgaande resultaten is gebleken dat er een SNP aanwezig is in exon 7 van akela 2007. Uit de AZ- sequentie (Bijlage VIII) kan opgemaakt worden dat er, als gevolg van de insertie, een frameshift heeft plaatsgevonden. Deze zorgt voor twee gesubstitueerde aminozuren en een vervroegde stopcodon. Deze laatste zal aanleiding geven tot functieverlies van het gevormde enzym doordat slechts een gedeelte van de sequentie vertaald wordt. Als gevolg hiervan hebben beide voorgaande substituties geen doorslaggevende invloed op de ontwikkeling van het enzym.

4 Bespreking

Zoals eerder vermeld, lijkt er in eerste plaats een probleem te zijn met de huidige diagnostiek van HD. Deze wordt enerzijds teveel beïnvloed door de beperkingen van de techniek zelf aangezien HD een multifactoriële aandoening is. Om deze invloeden zoveel mogelijk te beperken werd er reeds voor gezorgd dat er een techniek werd opgesteld voor de bepaling van heuplaxiteit op jongere leeftijd (16 weken). Hierdoor worden de invloeden van de omgevingsfactoren tot een minimum beperkt, wat een vooruitgang betekent op vlak van diagnostiek. Anderzijds wordt deze methode, met name PennHIP, in België nog te weinig uitgevoerd. Over heel België zijn bij benadering 2.478 zelfstandige dierenartsen actief waarvan slechts veertien pennHIP gecertificeerd zijn. Deze beperking wordt bevestigd door de reeds aanwezige databank van Akela. Van de 1279 honden is slechts 3,6 % getest m.b.v. PennHIP. Deze klinische evaluatie was dus niet beschikbaar voor alle monsters en is bijgevolg een beperking binnen het project.

Een kruis analyse tussen de leeftijd en de heupstatus heeft uitgewezen dat naarmate de leeftijd toeneemt er meer honden zijn met heupstatus type C en D en minder honden met type A (Kendall's tau = 0,210; $p < 0,05$). In een verdere analyse werd de correlatie tussen de leeftijd en de aanwezigheid van heuplaxiteit getest. Hieruit blijkt dat deze parameters niet gecorreleerd zijn (Kendall's tau = - 0,007; $p > 0,05$).

In beide analyses worden tegenstrijdige resultaten bevonden. Dit kan verklaard worden door de representativiteit van de afgenomen stalen. Een steekproef wordt verondersteld volledig willekeurig genomen te zijn uit de populatie. Door de deelname van een groot aantal erkende fokkers is er voor deze steekproefanalyse reeds een onbewuste selectie gebeurd. Fokkers worden namelijk verondersteld te fokken met honden vrij van heuplaxiteit. Hierdoor wordt het grote aantal type A heupen verklaard en het beperkt aantal honden met heupstatus type C, D en E.

Ondanks de onzuivere selectie blijken de resultaten van de eerste analyse in overeenstemming te zijn met andere werken van o.a. Dassler (2003) en Stanin et al. (2011). Uit de tweede analyse zou er besloten kunnen worden dat de deelnemende fokkers geslaagd zijn in het onderdrukken van heup laxiteit binnen hun populatie.

Of het geslacht al dan niet een invloed uitoefent op de aanwezigheid van deze aandoening staat nog ter discussie. Uit bovenstaande resultaten is gebleken dat in 26,5 % van de gevallen het gaat om een reu terwijl in 11,7 % van de gevallen het gaat om een teef. Morgan et al. (1999) toonden geen significant verband aan in een studie over de labrador retriever. Deze bevindingen worden eveneens bevestigd door Rettenmaier et al. (2002) en Dassler (2003). Een studie binnen vier hondenrassen (de Golden Retriever, de Labrador Retriever, Duitse Herder en de Rottweiler) toonde een

kleine prevalentie aan waarbij 55,4% van de aangetaste honden vrouwelijk waren tegenover 44,6% mannelijke dieren (Smith et al., 2001).

Uit de analyse van de totale databank is gebleken dat er een brede variatie aan rassen aanwezig is, in totaal 123. Daarvan zijn er slechts 28 rassen waarbij de HD status gekend is. Deze werden verder gebruikt voor de analyse van het ras i.f.v. de aanwezigheid van HD. In deze proef werd HD het meest frequent gediagnosticeerd bij de Labrador Retriever (85,7 %) gevolgd door de Duitse Herder (36,4 %). Deze cijfers bevestigen de invloed van het ras. Volgens de Amerikaanse 'Orthopedic Foundation for Animals' (OFA) staat de Bulldog op nummer één (72,0 % HD) gevolgd door de Bordeaux dog (56,7 % HD). Op plaats 36 staat de Golden Retriever (19,4 % HD) en op plaats 40 de Duitse Herder (19,0 % HD). Stanin et al. (2011) bevestigen eveneens de prevalentie van het ras waarbij de Engelse Bulldog op nummer één staat met 81,3 %.

Ook al werden slechts een beperkt aantal rassen onderzocht, LaFond et al. (2002) beschrijven 31 rassen die gevoelig zijn voor de ontwikkeling van HD.

Uit de sequentieanalyse is gebleken dat er nagenoeg geen SNPs aanwezig zijn in de exonen 6, 7 en 17 van het onderzochte ADAMTS17 gen. Eén uitzondering hierop was een insertie van een T nucleotide tussen nucleotide 30 en 31 in exon 7 van akela 2007 (hond vrij van heup laxiteit). Bij de keuze van dit chromatogram is er geopteerd voor het reverse chromatogram vermits het forward chromatogram teveel onzuiverheden bevatte, zo blijkt uit de foutenanalyse (zie sectie 3.4.1). Ook het gekozen chromatogram is niet altijd even zuiver. Of de insertie hier al dan niet een gevolg van is kan niet met 100 % zekerheid worden besloten. Vermoedelijk is deze mutatie niet gerelateerd aan heuplaxiteit, doch kan er geen sluitende conclusie genomen worden o.b.v. één hond.

5 Algemeen besluit

In dit onderzoek is er in de eerste plaats voldoende vordering gemaakt op vlak van de sequentie analyse. Dit is een zeer snelle en effectieve methode voor het bestuderen van genetische informatie. Het gebruik van speekselcellen voor het verkrijgen van DNA is een niet- invasieve methode. Op deze manier kan er op korte tijd een groot aantal stalen genomen worden. Dit is een zeer interessant gegeven om de oorzaak van genetische aandoeningen, waaronder heuplaxiteit, te achterhalen.

Desondanks waren er in deze scriptie niet voldoende mogelijkheden om volledig aan te tonen of er al dan niet een verband bestaat tussen het ADAMTS17 gen en heuplaxiteit. Om volledig uitsluitel te bieden kan het interessant zijn om meerdere honden hierop te onderzoeken. Aangezien heuplaxiteit een polygenetische afwijking is kan het aangewezen zijn om het onderzoek ook op andere genen verder te zetten (o.a. ADAM genen).

Daarnaast kan er uit dit onderzoek niet met 100 % zekerheid geconcludeerd worden dat er een verband bestaat tussen de leeftijd en heuplaxiteit. Wel heeft de statistische analyse aangetoond dat er een correlatie is tussen heuplaxiteit en het ras van de hond. Verder werd er vastgesteld dat het geslacht een mogelijke rol speelt in de ontwikkeling van heuplaxiteit.

In de toekomst zou dit onderzoek verder gezet kunnen worden door het aantal rassen te beperken tot de 31 rassen die het meest gevoelig zijn. Daarnaast kan het interessant zijn om het aantal stalen per ras (zowel goede als slechte heupen) uit te breiden waardoor er een meer representatief beeld kan worden gevormd over de totale populatie. Dit in combinatie met het beperken van het aantal deelnemende fokkers, kan ervoor zorgen dat onbewuste selectie binnen de populatie wordt vermeden. Uiteindelijk zullen, wanneer aan deze aanpassingen voldaan wordt, de resultaten meer representatief zijn wat automatisch leidt tot een betere besluittrekking.

Verder wordt de pennHIP methode, die gebruikt wordt om een diagnose te stellen m.b.t. heuplaxiteit, momenteel in België nog niet uitgebreid toegepast. Wanneer deze methode meer op punt staat kan er naar de toekomst toe meer concreet onderzoek gebeuren naar de relatie van verschillende factoren (o.a. ras, leeftijd en geslacht) tot de distractie index. Tijdens de zoektocht naar geschikte stalen bleek dat vele hondeneigenaars alsook fokkers weinig op de hoogte zijn van deze methode. De onwetendheid zorgt voor een terughoudende reactie, aangezien vele eigenaars worden afgeschrikt door de mogelijke nadelige gevolgen voor de hond. Hier bijkomend stelt zich het probleem dat er maar weinig gecertificeerde dierenartsen zijn. Dit gaat gepaard met extra kosten en inspanningen. Dit alles verlaagt de toegankelijkheid van pennHIP. Om hiervan werk te maken kan het interessant zijn om mensen alsook

dierenartsen nog meer te informeren over de aandoening en de preventieve maatregelen.

Als eindconclusie kan gesteld worden dat enerzijds radiografisch onderzoek (pennHIP) en anderzijds genetisch onderzoek bijzonder belangrijk zijn. Binnen het tijdsbestek van deze thesis was het niet mogelijk om het onderzoek volledig af te ronden, rekeninghoudend met de hierboven vermeldde opmerkingen. Desalniettemin heeft dit onderzoek een zekere vooruitgang geboekt op vlak van genetica bij de hond. In de toekomst raad ik de onderzoekers aan dit onderwerp nog verder uit te diepen.

6 Referentielijst

Alexander, J. (1992). The pathogenesis of canine hip dysplasia. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* , 503-511.

Bader, H. L., Ruhe, A. L., Wang, L. W., Wong, A. K., Walsh, K. F., Packer, R. A., Mitelman, J., Robertson, K. R., O'Brien, D. P., Broman, K. W., Shelton, D. G., Apte, S. S., & Neff, M. W. (2010). An ADAMTSL2 Founder Mutation Causes Musladin-Lueke Syndrome, a Heritable Disorder of Beagle Dogs, Featuring Stiff Skin and Joint Contractures. *Plos one* , 1-8.

Baldeschi, C., Gashe, Y., Rattenholl, A., Bouillé, P., Danos, O., Ortonne, J.P., Bruckner-Tuderman, L., & Meneguzzi, G. (2003). Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Human Molecular Genetics* , 1897-1905.

Ball, D. W., Hill, J. W., & Scott, R. J. (2011). Amino acids, proteins and enzymes. In D. W. Ball, J. W. Hill, & R. J. Scott, *The basics of general, organic and biological chemistry*. Flat World Education.

Barrett, A. J., Rawlings, N. D., & Woessner, J. F. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes*. UK: Elsevier.

Bell, J. A., & Hampton, R. (2014). Primary Open-Angle Glaucoma . *Medscape* .

Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., & Berman, H. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science Journals* , 75-81.

Bettelheim, F., Brown, W., Campbel, M., & Farrell, S. (2009). How Are Enzymes Named and Classified? In F. Bettelheim, W. Brown, M. Campbel, & S. Farrell, *Introduction to General, Organic and Biochemistry* (pp. 616-618). USA: Brooks/Cole Cengage Learning.

Bode, W., Stöckler, W., & Gomis-Rüth, F.-X. (1993). Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc - binding environments (HEXXHXXGXXH and Met - turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *Federation of European Biochemical Societies* , 134 - 140.

Borkakoti, N. (1999). Structural characteristics of the matrix metalloproteinases. In M. Parnham, K. Bottomley, D. Bradshaw, & J. Nixon, *Metalloproteinases as Targets for Anti - Inflammatory Drugs* (pp. 1 - 16). Basel: Birkhäuser Verlag.

Brass, W. (1989). Hip dysplasia in dogs. *Journal of Small Animal Practice* , 166-170.

Campbell, B. G., Wootton, J. A., Macleod, J. N., & Minor, R. R. (2001). Canine COL1A2 Mutation Resulting in C-Terminal Truncation of Pro- α 2(I) and Severe Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research* , 1147-1153.

ChemBioDraw . (2014). *ChemBioDraw Ultra version 14* . CambridgeSoft.

Chronic Kidney Disease and Failure. (2009, Juli 28). Opgeroepen op November 9, 2014, van Washington State University: <http://www.vetmed.wsu.edu/ClientED/ckd.aspx>

Chung, L., Dinakarpandian, D., Yoshida, N., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., Visse, R., & Nagase, H. (2004). Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *The EMBO Journal* , 3020-3030.

Clark, I., & Cawston, T. (1989). Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochemical Journal* , 201-206.

Collection and Preservation System. (2012, Oktober). Italië: Copan .

Curtis, R., & Barnett, K. (1980). Primary lens luxation in the dog. *Journal of small Animal Practice* , 657-668.

Dassler, C. L. (2003). Canine Hip Dysplasia: Diagnosis and Nonsurgical Treatment. In D. H. Slatter, *Textbook of Small Animal Surgery, Volume 2* (pp. 2019-2028). USA: Elsevier Science.

Davidson, A., Bell, R., Lees, G., Kashtan, C., Davidson, G., & Murphy, K. (2007). Genetic cause of autosomal recessive hereditary nephropathy in the English Cocker Spaniel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* , 394-401.

De Coster, P. (2004). Harde tandweefsels en bindweefselstoornissen. In C. de Baat, J. Aps, W. Brands, C. Carels, R. Jacobs, R. Koole, et al., *Het Tandheelkundig Jaar 2005* (pp. 162-177). Houten: Bohn Stafleu van Loghum.

Dislocated Eye Lens in Dogs. (s.a.). Opgeroepen op November 11, 2014, van Pet MD: http://www.petmd.com/dog/conditions/eyes/c_dg_lens_luxation

DNA. (s.a.). Opgeroepen op December 16, 2014, van Nationale Library of Medicine: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>

DNA Sequencing Troubleshooting. (2015, Mei). Opgeroepen op Mei 20, 2015, van Nucleics: http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-failed-reaction.html

Drögemüller, C., Becker, D., Brunner, A., Haase, B., Kircher, P., Seeliger, F., fehr, M., Baumann, U., Lindblad - Toh, K., & Leeb, T. (2009, Juli). A Missense Mutation in the SERPINH1 Gene in Dachshunds with Osteogenesis Imperfecta. *Plos Genetics* , pp. 1-9.

E.Z.N.A. Cycle Pure Kit. (2012, September). Omega bio - tek.

Eckardt, J., Kluth, S., Dierks, C., Philipp, U., & Distl, O. (2013). Population screening for the mutation associated with osteogenesis imperfecta in dachshunds. *Veterinary Record* , 364.

Engel, J., & Bächinger, H. P. (2005). Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. *Topics in current chemistry* , 7-33.

Farias, F. H., Johnson, G. S., Taylor, J. F., Giuliano, E., Katz, M. L., Sanders, D. N., Schnabel, R. D., McKay, S. D., Khan, S., Gharahkhani, P., O'Leary, C. A., Pettitt, L.,

- Forman, O. P., Boursnell, M., McLaughlin, B., Ahonen, S., Lohi, H., Hernandez-Merino, E., Gould, D. J., Sargan, D. R., & Mellersh, C. (2010). An ADAMTS17 Splice Donor Site Mutation in Dogs with Primary Lens Luxation. *Investigation Ophthalmology & Visual Science*, 51, 4716-4721.
- Fields, G. B. (1991). A model for interstitial collagen catabolism by mammalian collagenases. *Journal of Theoretical Biology*, 585-602.
- Fingert, J. H. (2011, Maart). Primary open-angle glaucoma genes. *Eye*, 25, 587-595.
- Flückiger, M. (2007). Scoring radiographs for canine Hip Dysplasia - The big three organisations in the world. *European Journal of Companion Animal Practice*, 135-140.
- Fratzl, P. (2008). Collagen: Structure and Mechanics, an introduction. In P. Fratzl, *Collagen: Structure and Mechanics* (pp. 1-14). USA: Springer Science+Business Media.
- Fries, C. L., & Remedios, A. M. (1995). The pathogenesis and diagnosis of canine hip dysplasia: A review. *Canine Veterinary Journal Volume 36*, 494-502.
- Frischknecht, M., Niehof-Oellers, H., Jagannathan, V., Owczarek-Lipska, M., Drögemüller, C., Dietschi, E., Dolf, G., Tellhelm, B., Lang, J., Tiira, K., Lohi, H., & Leeb, T. (2013). A COL11A2 Mutation in Labrador Retrievers with Mild Disproportionate Dwarfism. *Plos one*, 1-9.
- Gache, Y., Pin, D., Gagnoux-Palacios, L., Carozzo, C., & Meneguzzi, G. (2011). Correction of Dog Dystrophic Epidermolysis Bullosa by Transplantation of Genetically Modified Epidermal Autografts. *Journal of Investigative Dermatology*, 2069-2078.
- Genexpressie. (2008). Encyclopedia Britannica.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 895-899.
- Goldstein, O., Guyon, R., Kukekova, A., Kuznetsova, T. N., Pearce-Kelling, S. E., Johnson, J., Aguirre, G. D., & Acland, G. M. (2010). COL9A2 and COL9A3 mutations in canine autosomal recessive ocular skeletal dysplasia. *Mammalian Genome*, 398-408.
- Goldstein, O., Mezey, J. G., Boyko, A. R., Gao, C., Wang, W., Bustamante, C. D., Anguish, L. J., Jordan, J. A., Pearce-Kelling, S. E., Aguirre, G. D., & Acland, G. M. (2010). An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 establishes homology with human cone-rod dystrophy 9. *Molecular Vision*, 1549-1569.
- Gould, D., Pettitt, L., McLaughlin, B., Holmes, N., Forman, O., Thomas, A., Ahonen, S., Lohi, H., O'Leary, C., Sargan, D., & Mellersh, C. (2011). ADAMTS17 mutation associated with primary lens luxation is widespread among breeds. *Veterinary Ophthalmology*, pp. 1-7.
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 2714-2723.

- Han, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N. V., DeRidder, A. M., Sutter, M. B., Losert, W., Phillips, C. L., Visse, R., Nagase, H., & Leikin, S. (2010). Molecular Mechanism of Type I Collagen Homotrimer Resistance to Mammalian Collagenases. *The Journal of Biological Chemistry* , 22276-22281.
- Hanssen, I. (s.a.). *Hip Dysplasia*. Opgeroepen op Oktober 27, 2014, van Smooth Collie Club of Great Britain: <http://smoothcollieclub.co.uk/about-the-breed/health-issues/hip-dysplasia.html>
- Harvey, R. (2010). Collagen. In P. C. Champe, R. A. Harvey, & D. R. Ferrier, *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Hinds, D. A., Stuve, L. L., Nilsen, G. B., Halperin, E., Eskin, E., Ballinger, D. G., Frazer, K. A., & Cox, D. R. (2005). Whole-Genome Patterns of Common DNA Variations in Three Human Populations. *Science* , 1072-1079.
- Hip Dysplasia Statistics*. (2014, December). Opgeroepen op Mei 15, 2015, van Orthopedic Foundation for Animals: http://www.offa.org/stats_hip.html
- Hulmes, D. (2008). Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In P. Fratzl, *Collagen: Structure and Mechanics* (pp. 15 - 47). New York: Springer Science + Business Media.
- Hunt, R., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., & Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? In A. A. Komar, *Single Nucleotide Polymorphisms* (pp. 32-39). Humana Press.
- Interpretation of Sequencing Chromatograms*. (s.a.). Opgeroepen op Mei 20, 2015, van DNA sequencing core: <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/dnaseq/interpret.html#general>
- Judelson, H. (Oktober, 2006). Guidelines for designing primers.
- Kanemaki, N., T., T. K., Imayasu, M., Kawarai, S., Sakaguchi, M., Yoshino, A., Itoh, N., Meguro, A., & Mizuki, N. (2013). Dogs and Humans Share a Common Susceptibility Gene SRBD1 for Glaucoma Risk. *Plos one* , 1-6.
- Kapatkin, A. S., Mayhew, P. D., & Smith, G. K. (2002). Genetic Control of Canine Hip Dysplasia. *Compendium* , 681-687.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microscopy Research and Technique* , 357-370.
- Kiely, C. M., & Grant, M. E. (2002). The Collagen Family: Structure, Assembly and Organization in the Extracellular Matrix. In P. M. Royce, & B. Steinmann, *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: molecular, genetic and medical aspects* (pp. 159 - 221). New York: Wiley-Liss.
- Kleftogiannis, F., Handley, C. J., & Campbell, M. A. (1994). Characterization of extracellular matrix macromolecules from bovine synovial capsule. *Journal of Orthopaedic Research* , 365-374.

- Klemm, D. (2009). Normal Hip Joint Anatomy.
- Koide, T., & Nagata, K. (2005). Collagen Biosynthesis. In J. Brinckmann, H. Notbohm, & P. Müller, *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly* (pp. 85 - 114). Heidelberg: Springer Science + Business Media.
- Krane, S. M., & Inada, M. (2008). Matrix metalloproteinases and bone. *Bone* , 7-18.
- Kropatsch, R., Petrasch-Parwez, E., Seelow, D., Schlichting, A., Gerding, W. M., Akkad, D. A., Epplen, J. T., & Dekomien, G. (2010). Generalized progressive retinal atrophy in the Irish Glen of Imaal Terrier is associated with a deletion in the ADAM9 gene. *Molecular and Cellular Probes* , 357-363.
- Kuchtey, J., Kunkel, J., Esson, D., Sapienza, J. S., Ward, D. A., Plummer, C. E., Gelatt, K. N., & Kuchtey, R. W. (2013). Screening ADAMTS10 in Dog Populations Supports Gly661Arg as the Glaucoma-Causing Variant in Beagles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* , 1881-1886.
- Kuchtey, J., Olson, L. M., Rinkoski, T., MacKay, E. O., Iverson, T., Gelatt, K. N., Haines, J. L., & Kuchtey, R. W. (2011, februari). Mapping of the Disease Locus and Identification of ADAMTS10 As a Candidate Gene in a Canine Model of Primary Open Angle Glaucoma. *Plos genetics* , pp. 1-10.
- LaFond, E., Breur, G. J., & Austin, C. C. (2002, September/Okttober). Breed Susceptibility for Developmental Orthopedic Diseases in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* , pp. 467-477.
- Lancellotti, S., & De Cristofaro, R. (2011). Structure and Proteolytic Properties of ADAM13, A Metalloprotease Involved in the Pathogenesis of Thrombotic Microangiopathies. In E. Di Cera, *Proteases in Health and Disease* (pp. 106-134). UK: Elsevier.
- Leighton, E., Linn, J., Willham, R., & M.W., C. (1977). A genetic study of canine hip dysplasia. *American journal of veterinary research* , 241-244.
- Lethias, C., & Exposito, J.-Y. (2013). Invertebrate and Vertebrate Collagens. In F. W. Keeley, & R. P. Mecham, *Evolution of Extracellular Matrix* (pp. 39-72). Berlijn: Springer-Verlag.
- Lingaas, F., & Klemetsdal, G. (1990). Breeding values and genetic trend for hip dysplasia in the Norwegian Golden Retriever population. *Journal of Animal Breeding and Genetics* , 437-443.
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry* , 30433-30437.
- Luen Tang, B. (2001). ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* , 33 - 44.

- Mackenzie, S., Oltenacu, E., & Leighton, W. (1985). Heritability estimate for temperament scores in German shepherd dogs and its genetic correlation with hip dysplasia. *Behavior Genetics* , 475-482.
- Mackie, E., Tatarczuch, L., & Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology* , 109-121.
- Madsen, J. (1997). The joint capsule and joint laxity in dogs with hip dysplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , 1463-1465.
- Madsen, J., Oxlund, H., Svalastoga, E., & Schwarz, P. (1994). Collagen type III:I composition in hip joints of dogs susceptible to hip dysplasia. *Journal of Small Animal Practice* , 625-628.
- Magnol, J., Pin, D., Palazzi, X., Lacour, J., Gache, Y., & Meneguzzi, G. (2005). Characterization of a canine model of dystrophic bullous epidermolysis (DBE). Development of a gene therapy protocol. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine* , 107-119.
- Maskos, K. (2004). Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* , 249-263.
- McKusick, V. (2014). *OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals*. Opgeroepen op November 8, 2014, van The University of Sydney: <http://omia.angis.org.au/home/>
- Measuring Hip Joint Laxity*. (s.a.). Opgeroepen op Oktober 27, 2014, van PennHIP: <http://info.antechimaging services.com/pennhip/navigation/penn-HIP-method/distracton-index-measuring-laxity.html>
- Mellersh, C. S. (2012). Genetics of Eye Disorders in the Dog. In E. A. Ostrander, & A. Ruvinsky, *The genetics of the dog* (pp. 218 - 240). Londen: CAB International.
- Meyers, V., Jezyk, P., Aquirre, G., & Patterson, D. (1983). Short-limbed dwarfism and ocular defects in the Samoyed dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , 975-979.
- Morgan, J., Wind, A., & Davidson, A. (1999, Juli). Bone dysplasias in the labrador retriever: a radiographic study. *Journal of the American Animal Hospital Association* , pp. 332-340.
- Multiplex PCR*. (2013). Opgeroepen op April 26, 2015, van Slideshare: <http://www.slideshare.net/drashokrattan/multiplex-for-viral-and-atypical-pneumonia>
- Musladin-Leuke Syndrome (MLS)*. (s.a.). Opgeroepen op November 11, 2014, van Animal Genetics UK: <http://www.animalgenetics.eu/Canine/Canine-disease/canine-MLS-Musladin-Lueke-Syndrome.html>
- Nagase, H., & Kashiwagi, M. (2003). Aggrecales and cartilage matrix degradation. *Arthritis Research & Therapy* , 94-103.

Nagase, H., & Visse, R. (2011). Triple Helicase Activity and the Structural Basis of Collagenolysis. In W. C. Parks, & R. Mecham, *Extracellular Matrix Degradation* (pp. 95-122). Berlijn: Springer-Verlag.

NCBI: Gene. (s.a.). Opgeroepen op November 8, 2014, van National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Nerenberg, P. S., Salsas-Escat, R., & Stultz, C. M. (2008). Do collagenases unwind triple-helical collagen before peptide bond hydrolysis? Reinterpreting experimental observations with mathematical models. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 1154-1161.

Nowend, K., Starr-Moss, A., Lees, G., Berridge, B., Clubb, F., Kashtan, C., Nabity, M., & Murphy, K. (2012). Characterization of the Genetic Basis for Autosomal Recessive Hereditary Nephropathy in the English Springer Spaniel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 294-301.

Omelyanenko, N., Slutsky, L., & Mironov, S. (2014). Extracellular matrix of connective tissue: histophysiology, biochemistry and molecular biology. In N. Omelyanenko, L. Slutsky, & S. Mironov, *Connective Tissue: Histophysiology, Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 80-191). Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.

PCR Primer Design Guidelines. (1994). Opgeroepen op Mei 1, 2015, van Premier Biosoft: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html

Petersen, C., & Alward, W. L. (2013, Augustus 22). *Primary Open Angle Glaucoma: From One Medical Student to Another*. Opgeroepen op November 11, 2014, van University of Iowa Health Care: Ophthalmology and Visual Sciences: <http://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/tutorials/POAG/index.htm>

Physeal growth plate. (s.a.). Opgeroepen op December 7, 2014, van The Royal Children's Hospital Melbourne: http://www.rch.org.au/fracture-education/growth_plate_injuries/Physeal_growth_plate_injuries/

Rawlings, N. D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In K. Brix, & W. Stöcker, *Proteases: Structure and Function* (pp. 1-36). Wenen : Springer-Verlag .

Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2013, September 26). *Canis familiaris*. Opgeroepen op Oktober 12, 2014, van MEROPS - The Peptidase Database: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000347;type=peptidase>

Rettenmaier, J., Keller, G., Lattimer, J., Corley, E., & Ellersieck, M. (2002, Juli). Prevalence of canine hip dysplasia in a veterinary teaching hospital population. *Veterinary radiology & ultrasound: the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, pp. 313-318.

Ricard - Blum, S., Ruggiero, F., & van der Rest, M. (2005). The Collagen Superfamily. In J. Brinckmann, H. Notbohm, & P. Müller, *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly* (pp. 35 - 84). Heidelberg: Springer Science + Business Media.

Rivera, S., Khrestchatisky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. A., & Jaworski, D. M. (2010). Metcincin Proteases and their Inhibitors, Foes or Friends in Nervous System Physiology? *The Journal of Neuroscience* , 15337-15357.

Sargan, D. R., Withers, D., Pettitt, L., Squire, M., Gould, D. J., & Mellersch, C. S. (2007). Mapping the Mutation Causing Lens Luxation in Several Terrier Breeds. *Journal of Heredity* , 534-538.

Seemann, T. (2013). Understanding SNPs and INDELs in microbial genomes. *The genome Factory* .

Sekhon, B. S. (2010). Matrix metalloproteinases – an overview. *Research and Reports in Biology* , 1-20.

Smith, G. K., Mayhew, P. D., Kapatkin, A. S., McKelvie, P. J., Shofer, F. S., & Gregor, T. P. (2001). Evaluation of risk factors for degenerative joint disease associated with hip dysplasia in German Shepherd Dogs, Golden Retrievers, Labrador Retrievers, and Rottweilers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , 1719-1724.

Smith, G. (s.a.). *PennHIP Hip Improvement Program*. Opgeroepen op April 13, 2015, van PennHIP: <http://info.antechimagingsservices.com/pennhip/navigation/general/what-is-PennHIP.html>

SNP Summary Table Values. (2013). Opgeroepen op November 8, 2014, van Batch Genome Variation Server 138: <http://gvs.gs.washington.edu/GVSBatch138/HelpSNPSummary.jsp>

Stades, F. (s.a.). Glaucoom (groene staar) bij de hond en de Flatcoated Retriever in het bijzonder .

Stanin, D., Pavlak, M., Vrbanc, Z., & Potocnjak, D. (2011). Prevalence of hip dysplasia in dogs according to of relevance of hip dysplasia in dogs according to official radiographic Screening in Croatia. *Veterinarski Arhiv: Journal of the faculty of veterinary medicine university of Zagreb* , pp. 235-248.

Stevens, A., & Lowe, J. (2007). Steuncellen en de extracellulaire matrix. In A. Stevens, & J. Lowe, *Histologie van de mens* (pp. 49 - 64). Houten: Bohn Stafleu Van Loghum.

Stranger, B. E., Forrest, M. S., Dunning, M., Ingle, C. E., Beazley, C., Thorne, N., Redon, R., Bird, C. P., de Grassi, A., Lee, C., Tyler-Smith, C., Carter, N., Scherer, S. W., & Tavaré, S. (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* , 848-853.

Stroyan, K. D. (s.a.). OculoSkeletal Dysplasia "Dwarfism" and Eye Disorders in Labrador Retrievers.

- Stultz, C. M. (2002). Localized Unfolding of Collagen Explains Collagenase Cleavage Near Imino-poor Sites. *Journal of Molecular Biology* , 997-1003.
- Tchetina, E. V. (2010). Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Hindawi Publishing Corporation* , 1-16.
- Technical Manual. (2014). *Quantifluor dsDNA System* . USA: Promega.
- The Genetic Variation*. (2014). Opgeroepen op Februari 23, 2015, van Nature Education: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-genetic-variation-in-a-population-is-6526354>
- Todhunter, R. J., & Lust, G. (2003). Hip Dysplasia: Pathogenesis. In D. H. Slatter, *Textbook of Small Animal Surgery, Volume 1*. USA: Elsevier Science.
- User manuel Invisorb Spin Swab Kit. (2013). Berlijn, Duitsland: Stratec Molecular.
- Van Doren, S. R. (2011). Structural Basis of Extracellular Matrix Interactions with Matrix Metalloproteinases. In W. C. Parks, & R. Mecham, *Extracellular Matrix Degradation* (pp. 123-144). Berlijn: Springer-Verlag.
- Verge, S. (2009). Using PennHIP in Breeding: A Veterinarian's Perspective. *The Alpenhorn* , 1-7.
- Vingsbo-Lundberg, C., Nordguist, N., Olofsson, P., Sundvall, M., Saxne, T., Pettersson, U., & Holmdahl, R. (1998). Genetic control of arthritis onset, severity and chronicity in a model for rheumatoid arthritis in rats. *Nature Genetics* , 401-404.
- Voges, D., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1999). The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* , 1015-1068.
- Wade, C. M. (2011). Inbreeding and genetic diversity in dogs: results from DNA analysis. *The Veterinary Journal* , 183-188.
- Whitford, D. (2005). An introduction to protein structure and function. In D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*. Engeland: John Wiley & Sons.
- Williams, B. (2010). Study compares PennHIP vs OFA hip dysplasia tests. *American Animal Hospital Association* .
- Wu, C., Tchetina, E. V., Mwale, F., Hasty, K., Pidoux, I., Reiner, A., Chen, J., Van Wart, H. E., & Poole, R. A. (2002). Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research* , 639-651.
- Zhu, L., Chen, S., Jiang, Z., Zhang, Z., Ku, H.-C., Li, X., McCann, M., Harris, S., Lust, G., Jones, P., & Todhunter, R. (2012). Identification of quantitative trait loci for canine hip dysplasia by two sequential multipoint linkage analyses. *Journal of Applied Statistics* , 1719-1731.

7 Bijlagen

7.1 Bijlage I: Gedetailleerd overzicht collageen families

In onderstaande tabel worden de verschillende types van collageen besproken o.b.v. hun moleculaire samenstelling, de benaming van de verschillende genen en hun lokalisatie in de weefsels.

Tabel 53: Gedetailleerd overzicht collageen families bij de hond (Kielty & Grant, 2002; Ricard – Blum et al., 2005; Stevens & Lowe, 2007; Hulmes, 2008; Omelyanenko et al., 2014).

Typen	Moleculaire samenstelling	Genen	Lokalisatie
Fibrilvormend collageen			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ $[\alpha 1(I)]_3$	COL1A1 COL1A2	Verspreid in zowel harde als zachte weefsels waaronder bot, huid en ligamenten
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1	Hyalien kraakbeen, glasachtig lichaam en in de nucleus pulposus van de tussenwervelschijf
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1	Elastisch bindweefsel, wand van organen en foetale huid
V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$; $[\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)]$ $[\alpha 1(V)]_3$	COL5A1 COL5A2 COL5A3	Elastisch weefsel, bloedvatenwand, placenta en vruchtvlies
XI	$[\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)]$ $[\alpha 1(XI)\alpha 2(V)\alpha 3(XI)]$	COL11A1 COL11A2 COL11A3	Hyalien kraakbeen en glasachtig lichaam
XXIV	$[\alpha 1(XXIV)]_3$	COL24A1	Botweefsel en hoornvlies van het embryo
XXVII	$[\alpha 1(XXVII)]_3$	COL27A1	Hyalien kraakbeen
Niet - fibrilvormend collageen			
FACIT - collageen			

IX	$[\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})]$	COL9A1 COL9A2	Hyalien kraakbeen, glasachtig lichaam en in de nucleus pulposus van de tussenwervelschijf
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	COL12A1	Bindweefsels en botweefsel
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	COL9A1	Bindweefsels
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	COL16A1	
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	COL19A1	
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	COL20A1	
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	COL21A1	Hart- en skelet- spieren, maag, nieren en placenta
XXII	$[\alpha 1(\text{XXII})]_3$	COL22A1	Hart- en skelet- spieren en huidweefsel
Netwerkvormend collageen			
<u>Basale membraan</u> <u>collageen</u>			
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV});$ $\alpha 3(\text{IV})]_2\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV});$ $[\alpha 5(\text{IV})]_2\alpha 6(\text{IV})$	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6	Verschillende basale membranen
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	COL7A1	Vezels in de grenslaag tussen dermis en epidermis
<u>Korte- keten</u> <u>collageen</u>			
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$	COL8A1 COL8A2	Hoornvlies en het endotheel
X	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	COL10A1	Hypertrofische zone van het epifysair kraakbeen
Transmembraan collageen			
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1	Celmembranen
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	COL17A1	Celmembranen van het epidermis
XXIII	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$	COL23A1	Hart en nieren

XXV	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$	COL25A1	Precursoreiwit voor de ziekte van Alzheimer samen met amyloïde vezels (CLAC-P)
Multiplexinen			
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	COL15A	Endotheelcellen
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	COL18A1	Endotheelcellen
Collageen dat zich structureert in parelsnoervormige filamenten			
VI	$[\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI})]$	COL6A1 COL6A2 COL6A3	Microvezels in verschillende weefsels
XXVI	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$	COL26A1	Testis en eierstokken
XXVIII	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	COL28A1	Voornamelijk perifere zenuwen en t.h.v. de schedel

7.2 Bijlage II: Gedetailleerd overzicht van de collagenase families

In onderstaande tabel wordt een meer specifiek overzicht gegeven omtrent de collagenase families bij de hond. Hierbij wordt voornamelijk bij de familie van de matrixinen meer informatie gegeven omtrent de functie.

Tabel 54: Gedetailleerd overzicht collagenase families bij de hond (Bode et al., 1993; Borkakoti, 1999; Luen Tang, 2001; Rawlings et al., 2013).

Peptidasen	Gen	Substraat/functie
Familie: M8 – Leishmanolysinen		
leishmanolysin-2	LMLN	
leishmanolysin-3		
Familie: M10 – Matrixinen		
matrix metallopeptidase-1	LOC489428	Collagenase; type III
matrix metallopeptidase-8	MMP8	Collagenase; type I
matrix metallopeptidase-13	MMP13	Collagenase; type II
matrix metallopeptidase-13	MMP-2	Gelatinase; basale membraan collageen (type IV)
matrix metallopeptidase-9	MMP9	Gelatinase; basale membraan collageen (type IV)
matrix metallopeptidase-3	MMP3	Stromelysine; Omzetten van ECM eiwitten en activeren van andere MMPs
matrix metallopeptidase-11	MMP11	Stromelysine; Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase 14	MMP-14	Membraan type
matrix metallopeptidase 15	MMP15	Membraan type
matrix metallopeptidase 16	MMP16	Membraan type
matrix metallopeptidase 17	MMP17	Membraan type
matrix metallopeptidase 24	MMP24	Membraan type
matrix metallopeptidase-7	MMP7	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-12	MMP-12	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-19	MMP19	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-20	MMP20	verantwoordelijk voor de verwerking van glazuureiwitten

matrix metallopeptidase-21	MMP21	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-23B	MMP23B	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-26	MMP26	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-27	MMP27	Omzetten van ECM eiwitten
matrix metallopeptidase-28	MMP28	Omzetten van ECM eiwitten

Familie: M12**Subfamilie: M12A - Astacinen**

<i>Meprin A, alpha subunit</i>	MEP1A	Splitsen van polypeptiden
<i>Meprin A, beta subunit</i>	MEP1B	Splitsen van polypeptiden
<i>bone morphogenetic protein 1</i>	BMP1	
<i>tolloid-like 1</i>	TLL1	
<i>tolloid-like 2</i>	TLL2	
<i>astacin-like metallo-endopeptidase</i>	LOC483052	
<i>astacin-like metallo-endopeptidase</i>	LOC100856523	

Subfamilie: M12B - Adamalysinen

Vorming ECM

7.3 Bijlage III: Bindingssites Collageen type I

Type I collagen $\alpha 1$ chain sequence (UniProtKB-SwissProt accession no. P02452)

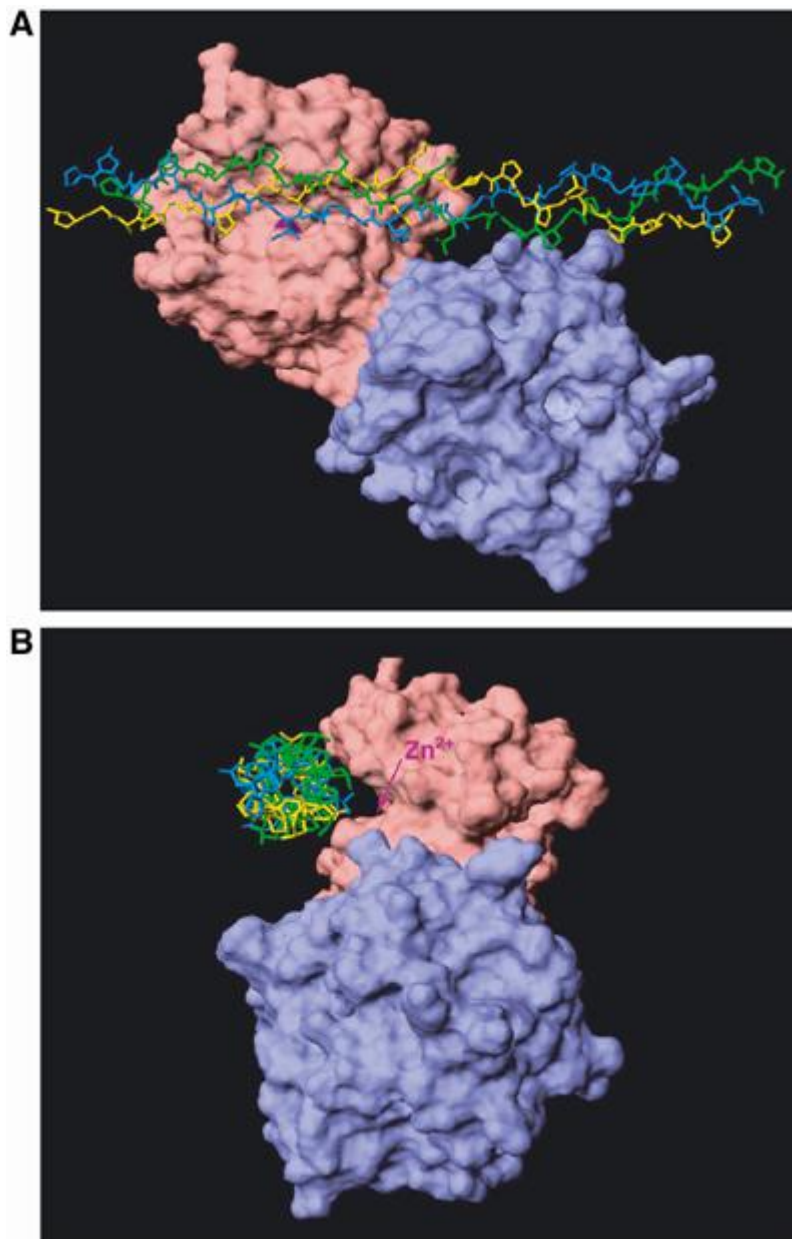
QLSYGYDEKSTGGISVPGPMGSPGRGLPGPPGAPGPQGFQGPPEGEPEGASGPMGPRGPPGPPGKN
 GDDGEAGKPRPGERGPPGPQGARGLPGTAGLPGMKGHRGFSGLDGAKGADAGPAGPKGEPSGNGAP
 GQMGRGLPGERGRPGAPGPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFPAGVAKGEAGPQGRGSEGPQ
 GVRGEPGPPGAGAAGPAGNPGADGQPGAKGANGAPGLAGAPGFPGARGPSGPQGPFGPPGPKNSGEP
 GAPGSKGDTGAKGEPPGVGVQGPFGPAGEEGKRGARGEPGPTGLPGPPGERGGPSRGFPAGADVAGPK
 GPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAKGLTGSPPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRPGPPGPPGAR
 GQAGVMGFPGPKGAAGEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQGPFGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQ
 GLPGPAGPPGEAGKPEQGVPGDLGAPGSPGARGERGFPGERGVQGPFGPAGPRGANGAPGNDGAKGDA
 GAPGAPGSQAGPLQGMFGERGAAGLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRLTGPIGPPGPAGAPGDK
 GESGSPGPAGPTGARGAPGDRGEPGPPGPAGFAGPPGADGQPGAKGEPPDAGAKGDAGPPGPAGPAGFP
 GPIGNVGAPGAKGARGSAAGPPGATGFPGAAGRVGPPGSPGNAGPPGPPGPAGKEGGKGRGETGPAGRP
 GEVGPPGPPGPAGEKSPGADGPAGAPGTPGPQGLAGQQRGVVGLPGQRGERGFPGLPGSPGEPGKQGPS
 GASGERGPPGPMGPPGLAGPPGESGREGAPGAEGSPGRDGSPPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGV
 GPAGKSGDRGETGPAGPAGPVGPVARGPAGPQGPGRGDKGETGEQDGRGIKGHRGFSGLQGPFGPPGSP
 GEQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAPGKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPGPPSAG
 FDFSFLPQPPQEKADGGYYRA

Type I collagen $\alpha 2$ chain sequence (UniProtKB-SwissProt accession no. P08123)

QYDGKGVGLGPGMGLMGRGPPGAAGAPGPQGFQGPAGEPEGEPPQTGPAGARGPAGPPGKAGEDGHP
 GKPRPGERGVVGPQGARGFPGTGLPGFKGIRGHNLGLKQPGAPGVKGEPPAGENGTPGQTGAR
 GLPGERGRVGAPGPAGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPAGAPGPKGEIGAVGNAGPAGPAGPRGEV
 GLPGLSGPVGPPGNPGANGLTGAKGAAGLPGVAGAPGLPGPRGIPGPVGAAGATGARGLVGEPPGASK
 GESGNKGEPPGSAGPQGPFGPSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRSPGSRGLPGADGRAGVMGPPGSR
 GASGPAGVRGPNGDAGRPEPGLMGPRGLPGSPGNIGPAGKEGPVGLPGIDGRPGPIGPAGARGEPPNI
 GFGPKGPTGDPGKNGDKGHAAGARGAPGPDGNNGAQGPFGPQGVQGGKGEQGPAGPPGFQGLPGPS
 GPAGEVKGKPERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESGAAGPTGPIGSRGPPSGPPGPDGNKGEPPGVGAV
 GTAGPSGPSGLPGERGAAGIPGGKGEKGEPLRGEIGNPGRDGARGAPGAVGAPGAGATGDRGEAGAA
 GPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNGFAGPAGAAGQPGAKGERGAKGPKGENGVVGPTGPVGAAGPAGPN
 GPPGPAGSRGDGGPPGMTGFPGAAGRTGPPGPSGISGPPGPPGPAGKEGLRGRGDQGPVGRTEVGAV
 GPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPGTGPQGLLAGPGLPGSRGERGLPGVAGAVGEPGLGLAGPPGAR
 GPPGAVGSPGVNAPGEAGRDGNPGNDGPPGRDQPGHKGERGYPGNIGPVGAAGAPGPHGVPVGPAGKH
 GNRGETGPSGPVGPAGAVGPRGSPGPQGIKRGDKGEPGEKGPRLPGLKGHNGLQGLPLAGHHGDQGAP
 GSVGPAGPRGPAGPSGPAGKDRGTGHPGTVPAGIRGPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPG

Figuur 30: Weergave van de aminozuursequenties van collageen type I (Bella et al., 1994).
 De splitsing site is weergegeven in rood, andere potentiële bindingssites zijn weergegeven in
 blauw. De plaatsen waar de ketens onderling zoutbruggen kunnen vormen zijn onderlijnd.

7.4 Bijlage IV: Katalytisch domein MMP1



Figuur 31: Katalytisch domein van MMP1 (Guex & Peitsch, 1997).
(A) Drievoudige helix van collageen werd uitgelijnd t.h.v. de actieve site van het katalytische domein van MMP1; (B) Aanzicht van A werd 90° geroteerd naar links (Guex & Peitsch, 1997).

7.5 Bijlage V: Akela formulier

Staalnummer: AKELA # _____



AKELA DATABASE:

Exterieur en afwijkingen

Eigenaar:

Naam en voornaam:

Adres:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Hond: (graag een kopij van de stamboom toevoegen!)

Naam:

Ras:

Geboortedatum:

Datum staalname:

Stamboomnummer:

Tatoeage / Chipnummer:

Geslacht: M / V

Gecastreerd: ja / nee

Gewicht (enkel indien gewogen):

BCS (1 t.e.m. 5):

In slaap: ja / nee

Beschrijving oorstanden:

Oorstanden (gebruik romeins cijfer)

Cat I oor = rechtopstaande oren//Cat II oor = tiporen//Cat III oor = oorbasis recht// Cat IV oor = afhangende oren (hangoren naar voren of hangoren naar achteren???)//CatV oor = rozenoren//Cat VI oor = gecoupeerde oren

Linkeroor:

Rechteroer:

Cryptorchidie?:

☐ Twee testikels (O normale grootte of O eerder abnormaal – grootte/consistentie)

☐ één testikel tekort (O R of O L)

☐ twee testikels tekort

☐ onbekend

Staalnummer: AKELA # _____

Gebitscontrole

Stand van de tanden: ☐ schaargebit ☐ overbijter ☐ onderbijter ☐ tanggebit

Gebitscontrole? ☐ Niet gecontroleerd
☐ Volledig gecontroleerd
☐ Gedeeltelijk gecontroleerd

Zijn alle tanden aanwezig? ☐ Ja ☐ Nee

Indien tanden ontbreken, duidt op de tekening aan welke tand tekort is.

De tandformule van de hond, r

Bovenkaak

104	103	102	101	201	202	203	204
105							205
106							206
107							207
108							208
109							209
110							210
							1

Rechts Links

Onderkaak

411							311
410							310
409							309
408							308
407							307
406							306
405							305
404	403	402	401	301	302	303	304

Rechts Links

www.virbac.nl

Staalnummer: AKELA # _____

Polydactylie?:

☐ Normaal (= 4) aantal tenen op achtervoet

☐ sint Hubertus klauw (= 5^{de} teen) (☐ enkel of ☐ dubbel)

Bijkomende karakteristieken

Vachtkleur:

Haartype: ☐ Ruwharige ☐ Kort-, gladhaar ☐ kort-, stokhaar ☐ Middellang stokhaar

☐ Lang stokhaar ☐ Lange bovenvacht zonder ondervacht

☐ Lange bovenvacht met onderwol ☐ Krulhaar ☐ Vilthaar ☐ Haarloos

Neuskleur: _____ BESCHRIJF OF MAAK EEN KLEURENFOTO

Medisch rapport:

Heup- / elleboogdysplasie/ andere gewrichtsproblemen:

Andere problemen:

Reeds radiografieën genomen (+ reden):

Overeenkomst tussen eigenaar en Akela

Het Akela-project focust zich op het verzamelen en het beheer van medische (normaliteit/abnormaliteit) en niet klinische gegevens, stamboom informatie en mondswab.

De eigenaar van het dier staat op moment van toestemming van aanleveren van de informatie en de stalen zijn eigendomsrecht af aan Akela. De hondeneigenaar behoudt wel het recht op informatie. Akela verplicht er zichzelf toe om de eigenaar van elk resultaat op de hoogte te brengen en indien dat relevant is, een medisch of fokadvies ter beschikking te stellen. Akela wijst er op dat mogelijk niet alle stalen worden gebruikt en dat er dus ook niet voor alle stalen een resultaat beschikbaar zal zijn.

Akela staat ook garant voor het beschermen van de privacy van de inzendende eigenaar en zijn dier. Akela zal nooit informatie over individuele dieren verspreiden, maar altijd rapporteren op populatie- of rasniveau.

VOLLEDIGE NAAM _____.

VOOR AKKOORD OP DATUM VAN en HANDTEKENING:

7.6 Bijlage VI: Overzicht primers ADAMTS17

Naam	Primer
ADAMTS17exon1_fwd	CTGGTTTAGACCCGTCCTGG
ADAMTS17exon1_rev	TTACGAGACGCCGTCAGC
ADAMTS17exon2_fwd	CCAGTAGCCCGGCCAATC
ADAMTS17exon2_rev	ACCCGCATCCCAACCTGC
ADAMTS17exon3_fwd	TGCCCCCTTCCCCAAAATAG
ADAMTS17exon3_rev	CAGTGGTCTTAGGGGGCAAT
ADAMTS17exon4_fwd	CCACTGGAGGCTGGCTATTC
ADAMTS17exon4_rev	CGGCAAACCTCTGGTAAGGA
ADAMTS17exon6_fwd	AGCTGCCTCTGCACTAATGT
ADAMTS17exon6_rev	GGGTAACCAGGATTTTGCTGC
ADAMTS17exon7_fwd	CCCTCCCAGCAACAGAATGT
ADAMTS17exon7_rev	TCCTCTACCCTAAGCAACCTCA
ADAMTS17exon8_fwd	AACACAACACATTGCCCGAC
ADAMTS17exon8_rev	GCAAAAGTATGTGGCAGCACT
ADAMTS17exon9_fwd	GGGCATCAGCCTGTGTTACT
ADAMTS17exon9_rev	CACCCAAGGGATGCTGCTAA
ADAMTS17exon10_fwd	CAGGCCCTTTCCTAGTTGCT
ADAMTS17exon10_rev	CAACTGCCTGTGAGGGTGTA
ADAMTS17exon11_fwd	ATTGCCGAACCTGAATCCCCA
ADAMTS17exon11_rev	CTCTTTGCCAGAGTGGGTT
ADAMTS17exon12_fwd	AAGGACGGACTGTCTGGAGT
ADAMTS17exon12_rev	CACACACATCATCCCTGCAC
ADAMTS17exon13_fwd	GATGCATTTTGCTGACGGCT
ADAMTS17exon13_rev	CCACTGCTCGAGAAACCAGT
ADAMTS17exon14_fwd	AAGCCTACAGAGCCCTCACT
ADAMTS17exon14_rev	GGTTGCAGGAGATAGCACCA
ADAMTS17exon15_fwd	TGCCTCAGGTAGCACTAGAAG
ADAMTS17exon15_rev	ATTTGATCCTTGGCTTTGGGC

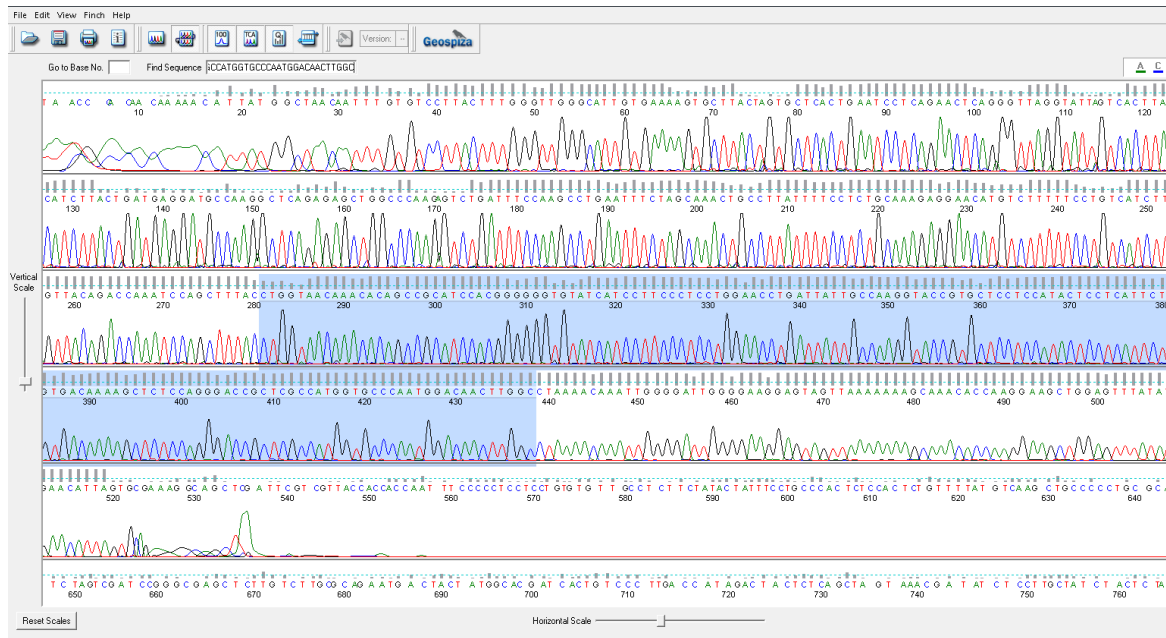
ADAMTS17exon16_fwd	GCCTGTGGGCTCCAAAATCA
ADAMTS17exon16_rev	TTCCTACTAATCCCCACCCCTG
ADAMTS17exon17_fwd	GCCATGTGCCAAGGTTTCTC
ADAMTS17exon17_rev	AACCCAGGTGATCTCTCCCT
ADAMTS17exon18_fwd	AAGACCTGGTGACCCTGCTA
ADAMTS17exon18_rev	GGGGAGTTTGCTTCTCCCTC
ADAMTS17exon19_fwd	TGCCATGTCTTACACACCCTC
ADAMTS17exon19_rev	AGCAACAAGAGAACATGGCA
ADAMTS17exon20_fwd	GCCCCCTCTGCTCTAATAGT
ADAMTS17exon20_rev	GTTATCTGAGGGCTGGCAAGG
ADAMTS17exon21_fwd	GGGACCATGTGCTCAGACTC
ADAMTS17exon21_rev	GCACCCCATTTTCGTGCTCTA
ADAMTS17exon22_fwd	AGCCTCCTTGTCCTGCATTA
ADAMTS17exon22_rev	TGAGGCATCGTGTTTGAGGC
ADAMTS17exon23a_fwd	ATACATGCGAGTGAGGGCAG
ADAMTS17exon23a_rev	AAAGCCATCCAGTGGCTGTTA
ADAMTS17exon23b_fwd	ACCACCATCACCAAGCTCAT
ADAMTS17exon23b_rev	GGGTTGAGAGGCAAAGTGCT
ADAMTS17exon23c_fwd	GTATCGGCCAAGGATGCCA
ADAMTS17exon23c_rev	GGCACAGCTCTTTATGAGGGG
ADAMTS17exon23d_fwd	GCCTTCTGGGGCATCTACTC
ADAMTS17exon23d_rev	GAGACGACCCCAGGGAGATT
ADAMTS17exon23e_fwd	TCCCATAGCCCAGACCTTGC
ADAMTS17exon23e_rev	TACATGCAGGGTGGATCGC
ADAMTS17exon23f_fwd	TGATAACCACCCTCCTTCACC
ADAMTS17exon23f_rev	GGCTTCCTTAGCTTGCCACC

7.7 Bijlage VII: Alignment exonen

Exon 6

Akela 2007

Reverse positie: 281-438

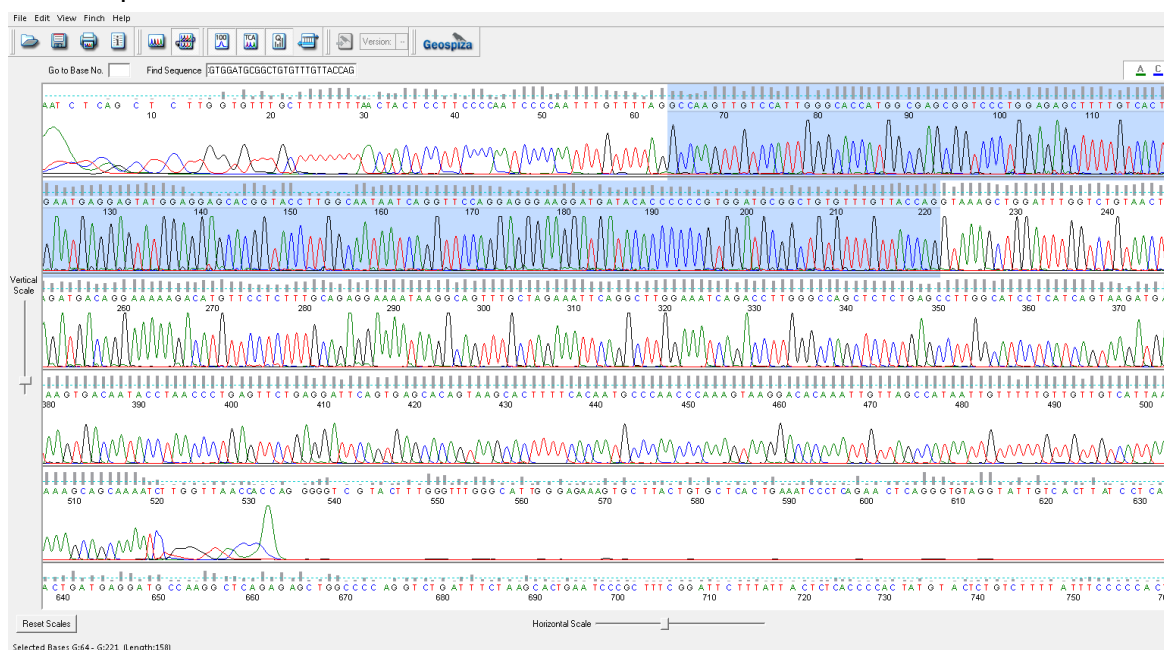
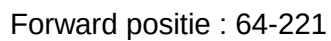


Akela 1616

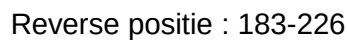
Reverse positie : 278-435



Forward positie : 68-225

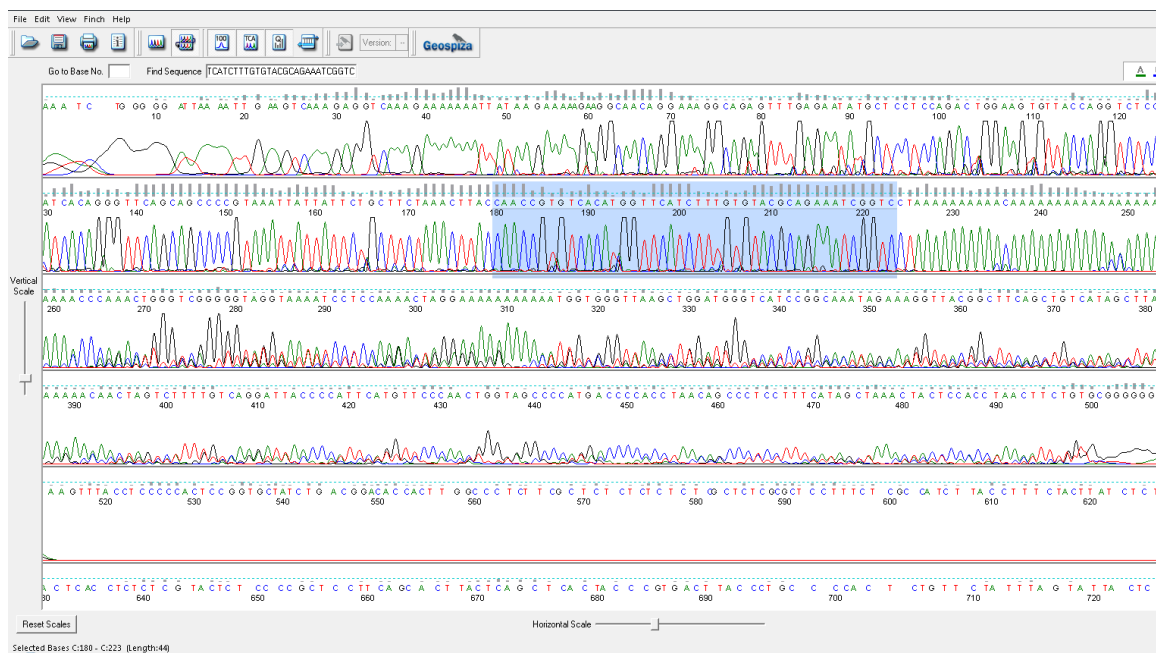


Reverse positie : 179-223 ➡ insertie T (plaats 193)



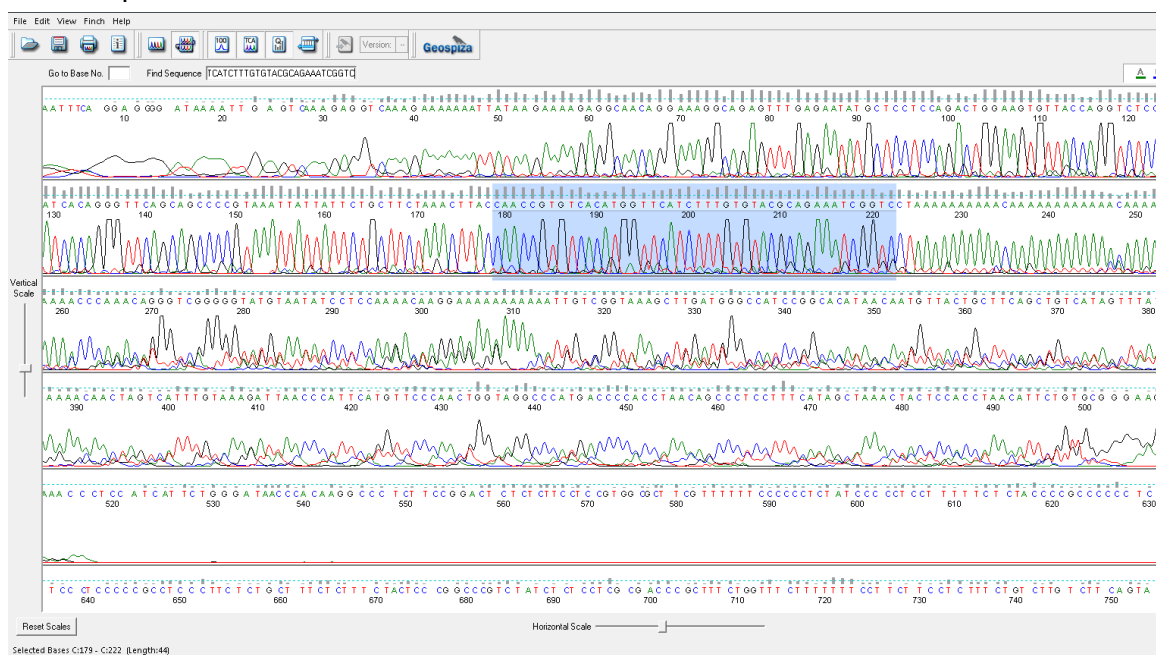
Akela 1617

Reverse positie: 180-223



Akela blanco

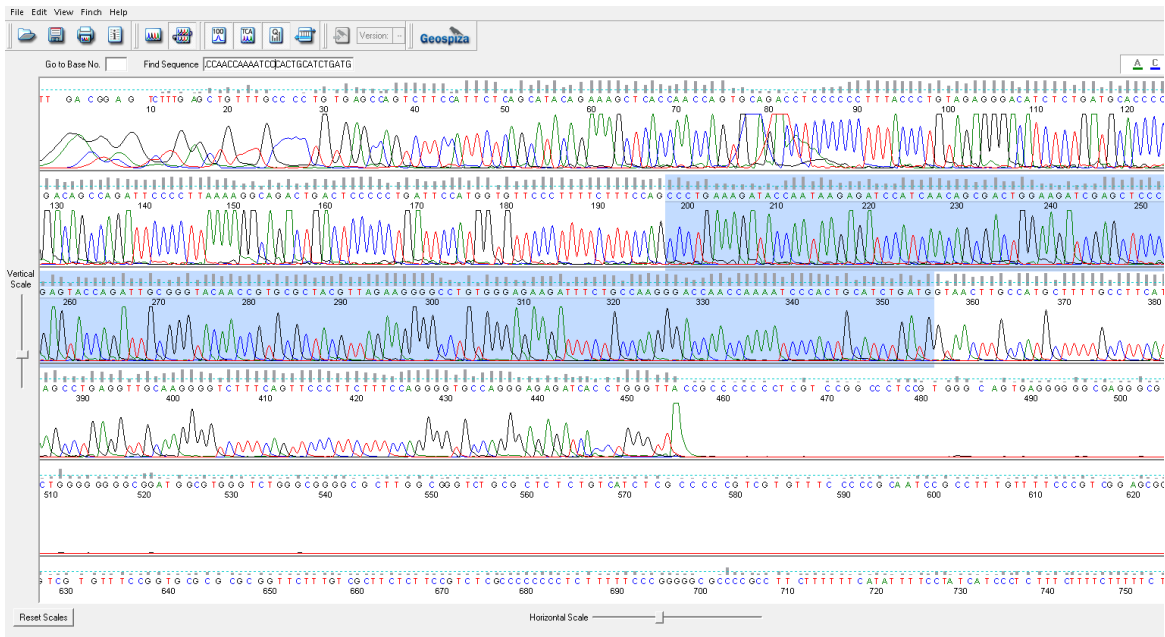
Reverse positie : 179-222



Exon 17

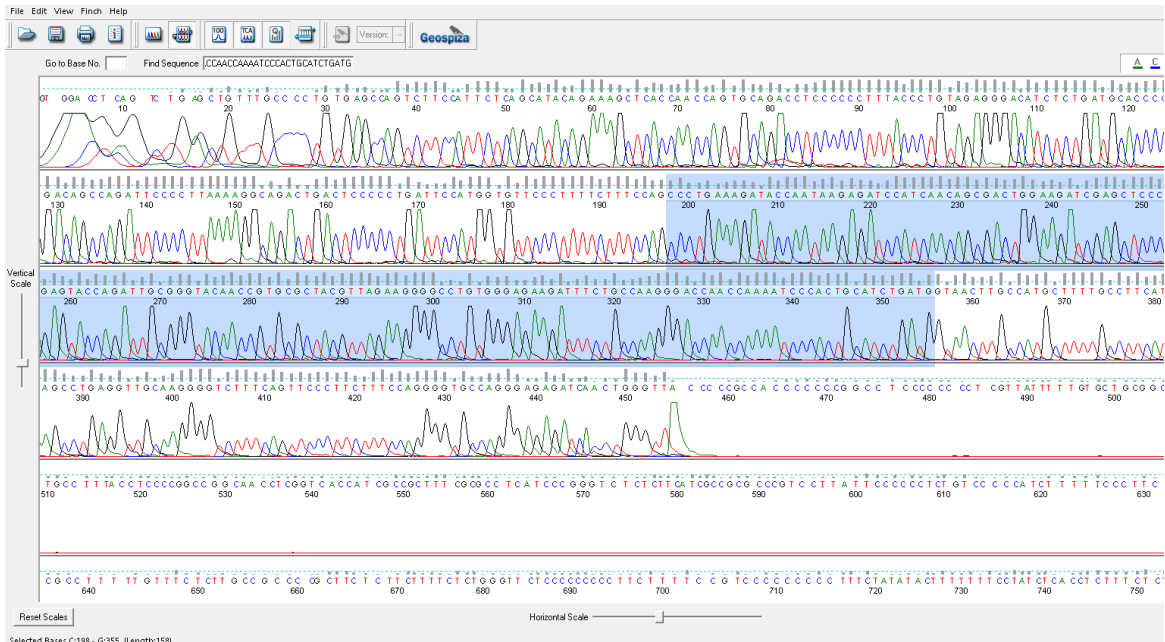
Akela 2007

Forward positie: 198-355

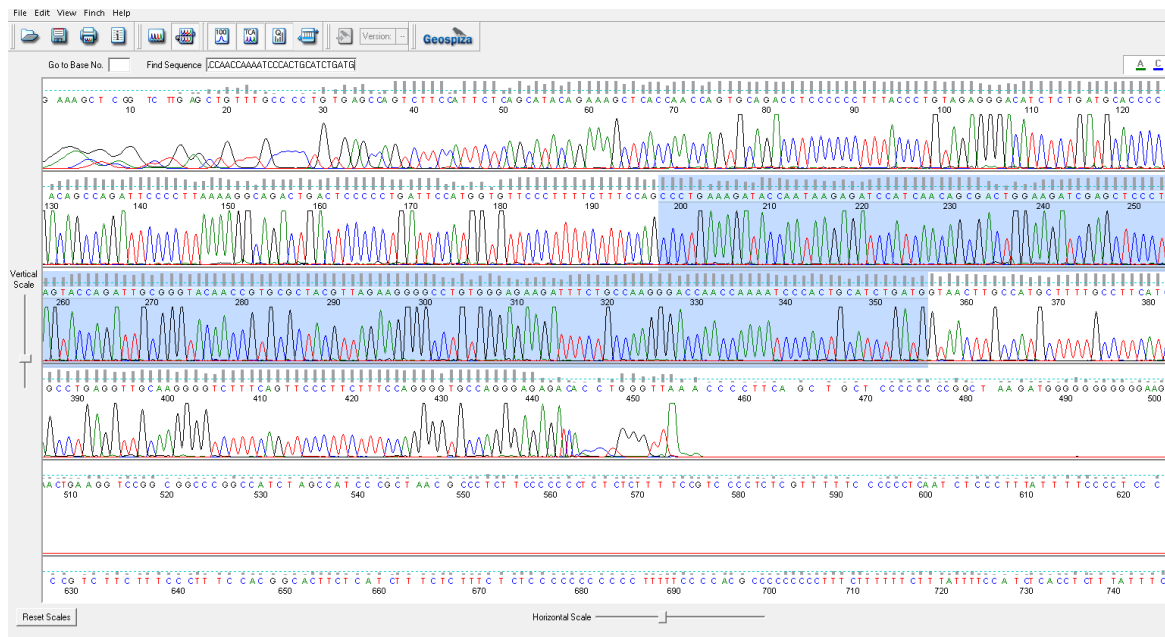
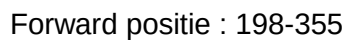


Akela 1616

Forward positie: 198-355



Forward positie : 196-353



7.8 Bijlage VIII: Effect SNP in exon 7 van ADAMTS17 op AZ niveau

Referentie gen

5'3' Frame 1

Met CDGALLPPLVLPLLLLLVWGLDPGSAVGDAADVEVVLPRRVRPDDVHLPPLP
GAPGPRKRRRPRAPLGAPRARPGERALLLHLPAGRDLYLQLRHDLRFLSRGFEV
EEAGAAGRRGRPAELCFYSGRVLGHPGSLVSLSACGAGGGLVGLIQLGQEQLIQ
PLNNSQGLLSRGEHLVRRKWSLTSPSTEAHIPGQLCQVLTEKKKPRKGRQSQDW
RERRNAIQLTNEHTVETLVVADAD Met VQYHGAEAAQRFILTV Met N Met VYN Met FQH
QSLGSKVNIQVTKLVLLRQRPAKLSIGHGERSLESFCHWQNEEYGGARYLGNNQ
VPGGKDDTTPPVDAAVFVTRTDFCVHKDEP C DTVGIAYLGGVCSAKRKCVLAEDNG
LNLAFTIAHELGHNLG Met NHDDDHSSCAGRSHI MetSGEWVKGRNPSDLWSWSSCSR
DDLENFLKSKVSTCLLVTDPRSQHVVRLPHKLP Met HYSANEQCQILFGTNATFCR
N Met EHL Met CAGLWCLVEGDTSCCKTKLDPPLDGTECGADKWCRAECVSKTPIPEH
VDGDWSPWGAWS Met CSRTCCTGARFRQRKCDNPPPGPGGTHCLGASVEHAVCE
NLPCPKGLPSFRDQQCQTHDRLSNKKKGLLTAVVDDKPCELYCSPLGKESPLL
ADRVLDGTPCGPYETDLCVHGKCKIGCDGIIGSAAKEDRCGVCSGDGKTCRVVK
GDFSHSRGTALKDTNKRINSNDWKIELPGEYQIAGTTVRYVRRGLWEKISAKGPTK
IPLHL Met VLLFHDQNYGIHYEYTPVNVHTAENQSEPEKPQDSLFIWTHSGWEGCSV
QCGGGERRTIVSCTRIVNKTTLVNDSDCPQASRPEPQVRRCNHPCQSRWVAG
PWSPCSATCEKGIQHREVTVCYQLQNGTHVTTRPLYCPGPRPAPVQSCEGQDCL
SIWEASEWSQCSATCGKGTQKRTVTCTNSQGKCDASTRPRAEEVCEDYSGCYEW
KTGDWSKCSSTCGKGLQSRVVQC Met HKVTGRHGSECPALLKPAAYRQCHQEVN
DKINVNTITSPRLAALTYKCTRDQWTVYCRVIREKNLCQD Met RWYQRCCQTCRDF
YANK Met RQPPPPSPSS Stop

ADAMTS17 gen Akela 2007

5'3' Frame 1

Met CDGALLPPLVLPLLLLLVWGLDPGSAVGDAADVEVVLPRRVRPDDVHLPPLP
GAPGPRKRRRPRAPLGAPRARPGERALLLHLPAGRDLYLQLRHDLRFLSRGFEV
EEAGAAGRRGRPAELCFYSGRVLGHPGSLVSLSACGAGGGLVGLIQLGQEQLIQ
PLNNSQGLLSRGEHLVRRKWSLTSPSTEAHIPGQLCQVLTEKKKPRKGRQSQDW
RERRNAIQLTNEHTVETLVVADAD Met VQYHGAEAAQRFILTV Met N Met VYN Met FQH
QSLGSKVNIQVTKLVLLRQRPAKLSIGHGERSLESFCHWQNEEYGGARYLGNNQ
VPGGKDDTTPPVDAAVFVTRTDFCVHKDE P Met Stop HGWDCLLRRCVQC Stop EE Met C
ACRRQWSQFGLYHRSRAGPQLGDEP Stop R Stop PLILCWQIPHHRVRRVGKGPES
Q Stop PLLVLLQS Stop Stop P Stop KLPQVESQHLFAGHRPPEPARGASPSQATGHALQ
CQRAVPDPVWHQRHLLQKHGASDVRWTVVPGGRRYVLQDQAGPSPGRHRVWGR
QVVPRRGVCEQDTHPGARGRRLEP Met GRLEHVQPDVWDGSPPLPAEE Met Stop QPP
PWARRHSLLSQCGACCLREPALP Stop GPAQLPRPAVPDT Stop PPEQQEEGPADS
SSG Stop Stop Stop T Met Stop TLLTSREGVPTAGG Stop QGPGWHTLRAL Stop DRPLCAW
QVPENWL Stop WHHRVVRGQGRPVWGLQRGRQDLPRGEGRLQPLSGYSPERY
Q Stop EIHQQRLEDRAPWRVPDCGYNRALR Stop KGPVGEDFCQGTNQNPTASDGAV
IS Stop PELWNPLRVHCSCQPHC Stop KSK Stop TRKTPGLFVHLDPQWLGRVQCAVWR
RGTENHCVLHTDC Stop Stop DHNAGE Stop Q Stop LSSSKPPRAPGPK Met QLTS Met PVK
VGGRP Met EPLLSNLREGHPASRGD Met CIPAAERYPRHHTAPLLPGPPASTSAELR
RPGPLIHLGGL Stop VVTVLCHLRQRDAKTNCDVHQLARK Met RCVHEAQSRGGVRG
LFRLLRVENWGLVQVLLDLWEGPAVPRGPVHAQGHRAWPQRVPRPVEASSLQTV
PPGGLQ Stop QDQREHHHLPSPCCSDLQ Met YTGPDGVLPGHPRKEPLPGHAVVPA
LLPDVQGLLCQQDAPAATTITKL Met