



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
W POZNANIU

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina naukowa: Biologia

mgr Michał Antkowiak

Geny otyłości: analiza wariantów strukturalnych w genomie psa
domowego (*Canis lupus familiaris*)

Genes of obesity: analysis of structural variants in genome of
Domestic dog (*Canis lupus familiaris*)

Praca doktorska wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
pod kierunkiem prof. dra hab. Macieja Szydlowskiego

Poznań 2023

Praca doktorska finansowana ze środków:



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Grant: NCN OPUS

**Tytuł: "Identyfikacja markerów otyłości psów przy pomocy
sekwencjonowania całogenomowego"**

Numer: 2016/23/B/NZ2/01762

Promotorowi, Panu prof. dr hab. Maciejowi Szydłowskiemu składam podziękowania za nawiązaną współpracę, udzielone porady i wskazówki, wszelką pomoc oraz okazaną cierpliwość.

Obecnym i byłym pracownikom i doktorantom Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt (w szczególności tym z pokoju 44) dziękuję za dobrą atmosferę pracy, udzielone wsparcie, wspólnie spędzony czas i nie jedno dobre wspomnienie.

Rodzicom dziękuję za wsparcie, motywowanie do pracy i za to, że zawsze we mnie wierzyli.

Wykaz skrótów:	6
Wykaz przygotowanych artykułów naukowych:	7
Streszczenie	8
Abstract	10
1. Wstęp	12
1.1 Domestykacja psa	12
1.2 Występowanie otyłości psa domowego i czynniki ryzyka	12
1.3 Genetyka otyłości psa domowego	15
1.4 Związek wariantów strukturalnych z masą ciała na przykładzie człowieka	16
1.5 Warianty strukturalne w genomie psa domowego i innych gatunków	18
2. Hipoteza badawcza.....	21
3. Cele pracy	22
4. Przebieg badań	23
5. Materiał i metody	24
5.1 Materiał badawczy	24
5.2 Metody badawcze	25
5.2.1 Wybór genów do badań	25
5.2.2 Projektowanie sond molekularnych	26
5.2.3 Izolacja DNA.....	27
5.2.4 Reakcja emulsyjnego PCR.....	28
5.2.5 Analiza statystyczna.....	29
6. Wyniki.....	30
6.1 Wyniki badania I	30
6.2 Wyniki badania II	30
6.3 Wyniki badania III	31
6.3.1 Wynik projektowania sond molekularnych.....	31
6.3.2 Gen <i>ALPL</i>	31
6.3.3 Gen <i>KCTD8</i>	31
6.3.4 Gen <i>MME</i>	32
6.3.5 Gen <i>SGSM1</i>	32
6.3.6 Gen <i>SLC12A6</i>	32
6.3.7 Gen <i>RYR3</i>	33
6.3.8 Gen <i>VPS26C</i>	33

7. Dyskusja.....	34
7.1 Zmienność liczby kopii genu <i>AMY2B</i> w populacji psów rasy labrador retriever.....	34
7.2 Zmienność liczby kopii genu <i>AMY2B</i> w populacji lisów rudych, lisów polarnych oraz jenotów azjatyckich	35
7.3 Analiza wariantów strukturalnych w genach wytypowanych na podstawie sekwencjonowania całogenomowego	39
8. Podsumowanie	43
9. Literatura	44
10. Tabele	53
11. Kopie artykułów naukowych	60
12. Oświadczenia.....	78

Wykaz skrótów:

BCS - Wskaźnik kondycji ciała (*ang. Body Condition Scoring*)

BLAT - *ang.* BLAST-like alignment tool

BLAST - *ang.* Basic Local Alignment Search Tool

BMI - Wskaźnik masy ciała (*ang. Body mass index*)

CNV - Zmienność liczby kopii (*ang. Copy number variation*)

ddPCR – PCR emulsyjny (*ang. Droplet digital PCR*)

DNA - Kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. Deoxyribonucleic acid*)

GWAS - Całogenomowe badanie asocjacyjne (*ang. Genome-wide association studies*)

kpz - kilo (tysiąc) par zasad

lncRNA - długie niekodujące cząsteczki kwasu rybonukleinowego (*ang. long non-coding RNA*)

PCR - Łańcuchowa reakcja polimerazy (*ang. Polymerase chain reaction*)

pz - pary zasad

SNP - Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang. Single nucleotide polymorphism*)

SV - Wariant strukturalny (*ang. Structural variant*)

WGS - Sekwencjonowanie całogenomowe (*ang. Whole Genome Sequencing*)

Wykaz przygotowanych artykułów naukowych:

Antkowiak Michał, Szczerbal Izabela, Nowacka-Woszek Joanna., Świtoński Marek, Szydłowski Maciej (2019): No association between *AMY2B* gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs. *Animal Genetics* 50:552-553

IF₂₀₂₂=3,169; MNiSW: 140 pkt.

Udział pierwszego autora: 55%

Antkowiak Michał, Nowacka-Woszek Joanna, Szczerbal Izabela, Świtoński Marek, Szydłowski Maciej (2020): *AMY2B* Gene Copy-Number Variation Studied by Droplet Digital PCR (ddPCR) in Three Canids: Red Fox, Arctic Fox, and Chinese Raccoon Dog. *Folia Biologica* (Kraków) 68:51-55

IF₂₀₂₂=0,432; MNiSW: 40 pkt.

Udział pierwszego autora: 60%

Antkowiak Michał, Szydłowski Maciej

Uncovering Structural Variants Associated with Body Weight and Obesity Risk in Labrador Retrievers: A Genome-Wide Study. Praca zaakceptowana 11.09.2023

do publikacji w czasopiśmie *Frontiers in Genetics*, DOI:10.3389/fgene.2023.1235821

IF₂₀₂₂=3,7; MNiSW: 140 pkt.

Udział pierwszego autor: 75%

Streszczenie

Otyłość psa domowego (*Canis lupus familiaris*) jest istotnie powiązana z dobrostanem. Nieprawidłowe zwiększenie masy ciała związane jest z licznymi schorzeniami, takimi jak cukrzyca, zespół metaboliczny, czy stłuszczenie wątroby. Labrador retriever jest jedną z kilku ras z predyspozycją do otyłości. Warianty strukturalne to duże mutacje, które (obok m.in. polimorfizmów pojedynczego nukleotydu) mogą potencjalnie kształtować ryzyko otyłości. Przykładowo, u człowieka zwielokrotnienie liczby kopii genu *AMY1* (kodującego amylazę ślinową) obniża ryzyko otyłości. Celem badań była ocena udziału wariantów strukturalnych w kształtowaniu ryzyka otyłości psa. Badaniami objęto 109 psów rasy labrador retriever, a także 60 lisów rudych (*Vulpes vulpes*), 53 lisów polarnych (*Alopex lagopus*) i 39 jenotów azjatyckich (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*). Warianty strukturalne identyfikowano na podstawie pośrednich wyników sekwencjonowania całogenomowego oraz z zastosowaniem emulsyjnego PCR.

Uzyskane dane nie wskazują na związek pomiędzy liczbą kopii genu amylazy trzustkowej, *AMY2B*, a masą ciała i otyłością psów rasy labrador retriever. Wynik ten nie wyklucza prawdziwości znanej tezy, że zwiększenie liczby kopii genu ma związek z domestykacją i wzrostem udziału skrobi w diecie. Jednocześnie, jest zgodny z ogólną wiedzą, że otyłość jest przede wszystkim zaburzeniem uczucia głodu i sytości, a nie skuteczności trawienia. Obserwowano zwielokrotnienie genu *AMY2B* w populacjach lisa rudego, lisa polarnego oraz jenota azjatyckiego, jednak średnia liczba kopii oraz poziom zmienności w populacjach były niskie. Jeżeli zwiększenie liczby kopii *AMY2B* jest odpowiedzią ewolucyjną na obecność skrobi w diecie, niską zmienność można tłumaczyć relatywnie krótką historią hodowli tych gatunków i niskim udziałem skrobi w diecie. Za pomocą emulsyjnego PCR ustalono obecność wariantów strukturalnych w sześciu z siedmiu genów wytypowanych na podstawie pośrednich danych sekwencjonowania całogenomowego. Wynik ten potwierdza powszechną obecność wariantów strukturalnych w genomie psa oraz przydatność metody sekwencjonowania z użyciem krótkich odczytów do wstępnej identyfikacji wariantów strukturalnych. Dla sześciu genów (*ALPL*, *SGSM1*, *RYR3*, *SLC12A6*, *KCTD8* oraz *VPS26C*) wykryto korelację pomiędzy obecnością wariantów strukturalnych a wskaźnikiem kondycji ciała (BCS) i/lub otyłością w populacji psów rasy labrador retriever. Uzyskane dane sugerują, że powszechna otyłość psa, w przeciwieństwie do otyłości poligenicznej człowieka, może być uwarunkowana wariantami, które mają jednocześnie wysoką częstość i duży wpływ na ryzyko otyłości. Fakt, że zidentyfikowane tu geny leżą poza szlakami sygnałowymi, które są

ważne dla otyłości człowieka, wskazuje, że źródła zmienności genetycznej dla otyłości człowieka i psa mogą być różne.

Abstract

Obesity in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) is closely linked to overall well-being. Abnormal weight gain is associated with various diseases, including diabetes, metabolic syndrome, and fatty liver. The Labrador Retriever is one breed known to be predisposed to obesity. Structural variants, which are substantial genetic mutations that can influence the risk of obesity, along with other factors such as single nucleotide polymorphisms, may play a role. For instance, in humans, an increase in the number of copies of the *AMY1* gene (which encodes salivary amylase) is associated with a reduced risk of obesity. This study aimed to evaluate the contribution of structural variants to the risk of obesity in dogs. The study encompassed 109 Labrador Retrievers, along with 60 red foxes (*Vulpes vulpes*), 53 arctic foxes (*Alopex lagopus*), and 39 raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*). Structural variants were identified using intermediate results from genome-wide sequencing and droplet digital PCR.

The data did not indicate a relationship between the copy number of the pancreatic amylase gene, *AMY2B*, and the body weight or obesity prevalence in Labrador Retrievers. This finding does not refute the widely known hypothesis that an increase in gene copies is related to domestication and an elevated proportion of starch in the diet. Simultaneously, it aligns with the general understanding that obesity primarily stems from hunger and satiety imbalances rather than digestive efficiency. While an increase in *AMY2B* copies was observed in red foxes, arctic foxes, and raccoon dogs, the average copy number and variability within these populations were low. This limited variability can be attributed to these species' relatively short breeding history and the low proportion of starch in their diet, assuming that an increase in *AMY2B* copies is an evolutionary response to starch consumption. The utilization of droplet digital PCR confirmed the presence of structural variants in six out of the seven genes selected from the intermediate genome-wide sequencing data. This outcome underscores the widespread occurrence of structural variants in the canine genome and the effectiveness of short-read sequencing for pre-identification of such variants. For six genes (*ALPL*, *SGSM1*, *RYR3*, *SLC12A6*, *KCTD8*, and *VPS26C*), a correlation was found between the presence of structural variants and the body condition index (BCS) and/or obesity in the Labrador Retriever population. These findings suggest that common obesity in dogs, in contrast to human polygenic obesity, may be influenced by variants that are both highly prevalent and have a large effect on obesity risk. The identification of genes outside

the signaling pathways associated with human obesity indicates potential differences in the genetic factors contributing to obesity between humans and canines.

1. Wstęp

1.1 Domestykacja psa

Do udomowienia psa domowego (*Canis lupus familiaris*) doszło w górnym paleolicie. Choć wcześniejsze badania sugerowały, że nastąpiło to pod jego koniec, ok. 14 tys. lat temu, najnowsze wyniki przesuwają to wydarzenie na okres pomiędzy 20 tys. a 40 tys. lat temu (Botigué i wsp., 2017; Galeta i wsp., 2020). Najprawdopodobniej pies stał się pierwszym gatunkiem powstałym w wyniku domestykacji. Obecnie podważa się również wcześniejszą hipotezę, zgodnie z którą do udomowienia psa doszło dwukrotnie (Botigué i wsp., 2017).

W przypadku psa, tak samo jak w przypadku większości udomowionych gatunków, proces domestykacji związany był z doborem sztucznym. Udomowienie znacząco wpłynęło na budowę ciała psa oraz jego behavior. Spośród wszystkich udomowionych gatunków, u psa domowego możemy obserwować największą różnorodność fenotypów. Wśród współczesnych psów obserwujemy duże zróżnicowanie rozmiaru i masy ciała (pomiędzy przedstawicielami różnych ras obserwuje się osobniki o masie od 1 kg do 100 kg), maści, budowy kończyn czy twarzoczaszki. Widocznym na pierwszy rzut oka zmianom anatomicznym towarzyszyły również zmiany w układzie nerwowym i mózgu, prowadzące m.in. do zmian behavioru. Ważne było pojawienie się fizjologicznych przystosowań do innej niż w przypadku dzikich wilków diety, co wiązało się przede wszystkim z rozwinięciem dostosowania do metabolizmu skrobi oraz zwiększonej ilości tłuszczu (Axelsson i wsp., 2013).

Pies jest gatunkiem modelowym dla chorób człowieka, co wynika m.in. z dzielenia naszego środowiska, a więc narażenia na podobne czynniki, również te wpływające na genom (Van Steenbeek i wsp., 2016). Ponadto, psy, w przeciwieństwie do udomowionych gatunków hodowlanych dożywają zwykle swojej naturalnej starości, co pozwala na obserwacje rozwoju schorzeń, które powiązane są z czynnikiem wieku, jak np. otyłość.

1.2 Występowanie otyłości psa domowego i czynniki ryzyka

Psy narażone są na nadwagę oraz otyłość. Wg jednej z analiz, 40% przebadanej w Holandii populacji cierpi na nadwagę, natomiast kolejne 20% na otyłość (Courcier i wsp., 2010). Badanie ankietowe w Pekinie wykazało, że odsetek otyłych psów sięga 44,4% (Mao i wsp., 2013). Z kolei badanie przeprowadzone w Japonii na stawce 5287 psów wykazało, że

niemal 40% zwierząt miało nadwagę, natomiast kolejnych 15% było otyłych (Usui i wsp., 2016). Brak jest badań rozpowszechnienia otyłości wśród polskiej populacji psów.

Nadmierne zwiększenie masy ciała skraca oczekiwaną długość życia i obniża jego jakość. Objawami przewlekłej otyłości u psów są m.in. wzrost poziomu cholesterolu i triglicerydów w osoczu (Jeusette i wsp., 2005) oraz rozwój insulinooporności, która prowadzi do rozwinięcia się cukrzycy (Lund i wsp., 2006). Inne schorzenia występujące u otyłych psów to choroba zwyrodnieniowa stawów, choroby wątroby czy zespół metaboliczny (Tvarijonaviciute i wsp., 2012).

Klasyfikacja cukrzycy u psa domowego jest bardziej złożona niż obecny u człowieka podział na cukrzycę typu 1. oraz typu 2., i jest ona powiązana z czynnikami genetycznymi w większym stopniu niż cukrzyca człowieka (Catchpole i wsp., 2008). Związek schorzenia z otyłością pozostaje niezaprzeczalny. Badania wykazały, że cukrzyca występuje u psów otyłych 2,6 razy częściej w porównaniu do psów w podobnym wieku o prawidłowej masie ciała (Lund i wsp., 2006). Warto wspomnieć również, że niektóre z ras są narażone na cukrzycę w większym stopniu. Są to m.in. cairn terrier, samojed i terier tybetański, co związane jest z trzema specyficznymi haplotypami głównego układu zgodności tkankowej. Obecność owych wariantów zwiększa ryzyko rozwinięcia cukrzycy, a u przedstawicieli trzech narażonych ras, haplotypy te występują powszechnie (Catchpole i wsp., 2008).

W przypadku choroby zwyrodnieniowej stawów, jej związek z otyłością wiązano dotychczas ze zwiększeniem obciążenia mechanicznego. Najnowsze badania sugerują również istotność czynników biochemicznych i ogólnoustrojowych wpływających na patofizjologię tego schorzenia (Loef i wsp. 2019). Choroba zwyrodnieniowa stawów oraz dysplazja stawu biodrowego to schorzenia występujące zwykle u dużych ras psów. W przypadku tych zwierząt nieprawidłowa masa ciała jest jednym z dodatkowych czynników pogarszających rokowanie (Runge i wsp., 2010).

Zespół metaboliczny to kombinacja powiązanych z otyłością zaburzeń. Zaburzenia te to insulinooporność (lub hiperglikemia), nadciśnienie tętnicze oraz hiperlipidemia (Alberti i wsp., 2006; Alberti i wsp., 2009). Stany charakterystyczne dla zespołu metabolicznego człowieka, takie jak insulinooporność, nadciśnienie czy hiperlipidemia, są obserwowane u psów, choć ich skutki nie są identyczne ze skutkami obserwowanymi u człowieka: miażdżyca tętnic, choroba niedokrwienna serca oraz udary są u psów rzadko obserwowane (Verkest, 2014).

Choć w tej pracy autor skupia się na genetycznym uwarunkowaniu otyłości psów, nie można nie wspomnieć o wpływie środowiska na nieprawidłowe zwiększenie masy ciała.

Podobnie jak u ludzi, u psów bardzo częstym powodem nadwagi jest nieprawidłowa dieta i niewielka ilość ruchu. Na wystąpienie nadwagi wpływa również to, czy zwierzę zostało wykastrowane, jego wiek oraz płeć (Colliard i wsp., 2006).

Bardziej narażone na rozwinięcie się nieprawidłowej masy ciała są samice. Wg. badań przeprowadzonych we Francji, samice były narażone na otyłość 1,57 razy częściej niż samce (Colliard i wsp., 2006). Wynik ten potwierdziły badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii, które wykazały, że u samic ryzyko wystąpienia otyłości wynosiło 41% (podczas gdy u samców 32%) (Holmes i wsp., 2007). Inne badania określiły iloraz szans wystąpienia otyłości u samic na 1,3 (Usui i wsp., 2016) bądź 1,2 (McGreevy i wsp. 2005) w porównaniu z samcami.

Kolejnym istotnym czynnikiem jest wiek zwierząt. Badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii określiły ryzyko wystąpienia nadwagi u psów w wieku powyżej 7,5 roku na 71% (Holmes i wsp., 2007). Badania przeprowadzone we Francji wykazały, że powyżej 12 roku życia, ryzyko wystąpienia nadwagi jest 12,33 razy większe w stosunku do psów jednorocznych (Colliard i wsp., 2006).

Na wystąpienie nadwagi i otyłości wpływa również to, czy zwierzę zostało wykastrowane. Francuskie badanie określiło częstość wystąpienia nieprawidłowej masy ciała u wykastrowanych zwierząt na 2,33 razy większą (Colliard i wsp., 2006). Badanie brytyjskie z kolei określiło częstość nadwagi u wykastrowanych psów na 59%, podczas gdy u zwierząt niewykastrowanych wynosiła ona 43% (Holmes i wsp., 2007). Również w badaniu przeprowadzonym w Japonii iloraz szans w grupie zwierząt wykastrowanych w porównaniu z grupą psów niewykastrowanych wyniósł 1,2 (Usui i wsp., 2016).

Opisano związki pomiędzy otyłością psów a cechami takimi jak zamożność właściciela (częściej otyłe były psy właścicieli biedniejszych), jego wiek (częściej otyłe były psy, którymi opiekowały się osoby starsze), czy miejsce zamieszkania (otyłość częściej występowała u psów żyjących na wsi) (McGreevy i wsp., 2005; Courcier i wsp., 2010).

Choć każdy pies może być zagrożony na nieprawidłowym wzrostem masy ciała z powodu niewłaściwej opieki, niektóre rasy są szczególnie narażone wystąpienie otyłości.

Rasy te to m.in. cocker spaniel, jamnik, dalmatyńczyk, a w szczególności aportery: labrador retriever i golden retriever (Colliard i wsp., 2006; Lund i wsp., 2006). Dla przedstawicieli wymienionych ras iloraz szans na wystąpienie nadwagi oraz otyłości zawiera się w przedziale od 1,5 do 1,9, w porównaniu z innymi rasami (Lund i wsp., 2006). Dla labradorów retrieverów (na których skupia się niniejsza praca) iloraz szans wyniósł 1,6 (przy porównaniu do grupy, w której znajdowali się przedstawiciele innych ras) (Lund i wsp., 2006); wyniki te

uzyskano dla kohorty 1738 labradorów, z których 35,9% miało nadwagę, natomiast 5,2% było otyłych. (Lund i wsp., 2006). Inne badanie wykazało, że przynależność do tej rasy zwiększa ryzyko wystąpienia otyłości 4,65 krotnie (Colliard i wsp., 2006). W badaniu skupiającym się na określeniu częstości występowania nadwagi i otyłości u psów, labradory zajęły szóstą pozycję w rankingu ras, u których otyłość była najczęściej obserwowana. Przeszło dwadzieścia procent z 79 zbadanych psów określono jako otyłe. Na pierwszym miejscu rankingu znalazły się jamniki z częstością występowania otyłości na poziomie 29,3% (Usui i wsp., 2016). Zwiększona podatność poszczególnych ras na nieprawidłowe zwiększenie masy ciała jest podstawowym dowodem na związek czynników genetycznych z omawianym zagadnieniem u przedstawicieli *Canis lupus familiaris*.

1.3 Genetyka otyłości psa domowego

Podobnie jak u ludzi, u psów większość przypadków otyłości to otyłość poligeniczna, natomiast otyłość monogeniczna jest rzadko diagnozowana. Możliwe, że skrajna otyłość monogeniczna nie występuje z powodu kontroli żywienia przez człowieka. Niestety z powodu m.in. fragmentacji populacji, dużej zmienności międzyrasowej czy niepełnych danych rodowodowych, określenie ogólnego poziomu odziedziczalności otyłości poligenicznej dla całego gatunku jest niemożliwe. Bazując jednak na podobieństwie między otyłością psów a innymi, lepiej opisanymi ssakami (człowiek, świnia, mysz), można założyć, że podobnie jak u tych gatunków, u psa odziedziczalność wynosi ok. 30% (Switonski i Mankowska, 2013).

U psa domowego wykryto delecję (14 pz) w intronie genu *POMC*, która znacząco zwiększa masę ciała i BCS psów rasy labrador retriever, poprzez zmianę funkcji dwóch hormonów peptydowych: β -MSH oraz β -endorfiny (Raffan i wsp., 2016; Mankowska i wsp., 2017). Z uwagi na duży wpływ fenotypowy delecję w genie *POMC* można zaklasyfikować do mutacji wywołujących otyłość monogeniczną, jednak jej relatywnie wysoka częstość występowania jest typowa dla poligenów.

W przypadku otyłości poligenicznej, opisanych zostało więcej mutacji. Jedną z prac przedstawiła badania *MC4R*, genu związanego ze szlakiem melanokortynowym. SNP został wykryty u psów rasy beagle i był związany z masą ciała (Zeng i wsp., 2014). Kolejne zmienności tego typu zostały wykryte w genie *GPR120*. W przebadanej populacji polimorfizm obecny był u 40 ze 141 osobników, a częstość jego występowania była wyższa u psów z wyższym BCS (Miyabe i wsp., 2015). U rasy labrador retriever został z kolei opisany

polimorfizm typu SNP związany z otyłością, który znajdował się w genie *TNF* (Mankowska i wsp., 2016). Potencjalnie efekty wywoływane przez mutacje w genach związanych z otyłością monogeniczną i w genach związanych z otyłością poligeniczną mogą się sumować.

1.4 Związek wariantów strukturalnych z masą ciała na przykładzie człowieka

Rozwój narzędzi bioinformatycznych ułatwiających identyfikację wariantów występujących w genomie, umożliwia zwrócenie uwagi na tzw. warianty strukturalne (*ang.* Structural variants, SV), czyli mutacje dłuższych fragmentów genomu, o wielkości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad. Zjawisko zwielokrotnienia (oraz delecji) długich fragmentów, obejmujących niekiedy całe geny, określa się mianem zmienności liczby kopii (*ang.* Copy number variation, CNV). "Wariant strukturalny" oraz "zmienność liczby kopii" są pojęciami, które w zasadzie pokrywają się. Tego drugiego terminu używa się zwykle w odniesieniu do znacznych powieleń danego fragmentu genomu. Określenie "wariant strukturalny" wydaje się ogólniejsze i bardziej adekwatne do opisanie krótszych mutacji. Dotąd przeprowadzono kilka badań nad związkiem pomiędzy zmiennością liczby kopii a otyłością u człowieka.

Jedna z wczesnych analiz tego zagadnienia została przeprowadzona *in silico*. Analiza ta skupiała się na wyszukiwaniu wariantów strukturalnych w genomach 1080 Amerykanów europejskiego pochodzenia. Wykryte zostały dwie duplikacje (geny *KIF2B* i *ARL15*) oraz 6 delecji (geny *EDIL3*, *SIPR5*, *FOXP2*, *TBCA*, *ABCB5* i *ZPLD1*), które powiązano z nieprawidłowym zwiększeniem masy ciała (Glessner i wsp., 2010). Kolejne badanie, również *in silico*, dotyczyło populacji kilkuset pacjentów cierpiących na ekstremalną otyłość. Wykorzystana metoda GWAS wykazała obecność wariantów strukturalnych w trzech genach zlokalizowanych na chromosomie 11. Geny te (*OR4P4*, *OR4S2*, *OR4C6*) powiązane są z receptorami węchowymi, natomiast obecność mutacji miała mieć związek z występowaniem u pacjentów skrajnej otyłości o wczesnym początku (Jarick i wsp., 2011). Z drugiej strony, molekularna weryfikacja CNV we wspomnianych genach, którą przeprowadzono na meksykańskiej populacji 1841 pacjentów, nie wykazała asocjacji pomiędzy masą ciała a wykrytą liczbą kopii (León-Mimila i wsp., 2018).

W tym samym badaniu przetestowano również geny *GPRC5B* oraz *NEGR1*, w obu przypadkach zakres zmienności liczby kopii wynosił od 1 do 4, co sugerowało występowanie

jednoczesnej delecji i duplikacji, jednak ponownie nie udało się powiązać tych wariantów strukturalnych z masą ciała (León-Mimila i wsp., 2018).

W przypadku genu *NPY4R*, pierwsze badanie nie wykryło związku masy ciała z obecnością wariantu strukturalnego (którego zakres wahał się od 1 do 4 kopii), jednak w kolejnym badaniu skupionym na tym genie, związek taki został wykryty. W kohorcie 558 pacjentów pochodzenia szwedzkiego, liczba kopii wahała się od 2 do 8. Duplikacja genu jest dodatnio skorelowana z BMI oraz obwodem bioder, jednak efekt ten obserwowano jedynie u kobiet, natomiast u mężczyzn nie występował. Gen *NPY4R* odpowiedzialny jest za kodowanie trzustkowego receptora polipeptydowego Y4, który związany jest z masą ciała jako inhibitor apetytu. Jego główne receptory znajdują się w mózgu (Shebantis i wsp., 2018).

Dobrze opisanym genem, powiązaniem z zagadnieniem asocjacji między wariantami strukturalnymi a masą ciała, jest gen *AMY1*, kodujący ślinową amylazę. Opisany w genie *AMY1* wariant strukturalny, będący zwielokrotnieniem tego genu, został ujemnie skorelowany z masą ciała w przebadanych populacjach człowieka. Zwiększenie liczby kopii owego fragmentu genomu powoduje obniżenie ryzyka wystąpienia nadwagi bądź otyłości w przebadanej meksykańskiej populacji dorosłych (Mejía-Benítez i wsp., 2015). Kolejne badanie również dotyczyło populacji meksykańskiej. Tym razem jednak oprócz dorosłych, badano również dzieci (odpowiednio 921 i 920 osób, kohorta wspomniana wcześniej). Wyniki potwierdziły związek wyższej liczby kopii genu *AMY1* z obniżeniem ryzyka wystąpienia otyłości u dzieci oraz wykazały ten sam efekt u dorosłych. (León-Mimila i wsp., 2018). Początkowo, biologiczny mechanizm wpływu liczby kopii genu *AMY1* na masę ciała był zupełnie nieznan, jednakże analiza GWAS sugerowała związek owego genu ze składem mikrobiomu jelitowego (Parks i wsp., 2013).

W jednym z eksperymentów, w przeciwieństwie do wcześniejszych badań na modelu mysim, nie wykryto związku pomiędzy liczbą kopii genu *AMY1* a liczebnością bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Z drugiej strony, opisano związek pomiędzy CNV owego genu a liczebnością bakterii z rodzaju *Prevotella*, o których wiadomo, że ich duża populacja korzystnie wpływa na metabolizm i spalanie węglowodanów. Nie wykryto bezpośredniego związku pomiędzy obfitością *Prevotella* a dietą pacjentów i dlatego, pomimo dużego postępu wiedzy na ten temat, związek liczby kopii genów amylazy z mikrobiotą pozostaje niejasny (León-Mimila i wsp., 2018). Późniejsze badania wykryły związek liczby kopii omawianego genu z liczebnością populacji kolejnych bakterii: rodzajów *Dialister* oraz *Capnocytophaga* (który występuje w ślinie). Ponownie jednak autorom nie udało się odkryć mechanizmu zależności. Ponadto, badanie (przeprowadzone na pacjentach z północnej Japonii) wykazało

związek zmienności liczby kopii genów z rodziny *AMY* z ryzykiem wystąpienia cukrzycy. Opisano również większą zmienność liczby kopii genu *AMY1* w przebadanej populacji w porównaniach ze zmiennością opisaną na podstawie wcześniejszych badań (Hasegawa i wsp., 2022).

W innym badaniu, w którym brało udział 560 mieszkańców Chin, w tym 260 cierpiących na zespół metaboliczny. Schorzenie to powiązано z aktywnością amylaz (jednak nie z samą liczbą kopii genów z rodziny *AMY*). W artykule zasugerowano, że niska aktywność amylaz w surowicy może być związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia owego zespołu. Aktywność amylaz została zaproponowana jako marker ryzyka wystąpienia tego schorzenia (Zhan i wsp., 2021).

Zmienność liczby kopii genu amylazy została również powiązana z ryzykiem otyłości. Wg badania przeprowadzonego na populacjach portorykańskiej i amerykańskiej, pacjenci z mniejszą liczbą kopii genu *AMY1* narażeni są w większym stopniu na rozwinięcie się insulinooporności, co z kolei prowadzi do cukrzycy typu 2. (Liu i wsp., 2020).

Warto jednak nadmienić, że obserwowany związek obecności wariantu strukturalnego w genie kodującym amylazę z masą ciała nie został potwierdzony we wszystkich artykułach omawiających *AMY1*. Badanie podważające ten jednoznaczny związek dotyczyło populacji brytyjskiej, kohorty pacjentów, których dane zbierane były od roku 1958 (1958 Birth Cohort). W badaniu tym związek pomiędzy BMI i liczbą kopii *AMY1* nie został wykazany (Shawn i Armour, 2019). Brak konsensusu na temat związku między liczbą kopii genu *AMY1* i masą ciała (choć ze znaczną przewagą prac wykazujących tę asocjację) sugerować może różnice pomiędzy poszczególnymi populacjami ludzkimi. Należy wziąć też pod uwagę, że pacjenci z populacji, w której owa asocjacja nie była zaobserwowana, urodzili się ponad 50 lat temu na Wyspach Brytyjskich, a więc w pewnym stopniu była to populacja izolowana. Ponadto, wciąż nie został poznany dokładny mechanizm wiążący liczbę kopii genu *AMY1* z masą ciała, a więc może on być bardziej złożony i wieloczynnikowy, niż zakładały hipotezy dotychczasowych badań.

1.5 Warianty strukturalne w genomie psa domowego i innych gatunków

Paralogiem genu *AMY1* jest *AMY2B*, odpowiedzialny za kodowanie amylazy trzustkowej. U psa domowego jest to gen najlepiej opisany pod względem występowania zmienności liczby kopii. Zwiokrotnienie liczby kopii genu zostało opisane u kilkunastu ras,

mimo że dla niektórych z nich próba badawcza była niewielka. Sugeruje to, że zwielokrotnienie tego genu jest powszechne. Polimorfizm liczby kopii *AMY2B* jest wysoki, zarówno pomiędzy rasami jak i pomiędzy osobnikami. Rasy bardziej pierwotne, które podlegały mniejszej sztucznej selekcji, takie jak japońska Akita, mają średnio mniejszą liczbę kopii niż rasy współczesne, u których zwielokrotnienie liczby kopii może dochodzić nawet do trzydziestu (Tonoike i wsp., 2015; Arendt i wsp., 2016).

Badania wskazują, że tak duże zwielokrotnienie materiału genetycznego ma związek z domestykacją psa domowego i pojawieniu się w jego diecie skrobi (amylaza odpowiedzialna jest za rozkład skrobi). Udomowienie psa miało bardzo silny wpływ na jego przystosowanie do nowej diety, ze zwierzęcia mięsożernego stał się zwierzęciem wszystkożernym. (Axleson i wsp., 2013; Ollivier i wsp., 2016).

Co ciekawe, zwiększenie liczby kopii genów z rodziny *AMY*, powiązanych z trawieniem skrobi, zaobserwowano u różnych przedstawicieli rzędu *Carnivora*, mięsożerców, w których diecie obecne są elementy roślinne. Zwielokrotnienia takie obserwowano u niedźwiedzi brunatnych (*Ursus Arctos*), niedźwiedzi czarnych (*Ursus americanus*) (Pajic i wsp., 2019; Rinker i wsp., 2019) i borsuków azjatyckich (*Meles leucurus*) (Abduriyim i wsp., 2019), ponadto, wyniki badań sugerują, że zwiększenie liczby kopii w omawianych genach występowało na przestrzeni filogenezy kilkakrotnie i niezależnie w różnych taksonach, oraz że zwiększenie liczby kopii genów odpowiedzialnych za kodowanie amylazy trzustkowej jest pierwszym krokiem do rozwinięcia obecności amylazy ślinowej (Pajic i wsp., 2019).

Polimorfizm strukturalny inny genów psa jest słabiej zbadany, jednak istnieją dane świadczące o tym, że niektóre przypadki zmienności liczby kopii są rasowo specyficzne. Przykładowo, w doświadczeniu przeprowadzonym na psach rasy bullmastif, wykryto 82 CNV, w tym 50 było specyficznych dla tej rasy. Wykryte warianty występowały w genach, które związane są m.in. z funkcjami metabolicznymi, regulacją proliferacji komórek oraz chemicznymi powiązaniemmi pomiędzy siarką i żelazem. Relacja pomiędzy obecnością CNV i budową ciała zwierząt została wytłumaczona naturą opisywanej rasy: bullmastify to duże i silnie umięśnione psy, natomiast opisane polimorfizmy pozytywnie wpływały na ich wzrost i sylwetkę. Warto zauważyć, że część wykrytych w tej rasie CNV pokrywało się z wariantami opisanymi u bulldogów, a więc rasy blisko z bullmastifami spokrewnionej. Sugeruje to, że analiza zmienności liczby kopii może być sposobem na badanie pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi rasami psów (Mortlock i wsp., 2018).

Prawdopodobnie, rasowo specyficzny jest również wariant strukturalny wykryty w locus genu *KITLG* u rasy retriever z Nowej Szkocji (Nova Scotia Duck Tolling Retriever).

Wspomniany gen jest istotny dla melanogenezy, a obecność powiązanego z nim CNV wpływa na intensywność umaszczenia osobników. Z badań na człowieku i myszy wiadomo, że geny związane z kolorem skóry i umaszczeniem uwikłane są w szlaki metaboliczne powiązane z otyłością. Co ciekawe, wariant znajduje się nie w samym genie, a w jego regionie upstream. Oznacza to, że mutacja taka może wywołać istotny efekt fenotypowy nawet pomimo położenia poza sekwencją kodującą (Weich i wsp., 2020). Identyczne wnioski można wysnuć na podstawie badań związku zaburzeń rozwoju płci z CNV w *SOX9*. W tym przypadku również efekt fenotypowy występuje, mimo że wariant znajduje się w regionie upstream, kilkaset tysięcy par zasad od genu (Nowacka-Woszek i wsp., 2019).

W badaniu opartym na analizie genomów trzystu osobników reprezentujących sto ras zbudowano mapę CNV dla całego genomu psa. Zidentyfikowano dwa regiony w genach *MED13L* oraz *TBX3*, których zmienność strukturalna wpływa na rozmiar ciała u różnych ras. W badaniu tym wykryto również, że CNV może być powiązany z takimi zagadnieniami jak formowanie się chromatyny (poprzez wpływ na motyw czynnika wiążącego), polimorfizm pojedynczych nukleotydów (poprzez współwystępowanie z nimi) oraz ekspresja długiego niekodującego RNA (lncRNA) (Serres-Armero i wsp., 2021).

2. Hipoteza badawcza

Asocjacje, które otrzymano podczas badań nad związkiem między otyłością a polimorfizmami pojedynczego nukleotydu w genach kandydujących okazały się rzadkie. Jednocześnie mutacje większe (strukturalne), i z racji swojej wielkości z większym prawdopodobieństwem *a priori* zaburzające funkcję genów, mogą być relatywnie bardziej rozpowszechnione w populacji psa niż obserwowane jest to w populacjach człowieka, o czym mogą świadczyć wyniki otrzymane dla mutacji genu *POMC* psa. Sugeruje to, że uwarunkowanie genetyczne otyłości psa domowego może różnić się od uwarunkowania genetycznego otyłości człowieka i obejmować geny charakteryzujące się jednocześnie wysoką częstością i dużym wpływem na ryzyko rozwoju otyłości.

Hipoteza postawiona w tej pracy stanowi, że w genetycznej determinacji otyłości psa istotne mogą być powszechne warianty strukturalne, a w szczególności warianty ulokowane w obrębie lub w pobliżu genów białek.

Wariantom strukturalnym, mimo że są reprezentowane w genomie w znacznie mniejszym stopniu niż mutacje krótkie, można przypisać większe prawdopodobieństwo *a priori* zaburzenia funkcji genu. Dotyczy to przede wszystkim wariantów ulokowanych w obrębie lub w pobliżu genów białek. W ślad za tym idzie ich potencjalny większy wpływ na ryzyko rozwoju otyłości u pojedynczego psa. Jednocześnie, selekcja sztuczna i planowane kojarzenia stosowane w hodowli psów mogą prowadzić do rozprzestrzenienia szkodliwych mutacji i utrzymywania jej wysokiej częstości w populacji. Dla mutacji charakteryzującej się jednocześnie dużym wpływem i wysoką częstością, prawdopodobieństwo identyfikacji w badaniach asocjacyjnych jest relatywnie duże, a w badaniach małych populacji, jakie są dostępne w badaniach nad otyłością psa, warianty takie stanowią praktycznie jedyną identyfikowalną grupę. Postawiona hipoteza jest więc z pewnym prawdopodobieństwem weryfikowalna na podstawie badań asocjacyjnych w małej populacji, w tym znaczeniu, że identyfikacja asocjacji w badaniach populacyjnych stanowi argument na rzecz prawdziwości postawionej hipotezy.

Weryfikacja wyżej postawionej hipotezy jest ważna dla rozwoju wiedzy o genetycznej determinacji otyłości. W badaniach otyłości psa może stanowić wskazówkę, co do kierunku i sposobu poszukiwania genów uwikłanych w rozwój otyłości, i docelowo w budowaniu strategii jej zwalczania. Natomiast w kontekście otyłości człowieka buduje wiedzę o ograniczeniach w traktowaniu psa jako zwierzęcia modelowego. Postawiona hipoteza jest zbudowana na gruncie istniejącej wiedzy o polimorfizmie genomów ssaków i genetycznej determinacji rozwoju

otyłości. Biorąc pod uwagę znaczenie teoretyczne i praktyczne oraz zasadność i weryfikowalność postawionej hipotezy postanowiono ustalić cele badawcze na rzecz jej weryfikacji, w oparciu o populacyjne badania asocjacyjne, mimo istniejących ograniczeń w odniesieniu do liczebności próby.

3. Cele pracy

Cele pracy ustalono w taki sposób, by potencjalnie uzyskać dowody naukowe przemawiające za prawdziwością postawionej wyżej hipotezy, w oparciu o zgromadzone wcześniej dane fenotypowe i dostępny materiał biologiczny zebrany w populacji psów rasy labrador retriever oraz lisów i jenotów azjatyckich. Sformułowano następujące cele:

1. Analiza znanego polimorfizmu strukturalnego w genie *AMY2B* oraz ocena asocjacji z masą ciała i otyłością.
2. Analiza porównawcza wariantów strukturalnych w genie *AMY2B* u lisów (*Vulpes vulpes*, *Vulpes lagopus*) oraz jenotów azjatyckich (*Nyctereutes procyonoides*).
3. Identyfikacja potencjalnych wariantów strukturalnych na podstawie wyników sekwencjonowania całogenomowego w genomie psów rasy labrador retriever.
4. Walidacja wytypowanych wariantów strukturalnych za pomocą techniki emulsyjnego PCR.
5. Ocena związku wariantów strukturalnych ze wskaźnikiem kondycji oraz otyłością psów rasy labrador retriever.

4. Przebieg badań

Przedstawione cele pracy zostały zrealizowane w ramach trzech badań, których chronologiczna kolejność wykonywania odpowiada kolejności przygotowania artykułów naukowych.

I. (cel 1) Analiza zmienności liczby kopii genu *AMY2B* w populacji psów rasy labrador retriever. Raport z tego badania, pt. "No association between *AMY2B* gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs" został opublikowany w czasopiśmie *Animal Genetics*.

II. (cel 2) Analiza zmienności liczby kopii genu *AMY2B* w populacjach lisów rudych (*Vulpes vulpes*), lisów polarnych (*Vulpes lagopus*) oraz jenotów azjatyckich (*Nyctereutes procyonoides*). Raport z tego badania, pt. "*AMY2B* Gene Copy-Number Variation Studied by Droplet Digital PCR (ddPCR) in Three Canids: Red Fox, Arctic Fox, and Chinese Raccoon Dog" został opublikowany w czasopiśmie *Folia Biologica (Kraków)*.

III. (cele 3-5) Analiza zmienności liczby kopii genów wytypowanych na podstawie wyników sekwencjonowania całogenomowego. Przeanalizowano następujące geny: *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, *MME* oraz *VPS26C*. Raport z tego badania pt. "Uncovering Structural Variants Associated with Body Weight and Obesity Risk in Labrador Retrievers: A Genome-Wide Study" został zaakceptowany do publikacji w czasopiśmie *Frontiers in Genetics* (data akceptacji: 11.09.2023r).

5. Materiał i metody

5.1 Materiał badawczy

Materiał do badań I oraz III stanowiła krew pobrana od 109 osobników rasy labrador retriever. Materiał biologiczny został pobrany podczas rutynowych zabiegów weterynaryjnych, za zgodą właścicieli, w czterech klinikach weterynaryjnych, w okresie 2012 - 2017.

Dane zarejestrowane dla każdego osobnika to: płeć, wiek (w miesiącach), masa ciała (w kg), status kastracji oraz ocena kondycji ciała (BCS) wykonana przez lekarza weterynarii. BCS to wskaźnik opisujący kondycje zwierzęcia, ze szczególnym uwzględnieniem stopnia otyłości (McGreevy i wsp. 2005). Dla wskaźnika przyjęto skalę 5-stopniową. W skali tej, wartości "1" oraz "2" opisują psy niedożywione, "3" dotyczy osobników o prawidłowej masie ciała, "4" to zwierzęta z nadwagą, natomiast "5" to psy otyłe. W niniejszym badaniu, wszystkie osobniki należały do grup "3", "4", bądź "5". Podsumowanie grup badawczych zostało zamieszczone w Tabeli 1.

Na potrzeby badań I oraz III, populację podzielono na dwie grupy: psy nieotyle i psy otyłe, definiując w ten sposób cechę "otyłość" jako cechę binarną. W badaniu I grupę psów zdrowych stanowił psy z BCS 3, natomiast grupę otyłych stanowiły psy z BCS 4 oraz 5. W badaniu III grupa psów bez otyłości obejmowała wszystkie psy z oceną kondycji ciała (BCS) 3, a także psy o najniższej masie ciała w grupie BCS 4. I odwrotnie, grupa psów otyłych obejmowała wszystkie psy z BCS 5, wraz z psami o najwyższej masie ciała w grupie BCS 4.

Materiał w badaniu II stanowiły tkanki trzech gatunków psowatych: 60 osobników lisa srebrzystego; barwnej odmiany lisa rudego (*Vulpes vulpes*), 53 osobników lisa polarnego (*Vulpes lagopus*) oraz 39 osobników jenota azjatyckiego (*Nyctereutes procyonoides*). Zwierzęta były utrzymywane na fermie zwierząt futerkowych, a ich tkanki (mięśniowa w przypadku lisów rudych, krew w przypadku lisów polarnych oraz jenotów) zostały pobrane *postmortem*, za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej (nr opinii: 19/2003, data: 30.06.2003). Materiał został zebrany na rzecz realizacji wcześniejszych badań wykonywanych w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt.

5.2 Metody badawcze

5.2.1 Wybór genów do badań

Gen testowany w doświadczeniach I oraz II, *AMY2B*, został wybrany do badań *a priori*, na podstawie danych literaturowych. Geny wybrane do walidacji w pracy III, wytypowano na podstawie bioinformatycznej analizy wyników sekwencjonowania całogenomowego (WGS) i wstępnej oceny związku z otyłością psów w grupie 50 zsekwencjonowanych osobników. Wytypowano regiony chromosomowe zlokalizowane wewnątrz lub w pobliżu następujących genów: *ALPL*, *RECQL4*, *KCTD8*, *RBPI*, *RYR3*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *VPS26C*, *MME*, *XRNI* oraz *GTF2A16*.

Wyniki WGS (pliki BAM zawierające odczyty sekwencyjne zmapowane do genomu referencyjnego CanFam3.1) analizowane były przy pomocy metod bioinformatycznych w celu wykrycia potencjalnych wariantów strukturalnych. Zastosowano dwie metody: DELLY (Rausch i wsp. 2012) oraz TARDIS (Soylev i wsp. 2019). Algorytm DELLY umożliwia wykrycie duplikacji, delecji, inwersji oraz translokacji chromosomowych. Wykorzystuje on metodę rozdzielnych odczytów (ang. *split reads*). Algorytm TARDIS to nowsza metoda pozwalająca wykryć również bardziej skomplikowane mutacje, takie jak duplikacje tandemowe.

Zarówno DELLY jak TARDIS analizują każdy z genomów osobno. Z tego względu dokładna lokalizacja tego samego polimorfizmu strukturalnego może różnić się pomiędzy osobnikami. W celu zidentyfikowania regionów chromosomalnych potencjalnie związanych z otyłością, wykorzystano algorytm CoNVaQ (Larsen i wsp., 2018). Algorytm CoNVaQ inicjuje nowy region za każdym razem, gdy zaczyna się lub kończy wariant zidentyfikowany u któregoś z osobników. Narzędzie umożliwia porównanie dwóch grup osobników różniących się fenotypami szuka regionów genomowych w których występowanie SV jest istotnie różne między grupami. W niniejszej pracy porównano 28 psów otyłych oraz 22 psy zdrowe. Wstępnie, do dalszej analizy wytypowano regiony z nieskorygowaną p-wartością $<0,05$, znajdujące się w obrębie lub w bliskiej odległości (<10 kpz) od jednego lub większej liczby genów kodujących białka.

Wstępnie wytypowane regiony poddano dokładniejszej analizie statystycznej. W niniejszym badaniu nie zastosowano jednak testu statystycznego oferowanego przez CoNVaQ, gdyż test ten nie pozwala uwzględnić dodatkowych, pozagenetycznych czynników ryzyka. Z algorytmu CoNVaQ wykorzystano jedynie dane pośrednie. Dla danego regionu

chromosomowego CoNVaQ określa zwiększenie bądź utratę materiału genetycznego dla każdego osobnika. Dane te wykorzystano w modelu statystycznym weryfikującym asocjację każdego z regionów chromosomowych z fenotypem, przy czym w modelu statystycznym uwzględniono także znane czynniki ryzyka. Dane uzyskane za pomocą CoNVaQ zostały przeanalizowane z użyciem ogólnego modelu liniowego dla masy ciała i modelu regresji logistycznej dla otyłości. Modele obejmowały również wiek (jako zmienną towarzyszącą), płć, kastrację zwierząt oraz obecność bądź brak delekcji w genie *POMC*. W przypadku *POMC*, delekcja była zaobserwowana u dwóch psów. Dodatkowo, w modelach uwzględniono trzy pierwsze składowe główne, wyliczone na podstawie informacji molekularnej. Uwzględnienie składowych głównych jest procedurą stosowaną w celu uniknięcia wyników fałszywie pozytywnych powstających na skutek ukrytego uwarstwienia populacji.

W celu dalszego filtrowania regionów chromosomów opracowano listę genów związanych z BMI człowieka przyjmując, że mutacje wewnątrz lub w pobliżu ortologów tych genów w genomie psa mają większe prawdopodobieństwo wpływu na otyłość psa niż inne geny. W tym celu wykorzystano katalog GWAS (www.ebi.ac.uk/gwas, dostęp 5 lutego 2022 r.), w którym znajdują się SNP zgłoszone w badaniach GWAS i które wykazały istotny związek z BMI wraz z odpowiadającymi im zmapowanymi genami. Utworzono listę 1966 genów.

5.2.2 Projektowanie sond molekularnych

Startery oraz sondy molekularne dla wybranych fragmentów genów zostały zaprojektowane przy pomocy dedykowanego narzędzia na stronie internetowej firmy BioRad (<https://www.bio-rad.com/digital-assays>) bądź programu Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Sondy i startery zaprojektowano w oparciu o genom referencyjny psa domowego (CanFam3.1); wykorzystano również bazę danych Ensembl genome browser 109 (<https://www.ensembl.org>).

Zaprojektowane startery oraz fragmenty, które miały one obejmować, testowane były *in silico* na okoliczność występowania podobnych sekwencji w innych częściach genomu psa, co byłoby zjawiskiem niekorzystnym, prowadzącym do zniekształcenia wyników z powodu obecności nadmiarowych produktów reakcji PCR nie pochodzących z badanego fragmentu.

Do tego celu użyto narzędzi Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information, NCBI) oraz BLAT Search Genome (University of California, Santa Cruz).

W badaniu II, skupiającym się na innych przedstawicieli psowatych wykorzystane zostały sondy i startery przygotowane wcześniej na podstawie genomu referencyjnego psa domowego, co wynikało z braku genomu referencyjnego dla badanych gatunków oraz bliskiego pokrewieństwa z psem. W przypadku badań I i II, dla genu *AMY2B* użyto sond, których sekwencje przedstawiono w publikacji Axlessona i wsp. (2013).

Genem referencyjnym użytym w badaniach I oraz III był gen *C7orf28B* położony na chromosomie 6. w genomie psa, w przypadku badania II wykorzystano alternatywny gen referencyjny *HSD17B7* (lokalizacja w genomie psa: chromosom 38.), ponieważ *C7orf28B* nie dawał sygnału dla testowanych psowatych, zapewne z powodu różnic genetycznych. Szczegółowe informacje na temat zaprojektowanych starterów zamieszczono w tabelach 2., 3. i 4. W przypadku oligonukleotydów zaprojektowanych przy pomocy narzędzia firmy BioRad, nie podano sekwencji nukleotydowych starterów i sond, ponieważ wykorzystane narzędzie udostępnia jedynie sekwencje produktów, bez wyszczególnienia informacji na temat sekwencji poszczególnych starterów. Gotowe oligonukleotydy zostały dostarczone przez firmę BioRad bądź przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

5.2.3 Izolacja DNA

W przypadku psów rasy labrador retriever, lisów polarnych oraz jenotów azjatyckich, DNA z krwi mrożonej został wyizolowany przy pomocy zestawu MasterPure DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicenter). W przypadku lisów rudych, DNA z tkanki mięśniowej został wyizolowany przy pomocy zestawu Genomic Mini kit (A&A Biotechnology). Jakość wyizolowanego DNA testowana była przy pomocy metody fluorymetrycznej z użyciem urządzenia Qubit[®] 2.0 Fluorometr (Invitrogen by Life Technologies).

5.2.4 Reakcja emulsyjnego PCR

Emulsyjny PCR (ddPCR) przeprowadzany był zgodnie z zaleceniami dostawcy urządzeń i odczynników, firmy BioRad. Łańcuchowa reakcja polimerazy została przeprowadzona z użyciem odczynnika ddPCR Supermix for Probes (BioRad), wcześniej zaprojektowanych sond molekularnych oraz enzymu restrykcyjnego. Enzym restrykcyjny inkubowany był z mieszaniną reakcyjną dla pofragmentowania DNA i uzyskania jego lepszej separacji w kroplach. Dobór enzymu zależny był od testowanego fragmentu: produkty PCR testowane były *in silico* w programach RestrictionMapper (<https://restrictionmapper.org/>) oraz GenScript Restriction Enzyme Map Analysis Tools (<https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>) w celu uniknięcia użycia enzymu, który przecinał sekwencje w obszarze produktu. Enzymy wybrane dla poszczególnych fragmentów zostały przedstawione w tabelach 2. oraz 3.

Po inkubacji trwającej 20 minut, mieszanina reakcyjna łączona była z olejem przeznaczonym do reakcji ddPCR (Droplet Generation Oil for Probes, BioRad) w celu wytworzenia kropeł w urządzeniu do generowania kropeł (QX200™ Droplet Generator, BioRad). Po wygenerowaniu kropeł, mieszanina była umieszczana na płytce 96-dołkowej, która następnie została zabezpieczona folią zapobiegającą odparowaniu mieszaniny w trakcie reakcji. Folia ochronna została zgrzana z płytką przy pomocy urządzenia PX1™ PCR Plate Sealer (BioRad) w temperaturze 115°C. Gotowa płytka została umieszczona w termocyklerze (T100™ Thermal Cycler, BioRad). Łańcuchowa reakcja polimerazy przeprowadzana była zgodnie z zaleceniami producenta. Dla każdego z testowanych fragmentów, temperatura przyłączania starterów określana była przy pomocy przeprowadzonej wcześniej reakcji gradientu temperatur. Temperatury te podane zostały w tabelach 2. i 3. Po przeprowadzeniu PCR, płytka z produktami reakcji umieszczona została w urządzeniu QX200™ Droplet Reader (BioRad), które umożliwiło cyfrowy odczyt wyników. Zarówno odczyt wyników, jak ich późniejsza analiza przeprowadzone były przy pomocy oprogramowania QuantaSoft w wersji 1.7.4.0917 (BioRad).

5.2.5 Analiza statystyczna

W przypadku badania I zastosowano regresję logistyczną oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W badaniu II wykorzystano nieparametryczny test Kruskal-Wallisa oraz nieparametryczny test Dunn'a. W badaniu III, w celu określenia asocjacji pomiędzy wytypowanymi mutacjami strukturalnymi a cechami związanymi z otyłością, zastosowano ogólny model liniowy (Typ III SS) z masą ciała i modelem regresji logistycznej ze statusem otyłości jako zmienną zależną (zmienna binarna). Modele brały pod uwagę wiek (jako zmienną towarzyszącą), płeć, status kastracji, obecność delecji 14 pz w genie *POMC* i liczbę kopii oznaczoną przy pomocy metody ddPCR (jako zmienną towarzyszącą). Analizy zostały przeprowadzone przy pomocy oprogramowania statystycznego R w wersji 4.2.2.

6. Wyniki

6.1 Wyniki badania I

Za pomocą techniki ddPCR uzyskano liczbę kopii genu *AMY2B* dla 109 osobników rasy labrador retriever. Średnia liczba kopii w grupach była następująca: psy zdrowe = 12,64, psy z nadwagą = 13,31, psy otyłe = 13,01, natomiast dla całej stawki osobników średnia liczba kopii wyniosła 13,06. Dokładne wyniki zostały przedstawione w Tabeli 5.

Dane te zostały poddane analizie statystycznej w celu znalezienia związku z cechami otyłości. Związek pomiędzy BCS a liczbą kopii nie został wykazany, zarówno w przypadku regresji logistycznej (BCS=3 vs BCS=4 i BCS=5; P-wartość = 0,189) jak i w przypadku analizy wariancji pomiędzy wszystkimi grupami (test ANOVA, P-wartość = 0,215).

6.2 Wyniki badania II

Uzyskano liczbę kopii genu *AMY2B* dla 60 lisów rudych, 53 lisów polarnych i 39 jenotów azjatyckich. Średnia liczba kopii dla lisów rudych wyniosła 2,11, dla lisów polarnych wyniosła 2,47, natomiast dla jenotów azjatyckich wyniosła 2,06. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 6.

Dla wszystkich trzech gatunków potwierdzono istnienie duplikacji genu *AMY2B*, jednak powszechność mutacji była zróżnicowana między gatunkami. U lisów rudych, wykryto 5 osobników z duplikacją genu, co stanowiło 8,33% przebadanej grupy. W grupie jenotów duplikacja była rozpowszechniona w podobnym stopniu, zaobserwowano ją u 3 osobników, co stanowiło 7,5% stawki. Z drugiej strony, dwa z przebadanych jenotów wykazały jedynie jedną kopię genu. Lisy polarne były populacją, u której duplikacja była rozpowszechniona w największym stopniu, zaobserwowano ją u 17 osobników, co stanowiło 32,07% stawki.

W środowisku R zostały przeprowadzone testy statystyczne, które wykazały istotną różnicę w liczbie kopii pomiędzy grupami. W przypadku testu Kruskal-Wallisa, wykonanego pomiędzy wszystkimi trzema grupami, p-wartość wyniosła 2.076×10^{-8} . Test Dunn'a, zestawiający ze sobą pary grup również istotną statystycznie różnicę liczby kopii pomiędzy lisami polarnymi a pozostałymi grupami na poziomie p-wartość $< 0,05$.

6.3 Wyniki badania III

6.3.1 Wynik projektowania sond molekularnych

Podczas projektowania starterów okazało się niemożliwe zaprojektowanie sond dla czterech genów: *RECQL4*, *RBP1*, *XRNI* i *GTF2A16*. Przeszkodą było występowanie innych fragmentów genomu, które byłyby rozpoznawane i amplifikowane przez pary starterów, co, jak wspomniano w podrozdziale 4.2.2, doprowadziłoby do zniekształcenia wyników z powodu obecności nadmiarowych produktów reakcji PCR, nie pochodzących z badanego fragmentu. Zaprojektowano sondy dla 7 genów: *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, *VPS26C* oraz *MME*. Wyniki dla poszczególnych genów zostały poniżej przedstawione w kolejności ich występowania na genomie. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w Tabeli 7.

6.3.2 Gen *ALPL*

Jeden z wytypowanych regionów znajduje się na chromosomie 2., w regionie upstream pierwszego eksonu genu *ALPL*. Obecność wariantu strukturalnego w tym regionie została potwierdzona, a wykrytą mutacją była delecja. Średnia liczba kopii dla osobników zdrowych (1,8) była wyższa zarówno od średniej liczby kopii u psów z nadwagą (1,7) jak i psów otyłych (1,6). Wpływ mutacji okazał się istotny dla BCS i otyłości (zmienna binarna) (odpowiednio: p-wartość = 0,017 oraz p-wartość = 0,008)

6.3.3 Gen *KCTD8*

Kolejny testowany fragment znajduje się na chromosomie 13., w trzecim intronie genu *KCTD8*. W przypadku tego genu, potwierdzono obecność wariantu strukturalnego, którym była delecja. Delecja ta była znacznie bardziej rozpowszechniona u osobników zdrowych, gdzie średnia liczba kopii wyniosła 0,6, a z 32 przebadanych osobników tylko u dwóch nie wykryto mutacji. Wśród osobników z nadwagą (średnia liczba kopii = 0,9) oraz otyłych (średnia liczba kopii = 1,0) mutacja nie była aż tak powszechna, jednak obecna była u ponad połowy osobników. Analiza statystyczna ujawniła związek delecji z otyłością (p-wartość = 0,025).

6.3.4 Gen *MME*

Trzecim testowanym fragmentem był fragment w intronie 14. genu *MME*, znajdującego się na chromosomie 23. W przypadku tego amplifikonu, obecność mutacji strukturalnej nie została potwierdzona, a wszystkie przebadane osobniki miały 2 kopie testowanego fragmentu.

6.3.5 Gen *SGSM1*

W przeciwieństwie do opisanych wcześniej fragmentów, w przypadku amplifikonu znajdującego się w intronie pierwszym genu *SGSM1*, na chromosomie 26., wykryta została obecność zwielokrotnienia liczby kopii. Zwielokrotnienie to obecne było u wszystkich osobników, jednak jego nasilenie było zróżnicowane. Każdy osobnik posiadał co najmniej 3 kopie fragmentu, najczęściej występującą wartością były 4 kopie, jednak zdarzały się też pojedyncze osobniki z 5 bądź 6 kopiami. Średnia liczba kopii dla osobników zdrowych, z nadwagą oraz otyłych była podobna (odpowiednio: 4,1; 3,9; 3,9). Mimo niewielkich różnic pomiędzy grupami, wpływ na BCS i otyłość okazał się istotny statystycznie (p-wartość = 0,029 i 0,013, odpowiednio).

6.3.6 Gen *SLC12A6*

Wyniki ddPCR dla fragmentu pierwszego intronu genu *SLC12A6*, znajdującego się na chromosomie 30., wykazały zarówno obecność delecji jak i duplikacji, przy czym ta druga występowała w stopniu bardzo ograniczonym. Delecja z kolei rozpowszechniona była wśród wszystkich grup, jednak największe jej rozpowszechnienie obserwowano u psów z nadwagą (gdzie występowała u ponad połowy osobników) i psów otyłych (gdzie zaobserwowaną ją u ponad 2/3 osobników). Wyniki te przekładały się na średnie liczby kopii, które były mniejsze u psów z nadwagą i otyłych (odpowiednio 1,1 i 1,5) niż u psów zdrowych (1,6 kopii). Mutację tę powiązano statystycznie z BCS (p-wartość = 0,029) i otyłością (0,020).

6.3.7 Gen *RYR3*

W przypadku genu *RYR3*, położonego na chromosomie 30., testowany fragment genu położony był w 99., przedostatnim intronie. Potwierdzona została delekcja, szeroko rozpowszechniona wśród wszystkich badanych grup. Podobnie, jak w przypadku *SLC12A6*, wśród psów z nadwagą osobniki z potwierdzoną mutacją stanowiły ponad połowę stawki, natomiast wśród zwierząt otyłych, było to ponad 2/3 grupy. Wyraźna też była różnica w średniej liczbie kopii: podczas gdy u psów zdrowych wyniosła ona 1,6, u osobników otyłych było to odpowiednio 1,4 i 1,0. Wykazano powiązanie tej delekcji z BCS (p-wartość=0,017) i otyłością (p-wartość = 0,012). Warto zwrócić uwagę na podobny rozkład genotypów pomiędzy testowanymi fragmentami genów *RYR3* oraz *SLC12A6*. Przykładowo, gdy u danego osobnika w jednym z genów występowała delekcja w układzie heterozygotycznym, analogiczną delekcję w układzie heterozygotycznym obserwowano także w drugim genie. Podobna sytuacja występowała w przypadku osobników z delekcją homozygotyczną oraz osobników bez delekcji. Podobieństwo genotypów w dwóch loci obserwowano u 96% psów. Główną różnicą pomiędzy omawianymi wariantami strukturalnymi była obecność dwóch osobników z duplikacją w przypadku fragmentu genu *SLC12A6*. W przypadku *RYR3* duplikacji nie zaobserwowano.

6.3.8 Gen *VPS26C*

Ostatni badany techniką ddPCR fragment znajdował się na chromosomie 31., przed pierwszym eksonem genu *VPS26C*. W tym fragmencie wykryto delekcję, która była rozpowszechniona w różnym stopniu pomiędzy grupami (średnio 2,0 kopii u psów otyłych; 1,6 kopii u psów z nadwagą oraz 1,4 kopii u psów zdrowych). Delekcja ta była powiązana statystycznie z występowaniem otyłości (p-wartość = 0,019).

7. Dyskusja

7.1 Zmienność liczby kopii genu *AMY2B* w populacji psów rasy labrador retriever

Zwiększenie liczby kopii genu *AMY2B* jest najlepiej opisanym przypadkiem zmienności liczby kopii wśród psów domowych. Począwszy od pierwszej publikacji na ten temat, która ukazała się w roku 2013, wątek został poruszony w kilku artykułach na przestrzeni ostatnich lat. Choć badania liczby kopii zostały przeprowadzone wcześniej dla kilkunastu populacji psa, w tym dla psów rasy labrador retriever, opisane w niniejszej pracy doświadczenie charakteryzowała relatywnie duża grupa badawcza (n=109) psów należących do jednej rasy. Uzyskany zakres zmienności liczby kopii trudno jest jednoznacznie zestawić z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły z powodu niewielkiej stawki psów rasy labrador retriever w poszczególnych doświadczeniach, które skupiały się bardziej na zebraniu wyników od przedstawicieli kilku ras. W najwcześniejszym badaniu zmienności liczby kopii genu *AMY2B* uzyskano zakres od 12 do 17 kopii, przy przebadanych siedmiu osobnikach (Axelsson i wsp., 2013).

W jednym z kolejnych doświadczeń z kolei uzyskano zakres od 8 do 13 kopii przy dziesięciu przetestowanych zwierzętach (Arendt i wsp., 2016). W badaniu przeprowadzonym w Japonii, które skupiało się na porównaniu liczby kopii genu wśród osobników ras współczesnych i ras pierwotnych, u labradorów uzyskano zakres od 7 do 34 kopii przy piętnastu przebadanych osobnikach (Tonoike i wsp., 2015). Gdyby zestawić oba rezultaty uzyskane dla labradorów w Europie, otrzymany zakres 8 do 17, pokrywa się z zakresem uzyskanym w niniejszej pracy, który wyniósł 9 - 18 kopii. Duża różnica pomiędzy wynikami otrzymanymi w doświadczeniach przeprowadzonych w Europie i w Japonii, może sugerować znaczną zmienność międzypopulacyjną w liczbie kopii omawianego genu.

Praca Arendt i wsp. (2014) skupiała się również na wykryciu zależności pomiędzy występowaniem cukrzycy a liczbą kopii genu *AMY2B*, asocjacja taka nie została jednak udowodniona. Nadto, ta część doświadczenia nie dotyczyła psów rasy labrador retriever (Arendt i wsp., 2014). Jak wspomniano wcześniej, było to pierwsze badanie owego genu

przeprowadzone na tak dużej grupie psów jednej rasy. Wcześniejsze badania dotyczyły kilku, maksymalnie kilkunastu osobników z poszczególnych ras (Axelsson i wsp., 2013; Tonoike i wsp., 2015; Arendt i wsp., 2016). Wynika to z trudności w uzyskaniu materiału. Choć pies jest najbardziej rozpowszechnionym zwierzęciem towarzyszącym, uzyskanie materiału badawczego od dużej grupy zwierząt nie jest łatwe, co związane jest m.in. z niechęcią właścicieli psów rasowych do badań związanych z genetyką molekularną.

Choć uzyskanych wartości liczby kopii genu *AMY2B* nie udało się powiązać z występowaniem nadwagi i otyłości, wydaje się, że dalsze badania owego zagadnienia są zasadne. Badania przeprowadzone na dużych kohortach przedstawicieli innych ras (zwłaszcza ras znanych z predyspozycji do otyłości) mogłyby przynieść więcej informacji na temat związku genu amylazy z otyłością, jak również historii ewolucyjnej związanej z gwałtownym powieleniem owego genu.

7.2 Zmienność liczby kopii genu *AMY2B* w populacji lisów rudych, lisów polarnych oraz jenotów azjatyckich

Zainteresowanie potencjalnym istnieniem zmienności liczby kopii genu *AMY2B* w genomach lisa rudego, lisa polarnego oraz jenota azjatyckiego wynikało z chęci skonfrontowania istnienia potencjalnego wariantu strukturalnego z tym występującym u psa domowego. Jak wspomniano wcześniej, liczby kopii u przedstawicieli niektórych ras psa domowego mogą osiągać spektakularne wartości (Tonoike i wsp., 2015; Arendt i wsp., 2016), co stoi w kontraście do dzikich wilków szarych, u których liczba kopii (poza pojedynczymi przypadkami) nie przekracza dwóch (Freedman i wsp., 2014; Arendt i wsp., 2016).

Poza psem domowym i wilkiem szarym, analizą zmienności liczby kopii *AMY2B* poddanych zostało również kilku przedstawicieli gatunków bardzo blisko spokrewnionych, należących do tego samego rodzaju: kojotów (*Canis latrans*), szakali (*Canis aureus*) oraz dingo (*Canis dingo*); ostatni z wymienionych jest de facto zdziczałym psem domowym. Ponadto, badaniu na obecność CNV w omawianym genie poddano osobniki kilku różnych gatunków z rodziny łąsicowatych (*Mustelidae*) (Abduriyim i wsp., 2019) oraz trzech gatunków niedźwiedzi (rodzaj *Ursus*) (Pajic i wsp., 2019; Rinker i wsp., 2019).

Nie są to jednak zwierzęta bardzo blisko spokrewnione z psem i wilkiem. Zarówno łąsicowate jak i niedźwiedziowate wywodzą się z linii ewolucyjnej, która od psowatych oddzieliła się

prawdopodobnie około 45 mln lat temu (za Timetree of Life). Brak więc badań taksonów pośrednich, nie tak dalekich ewolucyjnie jak wspomniane wyżej łasicowate i niedźwiedzie, ale z kolei bardziej oddalonych, niż gatunki, które od psa i wilka dzieli zaledwie ok. 2,4 mln lat ewolucji (za Timetree of Life).

Linia ewolucyjna przedstawionych w niniejszej pracy dwóch gatunków lisa oraz jednego gatunku jenota oddzieliła się od linii, z której wyewoluował rodzaj *Canis* prawdopodobnie ok. 12,2 mln lat temu, co sprawiło, że wydały się dobrymi kandydatami dla analizy porównawczej.

Do zwiększenia liczby kopii genów z rodziny *AMY* doszło również w kilku liniach ewolucyjnych zwierząt poza rzędem *Carnivora*. Jedną z grup, u których obserwowano kilkukrotne powielenie genu są gryzonie, a zwłaszcza mysz domowa (*Mus musculus*) i szczur wędrowny (*Rattus norvegicus*). U tych gatunków obserwowano do 15 kopii genu.

Innym zwierzęciem, u którego obserwuje się powielenie genu z rodziny *AMY* jest świnia domowa (*Sus scrofa domestica*), u której obserwowano do 13 kopii. U dzika (*Sus scrofa*), dzikiego przodka świni domowej, liczba kopii jest nawet nieznacznie wyższa niż u świni (do 15 kopii), co pokazuje brak wpływu domestykacji na liczbę kopii genów amylazy. Nie jest to jednak zaskakujące, ponieważ dieta wszystkożernego dzika jest obfita w skrobię (Pajic i wsp., 2019).

Trzecim znaczącym taksonem, u którego obserwuje się zwiększenie liczby kopii genów związanych z amylazą są naczelnie. Wyniki dla tej grupy są interesujące z uwagi na fakt, że nasi najbliżsi krewni, wszystkożerne szympansy zwyczajne (*Pan troglodytes*) oraz niemal całkowicie roślinożerne goryle nizinne (*Gorilla gorilla*) nie wykazują aż tak wysokich wartości liczby kopii. Maksymalna obserwowana liczba kopii u tych gatunków to 6, podczas gdy u ludzi notowano czasem wartości przekraczające 20 kopii (tak wysokie wartości występowały u pojedynczych osób) (Hasegawa i wsp., 2022). Prawdopodobnie, różnica pomiędzy liczbą kopii u człowieka i innych naczelnych wynika z obecności w diecie *Homo sapiens* zbóż, które są znacznie bogatsze w skrobię, niż rośliny spożywane przez małpy człekokształtne. Liczba kopii obserwowana u innych naczelnych, takich jak orangutan sumatrzański (*Pongo abeli*) czy pawian oliwkowy (*Papio anubis*), jest podobna do wyników wymienionych wcześniej gatunków z rodziny *Hominidae* (Pajic i wsp., 2019).

Poza opisanym wcześniej psem domowym, liczba kopii genu *AMY2B* dla przebadanych przedstawicieli podrzędu psokształtnych oscyluje wokół dwóch. Taką wartość uzyskano dla niedźwiedzi polarnych (*Ursus maritimus*) (Pajic i wsp., 2019; Rinker i wsp., 2019)

oraz większości przeanalizowanych przedstawicieli rodziny łasicowatych (*Mustelidae*) (Abduriyim i wsp., 2019). Wynik taki uzyskano też dla innego przedstawiciela rzędu *Carnivora*, kota domowego (*Felis catus*) (Pajic i wsp., 2019). W przypadku wilka szarego, najbliższego krewnego badanych tutaj gatunków, najczęściej obserwowano dwie kopie genu *AMY2B*, a duplikacja występowała rzadko (Freedman i wsp., 2014; Arendt i wsp., 2016).

Wykryte w niniejszej pracy osobniki trzech badanych gatunków ze zwielokrotnieniem genu *AMY2B* nie stanowiły wysokiego odsetka populacji, jednak warianty strukturalne były obserwowane częściej niż u wilków. Uzyskane rezultaty zdają się plasować dwa gatunki lisów oraz jenota bliżej zwierząt takich jak niektóre łasicowate i niedźwiedzie. Wśród borsuków azjatyckich (*Meles leucurus*) obserwowano do czterech kopii genu (Abduriyim i wsp., 2019), natomiast u niedźwiedzi, odpowiednio, do pięciu kopii u brunatnego (*Ursus arctos*) i do czterech kopii u czarnego (*Ursus americanus*) (Pajic i wsp., 2018; Rinker i wsp., 2019). Zauważyć należy przy tym, że u przedstawicieli rodzaju *Ursus* zwielokrotnieniu uległ inny gen amylazy, *AMY1B*. U niedźwiedzi brunatnych liczba kopii *AMY1B* sięga ośmiu. Trzeba mieć też na uwadze, że badania niedźwiedzi przeprowadzone zostały na niewielkiej stawce zwierząt (Rinker i wsp., 2019).

Maksymalna liczba kopii *AMY2B* zaobserwowana w niniejszej pracy, dla lisów oraz jenota wyniosła trzy. U dwóch jenotów azjatyckich zaobserwowano obecność jednej kopii omawianego genu, co zostało potwierdzone poprzez powtórne analizy ddPCR dla tych osobników. Wyniki te nie są jednak niczym niezwykłym, ponieważ sporadycznie obecność jedynie jednej kopii *AMY2B* obserwowano też u innych zwierząt, takich jak wilki i psy (Freedman i wsp., 2014, Arendt i wsp., 2016), niedźwiedzie polarne (Rinker i wsp., 2019) czy kotowate: gepardy grzywiaste (*Acinonyx jubatus*) i u przedstawicieli rodzaju *Panthera* (Kim i wsp., 2016).

Warto pamiętać, że przebadane w tym doświadczeniu lisy oraz jenoty były zwierzętami nie dzikimi, lecz hodowlanymi. Jako że fakt występowania elementów roślinnych w diecie hodowlanych psowatych jest znany (Gugołek i wsp., 2014), należy założyć, że omawiane tutaj grupy badawcze były karmione w podobny sposób. Duplikacja genu *AMY2B* najbardziej rozpowszechniona była u lisów polarnych. Osobniki z omawianym wariantem stanowiły niemal 1/3 przebadanej stawki. Wynik ten pokrywa się z badaniami sugerującymi większą strawność skrobi u hodowlanych lisów polarnych w stosunku do osobników dzikich (Ahlström i wsp., 2003) i może sugerować, że w przypadku

przeanalizowania duplikacji genu dla dzikich lisów polarnych, rozpowszechnienie wariantu byłoby mniejsze.

Przedstawione tutaj wyniki badań pokazały, że do badań molekularnych na psowatych należących do rodzajów *Vulpes* oraz *Nyctereutes*, mogą potencjalnie być wykorzystane sondy zaprojektowane dla przedstawicieli rodzaju *Canis*.

W przypadku fragmentów genu badanego oraz genu referencyjnego uzyskana liczba kropeł podczas reakcji ddPCR była podobna do liczby kropeł uzyskiwanej dla psów domowych. Linia, z której wyewoluowały psy oraz gałąź, z której wyewoluowały lisy i jenoty, rozdzieliła się ok. 12,2 mln lat temu (za Timetree of Life), jednak mimo to podobieństwo genetyczne niektórych fragmentów genomu okazało się bardzo wysokie. Oczywiście, nie należy rezultatów tych ekstrapolować na wszystkie geny.

Choć otrzymane wyniki nie wykazały spektakularnego zwiększenia liczby kopii genu *AMY2B* u przebadanych przedstawicieli lisa rudego, lisa polarnego oraz jenota azjatyckiego, potwierdzono obecność duplikacji owego genu i skonfrontowano wyniki z rezultatami innych przedstawicieli *Caniformia*. Sugeruje się, że badania tego zagadnienia powinny być kontynuowane, ponieważ przedstawione tu wyniki i wnioski nie wyczerpują zagadnienia. Przetestowany został jeden z kilku genów należących do rodziny *AMY*, dalsze badania mogłyby potencjalnie wykazać obecność nasilonej duplikacji w spokrewnionych genach, co sugerować mogą np. wyniki otrzymane dla niedźwiedzia brunatnego, u którego większą liczbę kopii obserwowano w genie *AMY1B* (Rinker i wsp., 2019).

Nadto, doświadczenie zostało przeprowadzone na zwierzętach hodowlanych, które mogły być karmione pokarmem z elementami roślinnymi, co z kolei mogło wpłynąć na wynik badania (Gugolek i wsp., 2014). Badano jedynie przedstawicieli trzech grup zwierząt, podczas gdy w rodzaju *Vulpes* znajduje się kilka gatunków, natomiast sam gatunek *Vulpes vulpes* obejmuje kilkanaście podgatunków. Zarówno różne gatunki jak i różne podgatunki lisów zasiedlają zróżnicowane środowiska na całym globie, dlatego koncept analizy zmienności genu *AMY2B* pomiędzy różnymi populacjami wydaje się interesujący.

7.3 Analiza wariantów strukturalnych w genach wytypowanych na podstawie sekwencjonowania całogenomowego

Wykryta w genie *ALPL* delecja, okazała się statystycznie istotna: mutacja występowała częściej u psów otyłych niż u psów zdrowych (odpowiednio 38% i 19% badanych osobników). Większość zwierząt, u których ją wykryto była heterozygotami, a układ homozygotyczny obserwowano u dwóch osobników. Na podstawie wyników obserwowanych u ludzi można wysnuć hipotezę, że opisywana delecja może mieć wpływ nie tylko na masę ciała zwierząt, ale i na ich stan zdrowia. W przypadku ludzi, mutacje zawarte w *ALPL*, prowadzą do rozwoju hipofosfatazji, choroby powiązanej z metabolizmem witaminy B6 oraz mineralizacją kości. Niektóre formy tego schorzenia charakteryzują się wysoką śmiertelnością, również okołoporodową (Martos-Moren i wsp., 2018).

W pierwszym intronie genu *SGSM1* wykryto duplikację. Choć wariant ten obecny był u wszystkich osobników i występowała pewna różnorodność międzyosobnicza, jednak zasadniczo większość psów wykazywała liczbę kopii na poziomie czterech. Mimo niskiego polimorfizmu analiza statystyczna wykazała istotny związek pomiędzy omawianym wariantem strukturalnym a masą ciała. U ludzi (a więc prawdopodobnie i u psów) gen ten podlega wysokiej ekspresji w trzustce oraz w układzie pokarmowym (za The Human Protein Atlas), a mechanizm zwiększenia liczby kopii mógł być analogiczny do zwiększenia liczby kopii genu *AMY2B*. Mimo że w niniejszym doświadczeniu związek pomiędzy zmiennością liczby kopii genu amylazy a zwiększeniem masy ciała nie został potwierdzony, wcześniejsze prace wiążą zwielokrotnienie tego obszaru genomu z presją środowiskową powstałą podczas domestykacji psa (Axelsson i wsp. 2013; Freedman i wsp., 2014).

Brak jest doniesień łączących gen *SGSM1* z nadwagą bądź otyłością. Badania na ludziach wiążą ten gen z modulacją małego białka G (Yang i wsp. 2007), z chorobami takimi jak zanik mięśni (Peeters i wsp., 2014), nowotwory (Li i wsp., 2022), bądź zaburzenia pracy układu nerwowego (Kim i wsp., 2021). Dla psa domowego wcześniej nie przeprowadzono badań nad *SGSM1*. Podsumowując, dalsze badania nad niniejszym genem w kontekście otyłości psa domowego wydają się uzasadnione.

Delecja strukturalna wykryta w genie *RYS3* zdaje się być obiecującym wynikiem niniejszej pracy. Wyniki uzyskane w analizie statystycznej sugerują, że wykryta w genie mutacja może mieć istotny wpływ na nieprawidłowe zwiększenie masy ciała psów rasy

labrador retriever. Białko kodowane przez gen, receptor ryonadynowy jest ważne dla procesów komórkowych oraz skurczów mięśni szkieletowych (Schwartzmann i wsp., 2002).

Znaczenie mutacji w *RYR3* sugerowały wcześniejsze prace, zarówno dotyczące ludzi jak i psów. W przypadku ludzi, opisane zostało istnienie polimorfizmu typu SNP, którego obecność powiązano z cukrzycą (czyli schorzeniem silnie powiązanymi z otyłością), a poza tym z chorobą Alzheimera (Gong i wsp., 2018). Całogenomowe analizy sprzężeniowe (*ang.* Genome-wide linkage) wykazały również związek pomiędzy kilkoma SNP a funkcjonowaniem adiponektyny, a więc białkiem wydzielanym przez tkankę tłuszczową (Chang i wsp., 2016). Związek *RYR3* z pracą układu mięśniowego obserwowano w badaniu przeprowadzonym na psach myśliwskich, terierach oraz psach nierasowych. W pracy wykazano, że w omawianym genie występuje SNP, którego obecność korzystnie wpływa na rozwój mięśni psa (Kim i wsp., 2018). Warto też nadmienić, że w przypadku świni domowej (*Sus scrofa domesticus*) w genie paralogicznym, *RYR1* (również pełniącym funkcje związane z działaniem kanałów jonowych wapnia) występuje mutacja wpływająca na jakość mięsa oraz otłuszczenie (Sadkowski i wsp., 2015). Powyższe wyniki świadczą o tym, że dalsze badania nad genem *RYR3* w kontekście otyłości psa domowego wydają się zasadne.

Mutacje w genie *SLC12A6* u człowieka związane są ze schorzeniem znanym jako zespół Andermanna. Fenotypy obserwowane u pacjentów powiązane są z zaburzeniami ruchu, to m.in. agnezja ciała modzelowatego i neuropatia obwodowa. Nierzadko pojawia się również upośledzenie intelektualne. (Van Poucke i wsp., 2019; Bogdanova-Mihaylova i wsp., 2021). Istnieje doniesienie z badań skupiających się na analizie mutacji w genie *SLC12A6* psa domowego i porównaniu obserwowanych fenotypów z fenotypami występującymi u człowieka. U psa wymienionych wcześniej typowych objawów zespołu Andermanna nie obserwowano. Odnotowano za to niedowład kończyn tylnych, skurcze mięśni oraz postępującą ataksję rdzeniowo-mózdkową; żadna z powyższych dysfunkcji nie była obserwowana u ludzi. U *Canis lupus familiaris* mutacja związana była z wystąpieniem przedwczesnego kodonu stop i skróceniem kodowanego białka. (Van Poucke i wsp., 2019). Brak w przypadku tego gatunku badań związku genu z nadwagą i otyłością. W ramach badań nad otyłością człowieka analiza GWAS pozwoliła określić jeden z wykrytych SNP jako potencjalnie zasocjowany z BMI (Dong i wsp., 2018).

Co ciekawe, rozkład genotypów w loci *RYR3* i *SLC12A6* pokrywał się w 96 procentach. Biorąc pod uwagę relatywnie bliskie położenie obu genów na chromosomie (<0,5 kpz), prawdopodobnie warianty w tych genach kosegregują w haplotypach. Podobnie też jak w

przypadku genu *RYR3*, opisany w genie *SLC12A6* wariant strukturalny okazał się być ujemnie skorelowany z masą ciała.

Podsumowując, wykryty związek mutacji z masą ciała, w połączeniu z obserwowaną kosegregacją z genem *RYR3*, sugerują, że dalsze badania nad genem *SLC12A6* są zasadne.

Istnieją ograniczone informacje na temat związku genu *KCTD8* z otyłością, jednak opisano w tym genie SNP, który może mieć wpływ na rozwój cukrzycy typu 2. u człowieka (Musambil i Siddiqui, 2019). Inny SNP, wykryty w genie za pomocą analizy GWAS, może być potencjalnie powiązany ze wskaźnikiem BMI (Kichaev i wsp., 2018). Nadto, *KCTD8* pełni rolę w szlakach sygnałowych odczuwania smaków gorzkiego i słodkiego, a także podlega silnej ekspresji w mózgu i pewnej ekspresji w tkance tłuszczowej (za The Human Protein Atlas).

W przypadku niniejszej pracy, wykryta w genie *KCTD8* delecja, choć szeroko rozpowszechniona w przebadanej populacji, jest o wiele częstsza u osobników zdrowych niż chorych, co jest zjawiskiem nieoczekiwanym, gdyż zwykle obecność delecji w obszarach genów prowadzi do uzyskania szkodliwego fenotypu.

Warto zwrócić uwagę również na stopień rozpowszechnienia delecji wśród przebadanej populacji. Z 32 przebadanych zdrowych osobników, co najmniej jeden zmutowany allel zaobserwowano u 30 psów, co stanowi niemal 94% grupy. Również u psów z nadwagą oraz otyłych, mutacja była bardzo częsta (odpowiednio 73% i 65%). Uzyskany wynik sugeruje, że obecność delecji poprawia przystosowanie osobników do życia w środowisku człowieka i w jakimś stopniu chroni zwierzęta przed nieprawidłowym wzrostem masy ciała. Uzyskane rezultaty uzasadniają dalsze badania nad genem *KCTD8* w populacjach psa domowego.

Białko kodowane przez gen *VPS26C* związane jest z transportem endosomalnym (McNally i wsp., 2017). W przypadku człowieka, u dwóch spokrewnionych pacjentów (kuzynów) wykryto identyczną mutację nonsensowną w układzie homozygotycznym. Odpowiadała ona za nieprawidłowy rozwój neurologiczny, nieprawidłowości w budowie szkieletu, zaburzenia wzrostu oraz charakterystyczny fenotyp twarzy (Beetz i wsp., 2020). Starsze badania, które zidentyfikowały *VPS26C* w genomie człowieka, wiązały go z zespołem Downa, ponieważ znajduje się on w regionie krytycznym chromosomu dla tego zaburzenia (Down Syndrome Critical Region of Chromosome). Miało to odzwierciedlenie w pierwotnej nazwie genu: *DCRA* (*Down syndrome Critical Region gene A*) (Nakamura i wsp., 1997).

VPS26C podlega ekspresji w wielu tkankach i nie jest w żaden sposób tkankowo specyficzny dla narządów związanych z układem pokarmowym, mięśniowym czy tkanką tłuszczową. Wykryta w niniejszej pracy delecja była bardziej rozpowszechniona u psów zdrowych (rezultat podobny do wyników dla genu *KCTD8*) a regresja logistyczna wykazała powiązanie delecji z otyłością. Otrzymane wyniki, w powiązaniu z brakiem badań nad związkiem genu *VPS26C* z otluszczeniem oraz brakiem tkankowo specyficznej ekspresji, sugeruje, że dalsze badania *VPS26C* nie są obiecujące.

Badania przeprowadzone u człowieka nad mutacjami w genie *MME* sugerują, że gen ten jest związany z nieprawidłowym zwiększeniem masy ciała. *MME* powiązany został z występowaniem nadwagi w czasie ciąży (Weiß i wsp., 2020). Podlega on ponadto ekspresji w podocytach, wpływając potencjalnie na rozwój powikłań takich jak nefropatia cukrzycowa. (Cai i Jiang, 2020). W niniejszym badaniu obecność wykrytego *in silico* wariantu strukturalnego w intronie 14. nie została potwierdzona metodą molekularną.

Niska liczba doniesień na temat omawianych genów wynika z tego, że nie zostały one wytypowane *a priori* na podstawie literatury. Większość z omawianych genów nie było wcześniej analizowany u psów domowych, co pozwoliło na poznanie nieznanych wcześniej aspektów genetyki psa.

Większość wykrytych narzędziami bioinformatycznymi wariantów stanowiły delecje, co jest spowodowane specyfiką surowych danych, na których pracują wykorzystywane algorytmy. Odczyty sekwencyjne są krótkie, co znacznie utrudnia pracę algorytmów wykrywających mutacje inne niż SNP i krótkie indele. Z tego też względu dłuższe delecje są mutacjami wykrywanymi częściej niż duplikacje, ponieważ wykrycie braku fragmentu genomu (lub mniejsze pokrycie danego fragmentu w przypadku mutacji heterozygotycznej) jest dla oprogramowania łatwiejsze niż wykrycie nadmiaru informacji genetycznej. Jest to w dużej mierze związane jest z parametrem pokrycia danego obszaru genomu. Wysoki poziom pokrycia danego fragmentu może fałszywie zasugerować obecność duplikacji, z drugiej strony niejako "ukryć" delecję. Z drugiej strony, niski poziom pokrycia może sprawić, że w danym obszarze nie zostanie wykryta ewentualna duplikacja.

8. Podsumowanie

1. Zebrane dane nie wskazują na związek pomiędzy liczbą kopii genu *AMY2B* a masą ciała i otyłością psów rasy labrador retriever. Wynik ten nie wyklucza prawdziwości znanej tezy, że zwiększenie liczby kopii genu ma związek z domestykacją. Jednocześnie, jest zgodny z ogólną wiedzą, że otyłość jest przede wszystkim zaburzeniem uczucia głodu i sytości, a nie skuteczności trawienia.

2. Obserwowano zwielokrotnienie genu *AMY2B* w populacjach lisa rudego, lisa polarnego oraz jenota azjatyckiego, jednak średnia liczba kopii oraz poziom zmienności w populacjach były niskie. Jeżeli zwiększenie liczby kopii *AMY2B* jest odpowiedzią ewolucyjną na obecność skrobi w diecie, niską zmienność można tłumaczyć relatywnie krótką historią hodowli tych gatunków i niskim udziałem skrobi w diecie.

3. Za pomocą emulsyjnego PCR potwierdzono obecność wariantów strukturalnych w sześciu z siedmiu genów wytypowanych na podstawie pośrednich danych sekwencjonowania całogenomowego. Wynik ten potwierdza powszechną obecność wariantów strukturalnych w genomie psa oraz przydatność metody sekwencjonowania z użyciem krótkich odczytów do wstępnej identyfikacji wariantów strukturalnych.

4. Dla sześciu genów (*ALPL*, *SGSM1*, *RYR3*, *SLC12A6*, *KCTD8* oraz *VPS26C*) wykryto korelację pomiędzy obecnością wariantów strukturalnych a BCS i/lub otyłością w populacji psów rasy labrador retriever. Uzyskane dane sugerują, że powszechna otyłość psa, w przeciwieństwie do otyłości poligenicznej człowieka, może być uwarunkowana wariantami, które mają jednocześnie wysoką częstość i duży wpływ na ryzyko otyłości. Dane te stanowią argument na rzecz prawdziwości postawionej wcześniej hipotezy. Fakt, że zidentyfikowane tu geny leżą poza szlakami sygnałowymi, które są ważne dla otyłości człowieka, wskazuje, że źródła zmienności genetycznej dla otyłości człowieka i psa mogą być różne.

9. Literatura

1. Abduriyim S., Nishita Y., Abramov A.V., Solovyev V.A., Saveljev A.P., Kosintsev P.A., Kryukov A.P., Raichev E., Väinölä., Kaneko Y. & Masuda R. (2019) Variation in pancreatic amylase gene copy number among Eurasian badgers (Carnivora, Mustelidae, Meles) and its relationship to diet. *Journal of Zoology* 308, 28-36.
2. Ahlstrøm Ø., Fuglei E. & Mydland L. T. (2003) Comparative nutrient digestibility of arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard and farm-raised blue foxes (*Alopex lagopus*). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 134, 63-68.
3. Alberti, K., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith Jr., S.C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome. *Circulation* 120, 1640–1645.
4. Alberti, K., Zimmet, P., Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—A new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine* 23, 469–480.
5. Arendt M., Cairns K. M., Ballard J.W.O., Savolainen P. & Axelsson E. (2016) Diet adaptation in dog reflects spread of prehistoric agriculture. *Heredity (Edinb)* 117, 301–306.
6. Arendt M., Fall T., Lindblad-Toh K. & Axelsson E. (2014) Amylase activity is associated with AMY2B copy numbers in dog: implications for dog domestication, diet and diabetes. *Animal Genetics* 45, 716-22.
7. Axelsson E., Ratnakumar A., Arendt M., Maqbool K., Webster M. T., Perolski M., Liberg O., Arnemo J. M., Hedhammar A., Lidnblad-Tok K. (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495, 360-364.
8. Beetz C., Amaziane N., Kdissa M., Karageorgou V., Bauer P., Suleiman J., Sutton V. R. & El-Hattab A. W. (2020) VPS26C homozygous nonsense variant in two cousins with neurodevelopmental deficits, growth failure, skeletal abnormalities, and distinctive facial features. *Clinical Genetics* 97, 644-648.
9. Benzinou M., Creemers J. W. M., Choquet H., Lobbens S., Dina C., Durand E., Guerardel A., Boutin P., Jouret B., Heude B., Balkau B., Tichet J., Marre M., Potoczna N., Horber F., Le Stunff C., Czernichow S., Sandbaek A., Lauritzen T.,

- Borch-Johnsen K., Andersen G., Kiess W., Körner A., Kovacs P., Jacobson P., Carlsson L. M. S., Walley A. J., Jørgensen T., Hansen T., Pedersen O., Meyre D. & Froguel P. (2008) Common nonsynonymous variants in *PCSK1* confer risk of obesity. *Nature Genetics* 40, 943-945.
10. Bogdanova-Mihaylova P., McNamara P., Burton-Jones S. & Murphy S. M. (2021) Expanding the phenotype of SLC12A6-associated sensorimotor neuropathy 14, e244641.
 11. Botigué L. R., Song S., Scheu A., Gopalan S., Pendleton A. L., Oetjens M., Travella A. M., Seregély T., Zeeb-Lanz A., Arbogast R., Bobo D., Daly K., Unterländer M., Burger J., Kidd J. M. & Veeramaha K R. (2017) Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature communications* 18, 16082.
 12. Cai R. & Jian J. (2020) LncRNA ANRIL Silencing Alleviates High Glucose-Induced Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis via Upregulation of MME in Podocytes. *Inflammation* 43, 2147-55.
 13. Catchpole B., Kennedy L. J., Davison L. J. & W. E. R. Ollier (2008) Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *The Journal of small animal practice* 49, 4-10.
 14. Chang Y., Chiu Y., He Ch. Sheu W. H., Lin M., Seto T. B., Assimes T., Jou Y., Su L., Lee W., Lee P., Tsai S. & Chuang L. (2016) Genome-wide linkage analysis and regional fine mapping identified variants in the RYR3 gene as a novel quantitative trait locus for circulating adiponectin in Chinese population. *Medicine (Baltimore)* 95, e5174.
 15. Colliard L., Ancel J., Benet J., Paragon B. & Blancenterd G. (2006) Risk Factors for Obesity in Dogs in France. *The Journal of Nutrition*. 136, 1951S-1954S.
 16. Courcier E. A., Thomsom R. M., Mellor D. J. & Yam P. S. (2010) An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *Journal of Small Animal Practice* 51, 362-67.
 17. Dong J., Levine D. M., Buas M. F., Zhang R., Onstad L., Fitzgerald R. C., Corley D. A., Shaheen N. J., Lagergren J., Hardie L. J., Reid B. J., Iyer P. G., Risch H. A., Caldas C., Caldas I., Pharaoh P. D., Liu G., Gammon M. D., Chow W., Bernstein L., Bird N. C., Ye W., Wu A. H., Anderson L. A., MacGregor S., Whiteman D. C., Vaughan T. L. & Thrift A. P. (2018) Interactions Between Genetic Variants and Environmental Factors Affect Risk of Esophageal Adenocarcinoma and Barrett's Esophagu. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, 1598-1606.e4.

18. Freedman A. H., Gronau I., Schweizer R. M., Ortega-Del Vecchyo D., Han E., Silva P. M., Galaverni M., Fan Z., Marx P., Lorente-Galdos B., Beale H., Ramirez O., Hormozdiari F., Alkan C., Vilà C., Squire K., Geffen E., Kusak J., Boyko A. R., Parker H. G., Lee C., Tadigotla, Siepel A., Bustamante C. D., Harknis T. T., Nelson S. F., Ostrander E. A., Marques-Bonet T., Wayne R. K. & Novembre J. (2014) Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs 10, e1004016.
19. Galeta P., Lázničková-Galetová M., Sablin M. & Germonpré (2020) Morphological evidence for early dog domestication in the European Pleistocene: New evidence from a randomization approach to group differences. *The Anatomical Record* 304, 42-62.
20. Glessner J. T., Bradfield J. P., Wang K., Takahashi N., Zhang H., Sleiman P. M., Mentch F. D., Kim C. E., Hou C., Thomas K. A., Garris M. L., Deliard S., Freckelton E. C., Otieno F. G., Zhao J., Chiavacci R. M., Li M., Buxbaum J. D., Berkowitz R. I., Hakonarson H. & Grant S. F. A. (2010) A Genome-wide Study Reveals Copy Number Variants Exclus. *American Journal of Human Genetics* 87, 661-666.
21. Gong S., Bin Su B., Tovar H., Mao Ch. Gonzalez V., Liu Y., Lu Y., Wang K. & Xu Ch. (2018) Polymorphisms Within RYR3 Gene Are Associated With Risk and Age at Onset of Hypertension, Diabetes, and Alzheimer's Disease. *American Journal of Hypertension* 31, 818-826.
22. Gugolek A., Strychalski J., Konstantynowicz M. & Zwoliński C. (2014) Comparative analysis of nutrient digestibility and nitrogen retention in wild and farmed canids. *Annals of Animal Science* 14, 307–314.
23. Hasegawa T., Kakuta M., Yamaguchi R., Sato N., Mikami T., Murashita K., Nakaji S., Itoh K. & Imoto S. (2022) Impact of salivary and pancreatic amylase gene copy numbers on diabetes, obesity, and functional profiles of microbiome in Northern Japanese population. *Scientific Reports* 12, 7628.
24. Holmes K. L., Morris P. J., Abdulla Z., Hackett R. & Rawlings J. M. (2007). Risk factors associated with excess body weight in dogs in the UK. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*. 91, 166–67.
25. Janssens L. A. A., Boudadi-Maligne M., Lawler D. F., O'Keefe R. & van Dongen S. (2021) Morphology-based diagnostics of “protodogs.” A commentary to Galeta et al., 2021, *Anatomical Record*, 304, 42–62, doi: 10.1002/ar.24500. *The Anatomical Record* 304, 2673-2684.

26. Jarick I., Vogel C. I. G., Scherag S., Schäfer H., Hebebrand J., Hinney A. & Scherag A. (2011) Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Human Molecular Genetics* 20, 840-852.
27. Jeusette I. C., Lhoest E. T., Istasse L. P. & Diez M. O. (2005) Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *American journal of veterinary research* 66, 81-86.
28. Kichaev G., Bhatia G., Loh P. R., Gazal S., Burch K., Freund M. K., Schoech A., Pasaniuc B. & Price A. L. (2018) Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *American Journal of Human Genetics* 104, 65-75.
29. Kim J., Williams F. J., Dreger D. L., Plassais J., Davis B. W., Parker H. G. & Ostrander E. A. (2018) Genetic selection of athletic success in sport-hunting dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E7212-E7221.
30. Kim J., Lim H., Moon B., Ang M., Kim S., Moon Ch. Seong B., Jang Y., Kim H. & Kim Ch. (2021) Epigenetic mechanisms involved in the neuroprotective effect of scorpion extract in a Parkinson's disease murine model based on multi-omics approach. *Journal of Traditional Chinese medicine* 41, 390-396.
31. Kim S., Cho Y. S., K., Kim H., Chung O., Kim H., Jho S., Semoun H., Kim J., Bang W. Y., Kim C., An J., Bae C. H., Bhak Y., Jeon S., Yoon H., Kim Y., Jun J., Lee H., Chao S., Uphyrkina O., Kostyria A., Goodrich J., Miquelle D., Roelke M., Lewis J., Yurchenko A., Bankevich A., Cho J., Lee S., Edwards J. S., Weber J. A., Cook J., Kim S., Lee H., Manica A., Liee I., O'Briem S. J., Bhak J. & Yeo J. (2016) Comparison of carnivore, omnivore, and herbivore mammalian genomes with a new leopard assembly. *Genome Biology* 17, 211.
32. Larsen S. J., do Canto L. M., Rogatto S.R. & Baumbach J. (2018) CoNVaQ: a web tool for copy number variation-based association studies". *BMC Genomics* 19, 369.
33. León-Mimila P., Villamil-Ramírez H., López-Contreras B., Morán-Ramos S., Macias-Kauffer L. R., Acuña-Alonzo V., Del Río-Navarro B. E., Salmerón J., Velazquez-Cruz R., Villarreal-Molina T., Aquilar-Salinas C. A. & Canizales-Quinteros S. (2018) Low Salivary Amylase Gene (AMY1) Copy Number Is Associated with Obesity and Gut Prevotella Abundance in Mexican Children and Adults. *Nutrients* 10, 1607.

34. Li J., Wang J., Ding Y., Zhao J. & Wang W. (2022) Prognostic biomarker SGSM1 and its correlation with immune infiltration in gliomas. *BMC Cancer* 28, 466.
35. Liu Y., Smith C. E., Parnell L. D., Lee Y., An P., Straka R. J., Tiwari H. K., Wood A. C., Kakagambe E. K., Hidalgo B., Hpokins P. N., Province M. A., Arnett D. K., Tucker K. L., Ordovas J. M. & Lai Ch. (2020) Salivary AMY1 Copy Number Variation Modifies Age-Related Type 2 Diabetes Risk. *Clinical Chemistry* 66, 718-726.
36. Lund E. M., Armstrong P. J., Kirk C. A. & Klausner J. S. (2006) Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 4, 177–186.
37. Mankowska M., Krzeminska P., Graczyk M. & Switonski M. (2017) Confirmation that a deletion in the POMC gene is associated with body weight of Labrador Retriever dogs. *Research in Veterinary Science* 112, 116-118.
38. Mankowska M., Stachowiak M., Graczyk A., Ciazynska P., Gogulski M. Nizanski W. & Switonski M. (2016) Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. *Animal Genetics* 47, 245-249.
39. Mao J., Xia Z., Chen J. & Yu J. (2013) Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. *Preventive Veterinary Medicine* 112, 438-42.
40. Martos-Moren G. A., Calzada J., Couce M. L. & Argente J. (2018) Hypophosphatasia: Clinical manifestations, diagnostic recommendations and therapeutic options. *Anales de pediatria* 88, 356.e1-356.e11.
41. McGreevy P. D., Thomson P. C., Pride C., Fawcett A., Grassi T. & Jones B. (2005) Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *The Veterinary Record* 156, 695-702.
42. McNally K. E., Faulkner R, Steinberg F., Gallon M., Ghai R., Pim D., Langton P., Pearson N., Danson C. M., Nägele H., Morris L. L., Singla A., Overlee B. L., Heesom K. J., Sessions R., Banks L., Collins B. M., Berger I., Billadeau D., Burstein E. & Cullen P. (2017) Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nature Cell Biology* 19, 1214-1225.
43. Mejía-Benítez M. A., Bonnefond A., Yengo L., Huyvaert M., Dechaume A., Peralta-Romero J., Klünder-Klünder M., Mena J. G., El-Sayed Moustafa J. S., Falchi M., Cruz

- M. & Froguel P. (2015) Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia* 58, 290-294.
44. Miyabe M., Gin A., Onozawa E., Daimon M., Yamada H., Yamada H., Oda H., Mori A., Momota Y., Azakami D., Yamamoto I., Mochizuki M., Sako T., Tamura K. & Ishioka K. (2015) Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77, 1201-1206.
45. Mortlock S. A., Williamson P. & Khatkar M. S. (2018) Copy number variation and variant discovery in Bullmastiff dogs. *Animal Genetics* 50, 177-181.
46. Musambil M. & Siddiqui (2019) Genetics and genomics studies in type 2 diabetes: A brief review of the current scenario in the Arab region. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 13, 1629-32.
47. Nakamura A., Hattori M., Sakaki Y. (1997) Isolation of a Novel Human Gene from the Down Syndrome Critical Region of Chromosome 21q22.2. *The Journal of Biochemistry* 122, 872-877.
48. Nowacka-Woszek J., Szczerbal I., Stachowiak M., Szydlowski M., Nizanski W., Dzimira S., Maslak A., Payan-Carreira R., Wydooghe E., Nowak T. & Switonski M. (2019) Association between polymorphisms in the SOX9 region and canine disorder of sex development (78,XX; SRY-negative) revisited in a multibreed case-control study. *PLOS One* 14, e0218565.
49. Ollivier M., Tresset A., Bastian F., Lagoutte L., Axelsson E., Ardent M., Bălăşescu A., Marshour M., Sablin M. V., Salanova L., Vigne J., Hitte Ch. & Hänni C. (2016) Amy2B copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *Royal Society Open Science* 11, 160449.
50. Pajic P., Pavlidis P., Dean K., Neznanova L., Romano R., Garneau D., Daugherty E., Globig A., Ruhl S. & Gokcumen O. (2019) Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals. *eLife* 44628.
51. Parks B. W., Nam E., Org E., Kostem E., Norheim F., Hui S. T., Pan C., Civelek M., Rau C. D., Bennett B. J., Mehrabian M., Ursell L. K., He A., Castellani L. W., Zinker B., Kirby M., Drake T. A., Drevon C. A., Knight R., Gargalovic P., Kirchgasser T., Eskin E. & Lusk J. A. (2013) Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell metabolism* 8, 141-152.

52. Peeters K., Chamova T. & Jordanova A. (2014) Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain* 137, 2879-2896.
53. Raffan E., Dennis R. J., O'Donovan C. J., Becker J. M., Scott R. A., Smith S. P., Withers D. J., Wood C. J., Conci E., Clements D. N., Summers K. M., German A. J., Mellersh C. S., Arendt M. L., Iyemere V. P., Withers E., Söder J., Wernersson S., Andersson G., Lindblad-Toh K., Yeo G. S. H. & O'Rahully S. (2016) A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. *Cell Metabolism* 23, 893-900.
54. Rausch T., Zichner T., Schlattl A., Stutz A. M., Benes V. & Korbel J. O. (2012) DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* 28, i333–9.
55. Rinker D., Specian N. K., Zhao S. & Gibbons J. G. (2019). Polar bear evolution is marked by rapid changes in gene copy number in response to dietary shift *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, 13446-13451.
56. Runge J. J., Kely S. P., Gregor T. P., Kotwal S. & Smith G. K. (2010) Distraction index as a risk factor for osteoarthritis associated with hip dysplasia in four large dog breeds. *Journal of Small Animal Practice* 51, 264-269.
57. Sadkowski S., Molińska-Glura M., Moliński K., Szczepankiewicz D., Świtoński M. & Szydłowski M. (2015) A well-known mutation in RYR1 alters distribution of adipose tissue in gilts. *Animal Science Papers and Reports* 33, 147-154.
58. Schwarzmann N., Kunerth S., Weber K., Mayr G. W. & Guse A. H. (2002) Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca²⁺ signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *The Journal of biological chemistry* 27, 50636-50642.
59. Serres-Armero A., Davis B. W., Povolotskaya I. S., Morcillo-Suarez C., Plassais J., Juan D., Ostrander E. A. & Marques-Bonet T. (2021) Copy number variation underlies complex phenotypes in domestic dog breeds and other canids. *Genome Research* 31, 762-774.
60. Shebantis K., Andersson-Assarsson J. C., Larsson I., Carlsson L. M. S., Feuk L. & Larhammar D. (2018) Copy number of pancreatic polypeptide receptor gene NPY4R correlates with body mass index and waist circumference. *PLoS One* 13, e0194668.

61. Shwan N. A. A. & Armour J. A. L. (2019) No Evidence for Association of BMI with Salivary Amylase Gene Copy Number in the UK 1958 Birth Cohort. *Obesity (Silver Spring)* 27, 1533-1538.
62. Soylev A., Le T., Amini H., Alkan C., & Hormozdiari F. (2019) Discovery of tandem and interspersed segmental duplications using high throughput sequencing. *Bioinformatics* 35, 3923–3930.
63. Switonski M. & Mankowska M. (2013) Dog obesity – The need for identifying predisposing genetic markers. *Research in Veterinary Science* 95, 831-36.
64. Tonoike A., Hori Y., Inoue-Murayama M., Konno A., Fujita K., Miyado M., Fukami M., Nagasawa M., Mogi K. & Kikusui T. (2015) Copy number variations in the amylase gene (AMY2B) in Japanese native dog breeds. *Animal Genetics* 46, 580-583.
65. Tvarijonaviciute A., Ceron J. J., Holden S. H., Cuthbertson D. J., Biourge V., Morris P. J. & German A. J (2012) Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. *BMC veterinary research* 28, 147.
66. Usui S., Yasuda H. & Koketsu Y. (2016) Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinic. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 338-343.
67. Van Poucke M., Stee K., Sonck L., Stock E., Bosseler L., Van Dorpe J., Van Nieuwerburg F., Deforce D., Peelman L. J., Van Ham L., Bhatti S. F. M. & Broeckx B. J. G. (2019) Truncating SLC12A6 variants cause different clinical phenotypes in humans and dogs. *European Journal of Human Genetics* 27, 1561-1568.
68. Van Steenbeek F. G., Hytönen M. K., Leegwater P. A. J. & Lohi H. (2016) The canine era: the rise of a biomedical model. *Animal Genetics* 47, 519-527.
69. Verkest K. R. (2014) Is the metabolic syndrome a useful clinical concept in dogs? A review of the evidence. *The Veterinary Journal* 199, 24-30.
70. Weich K., Affolter V., York D., Rebhun R., Grahn R., Kallenberg A. & Bannasch D. (2020) Pigment Intensity in Dogs is Associated with a Copy Number Variant Upstream of KITLG. *Genes (Basel)* 11, 75.
71. Weiß E., Berger H. M., Brandl W. T., Strutz J., Hirschmugl B., Simovic V., Tam-Amersdorfer C., Cvitic S. & Hiden U. (2020) Maternal Overweight Downregulates MME (Nepriylisin) in Feto-Placental Endothelial Cells and in Cord Blood. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 834.

72. Yang H., Sasaki T., Minoshima S. & Shimizu N. (2014) Identification of three novel proteins (SGSM1, 2, 3) which modulate small G protein (RAP and RAB)-mediated signaling pathway. *Genomics* 90, 249-260.
73. Zeng R., Zhang Y. & Du P. (2014) SNPs of melanocortin 4 receptor (MC4R) associated with body weight in Beagle dogs. *Experimental Animals* 63, 73-78.
74. Zhan F., Chen J., Yan H., Wang S., Zhao M., Zhang S., Lan X. & Maekawa M. (2021) Association of Serum Amylase Activity and the Copy Number Variation of AMY1/2A/2B with Metabolic Syndrome in Chinese Adults. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 14, 4705-4714.

10. Tabele

Tabela 1. Struktura próby psów rasy labrador retriever wykorzystanych w badaniach I i III. N = 109 osobników; BCS=3 to zdrowa grupa kontrolna, BCS=4 to psy z nadwagą a BCS=5 to psy otyłe.

BCS	Liczba osobników	Liczba samców	Liczba samic	Liczba osobników wykastrowanych	Średnia masa ciała (kg)	Średni wiek (w miesiącach)
3	32	13	19	9	32	45
4	50	21	29	7	37	57
5	27	10	17	7	41	72

Tabela 2. Informacje o starterach i sondach zaprojektowanych za pomocą narzędzia Primer3Plus.

Gen z badanym fragmentem	Sekwencje starterów i sond	Temperatura przyłączenia starterów	Długość amplifikonu	Enzym restrykcyjny
<i>AMY2B</i>	Starter F: 5' CCAAACCTGGACGGACATCT 3' Starter R: 5' TATCGTTCGCATTCAAGAGC 3' Sonda: 5' FAM-TTTGAGTGGCGCTGGG-BHQ-1	58 °C	76 pz	<i>HaeIII</i>
<i>SGSM1</i>	Starter F: 5' GAATGAAGTGGGTGGTAGGG 3' Starter R: 5' TTCTGCTACGCCAGTCTGAG 3' Sonda: 5' FAM-CATGCTGTGGGGATTATGTG-BHQ1 3'	58 °C	93 pz	<i>EcoRI</i>
<i>KCTD8</i>	Starter F: 5' AGTGGATGGACGGATGAGTT 3' Starter R: 5' ACCATCTCGGATGCTCCTAA 3' Sonda: 5' FAM-TGGAATATAGGCAGTCGTTAAAA-BHQ1 3'	58 °C	84 pz	<i>HaeIII</i>
<i>ALPL</i>	Starter F: 5' GGATCCTAGCTGCAGGTAACAGA 3' Starter R: 5' AGAACAAAACCTCTTTTAGTAAATTCC 3' Sonda: 5' FAM-CCACTCCTGCTGTACTAACAGG-BHQ1 3'	58 °C	80 pz	<i>HaeIII</i>
<i>VPS26C</i>	Starter F: 5' TTCTAACTGGAGATTGACTGATGG 3' Starter R: 5' TGAGTTTTCTCCCTTCGTGT 3' Sonda: 5' FAM-CACAAAGGAAAACAAATAATAAATTCA-BHQ1 3'	58 °C	100 pz	<i>HaeIII</i>

Tabela 3. Szczegółowe informacje dla starterów i sond zaprojektowanych za pomocą narzędzia BioRad (<https://www.bio-rad.com/digital-assays/>). Zawarte w kolumnie drugiej identyfikatory poszczególnych sond umożliwiają ich odnalezienie na stronie producenta.

Gen z badanym fragmentem	Assay ID (Bio-rad.com)	Temperatura przyłączenia starterów	Wielkość amplifikonu	Użyty enzym restrykcyjny
<i>RYR3</i>	dCNS468946122	56 °C	93 pz	<i>HaeIII</i>
<i>SLC12A6</i>	dCNS597396935	56 °C	75 pz	<i>HaeIII</i>
<i>MME</i>	dCNS546850895	56 °C	80 pz	<i>HaeIII</i>

Tabela 4. Szczegółowe informacja dla starterów i sond genów referencyjnych

Gen referencyjny	Sekwencje starterów i sond	Długość amplifikonu
<i>C7orf28B</i>	Starter F: 5' TTGTGCAGGATCAGAGCATC 3' Starter R: 5' CAACACAGGTTGACCAAGGA 3' Sonda: 5' HEX-TGCCATTTGTGTGCATCCCC-BQH1	91 pz
<i>HSD17B7</i>	Starter F: 5' ATGTCCACACA ACTAGCCATAC 3' Starter R: 5' GTGTCTCGGTAGCGCATTT 3' Sonda: 5' Hex-CACGCCCAGTCCTAGTCATGCTT-BHQ-1	98 pz

Tabela 5. Zmienności liczby kopii genu *AMY2B* u psów rasy labrador retriever. W pierwszej kolumnie przedstawione zostały poszczególne grupy na podstawie wskaźnika BCS. W drugiej grupie umieszczone liczbę osobników przyporządkowanych do poszczególnych grup. W kolumnie trzeciej znajdują się wartości średniej liczby kopii genu *AMY2B* poszczególnych, natomiast w czwartek kolumnie wartości mediany dla poszczególnych grup. W kolumnie piątej zamieszczono zakresy liczby kopii genu *AMY2B* dla poszczególnych grup badawczych. W ostatnim wierszu przedstawiono wartości dla całej kohorty przebadanych zwierząt.

Grupa	Liczba osobników	Średnia liczba kopii	Mediana	Zakres
BCS = 3	n = 32	12,64	12,65	9 - 16
BCS = 4	n = 50	13,31	13,2	9 - 18
BCS = 5	n = 27	13,01	13,1	10 - 15
Cała stawka	n = 109	13,06	13	9 - 18

Tabela 6. Wyniki analizy zmienności liczby kopii genu *AMY2B* dla lisa rudego, lisa polarnego oraz jenota azjatyckiego. W pierwszej kolumnie przedstawiono poszczególne grupy zwierząt. W drugiej kolumnie zamieszczono liczbę osobników w każdej grupie. W trzeciej kolumnie znajduje się średnia liczba kopii *AMY2B* dla każdej przeanalizowanej grupy, natomiast w kolumnie czwartej wartość mediany dla każdej z grup. W kolumnie piątej zamieszczono zakres liczby kopii genu *AMY2B* dla każdej z grup.

Grupa	Liczba osobników	Średnia liczba kopii	Mediana	Zakres
Lis rudy	n = 60	2,11	2,085	2 - 3
Lis polarny	n = 53	2,47	2,38	2 - 3
Jenot azjatycki	n = 39	2,06	2,11	1 - 3

Tabela 7. Wyniki zmienności liczby kopii genów testowanych w badaniu III.

Lokalizacja ¹	Zakres wyników ddPCR ²	Asocjacje	
		Masa ciała (kg) ³ (na kopię ± SE)	Otyłość ⁴ (Iloraz szans)
<i>ALPL</i> <i>delecja</i> 2:77.622.662–77.622.741	0 – 2,5	-2,88±1,17 P = 0,017	OR=0,18 95%CI: 0,04-0,58 P = 0,008
<i>KCTD8</i> <i>delecja</i> 13:40.904.429–40.904.512	0 – 2,1	1,55±0,83 P = 0,065	OR=2,36 95%CI: 1,14-5,23 P = 0,025
<i>SGSM1</i> <i>duplikacja</i> 26:18.996.505–18.996.597	2,8 – 5,8	-2,68±1,20 P = 0,029	OR=0,16 95%CI: 0,03-0,58 P = 0,013
<i>SLC12A6</i> <i>delecja/duplikacja</i> 30:774.403–774.537	0 – 3,3	-1,4±0,82 P = 0,029	OR=0,41 95%CI: 0,18-0,84 P = 0,020
<i>RYR3</i> <i>delecja</i> 30:1.182.396–1.182.519	0 – 2,1	-2,17±0,88 P = 0,017	OR=0,34 95%CI: 0,14-0,76 P = 0,012
<i>VPS26C</i> <i>delecja</i> 31:32.435.989–32.436.088	0 – 2,2	1,64±0,87 P = 0,065	OR=2,57 95%CI: 1,20-5,87 P = 0,019

¹Fragment zamplifikowany reakcją ddPCR (CanFam 3.1.) Prawdziwa lokalizacja polimorfizmów na chromosomach nie są znane, jednak obejmują zamplifikowane fragmenty; ²Wartości uzyskane w reakcji ddPCR są liczbami rzeczywistymi i przybliżają liczbę kopii danego wariantu genomu; ³Szacowany efekt w kg na kopię i odpowiadający mu błąd standardowy oszacowany w ogólnym modelu liniowym; ⁴Iloraz szans (OR) i odpowiadający mu 95% przedział ufności (95% CI) oszacowany w regresji logistycznej dla cechy binarnej. Iloraz szans = 1 wskazuje na brak różnic między grupami.

11. Kopie artykułów naukowych



No association between *AMY2B* gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs

Michał Antkowiak, Izabela Szczerbal, Joanna Nowacka-Woszek, Marek Switonski  and Maciej Szydlowski 

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637, Poznań, Poland

Accepted for publication 23 May 2019

Obesity in dogs (*Canis lupus familiaris*) is an important health issue. It is related to several other diseases such as hepatic lipidosis, diabetes mellitus and osteoarthritis disease, and it is highly prevalent in certain breeds, including Labrador retrievers.¹ Copy number variation (CNV) in *AMY1*, which encodes salivary α -amylase, has been observed across human populations with high and low carbohydrate diets.² In addition, an association between increased copy number and reduced risk of obesity has been reported.³ Previous studies have shown a variable copy number of *AMY2B*, encoding pancreatic α -amylase, in different dog breeds.⁴⁻⁶ A high copy number in this gene has been proposed to be a long-term response to a diet rich in starch.⁷ This suggests a possible association of copy number of canine *AMY2B* with obesity. We aimed to examine the association between canine *AMY2B* copy number and obesity, as measured by the five-point body condition score (BCS) and body weight.

Blood samples were collected from 109 Labrador retriever dogs according to standard Polish veterinary protocols in veterinary clinics during routine visits with the consent of the owners and with the approval of the local Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznań, Poland (31/2013). The sample set consisted of 32 healthy

dogs (BCS = 3; 13 males, nine of both sexes neutered and 23 normal; average age 45 months; average body weight 32 kg), 50 overweight dogs (BCS = 4; 21 males, seven neutered and 43 normal; 57 months; 37 kg) and 27 obese dogs (BCS = 5; 10 males, seven neutered and 20 normal; 72 months; 41 kg). DNA was isolated from frozen blood using a MasterPure DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicenter). The copy number of *AMY2B* was determined using droplet digital PCR (ddPCR). The PCR reaction was prepared using ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad), and HaeIII was used to improve DNA distribution across droplets. The primers were: F: 5'-CCAAACCTGGACGGACATCT and R: 5'-TATCGTTTCGCATTCAAGAGCAA. A TaqMan probe was used (5'-6-Fam-TTTGAGTGGCGCTGGG-BHQ-1). The *ORF* gene was used as a reference (F: 5'-TTGTGCAGGATCAGAGCATC; R: 5'-CAACA CAGGTTGACCAAGGA; probe: 5'-HEX-TGCCATTTGTGTGCATCCCC-BHQ1). The ddPCR was run under the conditions recommended by the manufacturer at an annealing temperature of 58 °C. Droplets were analyzed using a QX200 droplet reader (Bio-Rad) and QUANTASOFT (v. 1.7.4.0917).

In agreement with a previous study,⁴ we found an average *AMY2B* diploid copy number of 13.06 (SD = 1.72) and a range from nine to 18. We found no association of obesity with the *AMY2B* copy number (logistic regression BCS 3 vs. 4+5; $P < 0.189$) and no statistically significant differences in the number of copies across BCS groups (ANOVA, $P < 0.215$; Fig. 1a). Similarly, we observed no correlation between *AMY2B* copy number and body weight (Fig. 1b). Our results agree with a limited case-control study that showed no evidence of association between canine *AMY2B* and developing diabetes mellitus.⁴ We conclude that variation in *AMY2B* copy number is not associated with an increased risk of obesity in Labrador dogs.

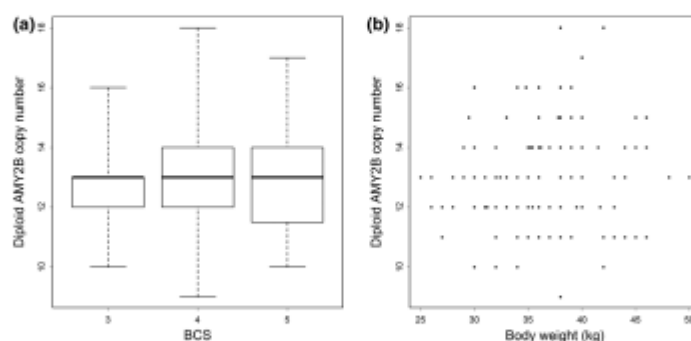


Figure 1 (a) Box plot of the diploid number of copies *AMY2B* in healthy (BCS = 3), overweight (BCS = 4) and obese (BCS = 5) dogs. The upper and lower part of the quadrangles signify the upper and lower quartiles. Lines crossing quadrangles indicate the medians. Lines over and under the quadrangles signify highest and lowest values. (b) Scatter plot of *AMY2B* copy number vs. body weight. The plots show that no relationship exists between *AMY2B* copy number and obesity.

2 Brief Note

Acknowledgements: This work was supported by the National Science Centre (Poland); projects no. 2016/23/B/NZ2/01762.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- 1 Switonski M. & Mankowska M. (2013) *Res Vet Sci* **95**, 831–6.
- 2 Perry G. H. *et al.* (2007) *Nat Genet* **39**, 1256–60.
- 3 Falchi M. *et al.* (2014) *Nat Genet* **46**, 492–7.
- 4 Arendt M. *et al.* (2014) *Anim Genet* **45**, 716–22.
- 5 Arendt M. *et al.* (2016) *Heredity* **117**, 301–6.
- 6 Freedman A. H. *et al.* (2014) *PLoS Genet* **10**, e1004016.
- 7 Axelsson E. *et al.* (2013) *Nature* **495**, 360–4.

Correspondence: M. Szydlowski (maciej@up.poznan.pl)

AMY2B Gene Copy-Number Variation Studied by Droplet Digital PCR (ddPCR) in Three Canids: Red Fox, Arctic Fox, and Chinese Raccoon Dog

Michał ANTKOWIAK^{ID}, Joanna NOWACKA-WOSZUK^{ID}, Izabela SZCZERBAL^{ID}, Marek SWITONSKI^{ID},
and Maciej SZYDŁOWSKI^{ID}

Accepted May 28, 2020

Published online June 16, 2020

Issue online June 30, 2020

Short communication

ANTKOWIAK M., NOWACKA-WOSZUK J., SZCZERBAL I., SWITONSKI M., SZYDŁOWSKI M. 2020. *AMY2B* gene copy-number variation studied by droplet digital PCR (ddPCR) in three canids: red fox, arctic fox, and Chinese raccoon dog. *Folia Biologica (Kraków)* **68**: 51-55.

Copy-number variation (CNV) is an important source of genetic variation, and one that played a role in the process of domestication. The adaptation to a new diet is a characteristic feature of dog domestication. We therefore sought genomic signatures of this process. The pancreatic alpha-amylase gene (*AMY2B*), expressed in the pancreas, exhibits a variable number of copies. It has been shown that the multiplication of this gene is associated with the adaptation of dogs to a starch-rich diet. To date, there has been no information made available on the copy-number variation of *AMY2B* in canid farm animals. The aim of the present study was to examine the *AMY2B* copy number in the red fox, the arctic fox, and in the Chinese raccoon dog. Droplet digital PCR (ddPCR) was used to count the gene copies in 152 animals (60 red foxes, 53 arctic foxes, and 39 Chinese raccoon dogs). We found that the majority (91%) of the animals had two copies of this gene. Of the red foxes and Chinese raccoon dogs, only 8% had three copies, while 32% of the arctic foxes had three copies. Our study showed that the multiplication of the *AMY2B* gene did not occur over several decades of breeding selection, which may reflect the low-starch feeding regime.

Key words: *AMY2B*, amylase, canid genetics, comparative genetics, starch digestion.

Michał ANTKOWIAK, Joanna NOWACKA-WOSZUK, Izabela SZCZERBAL, Marek SWITONSKI, Maciej SZYDŁOWSKI[✉], Department of Genetics and Animal Breeding, Poznań University of Life Sciences, Wołyńska 33, 60-637 Poznań, Poland.
E-mail: maciej.szydowski@up.poznan.pl

The *Canidae* family contains 36 species, including three species that are bred for their fur – the red fox (*Vulpes vulpes*), the arctic fox (*Alopex lagopus*), and the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) (SWITONSKI *et al.* 2003). The population size and breeding history of these species is distinct from the conditions met with in the history of dog domestication and selection. The earliest red fox farms started in Canada, approximately 120 years ago (STATHAM *et al.* 2011); they were followed by arctic fox farms in Scandinavia about 100 years ago (NOREN *et al.* 2005). Raccoon dog farms are the most recent, dating from 30 and 40 years ago in Poland and Finland, respectively (SLASKA *et al.* 2010). On the other hand, dogs (*Canis lupus familiaris*) have a long breeding history, having been domesticated about 15,000 years ago (OSTRANDER *et al.* 2017). The large number of dog breeds (approx. 400) show a vast di-

versity in terms of morphological and behavioral traits. There are many ancient dog breeds, such as the Japanese Akita and the Siberian Samoyed, which are closely related to their ancestor, the grey wolf (*Canis lupus*). There are also newer breeds, such as German Shepherds and Terriers (PARKER *et al.* 2004; PARKER *et al.* 2017). It is thought that majority of dog breeds arose during the last two centuries (VONHOLDT *et al.* 2010). On the other hand, there is evidence that additional copies of *AMY2B* appeared probably approximately 7000 years ago as reaction to the appearance of starch in dogs' diet (OLLIVIER *et al.* 2016).

The process of domestication involves changes in diet. It has been shown that one of the main contributors to dog domestication was the use of a different diet to that of wolves and other wild canids. Dogs' diet has been transformed to more closely resemble the omnivorous diet of humans (REITER *et al.* 2016). The

resequencing of the dog and wolf whole-genome has allowed for the identification of the genomic regions that were targeted for selection during dog domestication. These include regions harboring genes important for starch digestion and metabolizing fat (AXELSSON *et al.* 2013). One of the most interesting genes is pancreatic alpha amylase (*AMY2B*), which is responsible for the digestion of starch into maltose in the small intestine. It has been found that an increase in *AMY2B*'s copy number in dogs leads to increased enzyme activity and reflects the adaptation to increased starch consumption (ARENDR *et al.* 2014; AXELSSON *et al.* 2013). Copy-number variation (CNV) is a source of genetic variation which undergoes selection during domestication and environmental adaptation (AXELSSON *et al.* 2013). Human genome regions containing genes that encode different types of amylase enzymes are also highly polymorphic (SHWAN *et al.* 2017); for example, there are 2-15 copies of salivary amylase (*AMY1*) in humans (PERRY *et al.* 2007). It has been shown that a high number of copies of *AMY1* is negatively correlated with body mass index (BMI) (PINHO *et al.* 2018; VENKATAPOORNA *et al.* 2019), though not all studies confirmed this association (SHWAN and ARMOUR 2019).

The majority of studies of amylase genes in dogs deal with the *AMY2B* gene; a high variability in *AMY2B* copy number has been found across different breeds. Our study confirmed the copy number variability (9-18 copies) in dogs reported previously by ARENDR *et al.* (2014). Interestingly, it was shown that ancient breeds have fewer copies (2-12), while modern breeds have more than 20 (ARENDR *et al.* 2016; TONOIKE *et al.* 2015).

The *AMY2B* gene has been studied in relation to the predisposition of obesity in the Labrador Retriever breed, but no association between copy number variation and body mass or body condition score (BCS) was found (ANTKOWIAK *et al.* 2019). Moreover, variation in *AMY2B* copy number was also analyzed in relation to diabetes in dogs, but again no association was found (ARENDR *et al.* 2014).

To date, there has been no information on the copy-number variation of *AMY2B* in the canids kept on fur animal farms, under selection pressure for body size and fur quality. The aim of our study was thus to look for variation in *AMY2B* copy number in farmed red foxes, arctic foxes, and Chinese raccoon dogs.

Material and Methods

Biological samples were collected from 60 red foxes, 53 arctic foxes, and 39 Chinese raccoon dogs kept on a fur-bearing farm near Poznań. Samples were collected *postmortem* following the approval of the Local Ethical Commission for Investigations on Animals in Poznań (no. 19/2003; date of approval: 30 June 2003).

DNA was isolated with a MasterPure DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicenter) and a Genomic Mini kit (A&A Biotechnology) from blood and tissue, respectively. The concentration of DNA was measured by a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

AMY2B copy number was determined using droplet digital PCR (ddPCR). The PCR reaction was conducted using ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) and, for better DNA separation into droplets, the restriction enzyme *HaeIII* was added to the reaction mixture. The sequences for the studied gene and for the reference genes used in the assay design were taken from the dog genome assembly (CanFam 3.1); the tested gene was located on chromosome 6. The amplification of *AMY2B* employed the following primers: F: 5'CCAAACCTGGACGGACATCT, R: 5' TATCGTTCGCATTCAAGAGCAA, and TaqMan probe: 5' 6-Fam-TTTGAGTGGCGCTGGG-BHQ-1. The *HSD17B7* gene, in domesticated dogs located on chromosome 38, was used as a reference gene. The primers were as follows: F: ATGTCCACACAACACTAGCCATAC, R: GTGTCTCGGTAGCGCATTT, TaqMan probe: Hex-CACGCCAGTCCTAGTCATGCTT-BHQ-1. We carried out ddPCR in accordance with the manufacturer's instructions. The annealing temperature was 58°C. The QX200 droplet reader (Bio-Rad) was used for fluorescence detection and the results were analyzed using QuantaSoft software (v. 1.7.4.0917). The estimation of the *AMY2B* copy number was based on the known copy number of the reference gene (2 copies). For statistical analysis, the Kruskal-Wallis test and the Dunn's test (R software v. 3.4.0) was used.

Results and Discussion

Due to the high genome homology between canids, the CNV detecting assay for *AMY2B*, previously described (ANTKOWIAK *et al.* 2019; AXELSSON *et al.* 2013), was successfully used for amplification in foxes and Chinese raccoon dogs. We found that the median of diploid copy number of *AMY2B* for red foxes was 2.085 (with mean = 2.11 ± 0.29 SD). Only five animals (approx. 8%) had three copies of this gene. In Chinese raccoon dogs, the median copy number was 2.16 (with mean = 2.06 ± 0.4 SD) and three animals (approx. 8%) had three copies, while in two animals (approx. 5%) we observed only a single copy of *AMY2B*. The cohort of arctic foxes was the most polymorphic, with three copies of *AMY2B* being found in 17 animals (approx. 32%); the median was 2.38 (with mean = 2.47 ± 0.43 SD). Figure 1 presents exemplary results from the QuantaSoft software.

Comparison of the three groups of animals using the Kruskal-Wallis test showed that they differed statistically significantly with a p-value = 2.076×10^{-8} . Also, the comparison between particular groups showed

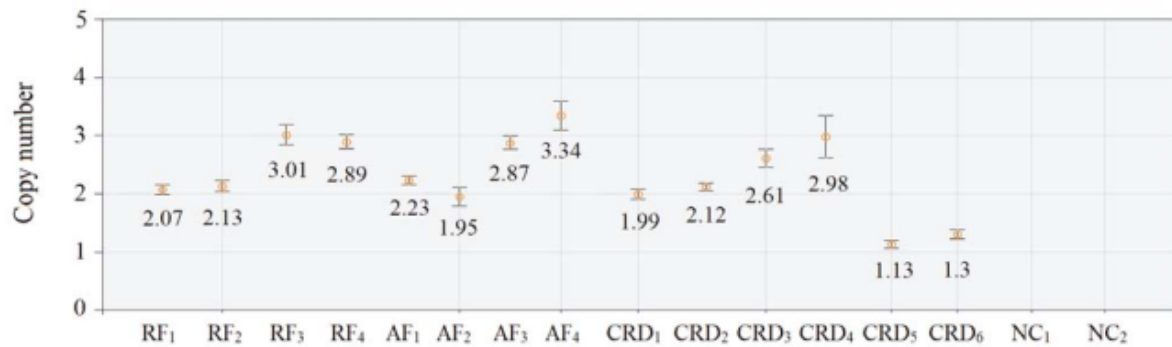


Fig. 1. Representative results of ddPCR; RF: red foxes; AF: arctic foxes; CRD: Chinese raccoon dogs; NC: negative controls.

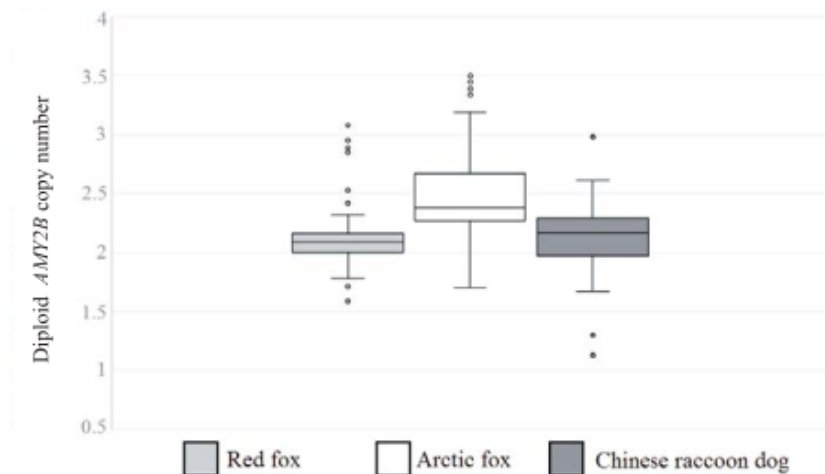


Fig. 2. Box-plot of the diploid number of *AMY2B* copies in the three studied canids. Upper and lower quartiles are marked in the upper and lower parts of the rectangles. Medians are marked by the lines crossing the boxes. The highest and lowest values are represented by the lines under and over the rectangles. The points under and over the boxes are outliers.

that the copy number in Arctic foxes was significantly different with a p -value <0.05 . Figure 2 shows box-plots for the results of all three species. The results show that the copy number in most animals did not deviate from two copies, so the copy number polymorphism of *AMY2B* in the studied animals seems to be low.

Two copies of *AMY2B* have been observed in several carnivore species, including the grey wolf (*Canis lupus*) (FREEDMAN *et al.* 2014), the polar bear (*Ursus maritimus*) (RINKER *et al.* 2019), species of the Mustelidae family (ABDURIYIM *et al.* 2019), and the domestic cat (PAJIC *et al.* 2019). The situation was similar in our observations, as most of the red foxes and Chinese raccoon dogs also had two copies. It is worth mentioning that the diet of farmed canid species includes plant-derived ingredients (GUGOLEK *et al.* 2014). We can assume that a similar diet was fed to the

canids studied here, although, only the arctic foxes presented a significant level of *AMY2B* polymorphism. Interestingly, it was shown that farmed arctic foxes present a higher digestibility of starch in comparison with wild arctic foxes (AHLSTRØM *et al.* 2003). This could explain the observed higher incidence of three copies of *AMY2B* in the studied cohort. Other predators that consume plants in their diet, such as the Asian badger (*Meles leucurus*) and the brown bear (*Ursus arctos*), as well as the American black bear (*Ursus americanus*), had up to four or three copies, respectively (ABDURIYIM *et al.* 2019; RINKER *et al.* 2019). It should be mentioned that the two bear species also show polymorphism in their copy number of *AMY1B*, another gene associated with pancreatic amylase; 3-4 copies of *AMY1B* were detected in American black bears and 4-8 copies in brown bears (RINKER *et al.* 2019).

In two Chinese raccoon dogs a single copy of *AMY2B* was found. This is not an exceptional observation, since it was sporadically also found in dogs and wolves (ARENDT *et al.* 2016), panthers (KIM *et al.* 2016), and polar bears (RINKER *et al.* 2019).

In this study, we have described the *AMY2B* copy number of three canid species farmed for fur for the first time. We found that the copy number variation for this gene was low. This can be explained by the short breeding history of these species, accompanied by the introduction of plant ingredients to their diets. We can assume that this period is probably too brief to introduce high variability on the genomic level, especially when compared to the long history of dog domestication and the increasing amounts of starch in their diet.

Acknowledgement

This work was supported by the National Science Centre, Poland (project no. 2016/23/B/NZ2/01762.)

Author Contributions

Research concept and design: M.S.; Collection and/or assembly of data: M.S., M.Sz.; Data analysis and interpretation: M.A., J.N.-W., I.S.; Writing the article: M.A., J.N.-W., I.S.; Critical revision of the article: J.N.-W., I.S., M.S.; Final approval of article: M.A., J.N.-W., I.S., M.S., M.Sz.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- ABDURIYIM S., NISHITA Y., ABRAMOV A.V., SOLOVYEV V.A., SAVELJEV A.P., KOSINTSEV P.A., KRYUKOV A.P., RAICHEV E., VÄINÖLÄ, KANEKO Y., MASUDA R. 2019. Variation in pancreatic amylase gene copy number among Eurasian badgers (*Canis musteloides*, Mustelidae, Meles) and its relationship to diet. *J. Zool.* (1987) **308**: 28-36. <https://doi.org/10.1111/jzo.12649>
- AHLSTRÖM Ö., FUGLEI E., MYDLAND L.T. 2003. Comparative nutrient digestibility of arctic foxes (*Alopex lagopus*) on Svalbard and farm-raised blue foxes (*Alopex lagopus*). *Comp. Biochem. Physiol. A MolIntegr. Physiol.* **134**: 63-68. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00184-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00184-8)
- ANTKOWIAK M., SZCZERBAL I., NOWACKA-WOSZUK J., SWITONSKI M., SZYDLOWSKI M. 2019. No association between *AMY2B* gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs. *Anim. Genet.* **50**: 552-553. <https://doi.org/10.1111/age.12824>
- ARENDT M., FALL T., LINDBLAD-TOH K., AXELSSON E. 2014. Amylase activity is associated with *AMY2B* copy numbers in dog: implications for dog domestication, diet and diabetes. *Anim. Genet.* **45**: 716-722. <https://doi.org/10.1111/age.12179>
- ARENDT M., CAIRNS K.M., BALLARD J.W.O., SAVOLAINEN P., AXELSSON E. 2016. Diet adaptation in dog reflects spread of prehistoric agriculture. *Heredity* (Edinb). **117**: 301-306. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.48>
- AXELSSON E., RATNAKUMAR A., ARENDT M., MAQBOOL K., WEBSTER M.T., PERLOSKI M., LIBERG O., ARNEMO J.M., HEDHAMMARÅ., LINDBLAD-TOH K. 2013. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* **495**: 360-364. <https://doi.org/10.1038/nature11837>
- FREEDMAN A.H., GRONAU I., SCHWEIZER R.M., ORTEGA-DEL VECCHYO D., HAN E., SILVA P.M., GALAVERNI M., FAN Z., MARX P., LORENTE-GALDOS B., BEALE H., RAMIREZ O., HORMOZDIARI F., ALKAN C., VILÀ C., SQUIRE K., GEFFEN E., KUSAK J., BOYKO A.R., PARKER H.G., LEE C., TADIGOTLA V., WILTON A., SIEPEL A., BUSTAMANTE C.D., HARKINS T.T., NELSON S.F., OSTRANDER E.A., MARQUES-BONET T., WAYNE R.K., NOVEMBRE J. 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genet.* **10**: e1004016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004016>
- GUGOLEK A., STRYCHALSKI J., KONSTANTYNOWICZ M., ZWOLIŃSKI C. 2014. Comparative analysis of nutrient digestibility and nitrogen retention in wild and farmed canids. *Ann. Anim. Sci.* **14**: 307-314. <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0002>
- KIM S., CHO Y.S., KIM H., CHUNG O., KIM H., JHO S., SEOMUN H., KIM J., BANG W.Y., KIM C., AN J., BAE C.H., BHAK Y., JEON S., YOON H., KIM Y., JUN J., LEE H., CHO S., UPHYRKINA O., KOSTYRIA A., GOODRICH J., MIQUELLE D., ROELKE M., LEWIS J., YURCHENKO A., BANKEVICH A., CHO J., LEE S., EDWARDS J.S., WEBER J.A., JO COOK, KIM S., LEE H., MANICA A., LEE I., O'BRIEN S.J., BHAK J., YEO J. 2016. Comparison of carnivore, omnivore, and herbivore mammalian genomes with a new leopard assembly. *Genome Biol.* **17**: 211. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1071-4>
- NORÉN K., DALÉN L., KVALØY K., ANGERBJÖRN A. 2005. Detection of farm fox and hybrid genotypes among wild arctic foxes in Scandinavia. *Conserv. Genet.* **6**: 885-894. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9075-8>
- OLLIVIER M., TRESSET A., BASTIAN F., LAGOUTTE L., AXELSSON E., ARENDT M., BALĂȘESCU A., MARSHOUR M., SABLIN M.V., SALANOVA L., VIGNE J., HITTE C., HÄNNI C. 2016. *AMY2B* copy number variation reveals starch diet adaptations in ancient European dogs. *R. Soc. Open Sci.* **3**: 160449. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.160449>
- OSTRANDER E.A., WAYNE R.K., FREEDMAN A.H., DAVIS B.W. 2017. Demographic history, selection and functional diversity of the canine genome. *Nat. Rev. Genet.* **18**: 705-720. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.67>
- PAJIC P., PAVLIDIS P., DEAN K., NEZANANOVA L., ROMANO R., GARNEAU D., DAUGHERITY E., GLOBIG A., RUHL S., GOKCUMEN O. 2019. Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals. *Elife* **14**: e44628. <https://doi.org/10.7554/eLife.44628.001>
- PARKER H.G., DREGER D.L., RIMBAULT M., DAVIS B.W., MULLEN A.B., CARPINTERO-RAMIREZ G., OSTRANDER E.A. 2017. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration and hybridization on modern dog breed development. *Cell Rep.* **19**: 697-708. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.079>
- PARKER H.G., KIM L.V., SUTTER N.B., CARLSON S., LORENTZEN T.D., MALEK T.B., JOHNSON G.S., DEFRANCE H.B., OSTRANDER E.A., KRUGLYAK L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* **304**: 1160-1164. <https://doi.org/10.1126/science.1097406>
- PERRY G.H., DOMINY N.J., CLAW K.G., LEE A.S., FIEGLER H., REDON R., WERNER J., VILLANEA F.A., MOUNTAIN J.L., MISRA R., CARTER N.P., LEE C., STONE A.C. 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* **39**: 1256-1260. <https://doi.org/10.1038/ng2123>
- PINHO S., PADEZ C., MANCO L. 2018. High *AMY1* copy number protects against obesity in Portuguese young adults. *Ann. Hum. Biol.* **45**: 435-439. <https://doi.org/10.1080/03014460.2018.1490452>

- REITER T., JAGODA E., CAPELLINI T.D. 2016. Dietary variation and evolution of gene copy number among dog breeds. *PLoS One* **10**: e0148899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148899>
- RINKER D., SPECIAN N.K., ZHAO S., GIBBONS J.G. 2019. Polar bear evolution is marked by rapid changes in gene copy number in response to dietary shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**: 13446-13451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901093116>
- SHWAN N.A.A., ARMOUR J.A.L. 2019. No evidence for association of BMI with salivary amylase gene copy number in the UK 1958 birth cohort. *Obesity (Silver Spring)* **27**: 1533-1538. <https://doi.org/10.1002/oby.22565>
- SHWAN N.A.A., LOUZADA S., YANG F., ARMOUR J.A.L. 2017. Recurrent rearrangements of human amylase genes create multiple independent CNV series. *Hum. Mutat.* **38**: 532-539. <https://doi.org/10.1002/humu.23182>
- SLASKA B., ZIEBA G., ROZEMPOLSKA-RUCINSKA I., JEZEWSKA-WITKOWSKA G., JAKUBCZAK A. 2010. Evaluation of genetic biodiversity in farm-bred, wild raccoon dogs in Poland. *Folia Biol. (Kraków)* **58**: 195-199. https://doi.org/10.3409/fb58_3-4.195-199
- STATHAM M.J., TRUT L.N., SACKS B.N., KHARLAMOVA A.V., OSKINA I.N., GULEVICH R.G., JOHNSON J.L., TEMNYKH S.V., ACLAND G.M., KUKKOVA A.V. 2011. On the origin of a domesticated species: identifying the parent population of Russian silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* **103**: 168-175. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01629.x>
- SWITONSKI M., ROGALSKA-NIZNIK N., SZCZERBAL I., BAER M. 2003. Chromosome polymorphism and karyotype evolution of four canids: the dog, red fox, arctic fox and raccoon dog. *Caryologia* **56**: 375-385. <https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589348>
- TONOIKE A., HORI Y., INOUE-MURAYAMA M., KONNO A., FUJITA K., MIYADO M., FUKAMI M., NAGASAWA M., MOGI K., KIKUSUI T. 2015. Copy number variations in the amylase gene (*AMY2B*) in Japanese native dog breeds. *Animal Genetics* **46**: 580-583. <https://doi.org/10.1111/age.12344>
- VONHOLDT B.M., POLLINGER J.P., LOHMEUHLER K.E., HAN E., PARKER H.G., QUIGNON P., DEGENHARDT J.D., BOYKO A.R., EARL D.A., AUTON A., REYNOLDS A., BRYC K., BRISBIN A., KNOWLES J.C., MOSHER D.S., SPADY T.C., ELKAHLOUN A., GEFFEN E., PILOT M., JEDRZEJEWSKI W., GRECO C., RANDI E., BANNASCH D., WILTON A., SHEARMAN J., MUSIANI M., CARGILL M., JONES P.G., QIAN Z., HUANG W., DING Z., ZHANG Y.P., BUSTAMANTE C.D., OSTRANDER E.A., NOVEMBRE J., WAYNE R.K. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* **464**: 898-902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>
- VENKATAPPOORNA C.M.K., AYINE P., PARRA E.P., KOENIGS T., PHILLIPS M., BABU J.R., SANDEY M., GEETHA T. 2019. Association of salivary amylase (*AMY1*) gene copy number with obesity in Alabama Elementary School Children. *Nutrients* **19**: E1379. <https://doi.org/10.3390/nu11061379>



OPEN ACCESS

EDITED BY
Giovanni Materba,
University of Verona, ItalyREVIEWED BY
Alsamman M. Alsamman,
International Center for Agriculture
Research in the Dry Areas (ICARDA),
Egypt
Paolo Zambonelli,
University of Bologna, Italy*CORRESPONDENCE
Maciej Szydlowski,
✉ maciej.szydlowski@up.poznan.plRECEIVED 06 June 2023
ACCEPTED 11 September 2023
PUBLISHED 20 September 2023CITATION
Antkowiak M and Szydlowski M (2023),
Uncovering structural variants associated
with body weight and obesity risk in
labrador retrievers: a genome-
wide study.
Front. Genet. 14:1235821.
doi: 10.3389/fgene.2023.1235821COPYRIGHT
© 2023 Antkowiak and Szydlowski. This is
an open-access article distributed under
the terms of the Creative Commons
Attribution License (CC BY). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Uncovering structural variants associated with body weight and obesity risk in labrador retrievers: a genome-wide study

Michał Antkowiak and Maciej Szydlowski*

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznań University of Life Sciences, Poznań, Poland

Although obesity in the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is known to decrease well-being and shorten lifespan, the genetic risk variants associated with canine obesity remain largely unknown. In our study, which focused on the obesity-prone Labrador Retriever breed, we conducted a genome-wide analysis to identify structural variants linked to body weight and obesity. Obesity status was based on a 5-point body condition score (BCS) and the obese dog group included all dogs with a BCS of 5, along with dogs with the highest body weight within the BCS 4 group. Data from whole-genome sequencing of fifty dogs, including 28 obese dogs, were bioinformatically analyzed to identify potential structural variants that varied in frequency between obese and healthy dogs. The seven most promising variants were further analyzed by droplet digital PCR in a group of 110 dogs, including 63 obese. Our statistical evidence suggests that common structural mutations in or near six genes, specifically *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, and *VPS26C*, may contribute to the variability observed in body weight and body condition scores among Labrador Retriever dogs. These findings emphasize the need for additional research to validate the associations and explore the specific functions of these genes in relation to canine obesity.

KEYWORDS

labrador retriever, obesity, *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, *VPS26C*

Introduction

Canine obesity is a significant problem because of its high prevalence and its association with unfavorable physiological conditions and diseases. Obesity is a common phenomenon in countries where dogs are kept as pets, being perhaps as common as human obesity. For example, in Dutch populations, overweight affects forty percent of dogs and obesity another twenty percent, whereas over forty percent of dogs in Beijing are affected by obesity (Courcier et al., 2010; Mao et al., 2013). Obesity is associated with obesity-related metabolic dysfunction (Tvarijonaviciute et al., 2012), orthopaedic disease, breathing difficulties and urinary incontinence, which reduce wellbeing and shorten life expectancy.

As in humans, common canine obesity is polygenic with contribution from a large number of genes, most with small effect size, and a significant environmental influence. In dogs, the contribution of polygenes to the overall variability, traditionally measured by the heritability coefficient, is difficult to estimate due to population fragmentation (both between and within breeds), incomplete pedigree records, and the lack of systematic data collection. Various characteristics of obesity, however, show similarity across mammals, and reliable heritability estimates exist for humans, mice, and pigs. From this point of view, it is believed

that obesity is moderately inherited in dogs (Switonski and Mankowska, 2013). A study of Strandberg et al. (2023) presented a comprehensive investigation into the heritability of body weight—a trait influenced by both body size and body fat accumulation. The analysis across 19 breeds estimated the average heritability of body weight to be 51%, with a range of 35%–70%. Moreover, the fact that certain breeds—such as Labrador retriever, Golden retriever, Pug, and Beagle—are especially prone to obesity indicates that some polygenes are fixed or very common in these breeds. The observation that Labrador dogs with the lowest birth weights are more likely to become overweight in adulthood can be explained by a genetic correlation between the two traits and indirectly suggests the existence of significant genetic variability related to obesity (Mugnier et al., 2020).

In contrast to human obesity, we know relatively little about the effects of individual genes and markers of obesity (Wallis and Raffan, 2020). From studies on humans and model animals, it appears that the genes implicated in the monogenic type of obesity may also carry mutations that stand out from the polygenic background (*LEP*, *PCSK1*, *LEPR*, *POMC*, *MCHR*, *SIM1*, *NTRK2*, *BDNF*, *SH2B1*, *MRAP2*, *KSR2*, *ADCY3*). This applies primarily to genes in the melanocortin pathway. A few effects of individual canine genes have been identified, including *POMC*, *TNF*, *MCHR*, *GPR120* and *ADCY3* (Zeng et al., 2014; Miyabe et al., 2015; Mankowska et al., 2016; Raffan et al., 2016; Mankowska et al., 2017; Sypniewski and Szydlowski, 2023). The outcomes of genome-wide association studies (GWAS) pertaining to body mass—an attribute intricately correlated with body fat—imply in a roundabout manner that genetic variations within *ACSLA*, a gene responsible for regulating back fat thickness in pigs, might likewise play a role in the susceptibility to canine obesity (Plassais et al., 2017). In contrast to investigations concerning human obesity, association analyses conducted in canines exhibit diminished statistical power, and the outcomes are frequently lacking validation within separate populations (except *POMC*). Consequently, our capacity is limited to identifying solely those variants that wield substantial influence over obesity-related traits.

The modest headway in pinpointing short variants linked to canine obesity underscores the potential advantages of incorporating an exploration into structural variants (SVs) within obesity research, given their anticipated capacity for exerting more pronounced individual effects. This move is facilitated by progress in computer-aided identification of structural variants based on genome-wide sequencing (Ionita-Laza et al., 2009; Teo et al., 2012). Arguments for the role of structural variants in obesity traits can be found in the discussions on the relationship between copy number variation (CNV) in the *AMY* gene and process of domestication (Axelsson et al., 2013). The first clue that structural variants in genes from the *AMY* family are associated with obesity was found in humans, where some data show correlation between the copy number of the *AMY1* gene, coding for pancreatic amylase, and body mass in children (Mejia-Benitez et al., 2015; León-Mimila et al., 2018), as well as Type 2 diabetes (Liu et al., 2020).

In this study, we search the dog genome for structural variants that may affect body weight and the predisposition of Labrador retriever dogs to obesity. We analyze genome-wide sequencing data from fifty dogs, including obese and nonobese individuals, and use

TABLE 1 Summary of the sample of 110 Labrador retriever dogs used in this study. Presented values are medians (and range). The records were collected from 2014 to 2017.

Dogs	N	Age (month)	Body weight (kg)
All	110	48 (12–120)	36.0 (25.0–50.0)
Males	46	60 (12–120)	38.0 (31.0–50.0)
Females	64	48 (12–120)	34.0 (25.0–46.0)
Neutered males	7	60 (36–96)	35.0 (32.0–44.0)
Neutered females	16	72 (36–120)	31.1 (26.0–44.0)
BCS = 3	32	36 (12–108)	30.5 (25.0–43.0)
BCS = 4	52	48 (12–120)	36.1 (30.0–48.1)
BCS = 5	26	76.5 (24–108)	41.75 (35.0–50.0)
Nonobese	47	36 (12–120)	32.0 (25.0–40.0)
Obese	63	60 (12–120)	39.0 (32.4–50.0)

bioinformatic methods to select polymorphic sites that may be significant for obesity-related traits. We validate these sites using the dd-PCR technique in a sample of 110 dogs. We find statistical evidence of a link between six structural variants in or near six protein-coding genes and obesity-related traits. We then justify the need to verify these preliminary associations in a broader study.

Materials and methods

Samples and whole-genome sequencing data

We used data on 110 Labrador retriever dogs, collected at four veterinary clinics during routine examinations from 2014 to 2017. All the dog owners gave their consent for participation in the research. The following data were collected: sex, age, body weight, neuter status, and body condition score on a five-point scale. Pedigree data were not collected.

To facilitate statistical analysis, the population was categorized into two groups: nonobese dogs and obese dogs. The nonobese dog group comprised all dogs with a body condition score (BCS) of 3, as well as dogs with the lowest body weight within the BCS 4 group (<33 kg). Conversely, the obese dog group included all dogs with a BCS of 5, along with dogs with the highest body weight within the BCS 4 group (>33 kg). The mean age and body weight were 56.7 months (SD = 33.8) and 36.2 kg (SD = 5.4 kg), respectively. The sample is summarized in Table 1.

Of these 110 dogs, 28 obese and 22 nonobese dogs were subjected to whole-genome sequencing as part of our previous study (Szydlowski and Antkowiak, 2022). FASTQ files are publicly available in the European Nucleotide Archive (PRJEB47658). Detailed information on mapping sequence reads on a reference genome is given in our previous report. Briefly, raw FASTQ files for each sample were aligned with the canine reference genome CanFam3.1 using BWA software (Li and Durbin, 2010). The aligned reads in SAM format were coordinate-sorted and converted to BAM format using SAMTOOLS (version 0.1.18; Li

et al., 2009). In this study, we reused the BAM files to search for structural variants that are potentially associated with obesity.

Bioinformatic detection of structural variants

In order to detect SVs in short paired-end sequencing data, we used two bioinformatic methods: DELLY (Rausch et al., 2012) and TARDIS (Soylev et al., 2019). DELLY has the ability to detect deletions, inversions, duplications, and interchromosomal translocations with its integrated analysis of split reads. TARDIS is a more recent method with the ability to detect more complex events, such as a tandem duplication.

Principal components analysis

Top principal components were included as covariates in the association analysis to account for population stratification. Principal components analysis (PCA) was conducted using plink software (ver. 2.0) on a sample of 50 sequenced dogs. We utilized 6.5 million short variants with a minor allele frequency (MAF) greater than 0.05.

Selecting variants for droplet digital PCR

Due to the separate analysis of each genome by the two algorithms, the predicted localizations of structural variants (SVs) may vary across samples. To identify chromosomal regions potentially associated with obesity, we utilized the CoNVaQ algorithm (Larsen et al., 2018). In CoNVaQ, a new region is initiated whenever an SV from any dog starts or ends. This tool enables the comparison of two sets of SV segments, searching for genomic regions where the occurrence of SVs is significantly associated with the phenotype. In our study, we compared 28 obese dogs with 22 nonobese dogs.

We considered regions with a CoNVaQ raw p -value below 0.05 located within or in close proximity (<10 kb apart) to one or more protein-coding genes. CoNVaQ utilizes a straightforward statistical model that incorporates Fisher's exact test, thereby excluding the consideration of other potential risk factors, such as sex, age, castration, and genotype at the *POMC* locus. The CoNVaQ output, however, includes the "Gain/Loss" status for each individual, facilitating the verification of associations in a statistical model that incorporates known risk factors.

The SV calls (Gain/Loss) obtained from CoNVaQ were used in the general linear model for body weight and the logistic regression model for obesity. These models also incorporated age (as a covariate), sex (male/female), neuter status (yes/no), the top three principal components, and the presence or absence of the *POMC* deletion (14-bp Del variant, as described by Raffan et al., 2016). With regard to the *POMC* gene, the homozygous deletion was observed in only two dogs, therefore the Del/Del dogs and heterozygotes were classified as a single group.

In order to narrow down the chromosome regions identified in the previous procedure and select regions for ddPCR assays, we compiled a

list of genes associated with BMI in humans. To do this, we utilized the GWAS Catalog (www.ebi.ac.uk/gwas, accessed on 5 February 2022), which provided us with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) reported in genome-wide association studies (GWAS) that demonstrated a significant association ($p < 1.0 \times 10^{-9}$) with BMI, along with their corresponding mapped genes. This comprehensive process resulted in a list of 1966 unique gene names.

Droplet digital PCR for CNV analysis

DNA was extracted from frozen blood samples with MasterPure DNA Purification Kit for Blood Version II (Epicenter). The DNA quality was tested using a Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Primers and assays for droplet digital PCR (ddPCR) of the fragments were designed by the tool on the BioRad website and by the Primer3PLUS program. The finished primers and assays were obtained from BioRad or the Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences. A T100TM thermal cycler, a QX200TM droplet generator, a PX1TM PCR plate sealer, and a QX200TM droplet reader were obtained from BioRad. The reaction PCR was prepared using ddPCR Supermix for Probes (BioRad). The restriction enzymes (*Hae*III, *Eco*RI, *Msp*I, *Xba*I) were added to the reaction mix to improve the distribution of DNA across the droplets.

Association analysis

To further explore the association between structural mutations identified by ddPCR and obesity-related traits in the sample of 110 dogs, we employed the general linear model (Type III SS) with body weight and logistic regression model with obesity status as the outcomes. These models incorporated age (as a covariate), sex, neuter status, presence of the *POMC* deletion (presence of 14-bp Del variant), and copy number determined by ddPCR (as a covariate). It is important to note that since principal components were not available for the unsequenced dogs, the association analysis was not adjusted for population stratification. Regression analyzes were performed using R statistical software version 4.2.2.

We adopted a significance level of $\alpha = 0.05$, and the resulting p -values were left unadjusted. Regardless of whether multiple-test correction is implemented or not, a cohort consisting of 110 individuals inherently lacks the capacity to offer unequivocal statistical substantiation. Within a limited population, the correction of p -values for variants pre-selected with a relatively high *a priori* likelihood substantially diminishes the likelihood of identifying prospective associations.

Results

Bioinformatic detection of structural variants

Analysis of the paired short-read sequencing data allowed for initial identification of almost 400,000 structural variants within 50 dog genomes. It should be noted, however, that the percentage of

TABLE 2 Summary of structural variants detected by bioinformatic analysis of paired short-read sequencing data. Ten percent of the largest variants from each method were excluded.

Type	DELLY			TARDIS		
	N/dog	Size range	Median size (bp)	N/dog	Size range	Median size (bp)
Deletion	7054	33bp–207 kb	389	318	31bp–62 kb	461
Insertion	180	386p–96bp	58	77	31bp–60 kb	93
Inversion	715	506p–206 kb	2,561	2	406p–60 kb	1,013
Tandem duplication	—	—	—	102	33bp–59 kb	3,205
All	7950	33bp–207 kb	402	500	31bp–62 kb	512

false results for short-read-based methods may be extremely high. To ameliorate this problem, we discarded the 10% longest variants from each method and excluded all variants shorter than 30bp. The two algorithms differed significantly in the number and size of the variants they found: DELLY identified an average of 7,950 variants per dog (with a median size of 402bp) while TARDIS detected only 500 variants per dog (with a median size of 512bp). A summary of the results is presented in Table 2. Because most false positive variants are represented by a single individual, such variants are unlikely to be statistically associated with obesity.

We proceeded to use the CoNVaQ method to identify chromosomal regions that exhibited differences in structural variation (SV) frequency between obese and nonobese dogs. A total of 1,291 regions demonstrated a raw p below 0.05 (ranging from 7.7×10^{-7} to 4.7×10^{-3}), with 241 of these regions overlapping with one or two protein-coding genes (Supplementary Figure S1). The SV calls (gain/loss) obtained from CoNVaQ were utilized in regression models for body weight and obesity, which included age, sex, neuter status, the top three principal components, and *POMC* deletion. The score plot for the first two principal components is shown on Supplementary Figure S2. The graph does not show an unambiguous picture of population stratification. Principal components and the effect of deletion in the *POMC* gene were not statistically significant, but were included in the models. Following the exclusion of regions with a p exceeding 0.05, a total of 56 regions remained (raw p ranging from 7.6×10^{-5} to 4.8×10^{-2}).

Among the 56 regions that were analyzed, only one region corresponded to the list of GWAS signals associated with human BMI. To determine which SV variants should be further examined, we took into account both the results of the initial association analysis (considering low p) and the proximity of the variants to protein coding genes. After careful deliberation, we chose the following seven genes for additional molecular analysis: *ALPL*, *KCTD8*, *RYR3*, *SGMI*, *SLC12A6*, *VPS26C*, and *MME* (with corresponding p of 2.8×10^{-3} , 3.1×10^{-3} , 4.8×10^{-4} , 2.8×10^{-3} , 4.8×10^{-4} , 2.9×10^{-3} , and 1.4×10^{-4} , respectively). It is worth noting that initially, four other genes (*RECQL4*, *RBPI*, *XRNI*, and *GTF2A16*) were also considered. However, designing assays for them proved to be impossible due to the presence of highly similar fragments in different parts of the reference genome. *RYR3* was selected due to its paralog, *RYR1*, which has been shown to influence the distribution of adipose tissue in gilts (Fujii et al., 1991; Sadkowsky et al., 2015).

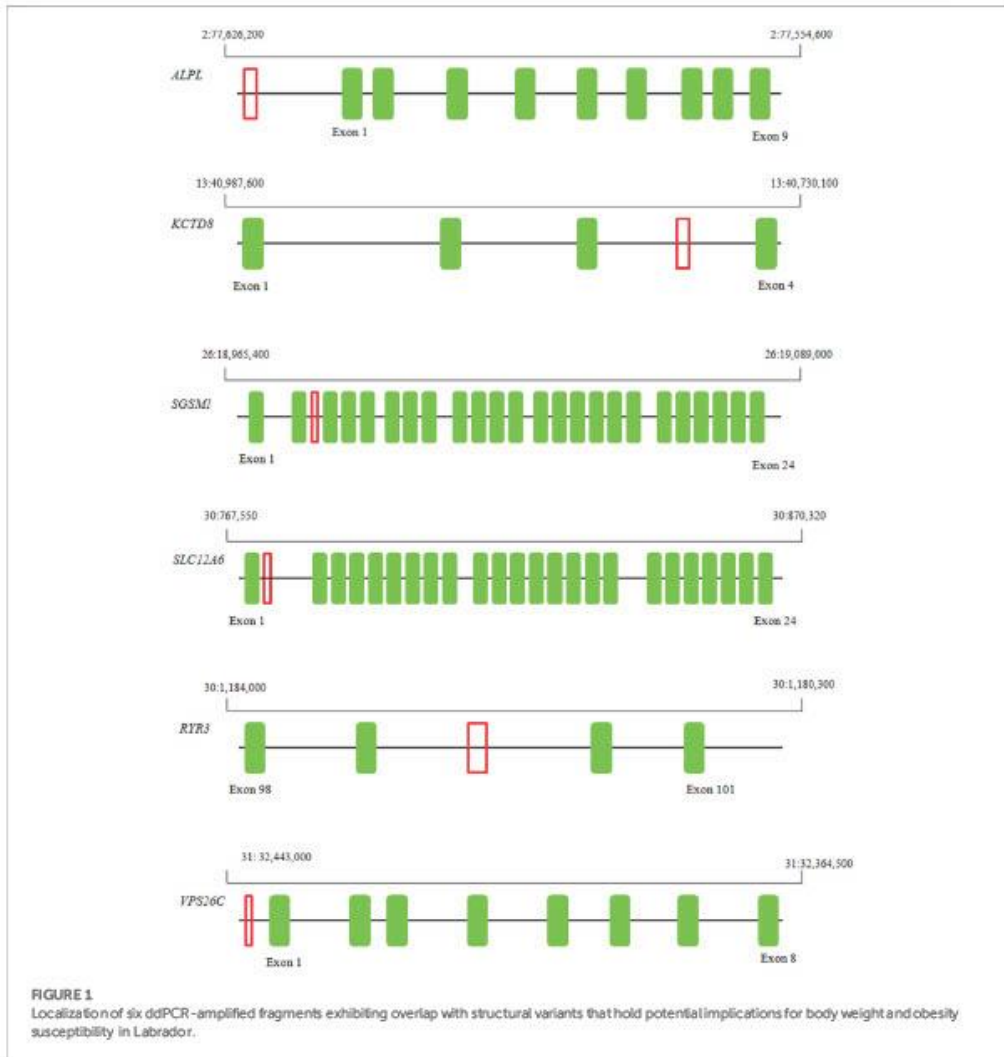
Results of ddPCR and association study

The assays were successfully designed for seven fragments. We confirmed the presence of structural polymorphism in six genes: *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, and *VPS26C*, though ddPCR showed no signal of structural variants for the *MME* gene. The chromosomal location of the six amplified fragments are presented on Figure 1.

We performed an association analysis between ddPCR results and obesity characteristics observed in the group of 110 Labrador. Again, the effect of deletions in the *POMC* gene was not statistically significant, but was included in the models. The structural variants observed in six genes exhibited associations with obesity, with four out of the six genes showing associations with both body weight and obesity (unadjusted $p = 0.03$, as shown in Table 3 and Figure 2; Figure 3; Figure 4). The effects of the four statistically significant mutations on body weight ranged from 34% to 54% SD. Notably, the results remain consistent for both traits, indicating that variants associated with increased body weight also elevate the risk of developing obesity.

The findings for the *RYR3* and *SLC12A6* genes are particularly intriguing, as these genes are closely located on chromosome 30, and their genotype distributions displayed remarkable similarity, suggesting a strong linkage disequilibrium. In the case of the *RYR3* gene, we amplified a 124-bp fragment located in intron 99 (CanFam3.1). The number of copies of this mutation ranged from zero to two, with a mean of 1.6 for dogs with a body condition score (BCS) of 3, and only 1.0 for those with a BCS of 5. This suggests that dogs carrying a deletion at the *RYR3* gene are more predisposed to excessive fat accumulation, while the risk of obesity decreases with each copy of the reference variant. Similarly, the deletion within the *SLC12A6* gene increases the risk of obesity. Collectively, the results pertaining to the *RYR3* and *SLC12A6* genes provide evidence of the potential importance of the chromosome 30 region in canine obesity, warranting further investigation.

The aforementioned associations were not adjusted for population stratification. In the preceding step, which encompassed fifty sequenced dogs, we computed the top twenty principal components. The eigenvalues for these components ranged from 2.6 to 1.0. The score plot for the first two principal components indicated genetic homogeneity within the population (Supplementary Figure S1). We believe that the procedure used here



would reveal hidden stratification of the population, including that resulting from two types of Labrador (American and English).

Discussion

The genetics of canine obesity is in its infancy compared to the genetics of human obesity, but for this reason, human genetics can offer a number of valid hypotheses, the verification of which in the canine population has recently brought significant progress. A number of candidate gene studies in relatively small cohorts have identified short mutations in the dog genome that shape traits associated with obesity in various breeds. A 14-bp intronic

deletion in the *POMC* gene greatly increases the body mass of Labrador retriever dogs, while altering the function of β -MSH and β -endorphin, two peptide hormones associated with food motivation and adiposity (Raffan et al., 2016; Mankowska et al., 2017). Moreover, two SNPs in the noncoding parts of *TNF* gene have been shown to be important for polygenic obesity in Labrador retriever dogs (Mankowska et al., 2016), whereas two exonic SNPs in the *MC4R* gene have been linked to body weight in Beagle dogs (Zeng et al., 2014). These findings indicate that the contribution of single genes to polygenic obesity may be greater in dogs than in humans, and suggests the possibility of identifying key markers that would be useful in risk prediction and treatment of obesity without the need for expensive genome-wide profiling.

TABLE 3 Results of association study between body weight and obesity and structural variants in six protein-coding genes.

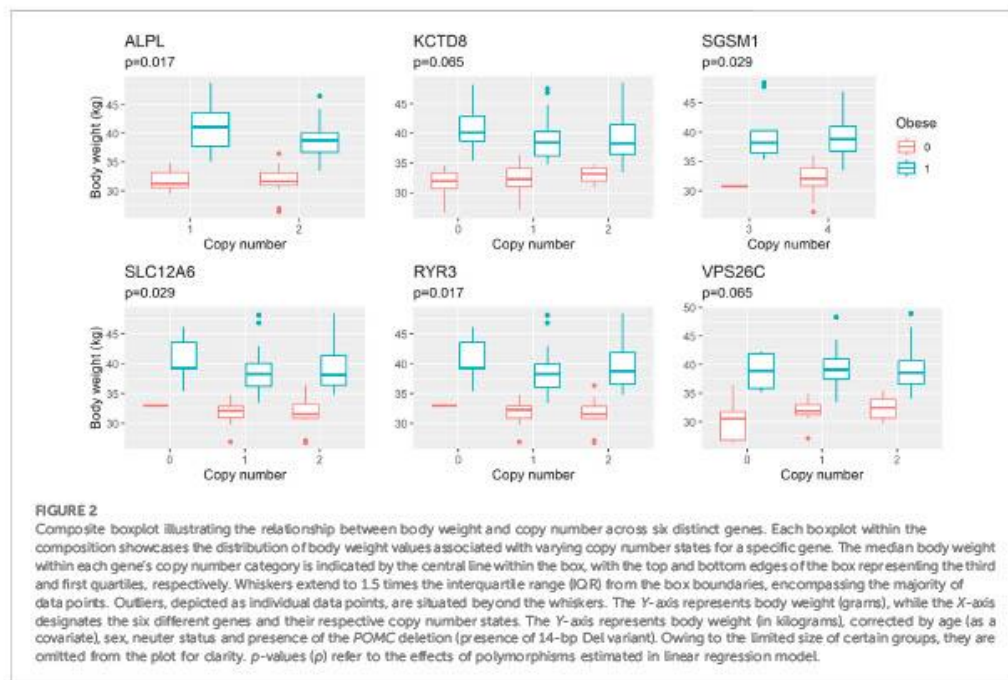
Localization ^a	Range of ddPCR output ^b	Association	
		Body weight (kg) ^c (per copy \pm SE)	Obesity ^d (odds ratio)
2:77,622,662–77,622,741 deletion, intergenic region between <i>ALPL</i> and <i>BCE1</i>	0–25	-2.88 ± 1.17 $p = 0.017$	OR = 0.18 95%CI: 0.04–0.58 $p = 0.008$
13:40,904,429–40,904,512 deletion, intron 3 of <i>KCTD8</i>	0–21	1.55 ± 0.83 $p = 0.065$	OR = 2.36 95%CI: 1.14–5.23 $p = 0.025$
26:18,996,505–18,996,597 duplication, intron 1 or 2 of <i>SGSM1</i>	2.8–5.8	-2.68 ± 1.20 $p = 0.029$	OR = 0.16 95%CI: 0.03–0.58 $p = 0.013$
30:774,403–774,537 deletion/duplication, intron 1 of <i>SLC12A6</i>	0–33	-1.84 ± 0.82 $p = 0.029$	OR = 0.41 95%CI: 0.18–0.84 $p = 0.020$
30:1,182,396–1,182,519 deletion, intron 99 of <i>RYR3</i>	0–21	-2.17 ± 0.88 $p = 0.017$	OR = 0.34 95%CI: 0.14–0.76 $p = 0.012$
31:32,435,989–32,436,088 deletion, intergenic region between <i>VPS26C</i> and <i>DYRK1A</i>	0–22	1.64 ± 0.87 $p = 0.065$	OR = 2.57 95%CI: 1.20–5.87 $p = 0.019$

^addPCR, amplified fragment (CanFam 3.1). The true chromosomal location of the polymorphism is unknown, but it covers the amplified fragment.

^bValues obtained from ddPCR, are real numbers and approximate the number of copies of the variant in the genome.

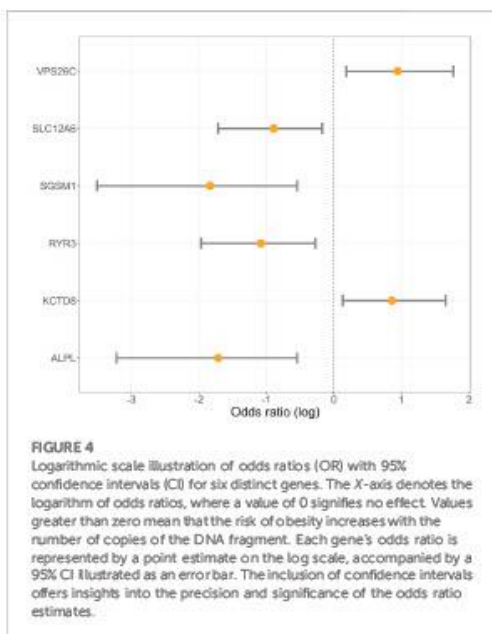
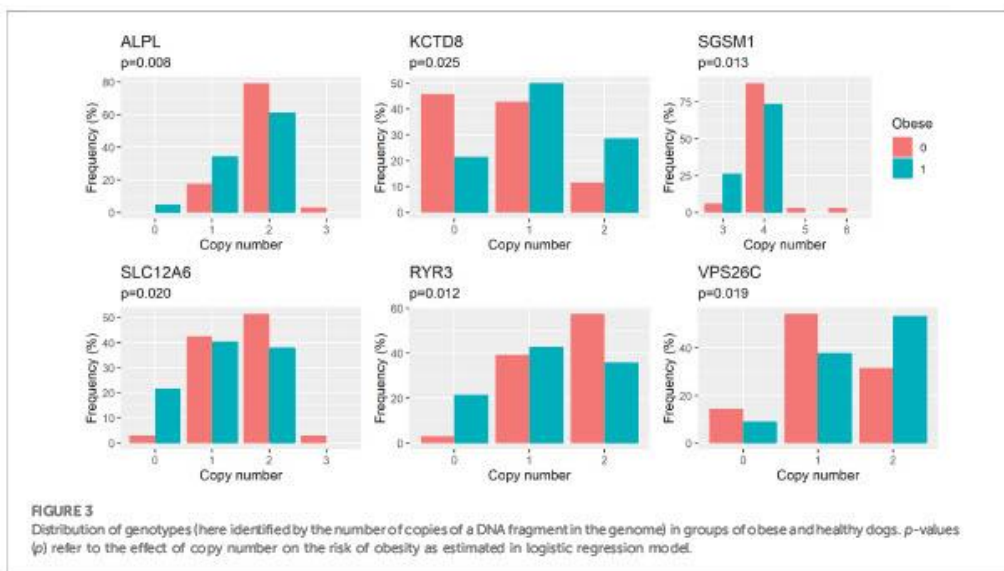
^cEstimated effect in kg per copy and the corresponding standard error as estimated in general linear model.

^dOdds ratio (OR) and the corresponding 95% confidence interval (95%CI) as estimated in logistic regression for binary trait. Odds ratio = 1 indicates no difference between the groups. Values <0.05 are highlighted in bold.



In this study, our focus was on structural polymorphisms in the dog genome. Generally, structural polymorphisms are less prevalent than short variants, but their potential impacts can be anticipated to be relatively significant and easier to detect in

small populations. While copy number variations (CNVs) have not been as extensively investigated as short variants, there is compelling evidence linking certain CNVs to BMI in humans. For instance, such variants have been identified near the



NEGR1, *GPRCSB*, and *PPYRI* genes (Willer et al., 2009; Speliotes et al., 2010; Jarick et al., 2011). Additionally, the 1p21.1 multi-allele CNV encompasses *AMY1A*, which encodes salivary α -amylase.

We did not find any evidence linking dog obesity traits to structural variants in or near genes that are considered crucial for obesity development, such as genes involved in the leptin-melanocortin signalling pathway and genes important for neuronal circuitry development (e.g., *BDNF*, *NTRK2*, *SEMA3A-G*). In human and animal models, these genes often harbour rare mutations that are responsible for severe and early-onset obesity. Furthermore, it is increasingly recognized that variants in or near these genes influence the risk of common polygenic obesity in humans. Despite the dominance of studies on these genes in the field of obesity genetics, it appears unlikely that these genes alone account for a significant portion of the genetic variation in obesity. In human studies, genome-wide association studies (GWAS) for obesity-related traits have identified thousands of loci, the majority of which have unknown underlying mechanisms. Our research, limited to common structural variants, suggests that these variants may be involved in mechanisms that have yet to be understood.

We obtained preliminary evidence suggesting that variants in six genes warrant further investigation. In our study, a structural deletion near the *ALPL* (Alkaline Phosphatase, Biom mineralization Associated) gene was associated with reduced body weight and a higher risk of obesity. In humans, mutations in this gene have been linked to hypophosphatasia, an inherited condition that disrupts bone and teeth mineralization. Moreover, it is intriguing that this gene has also been associated with adaptive thermogenesis, which has garnered significant attention for its role in increasing systemic energy expenditure and combating obesity and diabetes. In mice, the targeted removal of *ALPL* specifically in adipocytes leads to decreased overall energy expenditure and the onset of obesity, without affecting movement or feeding behavior (Sun et al., 2021). These

findings highlight the potential importance of *ALPL* in regulating energy balance and adiposity.

We have obtained statistical evidence suggesting that a structural deletion in or near the *KCTD8* (Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 8) gene could potentially increase body condition score. Additionally, it has been reported that an SNP in the Arabic population may be linked to diabetes (Musambil and Siddiqui, 2019). While clear associations between this gene and obesity traits are lacking, it is of interest due to its role in bitter and sweet taste signaling pathways. The gene is particularly highly expressed in the brain, but lower expression levels have also been observed in adipose tissue.

Our data also revealed that a duplication in the first intron of the *SGSM1* (Small G Protein Signaling Modulator 1) gene may lead to reduced body weight and a lower risk of obesity. The *SGSM1* gene is involved in GTPase activator activity and small GTPase binding activity, and it exhibits high expression levels in the brain. Interestingly, an intron variant in this gene has been associated with insulin measurement (Julienne et al., 2020).

We have demonstrated that deletions in or near the *SLC12A6* (Solute Carrier Family 12 Member 6) and *RYR3* (Ryanodine Receptor 3) genes are statistically associated with decreased body weight and a lower risk of obesity. These two genes are located in close proximity to each other on chromosome 30, and their effects on the two obesity traits are similar. In humans, mutations in the *SLC12A6* gene are generally associated with neuropathy (Bogdanova-Mihaylova et al., 2021), but there is no known connection between mutations in this gene and obesity-related traits, except for one genome-wide association study signal for BMI (Dong et al., 2018). Interestingly, the *SLC12A6* gene has been studied in both humans and dogs, revealing that truncating variants are responsible for movement disorders, although the phenotypes differ between species (Van Poucke et al., 2019).

The ryanodine receptor, encoded by the *RYR3* gene, plays a crucial role in releasing calcium from intracellular storage for various cellular processes, particularly in skeletal muscle contraction. It has been found that *RYR3* is under strong selection in sport-hunting genes (Kim et al., 2018). In humans, a single nucleotide polymorphism of this gene has been correlated with diabetes and hypertension, diseases associated with obesity (Gong et al., 2018). Genome-wide linkage analysis studies have also demonstrated a connection between polymorphism in the *RYR3* gene and the function of adiponectin in a Chinese population (Chang et al., 2016). In pigs, a short mutation in the *RYR1* gene, which is part of the intracellular calcium ion channel family like *RYR3*, is known to affect meat quality and fatness traits (Sadkowski et al., 2015). Additionally, an intronic variant in the human *RYR3* gene has been associated with hippocampal volume (Alliey-Rodriguez et al., 2019). Studies on rats have shown that obesity is associated with abnormal neuronal differentiation in the hippocampus (Liśkiewicz et al., 2021).

We also observed an association between a deletion near or in the *VPS26C* (VPS26 Endosomal Protein Sorting Factor C) gene and an increased risk of obesity. However, we are not aware of any studies that link this gene specifically to obesity.

In our studies, we did not observe any impact of the known deletion in the *POMC* gene on body weight or obesity. The reason behind our failure to detect the effect of the *POMC* gene may be

attributed to the rare occurrence of the deleterious variant in the homozygous genotype. It is plausible to assume that this deletion, which significantly disrupts gene function, follows a recessive pattern, thereby explaining our findings. We included the effect of *POMC* in all of our statistical models as a precautionary measure. In populations of limited size that lack substantial statistical power to detect significant sources of variation, incorporating a factor based solely on statistical significance can potentially lead to inaccuracies. Consequently, the inclusion of the *POMC* gene in the model was guided by existing knowledge that establishes its significance as a source of variation in Labrador.

Our association study is predicated upon a comparatively modest population, wherein a majority of individuals have not undergone sequencing. The extensive repertoire of association studies conducted within the human population has established that, owing to the vastness of the genome and the inherent role of chance, investigations involving small populations are particularly susceptible to yielding false positive outcomes. Although the mitigation of spurious associations is feasible through adjustments for both multiple testing and population stratification, these safeguards were not applicable in the context of our study. As alluded to earlier, a significant portion of individuals lacked complete genome screening, thus impeding a comprehensive accounting for potential population stratification. Given the constraints of the small sample size and the inherent limitations of a singular test, no provisions were made for multiple testing adjustments. Consequently, our findings should be regarded as moderately indicative statistical evidence that does not definitively resolve the matter of association but holds potential to inform and direct subsequent investigations.

Our research did not include a functional analysis, nor did we attempt to explain the mechanisms underlying the statistical associations described here. We acknowledge that elucidating such mechanisms will be challenging particularly because the genes identified as important for Labrador obesity traits in our research have not been studied in the context of human obesity thus far. However, irrespective of the underlying mechanism, confirming the statistical relationship between the identified structural variants and obesity can serve as an indirect objective in the breeding of Labrador.

In conclusion, we have provided statistical evidence suggesting that common structural mutations in or near six genes, namely, *ALPL*, *KCTD8*, *SGSM1*, *SLC12A6*, *RYR3*, and *VPS26C*, may play a role in the variability of body weight and body condition score in Labrador retriever dogs. These findings emphasize the need for additional research to validate the associations.

Data availability statement

Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: European Nucleotide Archive (PRJEB47658).

Ethics statement

The animal studies were approved by Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznań, Poland (31/2013). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional

requirements. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author contributions

Formal analysis: MA; Investigation, MA; Writing—original draft, MA; Writing—review and editing, MS; Supervision, MS; Project administration, MS; Funding acquisition, MS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland (project no. 2016/23/B/NZ2/01762).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Allley-Rodriguez, N., Grey, T. A., Shafiq, R., Asif, H., Intra, O., Bolo, N. R., et al. (2019). NRXN1 is associated with enlargement of the temporal horns of the lateral ventricles in psychosis. *Transl. Psychiatry* 17, 230. doi:10.1038/s41398-019-0564-9
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M., Maqbool, K., Webster, M. T., Persolki, M., et al. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495, 360–364. doi:10.1038/nature11837
- Bogdanova-Mihaylova, P., McNamara, P., Burton-Jones, S., and Murphy, S. M. (2021). Expanding the phenotype of SLC12A6-associated sensorimotor neuropathy. *BMJ Case Rep.* 27, e244641. doi:10.1136/bcr-2021-244641
- Chang, Y., Chiu, Y., He, Ch., Sheu, W. H., Lin, M., Seto, T. B., et al. (2016). Genome-wide linkage analysis and regional fine mapping identified variants in the RYR3 gene as a novel quantitative trait locus for circulating adiponectin in Chinese population. *Med. Baltim.* 95, e5174. doi:10.1097/MD.00000000000005174
- Courcier, E. A., Thomson, R. M., Mellor, D. J., and Yam, P. S. (2010). An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *J. Small Anim. Pract.* 51, 362–367. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00933.x
- Dong, J., Levine, D. M., Buss, M. F., Zhang, R., Onstad, L., Fitzgerald, R. C., et al. (2018). Interactions between genetic variants and environmental factors affect risk of esophageal Adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1598–1606.e1. doi:10.1016/j.cgh.2018.03.007
- Fujii, J., Otsu, K., Zorato, F., de Leon, S., Khanna, V. K., Weller, J. E., et al. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253 (5018), 448–451. doi:10.1126/science.1862346
- Gong, S., Bin, Su, B., Tovar, H., Mao, Ch., Gonzalez, V., Liu, Y., et al. (2018). Polymorphisms within RYR3 gene are associated with risk and age at onset of hypertension, diabetes, and Alzheimer's disease. *Am. J. Hypertens.* 31, 818–826. doi:10.1093/ajh/hpy046
- Ionita-Laza, I., Rogers, A. J., Lange, C., Raby, B. A., and Lee, C. (2009). Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics* 93, 22–26. doi:10.1016/j.ygeno.2008.08.012
- Jarick, I., Vogel, C. L., Scherag, S., Schäfer, H., Hebebrand, J., Hinney, A., et al. (2011). Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum. Mol. Genet.* 20, 840–852. doi:10.1093/hmg/ddq518
- Julienne, H., Lechat, P., Guillemot, V., Lasry, C., Yao, C., Araud, R., et al. (2020). Jacc command line and web interface for the joint analysis of GWAS results. *Nar. Genom. Bioinform.* 2, lqaa003. doi:10.1093/nar/gb/lqaa003
- Kim, J., Williams, F. J., Dreger, D. L., Plassais, J., Davis, B. W., Parker, H. G., et al. (2018). Genetic selection of athletic success in sport-hunting dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E7212–E7221. doi:10.1073/pnas.1800455115

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2023.1235821/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE S1

Manhattan plot for chromosomal regions potentially associated with obesity in Labrador retrievers. P-values are derived from the comparison of the frequency of structural variants between the groups of obese and healthy dogs using the CoNVaQ tool. Only 1291 regions with p-values > 0.05 are shown. Chromosome 39 represents the X chromosome.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2

The score plot for the first two principal components for the sample of 50 dogs.

- Larsen, S. J., do Couto, L. M., Rogatto, S. R., and Baumbach, J. (2018). CoNVaQ: A web tool for copy number variation-based association studies. *BMC Genomics* 19, 369. doi:10.1186/s12864-018-4732-8

León-Mimila, P., Villamil-Ramírez, H., López-Contreras, B., Morán-Ramos, S., Macías-Kaufner, L. R., Acuña-Alojzo, V., et al. (2018). Low salivary amylase gene (AMY1) copy number is associated with obesity and gut prevotella abundance in Mexican children and adults. *Nutrients* 10, 1607. doi:10.3390/nu10111607

Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595. doi:10.1093/bioinformatics/btp698

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Han, J., et al. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352

Liśkiewicz, A. D., Liśkiewicz, D., Marczak, Ł., Przytyła, M., Grabowska, K., Student, S., et al. (2021). Obesity-associated deterioration of the hippocampus is partially restored after weight loss. *Brain Behav. Immun.* 96, 212–226. doi:10.1016/j.bbi.2021.05.030

Liu, Y., Smith, C. E., Parnell, L. D., Lee, Y., An, P., Straka, R. J., et al. (2020). Salivary AMY1 copy number variation modifies age-related type 2 diabetes risk. *Clin. Chem.* 66, 718–726. doi:10.1093/clinchem/hvz072

Mankowska, M., Stachowiak, M., Graczyk, A., Ciazynska, P., Gogulski, M., Nizanski, W., et al. (2016). Sequence analysis of three canine adipokine genes revealed an association between TNF polymorphisms and obesity in Labrador dogs. *Anim. Genet.* 47, 245–249. doi:10.1111/age.12390

Mankowska, M., Krzeminska, P., Graczyk, M., and Switonicki, M. (2017). Confirmation that a deletion in the POMC gene is associated with body weight of Labrador retriever dogs. *Res. Vet. Sci.* 112, 116–118. doi:10.1016/j.rvsc.2017.02.014

Mao, J., Xia, Z., Chen, J., and Yu, J. (2013). Prevalence and risk factors for canine obesity surveyed in veterinary practices in Beijing, China. *Prev. Vet. Med.* 112, 438–442. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.08.012

Mejía-Benítez, M. A., Bomefont, A., Yengo, L., Huyvaert, M., Dechaume, A., Peralt-Romero, J., et al. (2015). Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia* 58, 290–294. doi:10.1007/s00125-014-3441-3

Miyabe, M., Gin, A., Onozawa, E., Daiton, M., Yamada, H., Yamada, H., et al. (2015). Genetic variants of the unsaturated fatty acid receptor GPR120 relating to obesity in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 1201–1206. doi:10.1292/jvms.15-0031

Mugnier, A., Morin, A., Collard, P., Devaux, L., Delmas, M., Adib-Lesaux, A., et al. (2020). Association between birth weight and risk of overweight at adulthood in Labrador dogs. *PLoS One* 15, e0243820. doi:10.1371/journal.pone.0243820

- Musambill, M., and Siddiqui, K. (2019). Genetics and genomics studies in type 2 diabetes: A brief review of the current scenario in the arab region. *Diabetes Metab. Syndr.* 13, 1629–1632. doi:10.1016/j.dsx.2019.03.017
- Plassais, J., Rimbaud, M., Williams, F. J., Davis, B. W., Schoenebeck, J. J., and Ostrander, E. A. (2017). Analysis of large versus small dogs reveals three genes on the canine X chromosome associated with body weight, muscling and back fat thickness. *PLoS Genet.* 13, e1006661. doi:10.1371/journal.pgen.1006661
- Raffan, E., Dennis, R. J., O'Donovan, C. J., Becker, J. M., Scott, R. A., Smith, S. P., et al. (2016). A deletion in the canine POMC gene is associated with weight and appetite in obesity-prone Labrador retriever dogs. *Cell. Metab.* 23, 893–900. doi:10.1016/j.cmet.2016.04.012
- Rausch, T., Zickler, T., Schlattl, A., Stutz, A. M., Benes, V., and Korbel, J. O. (2012). Delly: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* 28, i333–i339. doi:10.1093/bioinformatics/bts378
- Sadkowiak, S., Molińska-Glura, M., Moliński, K., Szczepankiewicz, D., Świątoński, M., and Szydlowski, M. (2015). A well-known mutation in RYR1 alters distribution of adipose tissue in gilts. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 33, 147–154.
- Soylev, A., Le, T., Amini, H., Alkan, C., and Hormozdiani, F. (2019). Discovery of tandem and interspersed segmental duplications using high throughput sequencing. *Bioinformatics* 35, 3923–3930. doi:10.1093/bioinformatics/btz237
- Spillotes, E., Willer, C., Berndt, S., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., et al. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* 42, 937–948. doi:10.1038/ng.686
- Strandberg, E., Andersson, L., Emanuelson, U., Björnvad, C. R., Ringmark, S., Hedhammar, Å., et al. (2023). Heritability and genetic trend of body weight in dogs of different breeds in Sweden. *J. Anim. Sci.* 101, skad173. doi:10.1093/jas/skac173
- Sun, Y., Rahbani, J. F., Jedrychowski, M. P., Riley, C. L., Vidoni, S., Bogowski, D., et al. (2021). Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. *Nature* 593, 580–585. doi:10.1038/s41586-021-03533-z
- Świątoński, M., and Mankowska, M. (2013). Dog obesity: the need for identifying predisposing genetic markers. *Res. Vet. Sci.* 95, 831–836. doi:10.1016/j.rvsc.2013.08.015
- Szyniewski, M., and Szydlowski, M. (2023). A study of 41 canine orthologues of human genes involved in monogenic obesity reveals marker in the ADCY3 for body weight in Labrador Retrievers. *Vet. Sci.* 10, 390. doi:10.3390/vetsci10060390
- Szydlowski, M., and Antkowiak, M. (2022). No evidence that long runs of homozygosity tend to harbor risk variants for polygenic obesity in Labrador retriever dogs. *J. Appl. Genet.* 63, 557–561. doi:10.1007/s13353-022-00693-0
- Teo, S. M., Pawitan, Y., Ku, C. S., and Salim, A. (2012). Statistical challenges associated with detecting copy number variations with next-generation sequencing. *Bioinformatics* 28, 2711–2718. doi:10.1093/bioinformatics/bts535
- Tvarijonaviciute, A., Ceron, J. J., Holden, S. L., Cuthbertson, D. J., Bourge, V., Morris, P. J., et al. (2012). Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: A comparison with human metabolic syndrome. *BMC Vet. Res.* 8, 147. doi:10.1186/1746-6148-8-147
- Van Poucke, M., Stee, K., Sonck, L., Stock, E., Bossele, L., Van Dorpe, J., et al. (2019). Truncating SLC12A6 variants cause different clinical phenotypes in humans and dogs. *Eur. J. Hum. Genet.* 27, 1561–1568. doi:10.1038/s41431-019-0432-3
- Wallis, N., and Raffan, E. (2020). The genetic basis of obesity and related metabolic diseases in humans and companion animals. *Genes (Basel)* 20, 1378. doi:10.3390/genes11111378
- Willer, C. J., Spillotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., et al. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41, 25–34. doi:10.1038/ng.287
- Zeng, R., Zhang, Y., and Du, P. (2014). SNPs of melanocortin 4 receptor (MC4R) associated with body weight in Beagle dogs. *Exp. Anim.* 63, 73–78. doi:10.1538/expanim.63.73

12. Oświadczenia

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że udział mgr Michała Antkowiaka w publikacji:

Antkowiak Michał, Szczerbal Izabela, Nowacka-Woszek Joanna, Świtoński Marek, Szydłowski Maciej (2019). No association between *AMY2B* gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs, Animal Genetics, 50:552-553.

Stanowił 55% i polegał na:

- Izolacji DNA z materiału biologicznego
- Udziale w optymalizacji i wykonaniu emulsyjnego PCR
- Udziale w przeprowadzeniu analizy statystycznej
- Udziale w interpretacji wyników
- Napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i udziale w dalszej edycji
- Przygotowaniu ryciny do manuskryptu
- Udziale w odpowiedzi na recenzje

Współautorzy:

Prof. dr hab. I. Szczerbal

Prof. UPP dr hab. J. Nowacka-Woszek

Prof. dr hab. Świtoński M., czł. PAN, dr h.c.

Prof. dr hab. M. Szydłowski
(autor korespondencyjny)

I. Szczerbal
J. Nowacka-Woszek
M. Świtoński
M. Szydłowski

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że udział mgr Michała Antkowiaka w publikacji:

Antkowiak Michał, Nowacka-Woszek Joanna, Szczerbal Izabela, Świtoński Marek, Szydłowski Maciej, (2020) *AMY2B Gene Copy-Number Variation Studied by Droplet Digital PCR (ddPCR) in Three Canids: Red Fox, Arctic Fox, and Chinese Raccoon Dog*. Folia Biologica (Kraków), 68:51-55.

Stanowił 60% i polegał na

- Izolacji DNA z materiału biologicznego
- Udziale w optymalizacji i wykonaniu emulsyjnego PCR
- Udziale w interpretacji wyników
- Przeprowadzeniu analizy statystycznej
- Napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i udziale w dalszej edycji
- Przygotowaniu wykresu i ryciny do manuskryptu
- Udziale w odpowiedzi na recenzje

Współautorzy:

Prof. UPP dr hab. J. Nowacka-Woszek

Prof. dr hab. I. Szczerbal

Prof. dr hab. Świtoński M., czł. PAN, dr h.c.

Prof. dr hab. M. Szydłowski
(autor korespondencyjny)

M. Nowacka-Woszek
.....
I. Szczerbal
.....
M. Świtoński
.....
M. Szydłowski
.....

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział mgra Michał Antkowiaka w artykule:

Antkowiak Michał, Szydłowski Maciej, Uncovering Structural Variants Associated with Body Weight and Obesity Risk in Labrador Retrievers: A Genome-Wide Study. Praca zaakceptowana 11.09.2023 do publikacji w czasopiśmie *Frontiers in Genetics*, DOI:10.3389/fgene.2023.1235821

Stanowił 75% i polegał na:

- Udziale w typowaniu genów do analizy
- Zaprojektowaniu starterów i sond molekularnych
- Izolacji DNA z materiału biologicznego
- Optymalizacji i wykonaniu reakcji emulsyjnego PCR
- Udziale w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- Napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i udziale w dalszej edycji
- Udziale w odpowiedzi na recenzje
- Przygotowaniu ryciny

Współautor:

Prof. dr hab. Maciej Szydłowski

(autor korespondencyjny)

