



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Mgr inż. Mateusz Sypniewski

Rozprawa doktorska

Podstawy całogenomowej oceny ryzyka otyłości psa
domowego (*Canis lupus familiaris*)

Dyscyplina: Zootechnika i rybactwo

Praca wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Macieja Szydłowskiego

Poznań, 2023

Wykaz przygotowanych raportów naukowych:

Rozprawę doktorską przygotowano w oparciu o dwa własne anglojęzyczne raporty naukowe, w tym jeden stanowiący oryginalny artykuł naukowy opublikowany w czasopiśmie spełniającym wymogi Rady Dyscypliny Zootechnika i rybactwo UP w Poznaniu, oraz drugi - złożony do redakcji czasopisma spełniającego podobne wymogi. Raporty naukowe stanowią załączniki do przedłożonej rozprawy doktorskiej i stanowią jej integralną część.

Raport naukowy 1. Sypniewski, M.; Szydłowski, M. 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.* 2023, 10, 390.

<https://doi.org/10.3390/vetsci10060390>

2-letni IF`21 = 2.518

Punkty MEiN = 20

Udział Kandydata: 90%

Raport naukowy 2. Sypniewski M., Szydłowski M. Variants in *ADCY3* gene are associated with body condition score in Labrador Retrievers.

Manuskrypt zgłoszony do publikacji w redakcji czasopisma spełniającego wymogi Rady Dyscypliny Zootechnika i rybactwo UP Poznań.

Udział Kandydata: 90%

Wykaz skrótów	4
Streszczenie	5
Abstract	6
Wstęp	7
Miary otyłości psów	8
Czynniki ryzyka otyłości.....	8
Czynniki pozagenetyczne	8
Czynniki genetyczne	9
Otyłość monogeniczna	11
Otyłość wielogeniczna.....	12
Czynniki epigenetyczne.....	15
Podłoże genetyczne otyłości u psów.....	16
Hipoteza i cel badań	17
Materiały i metody	18
Zwierzęta i fenotypy	18
Genotypy	19
Badanie asocjacyjne masy ciała	19
Badanie asocjacyjne BCS	20
Wyniki	22
Badanie asocjacyjne masy ciała	22
Badania asocjacyjne BCS	22
Dyskusja.....	23
Gen <i>ADCY3</i>	30
Znaczenie krótkich mutacji intronowych.....	33
Gen <i>POMC</i>	34
Wnioski.....	35
Bibliografia	35

Tabele.....	47
Ryciny.....	50
Przygotowane raporty naukowe.....	54

Wykaz skrótów

pz – pary zasad

BCS – Body Condition Score

SHAPE - Size, Health and Physical Evaluation

BMI – Body Mass Index

MAF – Minor Allele Frequency

SNP – Single Nucleotide Polimorphism

CNV – Copy Number Variation

WGS – Whole Genome Sequencing

WES – Whole Exome Sequencing

GWAS – Genome Wide Association Study

LD – Linkage Disequilibrium

OR – Odds Ratio

CI – Confidence Interval

FWER – Family Wise Error Rate

scRNA-seq – single cel RNA sequencing

cAMP – cyclic AMP

PCA – Principal Component Analysis

Streszczenie

Otyłość jest częstym schorzeniem u psów, ale indywidualna podatność różni się w zależności od wielu czynników ryzyka. Obok znanych czynników pozagenetycznych tj. diety, wieku czy sterylizacji, w występowaniu otyłości biorą udział również czynniki genetyczne i epigenetyczne. Psy rasy labrador retriever to jedna z ras znanych ze swoich predyspozycji do otyłości. Celem tej pracy była analiza związku między otyłością definiowaną w skali BCS oraz masą ciała 50 psów rasy labrador retriever, a markerami w genach związanych z otyłością monogeniczną u ludzi. W przedstawianych badaniach przeanalizowałem ortologi psa dla 41 genów człowieka. W badaniu masy ciała przeanalizowałem 11520 wariantów przy użyciu liniowego modelu mieszanego uwzględniającego płeć, wiek i sterylizację jako efekty stałe oraz strukturą populacji jako efekt losowy. Oszacowania uzyskane z modelu poddano procedurze permutacji maxT w celu skorygowania p-wartość o FWER $<0,05$. Jeden marker w genie *ADCY3* przekroczył próg istotności $0,05 < \alpha$. Wykrytym markerem jest delecja TA>T z p-wartość = $5,83 \times 10^{-5}$ zlokalizowana w 17: 19 222 459 w 1/20 intronie *ADCY3*. Wielkość efektu 17:19222459 TA>T wynosi 5,56 kg (SE 0,018), co oznacza, że nosiciele delekcji są średnio o 5,56 kg ciężsi na jedną kopię allelu. W badaniu skali BCS przeanalizowałem 1135 wariantów przy użyciu regresji logistycznej, z płcią, wiekiem i sterylizacją jako efektami stałymi. Dodatkowo, w celu znalezienia tylko nowych mutacji, znana 14 pz delecja *POMC* została uwzględniona jako efekt stały. Tylko dwa warianty, oba w genie *ADCY3*, wykazały istotność statystyczną. Jednym z nich jest nowa mutacja C>T w pozycji 17:19167157 w intronie 8/20 (p-wartość = 0,012); drugą jest mutacja G>A w pozycji 17:19180869 (rs22557040) w intronie 2/20 (p-wartość = 0,012). Dla każdego z dwóch markerów OR wyniósł 0,044 (95% CI: 0,007–0,264), co oznacza, że pies z markerem T w pozycji 17:19167157 lub markerem A w pozycji 17:19180869 ma znacznie mniejsze szanse rozwinięcia otyłości niż pies bez tych markerów. Wyniki mojej pracy wskazują na gen *ADCY3* jako ważny dla otyłości psów rasy labrador retriever. Wiadomo już, że mutacje w genie *ADCY3* są związane z otyłością u myszy i ludzi, co czyni polimorfizm genu *ADCY3* psa obiecującym celem dalszych badań.

Abstract

Obesity is a common condition in dogs, but individual susceptibility varies based on many risk factors. In addition to environmental factors, such as diet, age or sterilization, genetic and epigenetic factors are also involved in the susceptibility to obesity. Labrador Retrievers are one of the breeds known for their predisposition to obesity. The aim of this study was to analyze the relationship between obesity defined as BCS and body weight of 50 Labrador retrievers and markers of genes associated with monogenic obesity in humans. For this thesis I analyzed canine orthologs for 41 human genes. In the body weight study I analyzed 11,520 variants using a linear mixed model with gender, age, and sterilization as fixed effects, and population structure as a random effect. The estimates obtained from the model were subjected to the maxT permutation procedure in order to adjust the p-wartość by FWER <0.05 . One marker in the *ADCY3* gene exceeded the significance threshold of 0.05. The detected marker is a TA>T deletion with p-wartość = 5.83×10^{-5} located at 17:19,222,459 in the 1/20th intron of *ADCY3*. The effect size of 17:19222459 TA>T is 5.56 kg (SE 0.018), which means that carriers of the deletion are on average 5.56 kg heavier per allele copy. In the BCS study I analyzed 1,135 variants using logistic regression with sex, age, and sterilization as fixed effects. Additionally, to find only new mutations, the 14 bp *POMC* deletion was included as a fixed effect. Only two markers, both in the *ADCY3* gene, showed statistical significance. One of them is a new C>T mutation at position 17:19167157 in intron 8/20 (p-wartość = 0.012), the second is the G>A mutation at position 17:19180869 (rs22557040) in intron 2/20 (p-wartość = 0.012). For each of the two markers, the OR was 0.044 (95% CI: 0.007–0.264), which means that a dog with marker T at position 17:19167157 or marker A at position 17:19180869 has about 22 times less chance of developing obesity than a dog without these markers. The results of my work indicate new potential loci associated with obesity in Labrador retrievers. Mutations in the *ADCY3* gene are already known to be associated with obesity in mice and humans, making them promising markers for obesity studies in dogs.

Wstęp

Otyłość jest chorobą przewlekłą zarejestrowaną w Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób (ICD-10) pod numerem E66 i w swoim przebiegu charakteryzuje się nieprawidłowym lub nadmiernym nagromadzeniem tkanki tłuszczowej na skutek zaburzonej zdolności do wykorzystywania energii czerpanej z pożywienia. Podobnie jak w przypadku człowieka, na przestrzeni kilku ostatnich dziesięcioleci odnotowuje się znaczny wzrost występowania otyłości. Szacuje się, że w krajach rozwiniętych z których pochodzi większość doniesień literaturowych, częstość występowania otyłości u psów waha się w przedziale 19,7 – 59,3% (Bjørnvaad i in. 2019; Mason 1970; Edney i Smith 1986; Robertson 2003; McGreevy i in. 2005; Colliard i in. 2006; Lund i in. 2006; Courcier i in. 2010). Badanie przeprowadzone w 2019 w Danii na 21 rasach psów wykazało, że spośród 268 przebadanych zwierząt 20,5% stanowiły osobniki otyłe (Bjørnvaad i in. 2019). W 2005 roku w Australii stwierdzono, że spośród 2661 psów 33,5% miało stwierdzoną nadwagę, a 7,6% zdiagnozowaną otyłość (McGreevy i in. 2005). Badanie przeprowadzone w USA na populacji 21754 psów różnych ras wykazało, że 34% przebadanych zwierząt jest otyłych (Lund i in. 2006). W badaniu przeprowadzonym w Polsce, w próbie 185 psów prawie 25% zostało zaklasyfikowanych jako otyłe (Mankowska i in. 2017). Powyższe przykłady wskazują, że otyłość u psów jest obecnie zjawiskiem powszechnym. Rozwój otyłości u psa ma dla osobnika poważne konsekwencje zdrowotne. Tak jak w przypadku człowieka, otyłość prowadzi do rozwoju chorób układu krążenia, insulinooporności, cukrzycy czy zwyrodnienia stawów (Mankowska i in. 2017; Mao i in. 2013). Zapobieganie i walka z nadwagą i otyłością oznacza więc zachowanie lub przywrócenie zdrowego komfortu życia psa, a dla opiekuna zmniejszenie kosztów wynikających z usług weterynaryjnych.

Miary otyłości psów

Pomiaru stopnia otłuszczenia psa można dokonywać za pomocą tzw. Body Condition Score (BCS), czyli metody polegającej na łącznej ocenie dotykowej i wizualnej (Laflamme 1997). Obecnie istnieją co najmniej trzy systemy oceny otłuszczenia oparte na BCS, wszystkie polegające na badaniu wizualnym i dotykowym, ale wykorzystujące różne skale oceniania. Wyróżniamy system 5-punktowy (1 = wychudzony, 2 = niedowaga, 3 = w normie, 4 = nadwaga, 5 = otyłość), oraz 6 i 9-punktowy (1 = wychudzony, 2 = niedowaga, 3 = szczupły, 4 oraz 5 = w normie, 6 = lekka nadwaga, 7 = nadwaga, 8 oraz 9 = otyłość) (Mawby i in. 2004; Lund i in. 1999; McGreevy i in. 2005; Scarlett i Donoghue 1998). Niezależnie od obranej skali BCS, szacuje się, że na każdy punkt skali przypada ok. 6,5 – 7,2% zmiana w masie ciała (Witzel i in. 2014) oraz 5% zmiana w stopniu otłuszczenia (Mawby i in. 2004).

Istnieje również alternatywa dla systemu BCS pod postacią systemu SHAPE (z ang. Size, Health and Physical Evaluation; German 2006). System SHAPE jest oparty na 7 punktowej skali złożonej z klas oznaczonych literami A-G. Analogicznie do systemu BCS, po wykonaniu badania wizualnego i dotykowego pies zostaje przypisany do określonej klasy, gdzie A = niedowaga, B oraz C = szczupły, D = w normie, E oraz F = nadwaga i G = otyłość.

Czynniki ryzyka otyłości

Czynniki pozagenetyczne

Temat identyfikacji czynników ryzyka otyłości u psów podejmowano na przestrzeni lat wielokrotnie, w licznych badaniach. Do najważniejszych czynników pozagenetycznych możemy zaliczyć wpływy środowiskowe wynikające ze współdzielenia środowiska z człowiekiem, w tym głównie złe nawyki żywieniowe oraz brak aktywności fizycznej.

Nawyki żywieniowe, rozumiany tutaj jako nabyta skłonność opiekuna do nieprawidłowego żywienia psa, często stanowi istotny czynnik ryzyka otyłości w domostwach z niskim dochodem, gdzie dostęp do wysokiej jakości karmy jest utrudniony (Kienzle, Bergler, i Mandernach 1998; Courcier i in. 2010). Należy

przypuszczać, że niezależnie od warunków ekonomicznych panujących w gospodarstwie domowym, znaczną rolę w rozwoju otyłości stanowić może nadmierne żywienie psa towarzyszące zaspakajaniu przez opiekuna własnego głodu emocjonalnego. Karmienie psów raz dziennie (Robertson 2003; Colliard i in. 2006; Bland i in. 2009; Muñoz-Prieto i in. 2018) lub więcej niż trzy razy dziennie (Bland i in. 2009) może przyczyniać się do otyłości.

Interesującym aspektem jest wpływ więzi pomiędzy psem i opiekunem, a otyłością. W badaniu z 1998 stwierdzono, że opiekunowie otyłych psów wykazują skłonności do antropomorfizacji swoich psów, pozwalając im na spanie w łóżku, rozmawiając z nimi i spędzając więcej czasu na karmieniu ich (Kienzle, Bergler, i Mandernach 1998). Uzyskane wyniki zostały potwierdzone w 2012 roku, a dodatkowo zaobserwowano, że opiekunowie z wysokim BMI byli bardziej przywiązani do swoich psów (Stephens i in. 2012).

Wiek właścicieli również wywiera istotny wpływ na wystąpienie otyłości u psów. Z wiekiem spada aktywność fizyczna u ludzi prowadząc do skracania czasu aktywności fizycznej u psów i w konsekwencji do rozwoju otyłości (Mason 1970; Courcier i in. 2010). Kolejną grupą czynników ryzyka otyłości są indywidualne cechy biologiczne. Liczne badania wskazują, że otyłość występuje częściej u samic niż u samców oraz u osobników wysterylizowanych (Mason 1970; McGreevy i in. 2005; Colliard i in. 2006; Lund i in. 2006; Usui, Yasuda, i Koketsu 2016; Sallander i in. 2010; Mao i in. 2013; German i in. 2017). Zaobserwowano również, że ryzyko otyłości wzrasta wraz z wiekiem (Robertson 2003; Colliard i in. 2006; Courcier i in. 2010; Mao i in. 2013; German i in. 2017), chociaż część badań wskazuje, że psy w wieku 6-10 lat są obciążone wyższym ryzykiem niż psy powyżej 10 roku życia (Mason 1970; McGreevy i in. 2005; Lund i in. 2006; Usui, Yasuda, i Koketsu 2016; Kronfeld, Donoghue, i Glickman 1991).

Czynniki genetyczne

Częstość występowania otyłości w populacji jest uzależniona od czynników środowiskowych, jednakże predyspozycje do otyłości pozostają pod znacznym wpływem czynników genetycznych. Oznacza to, że psy charakteryzują się zróżnicowaną odpowiedzią organizmu na obecność tych samych, środowiskowych czynników ryzyka. Relatywnie łatwym w identyfikacji i podstawowym czynnikiem

genetycznym jest rasa psa. Odnotowuje się zróżnicowanie ras w odniesieniu do częstości występowania otyłości. W badaniu przeprowadzonym w 2006 roku na 21754 psach stwierdzono, że ponad 30% osobników wśród ras cocker spaniel, beagle, labrador retriever, golden retriever, owczarek szetlandzki, rottweiler oraz rasy mieszanej stanowiły psy z nadwagą, podczas gdy wśród ras owczarek niemiecki, shih tzu i pudel liczba przypadków nie przekraczała 25% (Lund i in. 2006).

Rola innych czynników genetycznych, mających znaczenie dla zmienności między osobnikami tej samej rasy, jest złożona i trudna do zidentyfikowania, a jej wyjaśnieniu nie sprzyja ograniczona ilość badań nad uwarunkowaniem otyłości u psów. Mając na uwadze powyższe, genetyczne podłoże otyłości zostanie omówione w oparciu o badania na człowieku i mysich modelach, stanowiących główne źródło wiedzy w tym zakresie. Dotychczasowe badania sugerują jednak, że genetyczne podstawy rozwoju otyłości człowieka, myszy, psa oraz ogólnie, ssaków są w dużym stopniu wspólne.

Podstawowym opisem ilościowego udziału czynników genetycznych w kształtowaniu zmienności otyłości w populacji jest współczynnik odziedziczalności. Odziedziczalność odpowiada na pytanie, na ile zróżnicowanie w występowaniu otyłości w populacji jest warunkowane przez czynniki genetyczne. Szacowanie odziedziczalności wymaga zebrania danych fenotypowych od osobników między którymi istnieje różny stopień spokrewnienia. Badania przeprowadzone na bliźniakach oraz rodzinach szacują odziedziczalność otyłości na poziomie 40 – 70% (Maes, Neale, i Eaves 1997; Elks i in. 2012). Średnie i wysokie wartości wskaźnika odziedziczalności odnotowuje się także dla różnych cech otłuszczenia u świń, w tym dla grubości tkanki podskórnej i procentowym udziale tłuszczu w mięśniach. Podobne wartości odziedziczalności dla różnych cech otłuszczenia u różnych gatunków ssaków pozwalają przypuszczać, że również u psów otyłość i cechy otłuszczenia są co najmniej średnio odziedziczalne.

Duży udział czynników genetycznych uzasadnia badania nad identyfikacją mutacji predysponujących do otyłości. Dotychczasowe wyniki pozwalają wyróżnić dwa rodzaje otyłości: otyłość monogeniczną oraz otyłość wielogeniczną (poligeniczną). Otyłość monogeniczna jest u człowieka rzadka i charakteryzuje się występowaniem pojedynczej mutacji mającej ogromny wpływ na funkcjonowanie całych genów i szlaków metabolicznych. Otyłość ma skrajnie silny charakter i pojawia się już we

wczesnym etapie życia, nawet w środowisku wolnym od dodatkowych pozagenetycznych czynników ryzyka.

W przypadku otyłości wielogenicznej, będącej zjawiskiem powszechnym, akumulacja w pojedynczym genomie wielu mutacji o małym, indywidualnym wpływie składa się całościowo na podwyższoną predyspozycję do rozwoju otyłości, która nasila się zwłaszcza w sprzyjających jej warunkach środowiskowych. Warto zaznaczyć, że pomimo wyróżnienia tych dwóch kategorii, badania Chami i in. 2020 nad związkiem otyłości z mutacjami w genie *MC4R* sugerują, że punktowe mutacje i predyspozycje wielogeniczne mogą wzajemnie wzmacniać lub osłabiać swój wpływ na rozwój otyłości. Ponieważ przypadki otyłości monogenicznej pojawiają się w całym spektrum genomów, do najtrudniejszych przypadków otyłości należą te, u których predyspozycja wynika zarówno z obecności pojedynczego szkodliwego wariantu, jak i akumulacji szkodliwych poligenów.

Otyłość monogeniczna

Molekularne podłoże otyłości monogenicznej objawia się w występowaniu rzadkich mutacji zaburzających funkcjonowanie pojedynczych genów. Charakterystyczną cechą otyłości o podłożu monogenicznym jest jej wystąpienie w nasilonym stopniu na wczesnym etapie życia, co znacząco ułatwia identyfikację przyczyny zaburzenia. Pierwsze kroki w badaniu otyłości monogenicznej podejmowano badając mysie modele otyłości i cukrzycy (Ingalls, Dickie, i Shell 1950; Hummel, Dickie, i Coleman 1966). Przełomem były badania nad genem *obesity* (*ob*), kodującym leptynę oraz genem *diabetes* (*db*) kodującym receptor leptyny. Myszy będące nosicielami dwóch kopii genu *ob* (opisanego później jako *LEP*) wykazywały skrajną otyłość (Zhang i in. 1994). Natomiast, myszy będące nosicielami dwóch kopii genu *db* (późniejszy *LEPR*) wykazywały skrajną otyłość oraz cukrzycę w sposób porównywalny z chorobliwą otyłością u człowieka (Ingalls, Dickie, i Shell 1950; Hummel, Dickie, i Coleman 1966; Abnormal splicing of the lepin receptotr in diabetic mouse) Przeprowadzając badania na linii myszy *agouti lethal yellow* wykryto, że otyłość u badanych myszy jest spowodowana przez rearanżację w regionie promotorowym tzw. genu *agouti*, odpowiedzialnego za powstawanie peptydu będącego antagonistą receptorów melanokortyny 1 oraz 4 (MC1R oraz MC4R) (D. Lu i in. 1994; Fan i in.

1997). Leptyna i melanokortyna stanowią część jednego z najważniejszych szlaków metabolicznych związanych z rozwojem otyłości tj. szlaku leptyny – melanokortyny.

Postępy w sekwencjonowaniu DNA doprowadziły do poszerzenia badań nad otyłością monogeniczną o sekwencjonowanie genomu. Nowa technika badawcza umożliwiła badanie całego genomu pod kątem mutacji powiązanych z otyłością. Istnieje kilka badań, w których techniki sekwencjonowania genomu przyczyniły się do identyfikacji szlaków metabolicznych oraz genów związanych z rozwojem otyłości. Przykładem takich odkryć są semaforyny klasy 3 (SEMA3A – G), czyli białka kierujące rozwojem niektórych neuronów podwzgórza produkujących proopiomelanokortynę (POMC; Van Der Klaauw i in. 2019). Kolejnym przykładem jest badanie przeprowadzone na 73 spokrewnionych rodzinach w populacji pakistańskiej. Wykazano, że mutacje w genach *LEPR* i *MC4R*, które zaburzają szlak leptyny – melanokortyny występują u 30% otyłych dzieci (Saeed i in. 2015).

Otyłość wielogeniczna

Na obraz otyłości wielogenicznej składają się mutacje w obrębie wielu genów. Chociaż pojedynczo, wpływ tych mutacji jest niewielki, ich akumulacja może doprowadzić do rozwinięcia predyspozycji do otyłości. Badania w tej dziedzinie stanowią duże wyzwanie ze względu na utrudnioną identyfikację przypadków otyłości wielogenicznej. Występujące objawy są niespecyficzne, łagodniejsze niż w przypadkach monogenicznych i pojawiają się stopniowo na przestrzeni wielu lat, co utrudnia oddzielenie czynników genetycznych od środowiskowych, w tym nawyków żywieniowych czy aktywności fizycznej.

Większość badań nad otyłością wielogeniczną koncentruje się na BMI, czyli na wskaźniku masy ciała obliczanego wg. wzoru $BMI = \frac{masa}{wys. ciała^2}$. Wskaźnik BMI jest standardową metodą oceny masy ciała w skali populacji ze względu na silną korelację z zawartością tkanki tłuszczowej i niezależność od wzrostu. Wadą BMI jest nieuwzględnianie typu budowy ciała (np. BMI osoby wysportowanej może wskazywać na otyłość pomimo niewielkiej zawartości tkanki tłuszczowej) oraz brak możliwości zastosowania u dzieci (Stupnicki i Tomaszewski 2016). Otyłość wielogeniczna to najpowszechniejsza forma otyłości w światowej populacji. Pierwsze badania nad otyłością wielogeniczną to analiza genów kandydujących. Badanie genów kandydujących

zostało po raz pierwszy zrealizowane w połowie lat 90. XX wieku i miało na celu walidację genów zidentyfikowanych za pomocą ludzkich i zwierzęcych modeli skrajnej otyłości pod kątem roli w powszechnej otyłości. W ciągu następnych lat przebadano dziesiątki genów kandydujących, jednak związek z otyłością udało się potwierdzić jedynie dla genów *ADRB3* (Kurokawa i in. 2008), *BDNF36*, *CNR1* (Benzinou i in. 2008), *MC4R38*, *PCSK1* (Nead i in. 2015) i *PPARG* (Tonjes i in. 2006).

Pod koniec lat 90 pojawiła się metoda badawcza oparta o analizę sprzężeniową. Metoda ta wymagała badań nad rodzinami obciążonymi wysokim ryzykiem wystąpienia danej choroby. Ograniczenie analiz jedynie do rodzin miało umożliwić łatwiejszą obserwację mechanizmu dziedziczenia loci mogących być powiązanych z daną chorobą. Mimo, że w ponad 80 analizach sprzężeniowych, obejmujących cały genom zidentyfikowano ponad 300 loci potencjalnie powiązanych z otyłością, niewiele loci zostało potwierdzonych w innych badaniach (Rankinen i in. 2006).

Ważnym krokiem w postępie badań nad genetycznym podłożem otyłości było opracowanie badań asocjacyjnych genomu (GWAS). Pierwsze wyniki badań GWAS pod kątem otyłości zostały opublikowane w 2007 roku. Pozwoliły zidentyfikować grupę markerów w pierwszym intronie genu *FTO*, który był istotnie powiązany z BMI (Frayling i in. 2007; Scuteri i in. 2007). Wraz z wielkością populacji wzrasta moc statystyczna do identyfikacji większej liczby loci, w szczególności w przypadku loci, które są mniej powszechne lub mają mniejszy wpływ. Badanie GWAS z 2018 roku dla BMI obejmowało prawie 800 000 osób i zidentyfikowało ponad 750 loci, wliczając w to allele rzadkie (najniższy MAF na poziomie 1,6%; Yengo i in. 2018).

Mimo szerokiego badania BMI, analizowano również inne cechy otyłości. W kontekście człowieka, przykładem są analizy GWAS dla bardziej szczegółowych cech, takich jak procentowy udział tkanki tłuszczowej w całkowitej masie ciała (Kilpeläinen, Zillikens, i in. 2011; Y. Lu i in. 2016), masa beztłuszczowa (Zillikens i in. 2017) czy poziomy krążącej leptyny (Kilpeläinen i in. 2016). Ponadto dwa badania GWAS skupiły się na trwałej, zdrowej szczupłości, zakładając, że geny warunkujące odporność na przyrost masy ciała mogą również wpływać na zapobieganie otyłości (Riveros-McKay i in. 2019; Orthofer i in. 2020). Chociaż efekty mutacji wykrytych badaniami GWAS z użyciem bardziej wyrafinowanych cech wiązanych z otyłością są na ogół znacznie mniejsze niż te dla BMI, cechy te są często dokładniejszą reprezentacją regulacji masy ciała, a zidentyfikowane loci częściej wskazują na odpowiednie szlaki biologiczne

leżące u podstaw otyłości. Prawie wszystkie loci z analiz GWAS zostały po raz pierwszy zidentyfikowane u dorosłych, ale większość tych loci wiąże się również z otyłością lub BMI u dzieci i młodzieży, co oznacza, że genetyczne podłoże otyłości jest niezależne od wieku, w którym otyłość została zdiagnozowana (Vogelezang i in. 2020; Bradfield i in. 2019; Felix i in. 2016).

Istotnym wkładem do badań nad otyłością u ludzi są populacje izolowane i założycielskie. Populacje tego typu są bardzo pomocne w identyfikacji nowych markerów o dużych efektach, które są częste w badanej populacji, ale rzadkie lub nieobecne w innych. Przykładem jest badanie genetycznego podłoża otyłości wśród mieszkańców wysp Samoa. W badanej populacji stwierdzono częste występowanie mutacji w genie *CREBRF* (Minster i in. 2016). Podczas gdy wspomniana mutacja występuje na wyspach Samoa z częstością 25,9% w innych populacjach występuje bardzo rzadko, co pokazuje jak istotny wkład odgrywają mniejsze, ale bardziej jednolite genetycznie populacje. Kolejnym przykładem jest badanie przeprowadzone na populacji Grenlandii. W badanej kohorcie wykryto mutację w regionie splicingowym genu *ADCY3* (Grarup i in. 2018). Częstość występowania tej mutacji w populacji pochodzenia inuickiego wynosiła 3.1% podczas gdy w innych populacjach nie przekraczała 0.01%. Wykazano, że *CREBRF* odgrywa rolę w magazynowaniu i wykorzystywaniu energii komórkowej (Minster i in. 2016), natomiast *ADCY3* odgrywa rolę w regulacji rozwoju tkanki tłuszczowej i wydzielaniu insuliny (Yang i Yang 2016).

Badania GWAS zwykle skupiają się na polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (SNP) ale są również wykorzystywane do badań powiązań polimorfizmów liczby kopii (CNV) z otyłością. Jak dotąd zidentyfikowano tylko kilka CNV, które mają przekonujący związek z BMI, takie jak delecja 16p12.3 21 kbp przed genem *GPRC5B70*, która może modulować wydzielanie insuliny (Soni i in. 2013) czy CNV 1p21.1 obejmujący gen *AMY1A* (Falchi i in. 2014), który wytwarza α -amylazę ślinową, kluczowy enzym w trawieniu skrobi (Meisler i Ting 1993).

Kolejnym przykładem badań nad otyłością wielogenową jest analiza rzadkich markerów z wykorzystaniem sekwencjonowania całokosmowego (WES). Oczekuje się, że markery o niskiej częstotliwości (1–5%) i rzadkie (<1%) miałyby większy wpływ na fenotyp niż markery powszechne, a zatem byłyby łatwiejsze do wykrycia. Zdecydowana większość badań GWAS opiera się na mikromacierzach złożonych z wyselekcjonowanych markerów reprezentatywnych dla całych haplotypów na

przestrzeni genomu. Co więcej, mikromacierze zawierają zarówno markery intronowe i eksonowe. Techniki WES dostarczają pełną informację wyłącznie na temat sekwencji kodujących genomu, ale z uwagi na fakt, że rzadkie i najbardziej szkodliwe mutacje znajdujemy głównie w sekwencjach kodujących, metoda WES niesie znaczny potencjał w identyfikacji genów otyłości. Badania WES na dużą skalę pozwoliły zidentyfikować kilka rzadkich markerów o istotnym efekcie. Przykładowo, badanie WES oparte na danych od ponad 400 000 osób zidentyfikowało SNP w omawianym wcześniej *MC4R* oraz dwa SNP w genie *GIPR*, który stymuluje wydzielanie insuliny i pośredniczy w odkładaniu tłuszczu (Baggio i Drucker 2007). Niedawne badanie na ponad 600 000 osobach, zidentyfikowało 16 genów, w których występowanie niesynonimicznych, rzadkich markerów było związane z BMI (Akbari i in. 2021).

Ponieważ otyłość jest złożonym, wieloczynnikowym schorzeniem, przy realizacji niektórych GWAS uwzględniono czynniki demograficzne takie jak płeć i wiek (Winkler i in. 2015) oraz czynniki środowiskowe takie jak aktywność fizyczna (Graff i in. 2017), dieta (Smith i in. 2018) lub palenie (Sung i in. 2017). Dotąd udało się zidentyfikować 12 loci, których wpływ na otyłość jest osłabiony lub zaostrzony przez czynniki środowiskowe. W szczególności zwiększona aktywność fizyczna lub zdrowa dieta mogą osłabić wpływ genu *FTO* na ryzyko otyłości o 30–40% (Qi i in. 2014; Kilpeläinen, Qi, i in. 2011).

Czynniki epigenetyczne

Stosunkowo nową dziedziną badań nad molekularnym podłożem otyłości jest epigenetyka. Termin epigenetyka jest zdefiniowany jako dziedziczne zmiany w funkcjonowaniu genów bez występowania zmian w sekwencji DNA. Do omawianych zmian zaliczamy metylację DNA, modyfikację histonów oraz niekodujące RNA regulujące ekspresję genów. Metylacja DNA zachodzi przede wszystkim w obrębie tzw. wysp CpG, czyli obszarów genomu zawierających wielokrotnie powtórzone sekwencje par guaniny i cytozyny. Szacuje się, że w genomie człowieka ok. 70% sekwencji promotorowych zlokalizowanych w okolicy startu transkrypcji zawiera wyspy CpG (Deaton i Bird 2011).

Proces metylacji zachodzi poprzez przyłączanie grup metylowych do nukleotydów za pośrednictwem metylotransferaz tj. enzymów *DNMT1*, *DNMT3A* oraz *DNMT3B*. Dodanie grupy metylowej do nukleotydów w sekwencji promotorowej lub

wzmacniającej transkrypcję uniemożliwia przyłączenie się czynników transkrypcyjnych prowadząc do obniżenia poziomu ekspresji danego genu. Modyfikacja histonów obejmuje obok metylacji, procesy acylacji, fosforylacji lub ubikwitynacji. Konsekwencją tych procesów jest wpływ na strukturę chromatyny i ograniczenie dostępu czynników transkrypcyjnych do sekwencji promotorowych i wzmacniających transkrypcję (Bannister i Kouzarides 2011).

Czynniki epigenetyczne łączą czynniki środowiskowe ze zmienioną aktywnością genów, a tym samym powiązaniem między zmianą nawyków żywieniowych a obserwowanymi fenotypami otyłości. W jednym z pierwszych badań nad związkiem czynników epigenetycznych z otyłością wykryto kilka wysp CpG powiązanych z otyłością u młodych osób (14 – 21 lat) oraz stwierdzono większą zmienność w stopniu metylacji DNA w porównaniu z osobami zdrowymi (Xu i in. 2013). W nowszym badaniu Nikpay i in. 2021 stwierdzono, że obecność rzadkich wariantów w regionie 2p23.3 ludzkiego genomu zwiększa podatność na metylację sekwencji powiązanych z ekspresją genów *POMC* oraz *ADCY3*.

Podłoże genetyczne otyłości u psów

Niewielka liczba badań dotyczących podłoża genetycznego otyłości u psów nie oznacza braku postępów w tej dziedzinie. Istotny postęp przyniosło badanie Raffan i in. 2016, w którym przebadano geny *MC4R*, *AGRP* oraz *POMC* będące częścią szlaku leptyny – melanokortyny. Ponad 300 psów rasy labrador retriever zostało poddanych genotypowaniu z wykorzystaniem sondy TaqMan do wykrycia mutacji w trzech wspomnianych genach, które mogą być powiązane z BCS (9 punktowa skala) i masą ciała. Analiza wykryła delecję o długości 14 pz w regionie 17:19431807-19431821 zlokalizowanym w genie *POMC* z efektem 1.90 kg na allel w przypadku masy ciała oraz z efektem 0.48 przyrostu w skali BCS na allel. Badanie Mankowska i in. 2017 potwierdziło związek omawianej mutacji z masą ciała natomiast nie potwierdziło związku z BCS w 5 punktowej skali. Innym przykładem jest badanie Sheet i in. 2020 przeprowadzone na 153 psach różnych ras. Analiza GWAS wykazała związek masy ciała z genami *CACNA1B*, *C22orf39*, *U6*, *MYH14*, *PTPN2* oraz *SEH1L*. Delecja 14 pz w genie *POMC* jest obecnie jedną z najlepiej opisanych mutacji związanych z otyłością u psów. Zbadanie tego oraz innych genów kandydujących z wykorzystaniem technik

WES i WGS ma potencjał dostarczenia więcej informacji, które umożliwiłyby wykrycie nowych mutacji powiązanych z otyłością lub replikację wcześniej prezentowanych wyników.

Interesującym aspektem jest różnica w nasileniu otyłości u człowieka i psa na skutek mutacji w genie *POMC*. W tym przypadku, otyłość u człowieka wykazuje charakter monogeniczny charakteryzujący się wystąpieniem otyłości na wczesnym etapie życia. W przypadku psów, otyłość jest diagnozowana na późniejszym etapie co jest charakterystyczne dla podłoża wielogenicznego. Jednym z potencjalnych wyjaśnień jest to, że właściciele ściślej kontrolują ilość spożywanego pokarmu przez psy. Oznacza to, że przypadki, w których otyłość u psów jest określana jako wielogeniczna na skutek wysokiej częstości w populacji i wystąpienia na późniejszym etapie życia, może być w rzeczywistości determinowana przez pojedyncze mutacje o dużym wpływie charakterystycznym dla chorób monogenicznych.

Należy podkreślić, że mimo że wpływ delecji w genie *POMC* psa jest całkiem duży, to jednak delecja ta samodzielnie nie odpowiada za większość zmienności genetycznej w populacji labradorów. Istnieją zatem jeszcze inne źródła zmienności genetycznej. Nie można wykluczyć, że obok poligenów istnieją mutacje o wyjątkowo silnym wpływie, tak jak obserwuje się to przypadku genu *POMC*. Relatywnie wysoka częstość bardzo szkodliwej mutacji w genie *POMC*, może wynikać z kierunku sztucznej selekcji, która w niezamierzony sposób jest w tym przypadku przeciwstawna selekcji naturalnej. Taki mechanizm utrzymywania szkodliwych genów w populacji może być odpowiedzialny za występowanie w populacji także innych wariantów, niezależnych od delecji w *POMC*.

Hipoteza i cel badań

Dotychczasowe wyniki badań nad genetyką otyłości psów, a szczególnie identyfikacja relatywnie często występującej delecji w genie *POMC*, która znacznie zwiększa ryzyko otyłości, uzasadniają rozważenie możliwości, że genetyczne podłoże otyłości psów ma częściowo inny charakter niż powszechna otyłość człowieka. W rozważanym modelu determinacji genetycznej występują mutacje, które mają zarówno wysoką częstość, jak i duży wpływ na ryzyko rozwoju otyłości.

Hipoteza tej pracy głosi, że obok genu *POMC*, w genomie psów labradorów istnieją inne mutacje charakteryzujące się wysokim wpływem na ryzyko otyłości i jednocześnie wysoką częstością. Identyfikacja takich mutacji jest możliwa nawet w małych populacjach psów, jedynie dostępnych w przypadku badań zmienności w ramach jednej rasy, tym samym powyższa hipoteza jest z pewnym prawdopodobieństwem pozytywnie weryfikowalna.

Postawiona tu hipoteza jest ważna dla hodowli psów rasy labrador, gdyż identyfikacja kilku mutacji odpowiedzialnych za większość zmienności genetycznej otwiera drogę do praktycznej selekcji wspomaganą informacją genetyczną. W celu uwiarygodnienia postawionej hipotezy została przeprowadzona bioinformatyczna i statystyczna analiza danych dotyczących sekwencji DNA pięćdziesięciu genomów psów labradorów o różnym stopniu rozwoju otyłości oraz psów zdrowych.

Celem badań jest identyfikacja w genomie labradorów mutacji kształtujących ryzyko otyłości, na podstawie danych fenotypowych oraz genomowych pochodzących od pięćdziesięciu psów rasy labrador, za pomocą narzędzi bioinformatycznych i statystycznych.

W ramach badań zostanie przeprowadzona analiza masy ciała, obiektywnej cechy skorelowanej ze stopniem otluszczenia i otyłością, oraz wskaźnikiem kondycji ciała (BCS), czyli subiektywną oceną stopnia rozwoju otyłości u osobnika. Zostanie przeprowadzona analiza statystyczna w celu identyfikacji krótkich mutacji, w tym mutacji pojedynczych nukleotydów oraz krótkich mutacji typu indel, które wykazują statystyczne powiązanie ze zmiennością masy ciała oraz BCS.

Materiały i metody

Zwierzęta i fenotypy

Badaniami objęto pięćdziesiąt psów rasy labrador retriever (32 samice i 18 samców) z populacji polskiej. Materiał badawczy został zebrany na potrzeby poprzednich badań (Mankowska i in. 2017; Grzemski i in. 2019; Szydłowski i Antkowiak 2022). Ich wiek wahał się od 12 do 120 miesięcy, a masa ciała od 25 do 50 kg.

Otyłość mierzono za pomocą pięciopunktowej skali BCS. Szesnaście psów z BCS = 5 sklasyfikowano jako otyłe, a pozostałe 34 psy z BCS = 3 (n = 16) i BCS = 4 (n = 18) przyjęto jako grupę kontrolną. Średnie dla stosunku wieku i płci były podobne w grupach otyłych i kontrolnych (Tabela 1). Dane rodowodowe nie były dostępne. Dokumentację zebrano z rutynowych wizyt w dwóch klinikach weterynaryjnych w latach 2014-2017.

Genotypy

Surowe dane dotyczące sekwencji genomu badanych psów są publicznie dostępne (Nucleotide Archive PRJEB47658). W opisywanych badaniach zostały przeanalizowane ortologi psa dla 41 genów człowieka (łącznie 14510 markerów). Badane geny zostały zaczerpnięte z komercyjnego panelu oferowanego przez Blueprint Genetics (Monogenic Obesity Panel; kod testowy KI1701; <https://blueprintgenetics.com/>; dostęp 15 czerwca 2023 r.).

Dane odnośnie do rozkładu 14 pz delecji *POMC* w badanej populacji znajdują się w Tabeli 1. Nazwy genów powiązanych z otyłością monogenową u ludzi oraz ich ortologi w genomie psa (CanFam3.1) przedstawiono w Tabeli 2. Procedury detekcji genotypów dla SNP i indeli zostały opisane w pracy Szydłowski i Antkowiak 2022. Wszystkie markery zostały adnotowane z wykorzystaniem oprogramowania VEP (McLaren i in. 2016).

W obydwu badaniach, analizowane markery zostały poddane dodatkowej kontroli jakości z wykorzystaniem oprogramowania PLINK (Chang i in. 2015). Do dalszych analiz zostały dopuszczone markery z *call rate* > 0.95, częstością mniejszego allelu > 0.05 i które znajdowały się w równowadze Hardy'ego – Weinberga (p-wartość > 0.05, test Fishera)

Badanie asocjacyjne masy ciała

Istotnym czynnikiem w szacowaniu wpływu markerów na dany fenotyp jest struktura populacji oraz ukryte pokrewieństwo pomiędzy osobnikami (Voight i Pritchard 2005; Bulik-Sullivan i in. 2015). Jednym z rozwiązań jest badanie asocjacji za pomocą liniowych modeli mieszanych (LMM). W podejściu LMM struktura populacji

jest dopasowana jako efekt stały, podczas gdy podobieństwo genetyczne między osobnikami jest włączone do modelu jako macierz wariancji-kowariancji efektu losowego dla osobników. Metoda ta pozwala na dostosowanie oszacowań efektu każdego markera do struktury populacji i nierównowagi sprzężeń.

Pomimo zalet LMM, jednoczesne testowanie tysięcy markerów prowadziłyby do dużej ilości fałszywie pozytywnych wyników, co jest szczególnie problemem w badaniach na małych próbach. W swojej publikacji (John i in. 2022) zaproponowali metodę permGWAS, która pozwala łączyć LMM z metodą permutacji maxT. W metodzie max(T) wykorzystuje się maksymalne wartości statystyk testowych wśród wszystkich testowanych markerów w danej permutacji. Uzyskane statystyki tworzą rozkład empiryczny, który następnie jest wykorzystywany w szacowaniu istotności statystycznej każdego z badanych markerów. Uzyskane w ten sposób p-wartości są skorygowane o tzw. Family Wise Error Rate (FWER), czyli $\alpha \geq$ p-wartość prawdopodobieństwa, że jeden lub więcej markerów jest fałszywie pozytywnych na skutek wielokrotnego testowania, gdzie α jest przyjętym *a priori* poziomem istotności statystycznej. Metoda permGWAS umożliwia zastosowanie LMM w ograniczonej populacji przy jednoczesnym skorygowaniu wyników o porównania wielokrotne.

W moim badaniu zastosowałem metodę permGWAS w celu identyfikacji markerów powiązanych z masą ciała psa (kg). Model mieszany (LMM) uwzględnił wiek, płęć oraz kastrację oraz został połączony z 10000 permutacjami max(t) przy użyciu metody permGWAS. W moich analizach jako α dla FWER przyjąłem 0,05, czyli 5% prawdopodobieństwa, że jeden lub więcej istotnych statystycznie markerów są wynikami fałszywie pozytywnymi.

Badanie asocjacyjne BCS

W ramach dodatkowej weryfikacji uzyskanych wyników postanowiłem wykonać badanie asocjacyjne z wykorzystaniem innego fenotypu i metody obliczeniowej. Fenotypem poddanym analizie była otyłość zdefiniowana jako BCS. Na grupę badaną składało się 16 psów z BCS 5, natomiast na grupę kontrolną 16 psów z BCS 3 i 18 z BCS 4. Porównanie otyłych osobników z zdrowymi i z nadwagą zostało przeprowadzone w celu zmniejszenia prawdopodobieństwa identyfikacji markerów jedynie pozornie związanych z rozwojem otyłości.

W celu zmniejszenia prawdopodobieństwa wyników fałszywie pozytywnych wynikających z porównań wielokrotnych zastosowałem procedurę *LD pruning*. Procedura ta opiera się na założeniu, że zamiast testować wszystkie markery, rozważamy tylko ich ułamek, tzw. markery znacznikowe, które są reprezentatywne dla całych bloków haplotypów. Procedurę LD pruning wykonano w programie PLINK (Chang i in. 2015), z poleceniem *indep-pairwise 50 5 0.5*. Polecenie to uwzględnia okno 50 SNP, oblicza LD między każdą parą SNP w oknie, usuwa jeden SNP z pary, jeśli LD jest większe niż 0,5 ($r^2 > 0,5$), przesuwa okno o 5 SNP do przodu powtarza procedura całą procedurę. Współczynnik r^2 jest zdefiniowany jako kwadrat współczynnika korelacji między obecnością lub brakiem allelu w pierwszym i drugim locus (Hill i Robertson 1968). Należy zauważyć, że LD pruning nie gwarantuje, że wszystkie markery znacznikowe będą nieskorelowane ze sobą. Ostatecznie, 1135 markerów znacznikowych zostało dopuszczonych do dalszej analizy.

W celu oszacowania wpływu każdego markera na prawdopodobieństwo przypisania psa do klasy BCS 5, czyli prawdopodobieństwa do rozwinięcia otyłości, zastosowałem addytywny model regresji logistycznej zaimplementowany w PLINK (wersja 1.9; Chang i in. 2015). Model statystyczny uwzględniał wiek, płeć i oraz sterylizację. Dodatkowo, postanowiłem włączyć do modelu efekt delekcji w genie *POMC* (Raffan i in. 2016; Tabela 1) w celu identyfikacji wyłącznie nowych asocjacji. Efekt dla każdego markeru jest wyrażony jako iloraz szans (OR). Ze względu na ograniczony rozmiar badanej populacji, zastosowałem procedurę permutacji max(T) z 1000000 permutacjami (Westfall i Young 1993).

W moich analizach jako α przyjąłem 0,05, czyli 5% prawdopodobieństwa, że jeden lub więcej istotnych statystycznie markerów są wynikami fałszywie pozytywnymi. Analizę asocjacji przeprowadzono za pomocą PLINK (Chang i in. 2015). Wykresy Manhattan i kwantyl-kwantyl (Q – Q) zostały wygenerowane przy użyciu pakietu ggplot2 w R (Wickham i in. 2019).

Wyniki

Badanie asocjacyjne masy ciała

W sumie przeanalizowałem 41 genów z 11,520 markerami. Jeden marker w genie *ADCY3* przekroczył próg istotności $0,05 < \alpha$ (Ryc. 1). Wykrytym markerem jest delecja TA> T z p-wartość = $5,83 \times 10^{-5}$ zlokalizowana w 17: 19 222 459 w 1/20 intronie *ADCY3*. Wielkość efektu 17:19222459 TA>T wynosi 5,56 kg (SE 0,018), co oznacza, że nosiciele delecji są średnio o 5,56 kg ciężsi na jedną kopię allelu. Drugi, najbardziej znaczący marker nieco poniżej progu istotności był w genie *RYR3*. Wykrytym markerem jest insercja G>A z p-wartość = $7,31 \times 10^{-5}$ zlokalizowana w 30:1 294 982 w 46/130 intronie. Wielkość efektu 30:1 294 982 G>A wynosi 5,97 kg (SE 0,018), co oznacza, że nosiciele delecji są średnio o 5,97 kg ciężsi na jedną kopię allelu. Wpływ delecji *POMC* 14 pz (17:19431807-19431820 CGCGGCGGGGCCCT> C) na masę ciała okazał się nie istotny statystycznie.

Badania asocjacyjne BCS

Przeanalizowałem 1135 markerów zlokalizowanych w 41 psich ortologach genów związanych z otyłością monogenową u ludzi. Liczba przeanalizowanych markerów wahała się od jednego do 151, z medianą dziesięciu markerów. Genem o największej liczbie przeanalizowanych markerów był *NTRK2* ze 151 markerami, podczas gdy geny *BBS12*, *MAGEL2*, *MC4R*, *MKS1* i *TRIM32* miały tylko pojedyncze markery. Tylko dwa markery, oba w genie *ADCY3*, wykazały istotność statystyczną (Ryc. 2). Jednym z nich jest nowa mutacja C>T w pozycji 17:19167157 w intronie 8/20 (p-wartość = 0,012); drugą jest mutacja G>A w pozycji 17:19180869 (rs22557040) w intronie 2/20 (p-wartość = 0,012). Oba markery są oddalone od siebie o 13,71 kbp i są całkowicie sprzężone ze sobą ($r^2 = 1,0$). Dla każdego z dwóch markerów OR wyniósł 0,044 (95% CI: 0,007–0,264), co oznacza, że pies z markerem T w pozycji 17:19167157 lub markerem A w pozycji 17:19180869 ma prawie 23-krotnie mniejsze szanse na rozwinięcie otyłości niż pies bez tych markerów. Rozkład genotypów w obrębie przypadków i zdrowych psów odzwierciedla tę tendencję (CC/CT/TT, przypadki: 12/4/0, zdrowe: 7/25/2). Przymuszalnie te dwie pozycje reprezentują

pojedynczy efekt w obrębie genu *ADCY3* lub innego genu w pobliżu *ADCY3*. Pozostałe jedenaście markerów znaczników zlokalizowanych w genie *ADCY3* były statystycznie nieistotne. Obydwa statystycznie istotne markery są zlokalizowane w intronach. Chociaż niektóre markery intronowe mogą wpływać na poziom ekspresji genów (np. poprzez alternatywny splicing), VEP nie przewidział żadnego funkcjonalnego efektu dla tych dwóch mutacji intronowych. W kolejnym kroku przeanalizowałem markery, które nie zostały bezpośrednio uwzględnione w badaniu asocjacyjnym, ale które były sprzężone z istotnymi statystycznie markerami ($r^2 > 0,5$). Każdy z tych markerów korelował z tymi samymi trzema pozycjami: dwoma markerami intronowymi w genie *ADCY3* ($r^2 = 0,69$; 17:19207760, G>A, MAF = 0,27 i 17:19222413, CCT>C, MAF = 0,27) i jednym wariantem synonimicznym w obrębie genu *POMC* ($r^2 = 0,66$, rs851959389, G>T, MAF = 0,26). A>G z p-wartość = 0.012). Ważnym aspektem moich wyników jest to, że dwa geny *ADCY3* i *POMC* znajdują się zaledwie 199,17 kbp od siebie na chromosomie 17. Wiadomo, że delecja 14 pz w eksonie 3/3 genu *POMC* zwiększa masę ciała u rasy labrador retriever (średnia wielkość efektu 1,90 kg na allel delecji wg. analizy (Raffan i in. 2016).

Aby upewnić się, że oszacowania efektów dla obydwu markerów w genie *ADCY3* są niezależne od efektu delecji w genie *POMC*, ponownie przeprowadziłem analizę asocjacji dla wszystkich markerów z delecją 14 pz wykluczoną z modelu regresji logistycznej. pz delecji w *POMC* jako efekt stały w modelu. Widoczne są pewne różnice w oszacowaniach istotności poszczególnych markerów, ale bez wpływu na oszacowania istotności dla obydwu markerów w *ADCY3*. Porównanie wykresów Q – Q bez korekty *POMC* wykazało pewne różnice w oszacowanych istotnościach markerów, chociaż wnioskowanie na temat dwóch markerów pozostaje podobne między modelami (Ryc. 3). Ponadto każdy z dwóch statystycznie istotnych markerów w tym genie *ADCY3* nie jest sprzężony ($r^2 = 0$) z 14-pz delecją w gen *POMC*, co sugeruje, że efekty tych markerów są niezależne od tej delecji (Ryc. 4).

Dyskusja

Rasa labrador retriever jest popularną rasą psów w wielu krajach rozwiniętych. Niezależnie od tego jaką lokalną populację obserwujemy, osobniki tej rasy są narażone na otyłość i nadwagę. To podobieństwo między populacjami z różnych regionów

geograficznych sugeruje pewną wrodzoną predyspozycję tej rasy do rozwoju otyłości w wieku dorosłym. Fakt, że dieta i aktywność fizyczna pozwalają psom na łatwe utrzymanie prawidłowej masy ciała sugeruje, że predyspozycja labradorów do otyłości genetyczne ma charakter poligeniczny.

Poligeniczny model dziedziczenia oznacza jednoczesny wpływ czynników środowiskowych jak i czynnika genetycznego, przy czym źródłem zmienności genetycznej jest liczna grupa genów. Udział wielu genów w kształtowaniu cechy (wielogenowość) jest z reguły opisywany jedynie pod kątem ich łącznego, summarycznego wpływu, a szereg statystycznych metod analizy cech poligenicznych zakłada, że składowa genetyczna jest sumą niemal nieskończonego spektrum genów z minimalnymi jednostkowymi wpływami (model infinitezymalny). Taki statystyczny model cech poligenicznych jest z powodzeniem stosowany w doskonaleniu roślin i zwierząt. Jednak jak wykazano w badaniu Raffan i in. 2016, wielogenowość otyłości nie wyklucza udziału genu o stosunkowo dużym wpływie, który wybija się na tle pozostałych genów i który istotnie kształtuje zmienność genetyczną w obrębie rasy.

Znajomość genów o dużych efektach może być przydatna w ograniczaniu genetycznego ryzyka otyłości w lokalnych populacjach labradorów i innych ras. Dotychczasowa wiedza na temat genów otyłości jest jednak bardzo ograniczona i opiera się głównie na wynikach badań genów kandydujących, w tym genów *POMC* i *FTO* analizowanych u ras flat coat retriever i labrador retriever (Raffan i in. 2016; Grzemski i in. 2019) oraz genu *CACNA1B*, który analizowano w osiemnastu rasach (Sheet i in. 2020). Przegląd literatury nie dostarcza przykładów systematycznego podejścia do identyfikacji genów ryzyka otyłości u psów, w tym całogenomowych analiz asocjacyjnych.

Wyzwanie w badaniach nad otyłością u psów stanowi samo zdefiniowanie badanego fenotypu. Najbliższą intuicyjnie oceną tego, co popularnie rozumiemy pod pojęciem stopnia otłuszczenia jest wagowy udział tłuszczu w ciele. Wyznaczenie takiego udziału jest bardzo trudne, niezależnie od badanego gatunku. W przypadku człowieka, najpowszechniej używaną oceną ilościową otyłości jest wskaźnik masy ciała (BMI - Body Mass Index). Wskaźnik masy ciała należy traktować jako przybliżoną miarę otyłości. Biorąc pod uwagę ten wskaźnik, otyłość człowieka zdefiniowana jest umownie jako $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$, natomiast nadwaga jako $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$. Z uwagi na fakt, że wskaźnik ten oparty jest na dwóch obiektywnych i łatwo dostępnych pomiarach

(często nawet zastępowanych wartościami deklarowanymi), jest szeroko stosowany w badaniach asocjacyjnych, które wymagają liczebnie dużych prób. Ponadto, ustalony próg BMI=30 prowadzi do prostej definicji otyłości i łatwej dychotomizacji populacji na grupy osób chorych i zdrowych, a tym samym umożliwia monitorowanie epidemii otyłości w populacji. W przypadku psów wskaźnik masy ciała nie ma zastosowania, nie opracowano także innego prostego i obiektywnego wskaźnika ilościowego, który byłby odpowiednikiem BMI. Trudność w opracowaniu wskaźnika ilościowego, który mógłby być uniwersalną miarą przydatną do oceny otyłości u różnych ras, wynika z ogromnego zróżnicowania w typach budowy ciała psów. Z kolei opracowanie wskaźnika odpowiedniego wyłącznie dla pojedynczej rasy nie stanowi praktycznego rozwiązania.

W moich badaniach nad genetyczną determinacją ryzyka otyłości analizowałem dwa fenotypy: wagę ciała oraz wskaźnik kondycji ciała (BCS). Waga ciała jest miarą obiektywną i bardzo łatwo dostępną, jednak może być traktowana co najwyżej jako cecha, która tylko częściowo odzwierciedla udział tłuszczu w ciele. Chociaż waga ciała jest skorelowana z otluszczeniem, niewątpliwie zależy także od udziału innych tkanek i ogólnej budowy ciała, oraz stopnia wypełnienia przewodu pokarmowego i pęcherza moczowego, przez co podlega dużym wahaniom w ciągu doby.

Mimo udziału tych pozagenetycznych czynników w zmienności, odziedziczalność wagi ciała jest relatywnie wysoka. W badaniach obejmujących 19 ras psów w Szwecji (badania nie obejmowały rasy labrador retriever) odziedziczalność wagi ciała oszacowano na 35% - 70%, w zależności od rasy (Strandber et al . 2023). Wyniki takie uzyskano po uwzględnieniu ważnych czynników różnicujących: płci, roku pomiaru, liczebności i numeru miotu matki. Należy zauważyć, że przytoczone badania należą do bardzo nielicznych badań szacujących parametry genetyczne w populacji psów. Średnia lub wysoka odziedziczalność wagi ciała wskazuje na znaczny udział wariacji genetycznej, która może być częściowo powodowana polimorfizmem genów odpowiadających za akumulację tkanki tłuszczowej. Na genetyczny związek między masą ciała a otyłością wskazuje też zaobserwowana u labradorów statystyczna zależność między niską wagą urodzeniową a podwyższonym ryzykiem rozwinięcia otyłości w wieku dorosłym (Mugnier i in. 2020). Tę statystyczną zależność najłatwiej wytłumaczyć plejotropowym działaniem genów, których kierunek wpływu na dwie cechy jest wzajemnie odwrotny. Należy przypuszczać jednak, że większość genów o plejotropowym działaniu na masę ciała i akumulację tłuszczu ma wpływ zbieżny,

przyczyniając się do powstania wyraźnej, dodatniej korelacji między wagą ciała i otyłością dorosłych psów.

W powyższy obraz plejotropowego oddziaływania genów wpisują się wyniki uzyskane w tej pracy. W moich badaniach gen *ADCY3* okazał się statystycznie istotnym czynnikiem zmienności zarówno dla masy ciała jak i dla BCS. Ten wynik ma duże praktyczne znaczenie dla poszukiwania genów otyłości psów, gdyż wskazuje na zasadność wykorzystania prostego i obiektywnego pomiaru, jakim jest waga ciała.

Drugą cechą analizowaną w moich badaniach był wskaźnik kondycji ciała (BCS). BCS to wskaźnik wyrażony na skali porządkowej, a więc, zgodnie z definicją tej skali, różnice między przedziałami skali nie są ustalone. Pomiar BCS można więc, w przeciwieństwie do wagi ciała, rozumieć jako opis jakościowy. Skala taka wymaga odmiennego podejścia statystycznego, które tutaj zastosowano. Zdecydowano się na regresję logistyczną dla cechy binarnej, przy czym dualizację próby na podstawie pomiaru BCS przeprowadzono w ten sposób, że do grupy psów dotkniętych otyłością zaliczono jedynie psy z BCS=5, natomiast psy, którym przypisano pozostałe reprezentowane wartości BCS stanowiły grupę kontrolną. Na potrzeby tej pracy otyłość zdefiniowano więc jako BCS=5. Należy zaznaczyć, że skala BCS nie jest miarą obiektywną, a oceniający ma duży wpływ na klasyfikację psa do podgrup BCS. Wykazano, że co trzeci opiekun psa zaniża ocenę kondycji własnego psa w stosunku do oceny dokonanej przez specjalistę, i tym samym nie spostrzega wczesnego etapu rozwoju otyłości (Gille i in. 2023). Jednocześnie udowodniono, że krótkie szkolenie przeprowadzone w grupie opiekunów mocno poprawia dokładność oceny. W świetle znacznego wpływu osoby oceniającej na przypisaną wartość BCS, należy się spodziewać, że pewne różnice między ocenami mogą występować również w ramach grupy specjalistów. To potencjalne dodatkowe źródło zmienności fenotypowej nie było tu jednak uwzględniane w obawie o nadmierną parametryzację modelu statystycznego.

Warto zwrócić uwagę na fakt, że niezależnie czy otyłość zdefiniujemy poprzez ustalenie progu na skali interwałowej (dla człowieka $BMI > 30$) czy porządkowej (tutaj BCS=5), definicja otyłości ma charakter czysto umowny. Diagnoza tej choroby jest uproszczona, bazuje wyłącznie na pomiarach fenotypowych, nie uwzględnia parametrów fizjologicznych i oderwana jest od etiologii. Przy tak niedoskonałej definicji otyłości, poszukiwanie genów choroby jest utrudnione. W pracach nad identyfikowaniem genów człowieka, skala badań niejako kompensuje uproszczenia w

diagnozie otyłości, ale w badaniach nad otyłością psa, gdzie populacje są małe, taka symplifikacja z pewnością obniża szansę identyfikacji genetycznych markerów choroby.

Jak wcześniej wspomniano, skala BCS wymaga odmiennego niż dla wagi ciała modelu statystycznego. Warto zauważyć jednak, że w literaturze naukowej spotyka się niepotrzebne uproszczenie metodyczne, w którym BCS traktowane jest jako pomiar ilościowy wyrażony na skali interwałowej. Co ważne w kontekście poruszanych tu zagadnień, taki przypadek analizy statycznej miał miejsce przy szacowaniu wpływu delekcji w genie *POMC*, a więc podstawowego i najważniejszego jak dotąd odkrycia w genetyce otyłości psów rasy labrador retriever (Raffan i in. 2016).

Przy wyjątkowo dużym wpływie genu *POMC* takie uproszczenie metodyczne nie miało konsekwencji dla poprawności wnioskowania statystycznego, jednak nie powinno być rekomendowane. Biorąc powyższe pod uwagę, zdecydowano się tutaj na zastosowanie modelu nieliniowego, co uniemożliwia bezpośrednio porównanie opisanego wcześniej wpływu genu *POMC* z oszacowanym tutaj efektem genu *ADCY3*.

Jak wcześniej wspomniano, pomiary takie jak SHAPE oraz BCS opierają się na badaniu wizualnym i dotykowym przez co ocena dla pojedynczego psa może być różna w zależności od osoby wykonującej badanie. Bardziej obiektywny charakter ma klasyfikacja psów jako zdrowe / otyłe na podstawie pomiaru parametru fizjologicznego, np. pomiaru stężenia glukozy w krwi na czczo (Sheet i in. 2020). Wadą tego przykładowego podejścia jest konieczność przetrzymania psa na czczo przez 12 godzin, co znacznie utrudnia przeprowadzenie badania w większej skali. Przy braku jednoznacznych miar otyłości, warto sięgnąć do wszelkiej cząstkowej informacji. W moim badaniu postanowiłem wykonać analizę asocjacyjną zarówno dla wagi ciała (wyrażonej w kilogramach) jak i dla BCS. Przeprowadzenie badania zarówno na cesze ilościowej jak i jakościowej pozwoliło z większą wiarygodnością interpretować uzyskane wyniki asocjacji, co jest szczególnie ważne w obliczu bardzo ograniczonej liczbowo próby.

Brak homogennej populacji stanowi dodatkowy problem w badaniach asocjacyjnych. Zróznicowanie pod względem ras w kohorcie może doprowadzić do sytuacji, w której różnice we frekwencji poszczególnych alleli wynikają nie z asocjacji z fenotypem (kosegregacji obserwowanego wariantu z nieznanym wariantem

sprawczym wynikającej z bliskiej lokalizacji chromosomowej), a genetycznych różnic pomiędzy reprezentowanymi rasami. Pojawiające się w ten sposób wyniki fałszywie pozytywne, były częstym zjawiskiem we wczesnych analizach asocjacyjnych, w których nie doceniano znaczenia rasowego (lub etnicznego w przypadku genetyki człowieka) uwarstwienia populacji. Przedstawione tu badania obejmowały osobniki wyłącznie jednej rasy, przez co uniknięto ryzyka fałszywej interpretacji wyników z tego powodu. Dodatkowo, statystyczna analiza celowana w wykrycie ukrytego uwarstwienia (np. z uwagi na reprezentację różnych typów w ramach jednej rasy) nie wykazała istnienia takiej struktury.

Kolejnym wyzwaniem w przeprowadzeniu wiarygodnej analizy asocjacyjnej jest identyfikacja ukrytego pokrewieństwa pomiędzy osobnikami tej samej rasy. Liczne, ukryte (nieznane) pokrewieństwa między reprezentowanymi w próbie psami, powoduje ryzyko, że potencjalne powiązania markerów z fenotypem wynikają nie z faktycznej asocjacji, a podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi osobnikami. Należy zauważyć, że wcześniej wspomniana heterogenność populacji oraz ukryte spokrewnienia to w gruncie rzeczy ten sam problem, którym jest nierozpoznana korelacja między obserwacjami w próbie. W interesującym eksperymencie myślowym, Hamer i Sirota 2000 stwierdzili, że w populacji wschodnio azjatyckiej częściej występuje marker powiązany z jedzeniem pałeczkami niż w populacji europejskiej. W rzeczywistości różnica w frekwencji wynika z porównania dwóch niezależnych populacji, a nie genetycznych predyspozycji do posługiwania się pałeczkami. W przełożeniu na problem badawczy przedstawiany w tej pracy, różnica w częstości występowania poszczególnych markerów może nie wynikać z powiązania z otyłością, a jedynie różnic pomiędzy poszczególnymi subpopulacjami rasy labrador retriever (np. typ amerykański i angielski).

Obecnie stosuje się co najmniej dwie metody uwzględnienia struktury populacji, w tym struktury ukrytej, w badaniach asocjacyjnych. W obu metodach struktura ta jest niejako rekonstruowana na podstawie informacji zawartych w polimorfizmie genomów. Pierwszym rozwiązaniem jest analiza składowych głównych (z ang. Principal Component Analysis – PCA). PCA polega na redukcji wielkowymiarowych danych (w tym przypadku genomowej macierzy spokrewnień) do kilku lub kilkunastu zmiennych nazywanych głównymi składowymi, które objaśniają najważniejsze i niezależne źródła zmienności w danych. W kontekście badań asocjacyjnych, PCA zakłada, że genetycznie

podobne do siebie osobniki będą tworzyć skupiska zbliżonych wartości głównych składowych, odzwierciedlających strukturę genetyczną populacji. Włączenie składowych głównych jako czynników do modelu statystycznego umożliwi kontrolę wpływu struktury populacji na wielkość oszacowań asocjacji typu wariant-fenotyp (Price i in. 2006). Przykładem zastosowania PCA w kontekście badań asocjacyjnych psa jest GWAS, w którym włączono pierwsze cztery główne składowe jako efekty stałe w modelu badającym powiązanie markerów z otyłością w próbie obejmującej osiemnaście ras psów (Sheet i in. 2020).

Drugą metodą kontroli struktury populacji w badaniach asocjacyjnych jest przedstawiony już wcześniej w tej pracy LMM. Użyteczność tego modelu w analizie typu GWAS jest jednak ograniczana przez wielkość badanej kohorty. W przeciwieństwie do PCA, metoda LMM wymaga większej kohorty w celu wiarygodnego oszacowania macierzy wariancji-kowariancji pomiędzy badanymi polimorfizmami, aczkolwiek niedawno zaproponowany permGWAS (John i in. 2022) prezentuje obiecujące rozwiązanie tego problemu poprzez połączenie modelu LMM z permutacjami.

W badaniu masy ciała postanowiłem zastosować metodę permGWAS w celu kontroli struktury populacji. W badaniu BCS początkowo było planowane zastosowanie metody PCA, ale włączenie głównych składowych do modelu prowadziło do trudności obliczeniowych. Z tego powodu postanowiłem ograniczyć wpływ struktury danych poprzez zastosowanie metody *LD pruning*, czyli usunięcie z analiz skorelowanych ze sobą polimorfizmów. Należy zaznaczyć, że technika *LD pruning* pozwala na ograniczenie wpływu korelacji (współliniowości) między polimorfizmami wynikającymi z bliskiego położenia chromosomowego. W tej metodzie wpływ kowariancji między wariantami, spowodowanej spokrewnieniem osobników, na jakość wnioskowania statystycznego nie jest ograniczany.

W przedstawionej pracy poszukiwałem markerów otyłości u labradorów retrieverów w 41 genach, których ortologii powiązane są z otyłością monogeniczną u ludzi. Wybór tych 41 genów jest uzasadniony faktem, że mechanizm, dzięki któremu rozwija się otyłość, jest podobny u różnych gatunków ssaków. Najszerzej opisane podobieństwa dotyczą człowieka i myszy. Jednocześnie, wiele markerów genetycznych, o których mówi się, że są zaangażowane w rozwój otyłości poligenicznej u ludzi, często znajduje się w genach, o których wiadomo, że są przyczyną różnych przypadków

otyłości monogenicznej. Zaletą analizy panelu genów zamiast całego genomu jest zmniejszenie zarówno ryzyka uzyskania wyników fałszywie pozytywnych jak i fałszywie negatywnych. Fakt ten jest szczególnie istotny w analizie mniej licznych kohort.

Należy zauważyć, że szereg genów biorących udział w determinacji ryzyka otyłości człowieka ma ekspresję w mózgu i oddziałuje na ośrodki głodu i sytości. Zakłócenie tych mechanizmów, przy stałym dostępie do pożywienia, prowadzi do nieprawidłowo dużego spożyciem pokarmu. Z tego powodu otyłość jest nazywana “chorobą mózgu”, a nowoczesne leki na cukrzycę i otyłość (Ozempic, Wegovy, Mounjaro) oddziałują na ośrodki zarządzające apetytem. Przykładowo, substancja czynna leku Ozempic, semaglutyd, jest uzyskanym syntetycznie hormonem (GLP-1) fizjologicznie produkowanym przez jelito cienkie w odpowiedzi na jedzenie, który ma receptory w mózgu (semaglutyd jest agonistą receptora GLP1R). U psów spożycie pokarmu jest jednak w znacznym stopniu kontrolowane przez człowieka, stąd zaburzenie odczucia głodu i sytości nie musi się bezpośrednio przekładać na zwiększenie spożycia pokarmu. Z tego punktu widzenia można argumentować, że główne źródło genetycznej zmienności ryzyka otyłości u psa może być inne niż u człowieka. Dokonany tutaj wybór genów do badań, przeprowadzony na podstawie wiedzy o przyczynach otyłości u człowieka, może mieć więc swoje ograniczenia. Z tej samej przyczyny mogą wynikać ograniczenia psa jako gatunku modelowego do badań nad otyłością człowieka.

Gen *ADCY3*

Spośród 41 testowanych genów tylko gen *ADCY3* dał statystycznie istotne wyniki wskazujące na jego związek z fenotypami otyłości. Gen *ADCY3* koduje enzym cyklazy adenylowej typu 3, który katalizuje tworzenie wtórnego przekaźnika cyklicznego monofosforanu adenozyliny (cAMP). Funkcja cAMP jest związana z podstawowymi procesami metabolicznymi, w tym metabolizmem glikogenu i lipidów (Ali i in. 2016). Podwyższony poziom cAMP zwiększa aktywność kinaz białkowych, które z kolei regulują poziom glukozy poprzez dezaktywację syntetazy glikogenowej i aktywację kinazy fosforylazej. W reakcji na obniżony poziom glukozy w krwi, trzustka wydziela glukagon, stymulujący syntezę cAMP, który z kolei pobudza proces

glikogenolizy w wątrobie. Przy wysokim poziomie glukozy w krwi, trzustka wydziela insulinę, która obniża poziom cAMP i w konsekwencji obniża poziom glukozy w krwi.

Mechanizm regulacji przemiany lipidów jest analogiczny do opisanego wcześniej procesu glikogenolizy. Proces lipolizy jest regulowany przez ilość cAMP. Pod wpływem cAMP, kinazy białkowe aktywują lipazę hormonowrażliwą która pobudza proces lipolizy w tkankach. Pomimo bycia tkankowo niespecyficznym, wyłączenie genu *ADCY3* w podwzgórzu u myszy prowadzi do rozwoju otyłości (H. Cao i in. 2016). Jednym z potencjalnych wyjaśnień tego mechanizmu jest niewrażliwość receptorów jądra brzuszno-przyśrodkowego na leptynę (VMH, z ang. Ventromedial Hypothalamus). Poprzez aktywację receptorów melanokortyny VMH pośredniczy w ścieżce sygnałowej leptyny moderującej metabolizm glukozy oraz insulinowrażliwość. Brak cAMP w VMH może prowadzić do nieprzekazania sygnału leptyny, który powinien skutkować moderacją apetytu i zużycia energii (H. Cao i in. 2016). Mutacje powodujące utratę funkcji w genie *ADCY3* są powiązane z wczesnym wystąpieniem ciężkiej otyłości (Saeed i in. 2018; Grarup i in. 2018; Toumba i in. 2022). Badanie WES przeprowadzone przez Saeed i in. (2018) na otyłych osobach w populacji pakistańskiej zidentyfikowało trzy SNP zlokalizowane w genie *ADCY3*: mutację przesuującą ramkę odczytu, w regionie splicingowym oraz mutację zmiany sensu. Nosiciele homozygotyczni omawianych SNP wykazywali hiperfagię oraz wystąpienie otyłości na wczesnym etapie życia. Z kolei, badanie przeprowadzone na populacji grenlandzkiej wykryło mutację obniżającą ekspresję genu *ADCY3* prowadząc do wzrostu ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 i większego przyrostu tkanki tłuszczowej (Grarup i in. 2018). Podobne analizy przeprowadzone na 33 otyłych osobach z populacji greko-cypryjskiej zidentyfikowały nową, potencjalnie patogenną mutację. Wariant c.349T>A w genie *ADCY3* prowadzi do zamiany leucyny na metioninę skutkując powstaniem mniej aktywnej izoformy białka *ADCY3* prowadząc do zaburzenia jego funkcji i w konsekwencji do rozwoju otyłości (Toumba i in. 2022).

Szlaki sygnałowe cAMP są kluczowe w regulacji rozwoju tkanki tłuszczowej. Poprzez akumulację cAMP, kinazy białkowe we wszystkich adipocytach, niezależnie od typu tkanki tłuszczowej ulegają aktywacji fosforylując m.in. białka CREB (W. Cao i in. 2004), AMPK (Yin, Mu, i Birnbaum 2003) oraz lipazę hormonowrażliwą (Djouder i in. 2010). Ufosforylowane białko CREB bierze udział w szlaku indukującym transkrypcję genu *UCP1* odpowiedzialnym za procesy termogenezy w brązowej tkance

tłuszczowej (W. Cao i in. 2004). Ufosforylowane białko AMPK jest inhibitorem procesu różnicowania się preadipocytów przyczyniając się do regulacji adipogenezy i procesu magazynowania lipidów w adipocytach (Habinowski i Witters 2001). Aktywowane poprzez cAMP kinazy wspomagają katalityczną funkcję lipazy hormonowrażliwej umożliwiając jej transport do powierzchni kropli tłuszczowych (Djouder i in. 2010).

Powyższe przykłady dotyczą utraty funkcji *ADCY3*, jednak istnieją również opisane przypadki wpływu wzrostu ekspresji *ADCY3* na rozwój otyłości. W badaniu (Pitman i in. 2014) na mysich modelach odpornych na otyłość wynikającą z diety stwierdzono, że osobniki zmutowane wykazywały o wiele niższy stopień otluszczenia i masę ciała niż grupa kontrolna. Charakteryzowały się również obniżonym poziomem białej i brązowej tkanki tłuszczowej. Zmutowane osobniki karmione dietą wysokotłuszczową były niewiele cięższe od grupy kontrolnej karmionej standardową dietą oraz nie wykazywały stłuszczenia wątroby. Analizy genomu wykazały, że pojedynczy SNP G>A w 3 eksonie *ADCY3* prowadzi do substytucji metioniny na izoleucynę prowadząc do powstania hiperaktywnej izoformy białka *ADCY3* skutkującą zwiększeniem cAMP w komórkach w rezultacie chroniąc zwierzęta przed otyłością. Warto zaznaczyć, że we wcześniej omawianym badaniu na populacji greko-cyprijskiej (Toumba i in. 2022) stwierdzono, że zamiana leucyny na metioninę prowadzi do powstania mniej aktywnej izoformy *ADCY3*. Według dystansu Granthama aminokwasy izoleucyna i leucyna wykazują największe podobieństwo molekularne spośród wszystkich aminokwasów (Grantham 1974). Oznacza to, że podłoże molekularne otyłości może być podobne niezależnie od badanego gatunku.

W moim badaniu, obydwa markery wykryte w badaniu BCS są wariantami ochronnymi, co sugeruje, że mutacje zwiększające ekspresję wystąpiły również w naszej kohorcie i że podstawowe mechanizmy wywoływania otyłości są potencjalnie podobne u ludzi, myszy i psów. W analizie masy ciała wykryto jeden marker ryzyka w *ADCY3*, co sugeruje obecność potencjalnych mutacji zaburzających funkcję genu w naszej kohorcie. Dodatkową przesłanką rekomendującą gen *ADCY3* do dalszych analiz jest fakt, że gen okazał się istotny statystycznie w obydwu badaniach pomimo zastosowania innych fenotypów i metod obliczeniowych.

Znaczenie krótkich mutacji intronowych

Warianty w genie *ADCY3*, które wykazały statystycznie powiązanie z masą ciała oraz wskaźnikiem kondycji ciała są zlokalizowane w intronach tego genu. Obecna wiedza na temat funkcjonowania genomu wskazuje, że z dużym prawdopodobieństwem zidentyfikowane mutacje genu *ADCY3* nie są mutacjami sprawczymi, a ich związek statystyczny z otyłością wynika jedynie z nierównowagi sprzężeniowej między nimi a nieuchwyconą w tym badaniu mutacją sprawczą. Istnieje jednak pewna doza prawdopodobieństwa, że zidentyfikowane tu mutacje, mimo swojego położenia w intronach, oddziałują na fenotypy bezpośrednio. Sprawczy mechanizm mutacji intronowej może wynikać z modyfikacji procesu splicingu intronów.

Pomimo że introny są sekwencjami niekodującymi, to jednak odgrywają kluczową rolę w kontroli splicingu pre-mRNA (Kornblihtt i in. 2013). Splicing jest procesem, w którym z pre-mRNA otrzymanego w wyniku transkrypcji są usuwane sekwencje intronowe. Mutacje w intronach mogą doprowadzić do alternatywnego splicingu. Alternatywny splicing jest naturalnym procesem, który poprzez łączenie eksonów jednego genu w różne kombinacje umożliwia pojedynczemu genowi kodować kilka różnych białek. Mutacje w intronach mogą doprowadzić nie tylko do zmiany procesu, ale także jego zakłócenia, w wyniku którego powstaje nieprawidłowe białko.

Przykładem najczęściej występującego u ssaków alternatywnego splicingu jest zjawisko pominięcia eksonu (Sammeth, Foissac, i Guigó 2008) gdzie dochodzi do pominięcia eksonu w procesie transkrypcji. Kolejnym, chociaż mniej częstym zjawiskiem jest tzw. retencja intronu, czyli sytuacja, w której intron pozostaje w sekwencji mRNA. Retencja intronu może skutkować zaburzeniami funkcji białek prowadząc do rozwoju nowotworów (Dvinge i Bradley 2015) lub choroby Alzheimera (Ong i Adusumalli 2020). Według bazy Human Protein Atlas (Pontén, Jirström, i Uhlen 2008) gen *ADCY3* wykazuje niską specyficzność tkankową, ale ulega najsilniejszej ekspresji w tkance tłuszczowej. W omawianym już wcześniej badaniu na populacji grenlandzkiej (Grarup i in. 2018) przeprowadzono analizę transkryptomyczną wykrytego wariantu splicingowego w genie *ADCY3*. Ilość mRNA genu *ADCY3* była niższa u hetero- i homozygot mutacji c.2433-1 G>A. Przypuszczalnie u nosicieli tej mutacji dochodzi do powstania nowych izoform mRNA *ADCY3* na skutek pominięcia eksonu lub retencji intronu (Tian, Peng, i Fu 2018).

Na tle wiedzy o funkcjonowaniu genomu człowieka, dla psa dostępne są o wiele mniej rozbudowane genomowe i transkryptomyczne bazy danych. W związku z tym niemożliwe było uzyskanie informacji *in silico* na temat wpływu opisywanych tu wariatów na potencjalne wystąpienie izoform ADCY3. Dalszym krokiem walidacji przedstawianych wyników byłyby analiza ekspresji np. scRNA-seq, w celu potwierdzenia wpływu tych markerów na funkcję genu *ADCY3*.

Gen *POMC*

Delecja 14 pz w genie *POMC* opisywana w poprzednich badaniach jako związana z otyłością była statystycznie nieistotna w naszym badaniu. W swoim badaniu, Raffan i in. 2016 analizowali delecję w modelu addytywnym; jednakże późniejsze badanie na niezależnej kohorcie sugerowało, że delecja może mieć charakter recesywny (Mankowska i in. 2017). Wpływ wariantu recesywnego można wykryć tylko wtedy, gdy w próbce są wystarczająco reprezentowane psy homozygotyczne pod względem danego allelu. W badanej kohorcie tylko jeden pies był homozygotyczny pod względem 14 pz delecji w genie *POMC* i może to być powodem, dla którego nie zaobserwowano tutaj wpływu genu *POMC*. Innym potencjalnym wyjaśnieniem może być fakt, że poprzednie badania ograniczały się do kilku miejsc w genomie co uniemożliwiło uwzględnienie w analizach ukrytego pokrewieństwa oraz struktury populacji, które mogą mieć wpływ na szacowanie efektów poszczególnych markerów.

W przedstawianej pracy przeanalizowano łącznie ponad 10,000 markerów w 41 genach co umożliwia zwiększenie dokładności oszacowań wpływu 14 pz delecji w *POMC* na otyłość. Należy jednak zaznaczyć, że wpływ genu *POMC* jest bardzo wiarygodny: nie tylko zostało to dobrze wykazane statystycznie w dwóch niezależnych populacjach, ale również wyjaśnione na poziomie molekularnym (Raffan i in. 2016). Otwartym pytaniem pozostaje wielkość efektu tego markera na otyłość w kontekście struktury populacji i ukrytego pokrewieństwa pomiędzy osobnikami, jednakże odpowiedź może przynieść tylko replikacja przedstawianych wyników na większej kohorcie.

Wnioski

Uzyskane wyniki uprawdopodobniają prawdziwość postawionej na wstępie hipotezy, że genetyczne uwarunkowanie powszechnej otyłości psów rasy labrador retriever może być inne niż u człowieka i obejmować warianty genetyczne, które charakteryzują się nie tylko wysokim wpływem, ale także relatywnie wysoką częstością. W tym świetle rośnie zasadność dalszych całogenomowych badań asocjacyjnych, mimo niedostępności liczebnie dużych prób.

Zgodność wyników uzyskanych dla dwóch różnych cech, wagi ciała oraz wskaźnika kondycji (BCS), wskazuje, że waga ciała niesie ważną informację dla badań nad otyłością psów rasy labrador retriever, mimo że tylko częściowo odzwierciedla udział tkanki tłuszczowej w ciele. Możliwość wykorzystania tego łatwo dostępnego i obiektywnego pomiaru ilościowego ma ważne znaczenie dla sukcesu przyszłych badań asocjacyjnych.

Wyniki mojej pracy wskazują na nowe potencjalne loci powiązane z otyłością u psów rasy labrador retriever. Oprócz znanego efektu delekcji 14 pz w genie *POMC*, warianty w pobliskim locus *ADCY3* mogą również odgrywać rolę w determinacji ryzyka rozwoju otyłości. Wiadomo już, że mutacje w genie *ADCY3* są związane z otyłością u myszy i ludzi, co czyni ten gen obiecującym przedmiotem badań nad otyłością u psów.

Bibliografia

- Akbari, Parsa, Ankit Gilani, Olukayode Sosina, Jack A Kosmicki, Lori Khrimian, Yi-Ya Fang, Trikaldarshi Persaud, Victor Garcia, Dylan Sun, i Alexander Li. 2021. „Sequencing of 640,000 exomes identifies GPR75 variants associated with protection from obesity”. *Science* 373 (6550): eabf8683.
- Ali, Eunüs S., Jin Hua, Claire H. Wilson, George A. Tallis, Fiona H. Zhou, Grigori Y. Rychkov, i Greg J. Barritt. 2016. „The Glucagon-like Peptide-1 Analogue Exendin-4 Reverses Impaired Intracellular Ca²⁺ Signalling in Steatotic Hepatocytes”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (9): 2135–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.006>.

- Baggio, Laurie L, i Daniel J Drucker. 2007. „Biology of incretins: GLP-1 and GIP”. *Gastroenterology* 132 (6): 2131–57.
- Bannister, Andrew J., i Tony Kouzarides. 2011. „Regulation of Chromatin by Histone Modifications”. *Cell Research* 21 (3): 381–95.
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Benzinou, Michael, Jean-Claude Chevre, Kirsten J Ward, Cécile Lecoœur, Christian Dina, Stephane Lobbens, Emmanuelle Durand, Jérôme Delplanque, Fritz F Horber, i Barbara Heude. 2008. „Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations”. *Human molecular genetics* 17 (13): 1916–21.
- Bjørnvad, C.R., S. Gloor, S.S. Johansen, P. Sandøe, i T.B. Lund. 2019. „Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches — A cross-sectional study of dog- and owner-related risk factors for obesity in Danish companion dogs”. *Preventive Veterinary Medicine* 170 (październik): 104730.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104730>.
- Bland, IM, A Guthrie-Jones, RD Taylor, i J Hill. 2009. „Dog obesity: owner attitudes and behaviour”. *Preventive veterinary medicine* 92 (4): 333–40.
- Bradfield, Jonathan P, Suzanne Vogelezang, Janine F Felix, Alessandra Chesi, Øyvind Helgeland, Momoko Horikoshi, Ville Karhunen, Estelle Lowry, Diana L Cousminer, i Tarunveer S Ahluwalia. 2019. „A trans-ancestral meta-analysis of genome-wide association studies reveals loci associated with childhood obesity”. *Human molecular genetics* 28 (19): 3327–38.
- Bulik-Sullivan, Brendan K., Po-Ru Loh, Hilary Finucane, Stephan Ripke, Jian Yang, Nick Patterson, Mark J. Daly, Alkes L. Price, i Benjamin M. Neale. 2015. „LD Score Regression Distinguishes Confounding from Polygenicity in Genome-Wide Association Studies”. *Nature genetics* 47 (3): 291–95.
<https://doi.org/10.1038/ng.3211>.
- Cao, Hong, Xuanmao Chen, Yimei Yang, i Daniel R Storm. 2016. „Disruption of type 3 adenylyl cyclase expression in the hypothalamus leads to obesity”. *Integrative obesity and diabetes* 2 (2): 225.
- Cao, Wenhong, Kiefer W Daniel, Jacques Robidoux, Pere Puigserver, Alexander V Medvedev, Xu Bai, Lisa M Floering, Bruce M Spiegelman, i Sheila Collins. 2004. „p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic

- AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene". *Molecular and cellular biology* 24 (7): 3057–67.
- Chami, Nathalie, Michael Preuss, Ryan W Walker, Arden Moscati, i Ruth JF Loos. 2020. „The role of polygenic susceptibility to obesity among carriers of pathogenic mutations in MC4R in the UK Biobank population". *PLoS medicine* 17 (7): e1003196.
- Chang, Christopher C, Carson C Chow, Laurent CAM Tellier, Shashaank Vattikuti, Shaun M Purcell, i James J Lee. 2015. „Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets". *GigaScience* 4 (1).
<https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>.
- Colliard, Laurence, Julie Ancel, Jean-Jacques Benet, Bernard-Marie Paragon, i Geraldine Blanchard. 2006. „Risk factors for obesity in dogs in France". *The Journal of nutrition* 136 (7): 1951S-1954S.
- Courcier, EA, RM Thomson, DJ Mellor, i PS Yam. 2010. „An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity". *Journal of Small Animal Practice* 51 (7): 362–67.
- Deaton, Aimée M., i Adrian Bird. 2011. „CpG islands and the regulation of transcription". *Genes & Development* 25 (10): 1010–22.
<https://doi.org/10.1101/gad.2037511>.
- Djouder, Nabil, Roland D Tuerk, Marianne Suter, Paolo Salvioni, Ramon F Thali, Roland Scholz, Kari Vahtomeri, Yolanda Auchli, Helene Rechsteiner, i René A Brunisholz. 2010. „PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis". *The EMBO journal* 29 (2): 469–81.
- Dvinge, Heidi, i Robert K Bradley. 2015. „Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes". *Genome medicine* 7: 1–13.
- Edney, AT, i PM Smith. 1986. „Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom." *The Veterinary Record* 118 (14): 391–96.
- Elks, Cathy E, Marcel Den Hoed, Jing Hua Zhao, Stephen J Sharp, Nicholas J Wareham, Ruth JF Loos, i Ken K Ong. 2012. „Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression". *Frontiers in endocrinology* 3: 29.
- Falchi, Mario, Julia Sarah El-Sayed Moustafa, Petros Takousis, Francesco Pesce, Amélie Bonnefond, Johanna C Andersson-Assarsson, Peter H Sudmant,

- Rajkumar Dorajoo, Masha'el Nedham Al-Shafai, i Leonardo Bottolo. 2014. „Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity”. *Nature genetics* 46 (5): 492–97.
- Fan, Wei, Bruce A Boston, Robert A Kesterson, Victor J Hruby, i Roger D Cone. 1997. „Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome”. *Nature* 385 (6612): 165–68.
- Felix, Janine F, Jonathan P Bradfield, Claire Monnereau, Ralf JP Van Der Valk, Evie Stergiakouli, Alessandra Chesi, Romy Gaillard, Bjarke Feenstra, Elisabeth Thiering, i Eskil Kreiner-Møller. 2016. „Genome-wide association analysis identifies three new susceptibility loci for childhood body mass index”. *Human molecular genetics* 25 (2): 389–403.
- Frayling, Timothy M, Nicholas J Timpson, Michael N Weedon, Eleftheria Zeggini, Rachel M Freathy, Cecilia M Lindgren, John RB Perry, Katherine S Elliott, Hana Lango, i Nigel W Rayner. 2007. „A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity”. *Science* 316 (5826): 889–94.
- German, Alexander J. 2006. „The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats”. *The Journal of Nutrition* 136 (7): 1940S-1946S.
<https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1940S>.
- German, Alexander J, Emily Blackwell, Mark Evans, i Carri Westgarth. 2017. „Overweight dogs exercise less frequently and for shorter periods: results of a large online survey of dog owners from the UK”. *Journal of nutritional science* 6: e11.
- Gille, Sanna, Hanna Fischer, Sanna Lindåse, Linda Palmqvist, Julia Lärka, Sara Wolf, Johanna Penell, i Josefin Söder. 2023. „Dog Owners' Perceptions of Canine Body Composition and Effect of Standardized Education for Dog Owners on Body Condition Assessment of Their Own Dogs”. *Veterinary Sciences* 10 (7): 447.
- Graff, Mariaelisa, Robert A Scott, Anne E Justice, Kristin L Young, Mary F Feitosa, Llilda Barata, Thomas W Winkler, Audrey Y Chu, Anubha Mahajan, i David Hadley. 2017. „Genome-wide physical activity interactions in adiposity—A meta-analysis of 200,452 adults”. *PLoS genetics* 13 (4): e1006528.

- Grantham, R. 1974. „Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution”. *Science* 185 (4154): 862–64.
<https://doi.org/10.1126/science.185.4154.862>.
- Grarup, Niels, Ida Moltke, Mette K. Andersen, Maria Dalby, Kristoffer Vitting-Seerup, Timo Kern, Yuvaraj Mahendran, i in. 2018. „Loss-of-Function Variants in ADCY3 Increase Risk of Obesity and Type 2 Diabetes”. *Nature Genetics* 50 (2): 172–74. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0022-7>.
- Grzemski, Adrian, Monika Stachowiak, Krzysztof Flisikowski, Monika Mankowska, Paulina Krzeminska, Maciej Gogulski, Roman Aleksiewicz, Maciej Szydłowski, Marek Switonski, i Joanna Nowacka-Woszek. 2019. „FTO and IRX3 genes are not promising markers for obesity in Labrador retriever dogs”. *Annals of Animal Science* 19 (2): 343–57.
- Habinowski, Susan A, i Lee A Witters. 2001. „The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells”. *Biochemical and biophysical research communications* 286 (5): 852–56.
- Hamer, D, i L Sirota. 2000. „Beware the Chopsticks Gene”. *Molecular Psychiatry* 5 (1): 11–13. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000662>.
- Hill, W. G., i Alan Robertson. 1968. „Linkage Disequilibrium in Finite Populations”. *Theoretical and Applied Genetics* 38 (6): 226–31.
<https://doi.org/10.1007/BF01245622>.
- Hummel, Katharine P, Margaret M Dickie, i Douglas L Coleman. 1966. „Diabetes, a new mutation in the mouse”. *Science* 153 (3740): 1127–28.
- Ingalls, Ann M, Margaret M Dickie, i GD Shell. 1950. „Obese, a new mutation in the house mouse.” *Journal of Heredity* 41: 317–18.
- John, Maura, Markus J Ankenbrand, Carolin Artmann, Jan A Freudenthal, Arthur Korte, i Dominik G Grimm. 2022. „Efficient permutation-based genome-wide association studies for normal and skewed phenotypic distributions”. *Bioinformatics* 38 (Supplement_2): ii5–12.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac455>.
- Kienzle, Ellen, Reinhold Bergler, i Anja Mandernach. 1998. „A Comparison of the Feeding Behavior and the Human–Animal Relationship in Owners of Normal and Obese Dogs”. *The Journal of Nutrition* 128 (12): 2779S–2782S.
<https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2779S>.

- Kilpeläinen, Tuomas O, Jayne F Martin Carli, Alicja A Skowronski, Qi Sun, Jennifer Kriebel, Mary F Feitosa, Åsa K Hedman, Alexander W Drong, James E Hayes, i Jinghua Zhao. 2016. „Genome-wide meta-analysis uncovers novel loci influencing circulating leptin levels”. *Nature communications* 7 (1): 10494.
- Kilpeläinen, Tuomas O., Lu Qi, Soren Brage, Stephen J. Sharp, Emily Sonestedt, Ellen Demerath, Tariq Ahmad, i in. 2011. „Physical Activity Attenuates the Influence of FTO Variants on Obesity Risk: A Meta-Analysis of 218,166 Adults and 19,268 Children”. *PLOS Medicine* 8 (11): e1001116.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001116>.
- Kilpeläinen, Tuomas O, M Carola Zillikens, Alena Stančáková, Francis M Finucane, Janina S Ried, Claudia Langenberg, Weihua Zhang, Jacques S Beckmann, Jian'an Luan, i Liesbeth Vandenput. 2011. „Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile”. *Nature genetics* 43 (8): 753–60.
- Kornblihtt, Alberto R, Ignacio E Schor, Mariano Alló, Gwendal Dujardin, Ezequiel Petrillo, i Manuel J Muñoz. 2013. „Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation”. *Nature reviews Molecular cell biology* 14 (3): 153–65.
- Kronfeld, David S., Susan Donoghue, i Lawrence T. Glickman. 1991. „Body Condition and Energy Intakes of Dogs in a Referral Teaching Hospital”. *The Journal of Nutrition* 121 (listopad): S157–58.
https://doi.org/10.1093/jn/121.suppl_11.S157.
- Kurokawa, Naoyuki, Elizabeth H Young, Yoshitomo Oka, Hiroshi Satoh, Nicholas J Wareham, MS Sandhu, i Ruth JF Loos. 2008. „The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals”. *International journal of obesity* 32 (8): 1240–49.
- Laflamme, DRPC. 1997. „Development and validation of a body condition score system for dogs”. *Canine Practice (Santa Barbara, Calif.: 1990)(USA)*.
- Lu, Dongsu, Derril Willard, Indravadan R Patel, Sue Kadwell, Laurie Overton, Tom Kost, Michael Luther, Wenbiao Chen, Richard P Woychik, i William O Wilkison. 1994. „Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor”. *Nature* 371 (6500): 799–802.

- Lu, Yingchang, Felix R Day, Stefan Gustafsson, Martin L Buchkovich, Jianbo Na, Veronique Bataille, Diana L Cousminer, Zari Dastani, Alexander W Drong, i Tonu Esko. 2016. „New loci for body fat percentage reveal link between adiposity and cardiometabolic disease risk”. *Nature communications* 7 (1): 10495.
- Lund, Elizabeth M, P Jane Armstrong, Claudia A Kirk, i Jeffery S Klausner. 2006. „Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices”. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 4 (2): 177.
- Lund, Elizabeth M, P Jane Armstrong, Claudia A Kirk, Linda M Kolar, i JS Klausnor. 1999. „Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States”. *Journal-American Veterinary Medical Association* 214: 1336–41.
- Maes, Hermine HM, Michael C Neale, i Lindon J Eaves. 1997. „Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity”. *Behavior genetics* 27: 325–51.
- Mankowska, M, P Krzeminska, M Graczyk, i M Switonski. 2017. „Confirmation that a deletion in the POMC gene is associated with body weight of Labrador Retriever dogs”. *Research in veterinary science* 112: 116–18.
- Mao, Junfu, Zhaofei Xia, Jiangnan Chen, i Jinhai Yu. 2013. „Prevalence and Risk Factors for Canine Obesity Surveyed in Veterinary Practices in Beijing, China”. *Preventive Veterinary Medicine* 112 (3): 438–42.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.08.012>.
- Mason, Eileen. 1970. „Obesity to pet dogs.” *Veterinary record* 86: 612–16.
- Mawby, Dianne I, Joseph W Bartges, Andre d’Avignon, Dorothy P Laflamme, Tamberlyn D Moyers, i Tamorah Cottrell. 2004. „Comparison of various methods for estimating body fat in dogs”. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40 (2): 109–14.
- McGreevy, PD, PC Thomson, C Pride, A Fawcett, T Grassi, i B Jones. 2005. „Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved”. *Veterinary Record* 156 (22): 695–702.
- McLaren, William, Laurent Gil, Sarah E. Hunt, Harpreet Singh Riat, Graham R. S. Ritchie, Anja Thormann, Paul Flicek, i Fiona Cunningham. 2016. „The Ensembl

- Variant Effect Predictor". *Genome Biology* 17 (1): 122.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>.
- Meisler, Miriam H, i Chao-Nan Ting. 1993. „The remarkable evolutionary history of the human amylase genes". *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4 (3): 503–9.
- Minster, Ryan L, Nicola L Hawley, Chi-Ting Su, Guangyun Sun, Erin E Kershaw, Hong Cheng, Olive D Buhule, Jerome Lin, Muagututi'a Sefuiva Reupena, i Satupa'itea Viali. 2016. „A thrifty variant in CREBRF strongly influences body mass index in Samoans". *Nature genetics* 48 (9): 1049–54.
- Mugnier, Amélie, Anthony Morin, Fanny Cellard, Loïc Devaux, Magalie Delmas, Achraf Adib-Lesaux, John Flanagan, Jérémy Laxalde, Sylvie Chastant, i Aurélien Grellet. 2020. „Association between birth weight and risk of overweight at adulthood in Labrador dogs". *Plos one* 15 (12): e0243820.
- Muñoz-Prieto, Alberto, Liza Rosenbaum Nielsen, Roman Dąbrowski, Charlotte Reinhard Bjørnvad, Josefin Söder, Elsa Lamy, Ingrida Monkeviciene, i in. 2018. „European Dog Owner Perceptions of Obesity and Factors Associated with Human and Canine Obesity". *Scientific Reports* 8 (1): 13353.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31532-0>.
- Nead, Kevin T, Aihua Li, Mackenzie R Wehner, Binod Neupane, Stefan Gustafsson, Adam Butterworth, James C Engert, A Darlene Davis, Robert A Hegele, i Ruby Miller. 2015. „Contribution of common non-synonymous variants in PCSK1 to body mass index variation and risk of obesity: a systematic review and meta-analysis with evidence from up to 331 175 individuals". *Human molecular genetics* 24 (12): 3582–94.
- Nikpay, Majid, Sepehr Ravati, Robert Dent, i Ruth McPherson. 2021. „Epigenome-Wide Study Identified Methylation Sites Associated with the Risk of Obesity". *Nutrients* 13 (6): 1984. <https://doi.org/10.3390/nu13061984>.
- Ong, Chin-Tong, i Swarnaseetha Adusumalli. 2020. „Increased intron retention is linked to Alzheimer's disease". *Neural regeneration research* 15 (2): 259.
- Orthofer, Michael, Armand Valsesia, Reedik Mägi, Qiao-Ping Wang, Joanna Kaczanowska, Ivona Kozieradzki, Alexandra Leopoldi, Domagoj Cikes, Lydia M Zopf, i Evgenii O Tretiakov. 2020. „Identification of ALK in Thinness". *Cell* 181 (6): 1246–62.

- Pitman, Jeffrey L., Matthew C. Wheeler, David J. Lloyd, John R. Walker, Richard J. Glynn, i Nicholas Gekakis. 2014. „A Gain-of-Function Mutation in Adenylate Cyclase 3 Protects Mice from Diet-Induced Obesity”. *PLOS ONE* 9 (10): e110226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110226>.
- Pontén, Fredrik, Karin Jirström, i Matthias Uhlen. 2008. „The Human Protein Atlas—a tool for pathology”. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 216 (4): 387–93.
- Price, Alkes L, Nick J Patterson, Robert M Plenge, Michael E Weinblatt, Nancy A Shadick, i David Reich. 2006. „Principal Components Analysis Corrects for Stratification in Genome-Wide Association Studies”. *Nature Genetics* 38 (8): 904–9. <https://doi.org/10.1038/ng1847>.
- Qi, Qibin, Audrey Y Chu, Jae H Kang, Jinyan Huang, Lynda M Rose, Majken K Jensen, Liming Liang, Gary C Curhan, Louis R Pasquale, i Janey L Wiggs. 2014. „Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: gene-diet interaction analysis in three US cohort studies”. *Bmj* 348.
- Raffan, Eleanor, Rowena J. Dennis, Conor J. O’Donovan, Julia M. Becker, Robert A. Scott, Stephen P. Smith, David J. Withers, i in. 2016. „A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs”. *Cell Metabolism* 23 (5): 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.012>.
- Rankinen, Tuomo, Aamir Zuberi, Yvon C Chagnon, S John Weisnagel, George Argyropoulos, Brandon Walts, Louis Pérusse, i Claude Bouchard. 2006. „The human obesity gene map: the 2005 update”. *Obesity* 14 (4): 529–644.
- Riveros-McKay, Fernando, Vanisha Mistry, Rebecca Bounds, Audrey Hendricks, Julia M Keogh, Hannah Thomas, Elana Henning, Laura J Corbin, Understanding Society Scientific Group, i Stephen O’Rahilly. 2019. „Genetic architecture of human thinness compared to severe obesity”. *PLoS genetics* 15 (1): e1007603.
- Robertson, ID. 2003. „The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA”. *Preventive Veterinary Medicine* 58 (1–2): 75–83.
- Saeed, Sadia, Amélie Bonnefond, Jaida Manzoor, Faiza Shabir, Hina Ayesha, Julien Philippe, Emmanuelle Durand, Hutokshi Crouch, Olivier Sand, i Muhammad Ali. 2015. „Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe

- obesity in children from a consanguineous population". *Obesity* 23 (8): 1687–95.
- Saeed, Sadia, Amélie Bonnefond, Filippo Tamanini, Muhammad Usman Mirza, Jaida Manzoor, Qasim M. Janjua, Sadia M. Din, i in. 2018. „Loss-of-Function Mutations in ADCY3 Cause Monogenic Severe Obesity". *Nature Genetics* 50 (2): 175–79. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0023-6>.
- Sallander, Marie, Malin Hagberg, Åke Hedhammar, Margareta Rundgren, i Jan E. Lindberg. 2010. „Energy-Intake and Activity Risk Factors for Owner-Perceived Obesity in a Defined Population of Swedish Dogs". *Preventive Veterinary Medicine* 96 (1): 132–41. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.05.004>.
- Sammeth, Michael, Sylvain Foissac, i Roderic Guigó. 2008. „A General Definition and Nomenclature for Alternative Splicing Events". *PLoS Computational Biology* 4 (8): e1000147. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000147>.
- Scarlett, JM, i S Donoghue. 1998. „Associations between body condition and disease in cats." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212 (11): 1725–31.
- Scuteri, Angelo, Serena Sanna, Wei-Min Chen, Manuela Uda, Giuseppe Albai, James Strait, Samer Najjar, Ramaiah Nagaraja, Marco Orrú, i Gianluca Usala. 2007. „Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits". *PLoS genetics* 3 (7): e115.
- Sheet, Sunirmal, Srikanth Krishnamoorthy, Jihye Cha, Soyoung Choi, i Bong-Hwan Choi. 2020. „Identification of Candidate Genes and Pathways Associated with Obesity-Related Traits in Canines via Gene-Set Enrichment and Pathway-Based GWAS Analysis". *Animals* 10 (11). <https://doi.org/10.3390/ani10112071>.
- Smith, Caren E, Jack L Follis, Hassan S Dashti, Toshiko Tanaka, Mariaelisa Graff, Amanda M Fretts, Tuomas O Kilpeläinen, Mary K Wojczynski, Kris Richardson, i Mike A Nalls. 2018. „Genome-Wide Interactions with Dairy Intake for Body Mass Index in Adults of European Descent". *Molecular nutrition & food research* 62 (3): 1700347.
- Soni, Arvind, Stefan Amisten, Patrik Rorsman, i Albert Salehi. 2013. „GPRC5B a putative glutamate-receptor candidate is negative modulator of insulin secretion". *Biochemical and biophysical research communications* 441 (3): 643–48.

- Stephens, Mark B, Cindy C Wilson, Jeffrey L Goodie, F Ellen Netting, Cara H Olsen, i Christopher G Byers. 2012. „Health perceptions and levels of attachment: owners and pets exercising together”. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 25 (6): 923–26.
- Stupnicki, Romuald, i Paweł Tomaszewski. 2016. „Wskaźnik masy ciała a zawartość tkanki tłuszczowej u dorosłych”. *Hygeia* 51 (4): 335–38.
- Sung, Yun, D. C. Rao, Treva Rice, Andrew Heath, Pamela Madden, Mary Feitosa, Llilda Barata, Jacek Czajkowski, Ingrid Borecki, i et al. 2017. „Genome-wide meta-analysis of 241,258 adults accounting for smoking behaviour identifies novel loci for obesity traits”. *Nature Communications* 8 (styczeń).
<https://doi.org/10.1038/ncomms14977>.
- Szydłowski, Maciej, i Michał Antkowiak. 2022. „No evidence that long runs of homozygosity tend to harbor risk variants for polygenic obesity in Labrador retriever dogs”. *Journal of Applied Genetics*, 1–5.
- Tian, Yan, Boqiang Peng, i Xianghui Fu. 2018. „New ADCY3 Variants Dance in Obesity Etiology”. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29 (6): 361–63.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.02.004>.
- Tonjes, ANKE, Markus Scholz, Markus Loeffler, i Michael Stumvoll. 2006. „Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator–activated receptor γ with pre-diabetic phenotypes: meta-analysis of 57 studies on nondiabetic individuals”. *Diabetes care* 29 (11): 2489–97.
- Toumba, Meropi, Pavlos Fanis, Dimitrios Vlachakis, Vassos Neocleous, Leonidas A. Phylactou, Nicos Skordis, Christos S. Mantzoros, i Maria Pantelidou. 2022. „Molecular modelling of novel ADCY3 variant predicts a molecular target for tackling obesity”. *International Journal of Molecular Medicine* 49 (1): 10.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5065>.
- Usui, Shiho, Hidemi Yasuda, i Yuzo Koketsu. 2016. „Characteristics of obese or overweight dogs visiting private Japanese veterinary clinics”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (4): 338–43.
- Van Der Klaauw, Agatha A, Sophie Croizier, Edson Mendes De Oliveira, Lukas KJ Stadler, Soyung Park, Youxin Kong, Matthew C Banton, Panna Tandon, Audrey E Hendricks, i Julia M Keogh. 2019. „Human semaphorin 3 variants

- link melanocortin circuit development and energy balance". *Cell* 176 (4): 729–42.
- Vogelezang, Suzanne, Jonathan P Bradfield, Tarunveer S Ahluwalia, John A Curtin, Timo A Lakka, Niels Grarup, Markus Scholz, Peter J Van der Most, Claire Monnereau, i Evie Stergiakouli. 2020. „Novel loci for childhood body mass index and shared heritability with adult cardiometabolic traits". *PLoS genetics* 16 (10): e1008718.
- Voight, Benjamin F, i Jonathan K Pritchard. 2005. „Confounding from Cryptic Relatedness in Case-Control Association Studies". *PLoS Genetics* 1 (3): e32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010032>.
- Westfall, Peter H, i S Stanley Young. 1993. *Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment*. T. 279. John Wiley & Sons.
- Wickham, Hadley, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy D'Agostino McGowan, Romain François, Garrett Golemund, Alex Hayes, Lionel Henry, i Jim Hester. 2019. „Welcome to the Tidyverse". *Journal of open source software* 4 (43): 1686.
- Winkler, Thomas W, Anne E Justice, Mariaelisa Graff, Llilda Barata, Mary F Feitosa, Su Chu, Jacek Czajkowski, Tõnu Esko, Tove Fall, i Tuomas O Kilpeläinen. 2015. „The influence of age and sex on genetic associations with adult body size and shape: a large-scale genome-wide interaction study". *PLoS genetics* 11 (10): e1005378.
- Witzel, Angela L., Claudia A. Kirk, George A. Henry, Philip W. Toll, John J. Brejda, i Inke Paetau-Robinson. 2014. „Use of a Novel Morphometric Method and Body Fat Index System for Estimation of Body Composition in Overweight and Obese Dogs". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244 (11): 1279–84. <https://doi.org/10.2460/javma.244.11.1279>.
- Xu, Xiaojing, Shaoyong Su, Vernon A Barnes, Carmen De Miguel, Jennifer Pollock, Dennis Ownby, Huidong Shi, Haidong Zhu, Harold Snieder, i Xiaoling Wang. 2013. „A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation". *Epigenetics* 8 (5): 522–33.
- Yang, Haihua, i Linghai Yang. 2016. „Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy". *J Mol Endocrinol* 57 (2): R93–108.

- Yengo, Loic, Julia Sidorenko, Kathryn E Kemper, Zhili Zheng, Andrew R Wood, Michael N Weedon, Timothy M Frayling, Joel Hirschhorn, Jian Yang, i Peter M Visscher. 2018. „Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~ 700000 individuals of European ancestry”. *Human molecular genetics* 27 (20): 3641–49.
- Yin, Wu, James Mu, i Morris J Birnbaum. 2003. „Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes”. *Journal of Biological Chemistry* 278 (44): 43074–80.
- Zhang, Yiying, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold, i Jeffrey M Friedman. 1994. „Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue”. *Nature* 372 (6505): 425–32.
- Zillikens, M Carola, Serkalem Demissie, Yi-Hsiang Hsu, Laura M Yerges-Armstrong, Wen-Chi Chou, Lisette Stolk, Gregory Livshits, Linda Broer, Toby Johnson, i Daniel L Koller. 2017. „Large meta-analysis of genome-wide association studies identifies five loci for lean body mass”. *Nature communications* 8 (1): 1–13.

Tabele

Tabela 1. Charakterystyka badanych psów

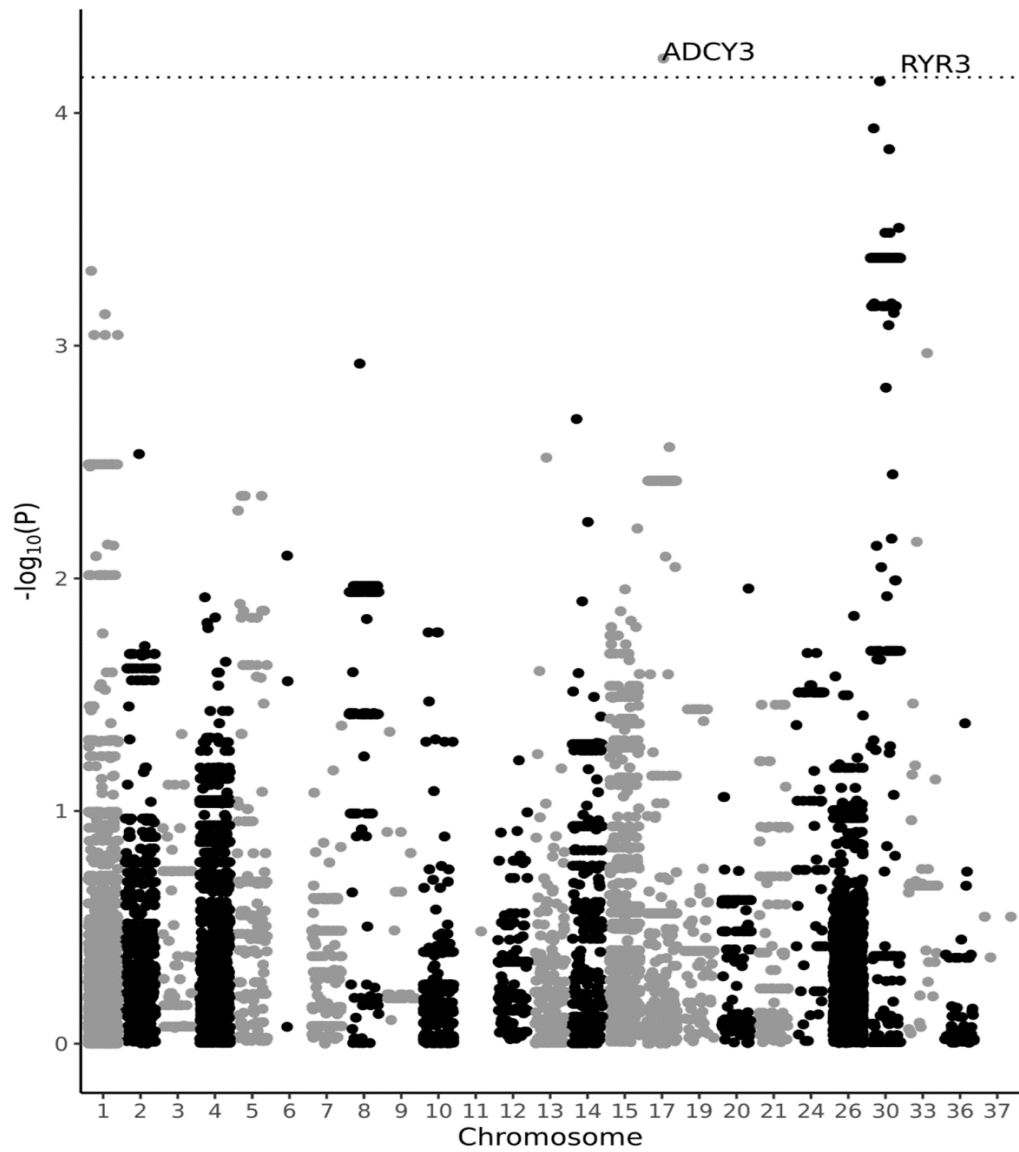
	Psy otyłe	Kontrola
BCS	5	3–4
N	16	34
Samce / samice	5 / 11	13 / 21
Wiek w miesiącach (zakres)	65,1 (24–108)	50,2 (12–120)
Średnia masa ciała w kg (zakres)	42,2 (35–50)	33,3 (25–48,1)
Psy sterylizowane	4	8
Genotypy delekcji 14 pz w genie <i>POMC</i> (Podwójna delekcja / Heterozygota / Brak delekcji)	1 / 4 / 11	0 / 8 / 26

Tabela 2. Panel genów powiązanych z otyłością monogeniczną u ludzi (HUGO ID) wraz z ich ortologami (Ensembl ID) i ich pozycją w genomie psa.

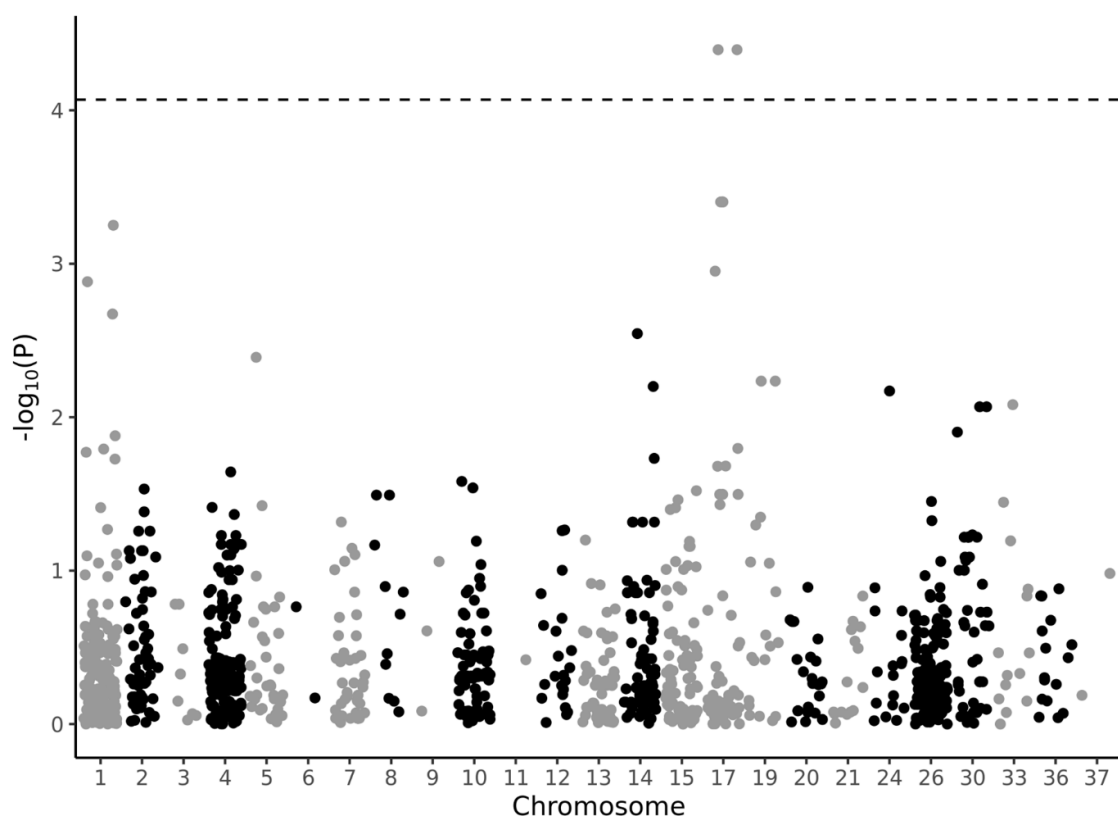
HUGO ID	Ensembl ID	Pozycja
MC4R	ENSCAFG00000000090	1: 16131589-16133079
NTRK2	ENSCAFG00000001380	1: 74449060-74777032
DYRK1B	ENSCAFG00000005428	1: 113644100-113828488
NR0B2	ENSCAFG000000012261	2: 73234586-73236206
PAX7	ENSCAFG000000015539	2: 79815748-73236206
PCSK1	ENSCAFG00000007882	3: 13233594-13274094
MAGEL2	ENSCAFG000000010136	3: 36363930-36365870
ABLM3	ENSCAFG000000018323	4: 59690735-59798383
GHR	ENSCAFG000000018579	4: 67022252-67290473
LEPR	ENSCAFG000000018600	5: 44688109-44775636
CDH15	ENSCAFG000000019846	5: 64258741-64277190
SH2B1	ENSCAFG000000017219	6: 18371832-18380962
SDCCAG8	ENSCAFG000000015803	7: 34396345-34631462
TTC8	ENSCAFG000000017478	8: 60061732-60115075
MKS1	ENSCAFG000000017464	9: 32860995-32879338
WDPCP	ENSCAFG000000003119	10: 62877527-63316345
TRIM32	ENSCAFG000000003516	11: 70462007-70463974
PHIP	ENSCAFG000000002804	12: 39904603-40032194
SIM1	ENSCAFG000000003538	12: 58485823-58553192
VPS13B	ENSCAFG000000000507	13: 1101610-1871225
LEP	ENSCAFG000000001672	14: 8116122-8131395
BBS9	ENSCAFG000000003161	14: 45200458-45643645
BBS10	ENSCAFG0000000031800	15: 19331876-19335583
CEP290	ENSCAFG000000006027	15: 29194983-29280429
CPE	ENSCAFG000000008861	15: 61321227-61414789
ADCY3	ENSCAFG000000004090	17: 19154571-19232411
POMC	ENSCAFG000000004149	17: 19431585-19434440
ALMS1	ENSCAFG000000008827	17: 49301606-49513625
BBS12	ENSCAFG000000003998	19: 17538346-17540487

BBS7	ENSCAFG00000004128	19: 18280520-18315825
PPARG	ENSCAFG00000004991	20: 6050357-6207981
UCP3	ENSCAFG000000042759	21: 24277896-24288639
TUB	ENSCAFG00000006892	21: 31566130-31625101
MKKS	ENSCAFG00000005651	24: 11898236-11913740
MC3R	ENSCAFG00000011887	24: 41492371-41494033
GNAS	ENSCAFG00000023756	24: 43643405-43658657
KSR2	ENSCAFG00000009865	26: 13987827-14395111
RYR3	ENSCAFG00000008056	30: 1180359-1533619
ARL6	ENSCAFG00000009111	33: 4800917-4839635
CEP19	ENSCAFG00000013046	33: 29735351-29741128
BBS5	ENSCAFG00000041315	36: 14207014-14233633
MSTN	ENSCAFG00000009398	37: 729172-734362

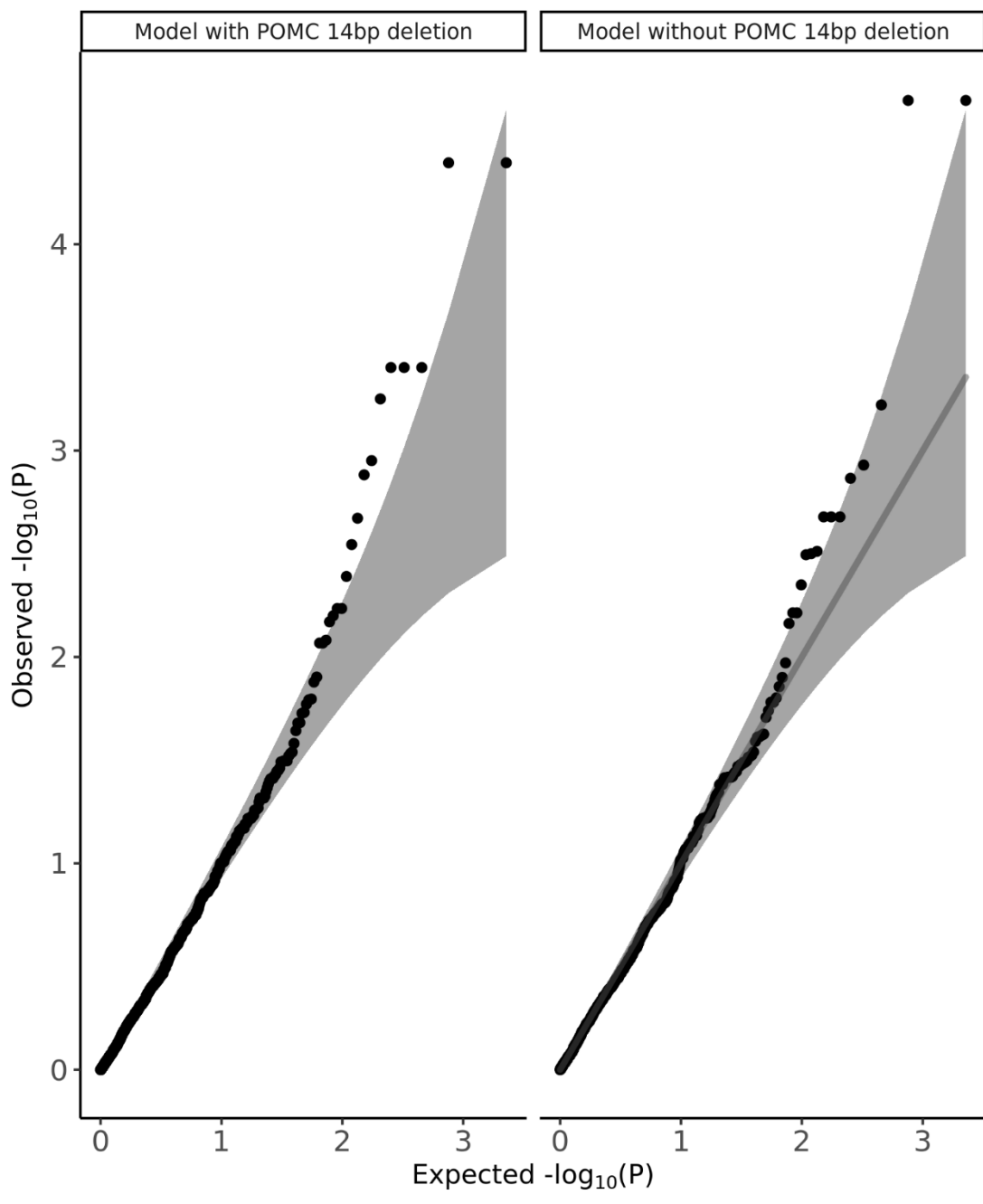
Ryciny



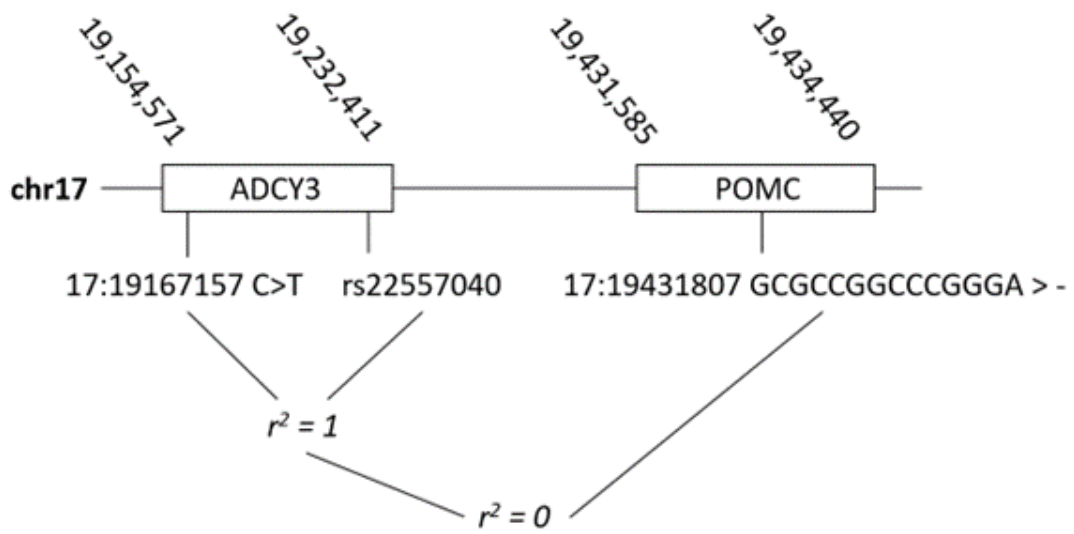
Rycina 1. Wykres Manhattan dla asocjacji 11520 polimorfizmów z masą ciała. Przerwana linia oznacza próg istotności statystycznej (FWER) $< 0,05$. Widoczny jeden istotny statystycznie marker w genie *ADCY3* (17:19222459 TA>T z p-wartością = $5,83 \times 10^{-5}$).



Rycina 2. Wykres Manhattan dla asocjacji 1135 markerów z BCS. Przerywana linia oznacza próg istotności statystycznej (FWER) $< 0,05$. Dwa istotnie statystycznie warianty to SNP zlokalizowane w genie *ADCY3* (17:19167157 T>C oraz 17:19180869 A>G z p-wartością 0,012).



Rycina 3. Wykres Q-Q porównujący rozkład p-wartości przed i po uwzględnieniu w modelu 14 pz delecji w genie *POMC* jako efektu stałego. Widoczne są pewne różnice w oszacowaniach istotności wpływu poszczególnych wariantów. Różnice te jednak nie mają znaczenia dla wnioskowania o asocjacji markerów w genie *ADCY3*.





Rycina 4. Położenie genów *ADCY3* oraz *POMC* w genomie psa. Warianty w genie *ADCY3* są ze sobą silnie sprzężone ($r^2 = 1$), ale jednocześnie pozostają niezależne od 14 pz delecji w genie *POMC*.

Przygotowane raporty naukowe

Communication

A Study of 41 Canine Orthologues of Human Genes Involved in Monogenic Obesity Reveals Marker in the *ADCY3* for Body Weight in Labrador Retrievers

Mateusz Sypniewski  and Maciej Szydlowski * 

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

* Correspondence: maciej.szydlowski@up.poznan.pl

Simple Summary: Obesity is a prevalent problem in dogs, although individual susceptibility is determined by a combination of genetic and non-genetic risk factors. This study looked at 41 canine orthologues of human genes linked to obesity in humans to find genes linked to weight in Labrador Retriever dogs. A linear mixed model using sex, age, and sterilization as covariates and population structure as a random effect were used to evaluate 11,520 variants in 50 adult dogs. A statistically significant variant in the *ADCY3* gene was discovered throughout the study, making it a promising marker for canine obesity research. Our findings provide further evidence that the genetic makeup of obesity in Labrador Retriever dogs contains genes with large effect sizes.

Abstract: Obesity and overweight are common conditions in dogs, but individual susceptibility varies with numerous risk factors, including diet, age, sterilization, and gender. In addition to environmental and biological factors, genetic and epigenetic risk factors can influence predisposition to canine obesity, however, they remain unknown. Labrador Retrievers are one of the breeds that are prone to obesity. The purpose of this study was to analyse 41 canine orthologues of human genes linked to monogenic obesity in humans to identify genes associated with body weight in Labrador Retriever dogs. We analysed 11,520 variants from 50 dogs using a linear mixed model with sex, age, and sterilization as covariates and population structure as a random effect. Estimates obtained from the model were subjected to a maxT permutation procedure to adjust *p*-values for FWER < 0.05. Only the *ADCY3* gene showed statistically significant association: TA>T deletion located at 17:19,222,459 in 1/20 intron (per allele effect of 5.56 kg, SE 0.018, *p*-value = 5.83×10^{-5} , TA/TA: 11 dogs; TA/T: 32 dogs; T/T: 7 dogs). Mutations in the *ADCY3* gene have already been associated with obesity in mice and humans, making it a promising marker for canine obesity research. Our results provide further evidence that the genetic makeup of obesity in Labrador Retriever dogs contains genes with large effect sizes.

Keywords: GWAS; linear mixed models; obesity; dogs; whole genome sequencing



Citation: Sypniewski, M.; Szydlowski, M. 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.* **2023**, *10*, 390. <https://doi.org/10.3390/vetsci10060390>

Academic Editor: J. Alberto Montoya-Alonso

Received: 7 April 2023

Revised: 5 May 2023

Accepted: 6 May 2023

Published: 8 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Obesity is the most common type of malnutrition in dogs [1–6]. Individual susceptibility arises from interaction between environmental (e.g., diet and physical activity), biological (age, sex or sterilization), genetic (including breed), and epigenetic risk factors [7]. In humans, the cause of obesity may be monogenic or polygenic. Monogenic obesity is characterized by the occurrence of single mutations affecting the functions of entire genes and metabolic pathways. In the case of common polygenic obesity, the inheritance mechanism typical for polygenic diseases is observed, where the accumulation of many mutations and non-genetic factors contributes to the phenotype. Despite the distinction of these two categories, the occurrence of monogenic obesity is to some extent conditioned by polygenic predispositions, and genes linked to human monogenic obesity are important for polygenic obesity [8].

The Labrador Retriever breed is a popular dog breed in many countries. Regardless of location, Labrador populations are at risk of becoming obese and overweight. Multivariate analysis adjusted for geographic region, diet, and age found that out of 1738 tested Labrador Retrievers, 35.9% dogs were classified overweight and 5.2% obese [9]. This suggests an established predisposition for this breed to develop obesity in adulthood. At the same time, dietary regime and exercise allow dogs to maintain the correct weight, which is typical of polygenic obesity. The polygenic nature of obesity does not exclude the participation of genes with a high influence that contribute to individual genetic variability within the breed [10]. Knowledge of genes with large effects could be useful for breeders to limit risk variants in populations. So far, knowledge of the individual effects of obesity genes is very limited and is mainly based on candidate gene studies [10–12].

It is expected that polygenes can explain a significant portion of intra-breed phenotypic variation in obesity, however, reliable estimates of heritability are missing. Sequencing of candidate genes for obesity in Labrador Retriever dogs identified a 14 bp deletion in the *POMC* gene that has a large effect on body weight, a trait strongly correlated with obesity [10,13]. This finding not only indicates that the genetic architecture of obesity may include genes with large effects, but also proves that the candidate gene approach can be an effective method of identifying genetic risk factors in small canine populations.

The aim of this study was to analyse 41 canine orthologues of genes linked to human obesity to identify those which have associations with body weight in Labrador Retriever dogs. To minimise risk of false positive results due to limited population size, we used data on whole genome sequencing (WGS) to adjust for linkage disequilibrium (LD) and population structure. Our limited research may provide another source of future meta-analysis.

2. Material and Methods

2.1. Animals and Phenotypes

We analysed 50 Labrador Retriever dogs (32 females and 18 males) with age ranged between 12 to 120 months. The analysed phenotype was body mass in kilograms and ranged between 25–50 kg with mean of 36.13 (SD 6.43). Pedigree data were not available. The records were collected from 2014 to 2017 in two veterinary clinics during routine visits.

2.2. Genotypes

We analysed the canine orthologs of 41 genes associated with monogenic obesity in humans. The list of gene names was taken from a commercial panel offered by the Blueprint Genetics (Monogenic Obesity Panel; test code KI1701; <https://blueprintgenetics.com/>; accessed on 12 September 2022). The gene names with the location in the canine reference genome (CanFam3.1) are presented in Supplementary Table S1. We decided to add RYR3 gene to the study because our preliminary analyses on structural variants suggested that it may be important for body condition score in Labrador retriever. Information on analysed genes were taken from the human GeneCards database [14] (accessed on 12 September 2022) and mouse genome Database [15] (accessed on 12 September 2022). The whole genome sequences for the fifty dogs were available from previous study [16]. The raw sequence data are publicly available (Nucleotide Archive PRJEB47658). The procedure for genotype calls for SNPs and short variants was as described by Szydlowski and Antkowiak [16]. All variants were annotated with VEP ver. 104 [17]. For the procedures of variant inclusion, we used PLINK V.1.9 software [18]. We included variants with call rate > 95%, minor allele frequency (MAF) > 5%, and in Hardy–Weinberg equilibrium (Fisher exact test p -value > 10^{-6}). Following the filtering, 11,520 variants remained for association analysis.

2.3. Association Analysis

False discoveries in association studies are a major concern which can be attributed to spurious associations caused by population structure and cryptic relatedness between individuals [19,20]. To minimise risk of false positive results, we applied a linear mixed model (LMM), in which genetic similarity between individuals was incorporated as the

variance–covariance structure of the random effect for individuals. This method allows adjustment of effect estimates of each marker for population structure and linkage disequilibrium. Despite the advantages of LMM, testing of thousands of markers simultaneously in a small sample would lead to a large number of false positive associations. To further minimize false positives, we estimated significance threshold with the maxT permutation method [21]. In this approach, a maximal test statistic computed over all markers in each of their permutations is taken to estimate significance threshold adjusted for family-wise error rate (FWER) where the FWER is defined as the probability of making at least one type-I error (or false positive). A recent study by John et al. [22] proposed a new approach which combines LMM and maxT permutation with small computational burden, named permGWAS. To test the association between weight and each variant, we applied permutation-based association study with a linear mixed model (LMM) using the permGWAS method. Age, sex, and sterilisation status were fitted in the statistical model as covariates. For selection of statistically significant variants, we applied FWER < 0.05 significance threshold. We used plink 1.9 software for data filtering [18] and permGWAS software for association analysis (<https://github.com/grimmlab/permGWAS>; accessed on 21 September 2022; [22]). The Manhattan plot was generated using ggplot2 package in R [23,24].

3. Results

In total, we analysed 41 genes with 11,520 short variants. The permGWAS took approx. 9 min to estimate FWER adjusted p -values with 10,000 permutations. One variant in the *ADCY3* gene passed FWER < 0.05 significance threshold (Figure 1). The variant is a TA>T deletion located at 17:19,222,459 in 1/20 intron (per allele effect of 5.56 kg, SE 0.018, p -value = 5.83×10^{-5} , TA/TA: 11 dogs; TA/T: 32 dogs; T/T: 7 dogs). The second, most significant variant, slightly below significance threshold, was G>A substitution in the *RYR3* gene (30:1,294,982, intron 46/130, per allele effect of 5.97 kg, SE 0.018, p -value = 7.31×10^{-5} , G/G: 25 dogs, G/A: 19 dogs, AA: 6 dogs).

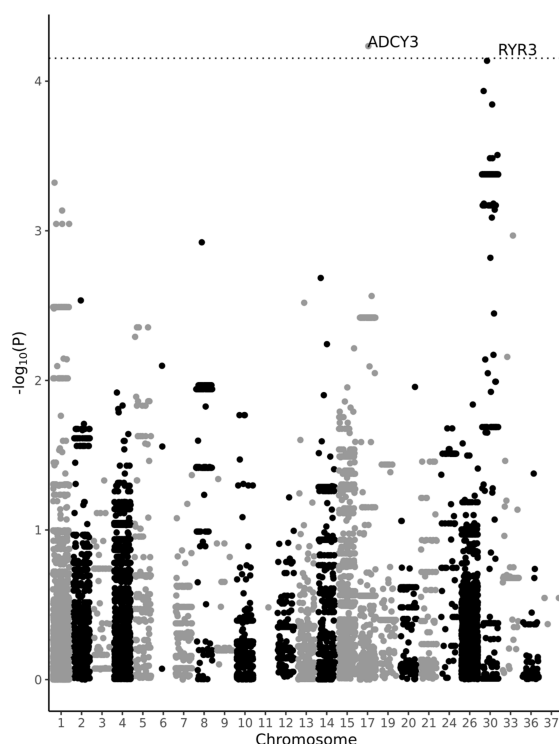


Figure 1. Manhattan plot for the 11,520 variants in the canine genome. Dotted line indicates FWER threshold < 0.05. One position within the *ADCY3* gene occurred with statistical significance (17:19222459 TA>T with p -value = 5.83×10^{-5}).

For *POMC* 14 bp deletion (17:19431807-19431820 CGCGGCGGGGCCCT>C) no significant association was detected.

4. Discussion

Out of 41 tested genes, only *ADCY3* yielded a statistically significant result. *ADCY3* catalyses the synthesis of cyclic AMP (cAMP) from ATP. Cyclic AMP is an essential second messenger in intracellular signalling downstream of key metabolic mediators such as glucagon-like peptide 1, ghrelin, and α -melanocyte-stimulating hormone [25], and cAMP signalling has been linked to insulin secretion in beta cells [26]. Loss-of-function mutations in this gene are linked to early onset of severe obesity in humans [27–29]. In addition, mouse models have indicated that *ADCY3* has an important role in the regulation of glucose metabolism and adiposity [26]. Mutations in *ADCY3* in mice cause impaired insulin sensitivity and dyslipidaemia [30] and mice with *ADCY3* knockout show increased fat mass, hyperphagia, depression-like phenotypes, and leptin resistance [31,32]. Furthermore, a common variation in *ADCY5*, a gene in the same family as *ADCY3*, is known to be associated with fasting plasma glucose levels and risk of type 2 diabetes [33]. Studies on mice showed that gain-of-function mutation in *ADCY3* reduced white and brown adipose tissue depots and protected the animals from hepatic lipid accumulation when fed with a high-fat diet [34]. Although the 17:19,222,459 TA>T variant is located in the intron, it has been proven that introns play a role in synthesis of noncoding RNA [35] and regulation of gene expression [36,37]. Moreover, epigenomic study in a human cohort identified rare variants within the 2p23.3 region making this region more susceptible to methylation. The result is lowered expression of *ADCY3* gene which is associated with BMI increase [7]. Unfortunately, to the best of the authors' knowledge there have been no similar studies for dogs. Furthermore, we cannot rule out that the influence of the *ADCY3* gene observed here is an indirect effect, correlated with a structural mutation that was not investigated in our study.

The second most significant variant was in the *RYR3* gene. Despite not passing the significance threshold, there are some indicators linking this gene with obesity. *RYR3* encodes ryanodine receptor 3, a high-conductance cation channel, which releases calcium ions from intracellular storage [38–42]. Calcium modulators such as *RYR3* can regulate adiponectin expression, which is an important adipose-specific protein responsible for, e.g., insulin sensitizing [43]. Study on *RYR3* knockdown mice identified that *RYR3* plays role in regulation of adiponectin expression. Silencing of *RYR3* in high-fat-fed obese mice increased serum adiponectin level, improved INS sensitivity, and lowered fasting glucose levels [44].

Previous studies [10,13] reported the effect of 14 bp deletion in the *POMC* gene, however, no significant association was detected in our study. An explanation is the low frequency of this variant in our cohort (12 heterozygous and a single homozygous).

Our research has a number of obvious weaknesses that must be considered if false conclusions are to be avoided. First, despite a number of efforts to reduce false positives in this small population, there is no guarantee that the risk of false positives has been sufficiently reduced. Second, our results may be false not only because of the small sample, but also because of its heterogeneity. Thirdly, the conducted studies do not explain the mechanism of the association observed here, which is particularly important for the mutation located in the intron. The three limitations mentioned here, among other weaknesses of our research, force us to treat the obtained results with caution.

5. Conclusions

The findings of this study suggest that intronic mutation in the *ADCY3* gene may be an important statistically linked risk factor for obesity in the Labrador Retriever breed. Mutations in the *ADCY3* gene have already been linked to obesity in mice and humans, making the gene a promising marker for obesity research in dogs. Our results provide further evidence that the genetic architecture of obesity in Labrador Retriever dogs includes

genes with large effect sizes. Our report provides another source of data for a meta-analysis aimed at identifying robust genetic risk factors for obesity.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci10060390/s1>, Table S1: The 41 genes linked to monogenic obesity in humans, and their orthologs in the canine genome.

Author Contributions: Formal analysis, M.S. (Mateusz Sypniewski); Investigation, M.S. (Mateusz Sypniewski); Writing—original draft, M.S. (Mateusz Sypniewski); Writing—review & editing, M.S. (Mateusz Sypniewski); Visualization, M.S. (Mateusz Sypniewski); Supervision, M.S. (Maciej Szydlowski); Project administration, M.S. (Maciej Szydlowski); Funding acquisition, M.S. (Maciej Szydlowski). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board of Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznań, Poland (31/2013). All analyses were performed with the owner consent.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The raw sequence data is publicly available at Nucleotide Archive PRJEB47658.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mason, E. Obesity to Pet Dogs. *Vet. Rec.* **1970**, *86*, 612–616. [[CrossRef](#)]
2. Edney, A.; Smith, P. Study of Obesity in Dogs Visiting Veterinary Practices in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **1986**, *118*, 391–396. [[CrossRef](#)]
3. Robertson, I. The Association of Exercise, Diet and Other Factors with Owner-Perceived Obesity in Privately Owned Dogs from Metropolitan Perth, WA. *Prev. Vet. Med.* **2003**, *58*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. McGreevy, P.; Thomson, P.; Pride, C.; Fawcett, A.; Grassi, T.; Jones, B. Prevalence of Obesity in Dogs Examined by Australian Veterinary Practices and the Risk Factors Involved. *Vet. Rec.* **2005**, *156*, 695–702. [[CrossRef](#)]
5. Colliard, L.; Ancel, J.; Benet, J.-J.; Paragon, B.-M.; Blanchard, G. Risk Factors for Obesity in Dogs in France. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1951S–1954S. [[CrossRef](#)]
6. Bjørnvad, C.R.; Gloor, S.; Johansen, S.S.; Sandøe, P.; Lund, T.B. Neutering Increases the Risk of Obesity in Male Dogs but Not in Bitches—A Cross-Sectional Study of Dog- and Owner-Related Risk Factors for Obesity in Danish Companion Dogs. *Prev. Vet. Med.* **2019**, *170*, 104730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nikpay, M.; Ravati, S.; Dent, R.; McPherson, R. Epigenome-Wide Study Identified Methylation Sites Associated with the Risk of Obesity. *Nutrients* **2021**, *13*, 1984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chami, N.; Preuss, M.; Walker, R.W.; Moscati, A.; Loos, R.J. The Role of Polygenic Susceptibility to Obesity among Carriers of Pathogenic Mutations in MC4R in the UK Biobank Population. *PLoS Med.* **2020**, *17*, e1003196. [[CrossRef](#)]
9. Lund, E.M.; Armstrong, P.J.; Kirk, C.A.; Klausner, J.S. Prevalence and Risk Factors for Obesity in Adult Dogs from Private US Veterinary Practices. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* **2006**, *4*, 177.
10. 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.; et al. A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 893–900. [[CrossRef](#)]
11. Grzemeski, A.; Stachowiak, M.; Flisikowski, K.; Mankowska, M.; Krzeminska, P.; Gogulski, M.; Aleksiewicz, R.; Szydlowski, M.; Switonski, M.; Nowacka-Woszek, J. FTO and IRX3 Genes Are Not Promising Markers for Obesity in Labrador Retriever Dogs. *Ann. Anim. Sci.* **2019**, *19*, 343–357. [[CrossRef](#)]
12. Sheet, S.; Krishnamoorthy, S.; Cha, J.; Choi, S.; Choi, B.-H. Identification of Candidate Genes and Pathways Associated with Obesity-Related Traits in Canines via Gene-Set Enrichment and Pathway-Based GWAS Analysis. *Animals* **2020**, *10*, 2071. [[CrossRef](#)]
13. Mankowska, M.; Krzeminska, P.; Graczyk, M.; Switonski, M. Confirmation That a Deletion in the POMC Gene Is Associated with Body Weight of Labrador Retriever Dogs. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *112*, 116–118. [[PubMed](#)]
14. Stelzer, G.; Rosen, N.; Plaschkes, I.; Zimmerman, S.; Twik, M.; Fishilevich, S.; Stein, T.I.; Nudel, R.; Lieder, I.; Mazor, Y.; et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *54*, 1.30.1–1.30.33. [[CrossRef](#)]

15. Bult, C.J.; Blake, J.A.; Smith, C.L.; Kadin, J.A.; Richardson, J.E. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D801–D806. [[CrossRef](#)]
16. Szydlowski, M.; Antkowiak, M. No Evidence That Long Runs of Homozygosity Tend to Harbor Risk Variants for Polygenic Obesity in Labrador Retriever Dogs. *J. Appl. Genet.* **2022**, *63*, 557–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 122. [[CrossRef](#)]
18. Chang, C.C.; Chow, C.C.; Tellier, L.C.; Vattikuti, S.; Purcell, S.M.; Lee, J.J. Second-Generation PLINK: Rising to the Challenge of Larger and Richer Datasets. *GigaScience* **2015**, *4*, 7. [[CrossRef](#)]
19. Voight, B.F.; Pritchard, J.K. Confounding from Cryptic Relatedness in Case-Control Association Studies. *PLoS Genet.* **2005**, *1*, e32. [[CrossRef](#)]
20. Bulik-Sullivan, B.K.; Loh, P.-R.; Finucane, H.; Ripke, S.; Yang, J.; Patterson, N.; Daly, M.J.; Price, A.L.; Neale, B.M. LD Score Regression Distinguishes Confounding from Polygenicity in Genome-Wide Association Studies. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 291–295. [[CrossRef](#)]
21. Westfall, P.H.; Young, S.S. *Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for p-Value Adjustment*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 1993; Volume 279, ISBN 0-471-55761-7.
22. John, M.; Ankenbrand, M.J.; Artmann, C.; Freudenthal, J.A.; Korte, A.; Grimm, D.G. Efficient Permutation-Based Genome-Wide Association Studies for Normal and Skewed Phenotypic Distributions. *Bioinformatics* **2022**, *38*, ii5–ii12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.D.; François, R.; Golemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **2019**, *4*, 1686. [[CrossRef](#)]
24. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 21 September 2022).
25. Xu, T.-R.; Yang, Y.; Ward, R.; Gao, L.; Liu, Y. Orexin Receptors: Multi-Functional Therapeutic Targets for Sleeping Disorders, Eating Disorders, Drug Addiction, Cancers and Other Physiological Disorders. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 2413–2423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yang, H.; Yang, L. Targeting CAMP/PKA Pathway for Glycemic Control and Type 2 Diabetes Therapy. *J. Mol. Endocrinol.* **2016**, *57*, R93–R108. [[CrossRef](#)]
27. Saeed, S.; Bonnefond, A.; Tamanini, F.; Mirza, M.U.; Manzoor, J.; Janjua, Q.M.; Din, S.M.; Gaitan, J.; Milochau, A.; Durand, E.; et al. Loss-of-Function Mutations in ADCY3 Cause Monogenic Severe Obesity. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 175–179. [[CrossRef](#)]
28. Toumba, M.; Fanis, P.; Vlachakis, D.; Neocleous, V.; Phylactou, L.A.; Skordis, N.; Mantzoros, C.S.; Pantelidou, M. Molecular Modelling of Novel ADCY3 Variant Predicts a Molecular Target for Tackling Obesity. *Int. J. Mol. Med.* **2022**, *49*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saeed, S.; Arslan, M.; Froguel, P. Genetics of Obesity in Consanguineous Populations: Toward Precision Medicine and the Discovery of Novel Obesity Genes. *Obesity* **2018**, *26*, 474–484. [[CrossRef](#)]
30. Tong, T.; Shen, Y.; Lee, H.-W.; Yu, R.; Park, T. Adenylyl Cyclase 3 Haploinsufficiency Confers Susceptibility to Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34179. [[CrossRef](#)]
31. Wang, Z.; Li, V.; Chan, G.C.; Phan, T.; Nudelman, A.S.; Xia, Z.; Storm, D.R. Adult Type 3 Adenylyl Cyclase-Deficient Mice Are Obese. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6979. [[CrossRef](#)]
32. Chen, X.; Luo, J.; Leng, Y.; Yang, Y.; Zweifel, L.S.; Palmiter, R.D.; Storm, D.R. Ablation of Type III Adenylyl Cyclase in Mice Causes Reduced Neuronal Activity, Altered Sleep Pattern, and Depression-like Phenotypes. *Biol. Psychiatry* **2016**, *80*, 836–848. [[CrossRef](#)]
33. Dupuis, J.; Langenberg, C.; Prokopenko, I.; Saxena, R.; Soranzo, N.; Jackson, A.U.; Wheeler, E.; Glazer, N.L.; Bouatia-Naji, N.; Gloyn, A.L. New Genetic Loci Implicated in Fasting Glucose Homeostasis and Their Impact on Type 2 Diabetes Risk. *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 105–116. [[CrossRef](#)]
34. Pitman, J.L.; Wheeler, M.C.; Lloyd, D.J.; Walker, J.R.; Glynne, R.J.; Gekakis, N. A Gain-of-Function Mutation in Adenylate Cyclase 3 Protects Mice from Diet-Induced Obesity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110226. [[CrossRef](#)]
35. Rearick, D.; Prakash, A.; McSweeney, A.; Shepard, S.S.; Fedorova, L.; Fedorov, A. Critical Association of ncRNA with Introns. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 2357–2366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bicknell, A.A.; Cenik, C.; Chua, H.N.; Roth, F.P.; Moore, M.J. Introns in UTRs: Why We Should Stop Ignoring Them. *BioEssays* **2012**, *34*, 1025–1034. [[CrossRef](#)]
37. Cenik, C.; Chua, H.N.; Zhang, H.; Tarnawsky, S.P.; Akef, A.; Derti, A.; Tasan, M.; Moore, M.J.; Palazzo, A.F.; Roth, F.P. Genome Analysis Reveals Interplay between 5'UTR Introns and Nuclear mRNA Export for Secretory and Mitochondrial Genes. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001366. [[CrossRef](#)]
38. Dulhunty, A.F.; Pouliquin, P. What We Don't Know about the Structure of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2003**, *30*, 713–723. [[CrossRef](#)]
39. Johnson, J.D.; Kuang, S.; Mislser, S.; Polonsky, K.S. Ryanodine Receptors in Human Pancreatic β Cells: Localization and Effects on Insulin Secretion. *FASEB J.* **2004**, *18*, 878–880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mitchell, K.J.; Pinton, P.; Varadi, A.; Tacchetti, C.; Ainscow, E.K.; Pozzan, T.; Rizzuto, R.; Rutter, G.A. Dense Core Secretory Vesicles Revealed as a Dynamic Ca^{2+} Store in Neuroendocrine Cells with a Vesicle-Associated Membrane Protein Aequorin Chimaera. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 41–52. [[CrossRef](#)]

41. Giannini, G.; Clementi, E.; Ceci, R.; Marziali, G.; Sorrentino, V. Expression of a Ryanodine Receptor-Ca²⁺ Channel That Is Regulated by TGF- β . *Science* **1992**, *257*, 91–94. [[CrossRef](#)]
42. Giannini, G.; Conti, A.; Mammarella, S.; Scrobogna, M.; Sorrentino, V. The Ryanodine Receptor/Calcium Channel Genes Are Widely and Differentially Expressed in Murine Brain and Peripheral Tissues. *J. Cell Biol.* **1995**, *128*, 893–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, H.B.; Kong, M.; Kim, T.M.; Suh, Y.H.; Kim, W.-H.; Lim, J.H.; Song, J.H.; Jung, M.H. NFATc4 and ATF3 Negatively Regulate Adiponectin Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes* **2006**, *55*, 1342–1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tsai, S.-H.; Chang, E.Y.-C.; Chang, Y.-C.; Hee, S.-W.; Tsai, Y.-C.; Chang, T.-J.; Chuang, L.-M. Knockdown of RyR3 Enhances Adiponectin Expression Through an Atf3-Dependent Pathway. *Endocrinology* **2013**, *154*, 1117–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Variants in *ADCY3* gene are associated with body condition score in Labrador Retrievers

Mateusz Sypniewski¹ and Maciej Szydlowski¹

¹Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, 60-637 Poznań, Poland

Correspondence to: Maciej Szydlowski, e-mail: maciej.szydlowski@up.poznan.pl

Abstract

We analyzed 1135 representative short variants of 41 canine genes whose human orthologues are involved in monogenic obesity, with the aim of finding markers of polygenic obesity in Labrador retriever dogs. Two highly correlated intronic variants within the *ADCY3* gene occurred with statistical significance (adjusted $p = 0.012$): a novel T>C mutation at position 17:19167157 and a G>A mutation at position 17:19180869 (rs22557040), both with an odds ratio of 0.044. We also showed that the novel association effect of the *ADCY3* gene with obesity is independent of the known effect of the closely located 14-bp deletion in the *POMC* locus. Results indicate new potential obesity related loci in Labrador retriever breed.

Keywords: GWAS; obesity; dogs; whole-genome sequencing

Introduction

Canine overweight and obesity in Western countries varies between 19.7 and 59.3% making it the most frequent form of malnutrition (Bjørnvad et al., 2019; Colliard et al., 2006; Courcier et al., 2010; Edney & Smith, 1986; Lund et al., 2006; Mason, 1970; McGreevy et al., 2005; Robertson, 2003). Diet, physical activity, age, gender, neutering, and breed are factors known to affect obesity in dogs. Phenotypic variation in obesity within a breed can be attributed to polygenes, though reliable heritability estimates for canine obesity traits are very difficult to

obtain. The candidate gene approach has proved successful in identifying the *POMC* gene as an important genetic factor with a large effect on body weight, adiposity, and food motivation in Labrador retrievers and closely related flat-coat retrievers dogs (Mankowska et al., 2017; Raffan et al., 2016). This finding regarding *POMC*'s effect suggests that the genetic architecture of polygenic obesity differs in humans and dogs and encourages us to search among the genes that cause monogenic obesity in human for others that have large effects on polygenic obesity in dogs. The Labrador Retriever breed is a popular dog breed in many countries. Regardless of location, however, Labrador individuals are at risk of obesity and overweight. This similarity between populations from different geographic regions suggests an established predisposition for this breed to develop obesity in adulthood. The fact that dietary regime and exercise allow dogs to easily maintain their correct weight suggests that the genetic predisposition is polygenic. As shown in Raffan (Raffan et al., 2016) study, the polygenic nature of obesity does not exclude the participation of genes with a relatively high influence that contribute to variability within the breed. Identification of genes with large effects could be useful for breeders in limiting the risk of obesity in populations. Knowledge of obesity genes to date has been very limited, and is based mainly on candidate gene studies, such as of *POMC* and *FTO* in flat-coat retrievers and Labrador retrievers (Grzemeski et al., 2019; Raffan et al., 2016) and *CACNA1B* in the study of Sheet *et al.*, (2020), which considered eighteen breeds. In our previous paper we provided evidence that *ADCY3* gene is associated with body weight in Labrador Retrievers (Sypniewski & Szydlowski, 2023). Because the gene is known to be associated with obesity traits in mice and humans, it can be considered a strong candidate gene for obesity in dogs (Siljee et al., 2018). This study uses the candidate gene approach to identify new risk variants for canine obesity. We analyze 41 genes linked to human obesity in order to identify those which have possible associations with obesity in Labrador retriever dogs. We provide evidence for the association of the *ADCY3*

gene with body condition score (BCS) and show that this effect is independent of the known effects of the *POMC* gene, which is located nearby.

Material and Methods

Animals and phenotypes

The study included fifty Labrador retriever dogs (32 females and 18 males) from the Polish population. Their ages ranged from 12 to 120 months, and the body mass between 25 and 50 kg. Obesity was measured using the five-point body condition score (BCS), which is a validated measure of adiposity that accounts for variation in body morphology within and across breeds (Mawby et al., 2004). The BCS was determined by visual and palpation assessment during routine veterinary examination. The amount of fat cover over the dogs' ribs, tail base and the abdominal contour were used in assessing the BCS. Sixteen dogs with BCS = 5 were classified as obese, and the remaining 34 dogs with BCS = 3 (n = 16) and BCS = 4 (n = 18) were taken as the control group. Averages for age and sex ratio were similar between the obese and control groups (**Table 1**). Pedigree data was not available; however, the dogs were assumed not to be closely related. The records were collected from routine visits to two veterinary clinics from 2014 to 2017.

Genotypes

We analyzed the canine orthologs of 41 human genes that trigger monogenic obesity in human. The 41 gene names were taken from a commercial gene panel offered by the Blueprint Genetics (Monogenic Obesity Panel; test code KI1701; <https://blueprintgenetics.com/>; accessed on 12 September 2022). The gene names with genomic locations in the canine reference genome (CanFam3.1) are presented in Table 2. Information on analyzed genes was taken from the GeneCards human database (Stelzer et al., 2016); accessed on 12 September 2022) and the Mouse Genome Database (Bult *et al.*, 2019;

accessed on 12 September 2022). Genomic DNA was extracted from blood with the use of the Blood Mini isolation kit (A&A Biotechnology). The whole-genome sequences for the fifty dogs were available from a previous study (Szydlowski & Antkowiak, 2022). The raw sequence data are publicly available (Nucleotide Archive PRJEB47658). The procedures for genotype calls for the SNPs and short variants have been described by Szydlowski and Antkowiak (Szydlowski & Antkowiak, 2022). All variants were annotated with VEP ver. 104 (McLaren et al., 2016). We used PLINK v.1.9 software for variant inclusion and pruning (Chang et al., 2015). We included variants which had a call rate > 95%, a minor allele frequency (MAF) > 5% and which were in Hardy–Weinberg equilibrium (Fisher exact test $p > 0.05$). To reduce the problem of multiple testing, we used linkage disequilibrium (LD) pruning; in this method, instead of testing all variants, we consider only a fraction of the variants that are representative of entire haplotype blocks i.e., tag variants. LD pruning was performed using PLINK with the command *indep-pairwise 50 5 0.5*. This command considers a window of 50 SNPs, calculates the LD between each pair of SNPs in the window, removes one of a pair of SNPs if the LD is greater than 0.5 ($r^2 > 0.5$), shifts the window 5 SNPs forward, and repeats the procedure. The r^2 is the square of the correlation coefficient between the presence or absence of an allele at the first locus and the second locus (Hill & Robertson, 1968). It should be noted that the procedure does not guarantee that all tag variants are uncorrelated. Following the filtering and LD pruning, 1135 tag variants remained for association analysis. The reliable genotypes for 14-bp deletion at *POMC* locus were taken from whole-genome sequencing data (Raffan et al., 2016; Szydlowski & Antkowiak, 2022).

Association analysis

To test the association between obesity and each variant we performed an additive logistic regression model implemented in PLINK v.1.9 (Chang et al., 2015). Age, sex, and neutering status were fitted in the statistical model. Additionally, in order to find only novel

associations, the model included genotypes for 14-bp deletion in the *POMC* gene (Raffan et al., 2016); **Table 2**). The effect for each variant is expressed in terms of an odds ratio (OR), which is a statistic that quantifies here the strength of the association of the minor allele with obesity, and which is correlated with another measure of association, the relative risk. Note that the relative risk has a more straightforward interpretation than OR, but could not be estimated in our study. Due to our limited sample size, we used the max(T) permutation procedure with 1,000,000 permutations in order to estimate empirical p-values and Family Wise Error Rate (FWER) threshold (Westfall & Young, 1993). The FWER is defined as the probability of making at least one type-1 error and we assumed < 0.05 FWER significance threshold. The association analysis was performed using PLINK (Purcell et al., 2007).

Results

Tag variants and their associations with obesity

We analyzed 1135 tag variants for the 41 genes, and the remaining 14,510 variants were not considered. The number of tag variants within a gene locus represents the variability of the gene in a population. The number of tag variants for each of the 41 genes varied from one to 151, with median of ten. The gene with greatest number of tag variants was *NTRK2*, with 151 tag variants, whereas the *BBS12*, *MAGEL2*, *MC4R*, *MKS1*, and *TRIM32* genes had only single variants. In order to find tag variants associated with obesity, we estimated and tested the individual effects of the 1135 tag variants in a logistic regression model. Only two variants, both in the *ADCY3* gene, occurred with statistical significance for obesity (**Figure 1**). One is a novel C>T mutation at position 17:19167157 in intron 8/20 (adjusted $p = 0.012$); the other is a G>A mutation at position 17:19180869 (rs22557040) in intron 2/20 (adjusted $p = 0.012$). The two variants are located 13.71 kb apart and were in perfect disequilibrium in the sample ($r^2 = 1.0$); MAF was 0.33 in each position. For each of the two variants, the OR was 0.044 (95% CI: 0.007–0.264), which means that a dog with the T variant at 17:19167157 or an A

variant at the position 17:19180869 has clearly lower odds of obesity than a dog without these variants. The genotype distribution within cases and healthy dogs reflects this tendency (CC/CT/TT, cases: 12/4/0, healthy: 7/25/2). Apparently, these two positions represent a single effect within the *ADCY3* gene, or another gene in the vicinity of the *ADCY3*. The other eleven tag variants located within the *ADCY3* gene were statistically insignificant.

Effects of *ADCY3* and *POMC* genes

The two statistically significant tag variants are both intronic variants, and the prior probability that they are causative mutations is low. Although in general some intronic variants may affect the level of gene expression (e.g., through alternative splicing) VEP did not predict any functional effect for these two intronic mutations. We therefore turned to variants that were not directly included in the association study but which had been tagged with the two tag variants ($r^2 > 0.5$). Each of these variants correlated with the same three positions: two other intronic variants within the *ADCY3* gene ($r^2 = 0.69$; 17:19207760, G>A, MAF = 0.27 and 17:19222413, CCT>C, MAF = 0.27) and one synonymous variant within the *POMC* gene ($r^2 = 0.66$, rs851959389, G>T, MAF = 0.26). We found no tagged exonic variants or variants that were annotated as potentially important. Nevertheless, we ran additional logistic regression for only these three variants under the model that again included age, neutering, sex, and 14-bp deletion as covariates. All of the three positions occurred with statistical significance (17:19207760: $p = 0.023$, OR = 0.19; 17:19222413: $p = 0.023$, OR = 0.28; rs851959389: $p = 0.039$, OR = 0.30). The effects of the tagged variants, however, were less protective than the effects previously calculated for the two tag variants in terms of risk of developing obesity. An important aspect of our results is that the two genes *ADCY3* and *POMC* are located just 199.17 kb apart on chromosome 17. The 14-bp deletion within the 3/3 exon of the *POMC* gene is known to increase body weight in the Labrador retriever breed (mean effect size 1.90 kg per deletion allele, according to (Raffan et al., 2016). In order to

make sure that the association effects calculated for the two tag variants within the *ADCY3* gene are separate from the deletion effect in the *POMC* gene, we took a closer look at the results for these two genes. In an additional analysis we reran the logistic model for all tag variants with the 14-bp deletion excluded from the model. Comparison of the Q–Q plots with and without *POMC* adjustment showed some differences in p-values, though the inference on the two tag variants remains similar for the two models (**Figure 2**). Moreover, each of the two statistically significant tag variants within that *ADCY3* gene is in linkage equilibrium ($r^2 = 0$) with the 14-bp deletion in the *POMC* gene, suggesting that the effects of these variants are independent of *POMC* gene (**Figure 3**). We also directly tested the effects on the genotype of the 14-bp deletion in the *POMC* gene; our data showed not such effects ($p = 0.29$). It should be noted that, of the fifty dogs examined here, only one dog was homozygous for the deletion. The current understanding is that the deletion may be the recessive variant, meaning that it is possible that the effect of the *POMC* gene is not important in our sample (Mankowska et al., 2017; Szydlowski & Antkowiak, 2022). These results imply that the two statistically significant tag variants in the *ADCY3* gene have an associated effect on BCS that is independent of the known effect of the 14-bp deletion in the *POMC* gene.

Discussion

In this study, we continue to search for risk variants for obesity in Labrador retrievers, targeting 41 genes that are associated with monogenic obesity in humans. Our choice of these 41 genes is justified by the fact that the mechanism by which obesity develops is similar across different mammalian species, and the many variants that are reported to be involved in polygenic obesity in humans are often found in the genes that are known to be causative in various cases of monogenic obesity. Analysis of the panel of genes instead of the entire genome has the advantage of reducing both the risk of false positive and false negative errors, which is especially useful in the analysis of small samples. Overall, out of 41 tested genes,

only *ADCY3* yielded statistically significant results with the tag variant in this gene being in linkage disequilibrium with the known 14-bp deletion in the *POMC* gene. Both tag variants are in perfect disequilibrium, but neither was removed during LD pruning due to their distance (over fifty variants). The *ADCY3* gene encodes adenylyl cyclase type-3 enzyme which catalyzes the formation of the secondary messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP). The function of cAMP is associated with several biochemical processes including metabolism of sugar, glycogen, and lipid (Ali et al., 2016). The last of these suggests the *ADCY3* gene as a candidate gene for human obesity studies. Loss-of-function mutations in this gene are linked to the early onset of severe obesity (Grarup et al., 2018; Saeed et al., 2018; Toumba et al., 2022). Studies on mice have shown that a gain-of-function mutation in *ADCY3* reduces white and brown adipose tissue deposits and protects from hepatic lipid accumulation when fed with high-fat diet (Pitman et al., 2014). Both the significant tag variants in our study are also protective variants, suggesting that gain-of-function mutations also occurred in our cohort and that the underlying mechanisms of inducing obesity are potentially similar across humans, mice, and dogs. While the variants in *ADCY3* discussed in this study are located in introns, it has been shown that introns play a role in the synthesis of noncoding RNA (Rearick et al., 2011) and in the regulation of gene expression (Bicknell et al., 2012; Cenik et al., 2011). Validation of the results would, however, require analysis of the transcriptome. In our previous study we showed that a short intronic deletion in *ADCY3* gene (TA>T, 17:19,222,459) of Labrador retrievers is associated with body weight corrected for known risk factors (age, sex, neutering status, *POMC*) and analysed under the model that adjusted for population structure and linkage disequilibrium (Sypniewski & Szydlowski, 2023). In this study the TA>T, 17:19,222,459 deletion has been excluded from analysis due to LD pruning. We decided to estimate its association with BCS with separate logistic regression using the same risk factors as covariates. The result was statistically significant with OR =

6.034 and $p = 0.020$ indicating for positive association of the TA>T, 17:19,222,459 deletion with BCS. The fact that two very different obesity traits (body weight and body condition score) are associated with the *ADCY3* gene reinforces the strength of the evidence that this gene is another risk factor for obesity in Labrador retrievers.

Our results implicate *ADCY3* as a potential locus for obesity in dogs, and rs22557040: G>A and 17:19167157: T>C as potential markers for genetic testing for obesity development risk. Additionally, rs22557040: G>A and 17:19167157: T>C were found to be in LD with an SNP located in the *POMC* gene. The *POMC* gene encodes proopiomelanocortin, a precursor polypeptide of multiple peptide hormones, including melanocortin. Mutations in these genes have been associated with early onset obesity in humans (Kuehnen et al., 2012), as well as with increased interest in food and subsequent obesity in Labrador retriever and Flat-Coated retriever dogs (Raffan et al., 2016). In general, association studies conducted for various species of domestic and farm animals indicate that functional mutations and associations are often limited to individual breeds. Therefore the results of this study may not be applicable to other canine breeds. The 14-bp deletion reported by Raffan et al. (Raffan et al., 2016) as associated with obesity was statistically insignificant in our study. Raffan et al. (Raffan et al., 2016) tested the deletion under an additive model; however, a later study of an independent sample of Labrador retrievers suggested that the deletion may have a recessive effect (Mankowska et al., 2017). In general, the effect of a recessive variant can be detected only when dogs homozygous for the variant are sufficiently represented in a sample. In our sample, only one dog was homozygous for the deletion in the *POMC* gene, and this may be the reason that the effects of the *POMC* gene were not observed here. Although the two previous reports on the *POMC* gene did not take into account the possible influence of the *ADCY3* gene, the effect of the *POMC* gene is very reliable: not only has this been well demonstrated

statistically in two independent populations, but it has been also explained at the molecular level.

Conclusions

The results of this study indicate that obesity in the Labrador retriever breed might be influenced by genes with large effects. Apart from the known effect of the 14-bp deletion in the *POMC* gene, variants in the nearby *ADCY3* locus might also play a role in obesity development risk. Mutations in the *ADCY3* gene are already known to be associated with obesity in mice and humans, and this makes them promising markers for obesity studies in dogs.

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

Ethic Commission Agreement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board of Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznań, Poland (31/2013). All analyses were performed with the owner consent.

References

- Ali, E. S., Hua, J., Wilson, C. H., Tallis, G. A., Zhou, F. H., Rychkov, G. Y., & Barritt, G. J. (2016). The glucagon-like peptide-1 analogue exendin-4 reverses impaired intracellular Ca²⁺ signalling in steatotic hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(9), 2135–2146. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.05.006>
- Armstrong, P. J., & Lusby, A. L. (2011). Clinical importance of canine and feline obesity. *Practical Weight Management in Dogs and Cats*, 6.
- Bicknell, A. A., Cenik, C., Chua, H. N., Roth, F. P., & Moore, M. J. (2012). Introns in UTRs: Why we should stop ignoring them. *BioEssays*, 34(12), 1025–1034. <https://doi.org/10.1002/bies.201200073>

- Bjørnvad, C. R., Gloor, S., Johansen, S. S., Sandøe, P., & Lund, T. B. (2019). Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches—A cross-sectional study of dog- and owner-related risk factors for obesity in Danish companion dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, *170*, 104730. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104730>
- Bult, C. J., Blake, J. A., Smith, C. L., Kadin, J. A., & Richardson, J. E. (2019). Mouse genome database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D801–D806.
- Cenik, C., Chua, H. N., Zhang, H., Tarnawsky, S. P., Akef, A., Derti, A., Tasan, M., Moore, M. J., Palazzo, A. F., & Roth, F. P. (2011). Genome Analysis Reveals Interplay between 5'UTR Introns and Nuclear mRNA Export for Secretory and Mitochondrial Genes. *PLoS Genetics*, *7*(4), e1001366. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001366>
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *Giga-Science*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>
- Colliard, L., Ancel, J., Benet, J.-J., Paragon, B.-M., & Blanchard, G. (2006). Risk factors for obesity in dogs in France. *The Journal of Nutrition*, *136*(7), 1951S-1954S.
- Courcier, E., Thomson, R., Mellor, D., & Yam, P. (2010). An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *Journal of Small Animal Practice*, *51*(7), 362–367.
- Edney, A., & Smith, P. (1986). Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, *118*(14), 391–396.
- Grarup, N., Moltke, I., Andersen, M. K., Dalby, M., Vitting-Seerup, K., Kern, T., Mahendran, Y., Jørsboe, E., Larsen, C. V. L., Dahl-Petersen, I. K., Gilly, A., Suveges, D., Dedoussis, G., Zeggini, E., Pedersen, O., Andersson, R., Bjerregaard, P., Jørgensen, M. E., Albrechtsen, A., & Hansen, T. (2018). Loss-of-function variants in ADCY3 increase risk of obesity and type 2 diabetes. *Nature Genetics*, *50*(2), 172–174. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0022-7>
- Grzemeski, A., Stachowiak, M., Flisikowski, K., Mankowska, M., Krzeminska, P., Gogulski, M., Aleksiewicz, R., Szydłowski, M., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2019).

- FTO and IRX3 genes are not promising markers for obesity in Labrador retriever dogs. *Annals of Animal Science*, 19(2), 343–357.
- Hill, W. G., & Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38(6), 226–231. <https://doi.org/10.1007/BF01245622>
- Kuehnen, P., Mischke, M., Wiegand, S., Sers, C., Horsthemke, B., Lau, S., Keil, T., Lee, Y.-A., Grueters, A., & Krude, H. (2012). An Alu Element–Associated Hypermethylation Variant of the POMC Gene Is Associated with Childhood Obesity. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002543. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002543>
- 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(2), 177.
- 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.
- Mason, E. (1970). Obesity to pet dogs. *Veterinary Record*, 86, 612–616.
- Mawby, D. I., Bartges, J. W., d'Avignon, A., Laflamme, D. P., Moyers, T. D., & Cottrell, T. (2004). Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(2), 109–114.
- McGreevy, P., Thomson, P., Pride, C., Fawcett, A., Grassi, T., & Jones, B. (2005). Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Veterinary Record*, 156(22), 695–702.
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., Flicek, P., & Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
- Pitman, J. L., Wheeler, M. C., Lloyd, D. J., Walker, J. R., Glynne, R. J., & Gekakis, N. (2014). A Gain-of-Function Mutation in Adenylate Cyclase 3 Protects Mice from Diet-Induced Obesity. *PLOS ONE*, 9(10), e110226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110226>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set

- for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575.
- 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., ... O'Rahilly, S. (2016). A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. *Cell Metabolism*, 23(5), 893–900. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.012>
- Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S. S., Fedorova, L., & Fedorov, A. (2011). Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2357–2366. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1080>
- Robertson, I. (2003). The association of exercise, diet and other factors with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan Perth, WA. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(1–2), 75–83.
- Saeed, S., Arslan, M., & Froguel, P. (2018). Genetics of Obesity in Consanguineous Populations: Toward Precision Medicine and the Discovery of Novel Obesity Genes. *Obesity*, 26(3), 474–484. <https://doi.org/10.1002/oby.22064>
- Sheet, S., Krishnamoorthy, S., Cha, J., Choi, S., & Choi, B.-H. (2020). Identification of Candidate Genes and Pathways Associated with Obesity-Related Traits in Canines via Gene-Set Enrichment and Pathway-Based GWAS Analysis. *Animals*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/ani10112071>
- Siljee, J. E., Wang, Y., Bernard, A. A., Ersoy, B. A., Zhang, S., Marley, A., Von Zastrow, M., Reiter, J. F., & Vaisse, C. (2018). Subcellular localization of MC4R with ADCY3 at neuronal primary cilia underlies a common pathway for genetic predisposition to obesity. *Nature Genetics*, 50(2), 180–185.
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite:

From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1), 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>

Sypniewski, M., & Szydłowski, 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. *Veterinary Sciences*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/vetsci10060390>

Szydłowski, M., & Antkowiak, M. (2022). No evidence that long runs of homozygosity tend to harbor risk variants for polygenic obesity in Labrador retriever dogs. *Journal of Applied Genetics*, 1–5.

Toumba, M., Fanis, P., Vlachakis, D., Neocleous, V., Phylactou, L. A., Skordis, N., Mantzoros, C. S., & Pantelidou, M. (2022). Molecular modelling of novel ADCY3 variant predicts a molecular target for tackling obesity. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(1), 10. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5065>

Westfall, P. H., & Young, S. S. (1993). *Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment* (Vol. 279). John Wiley & Sons.

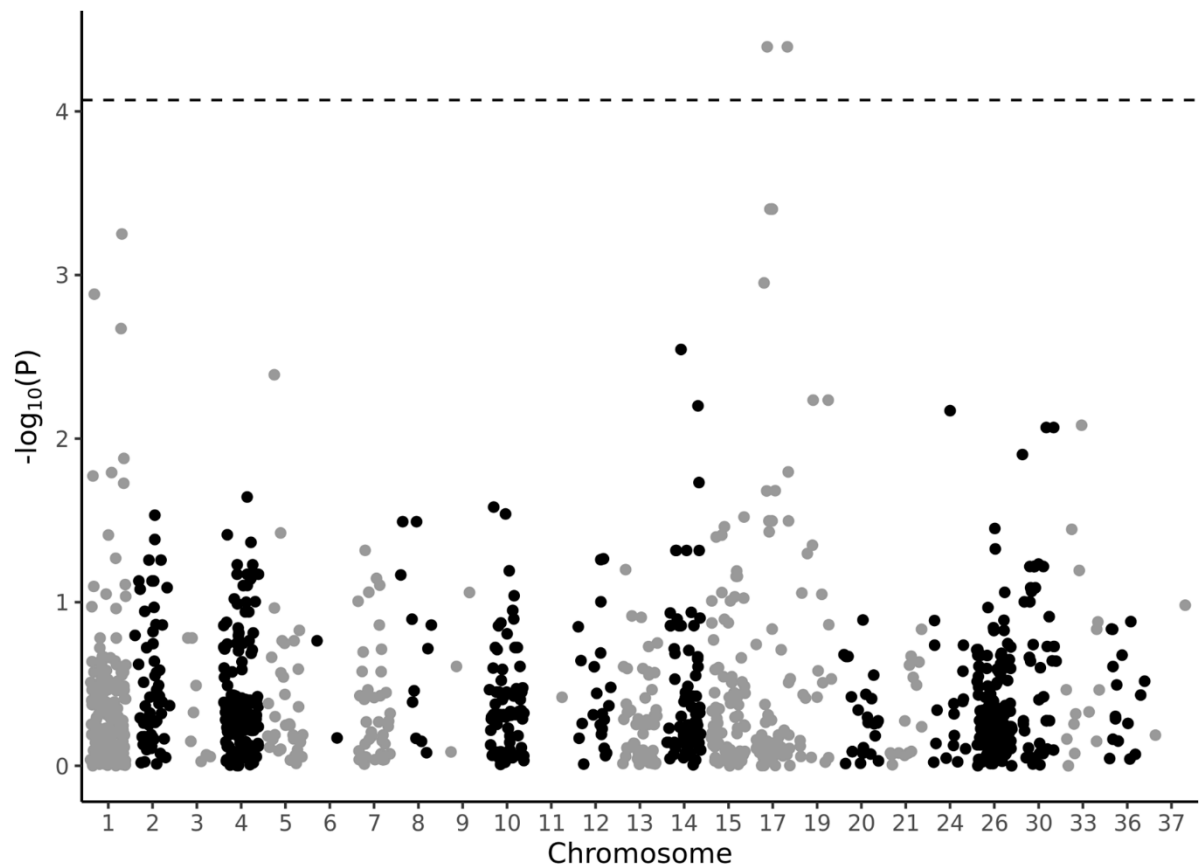


Figure 1. Manhattan plot for the 1135 tag variants in the canine genome. The empirical p-values were obtained under the model adjusted for the 14-bp deletion in the POMC locus. The dashed line indicates familywise error rate (FWER) threshold < 0.01 . Two positions within the ADCY3 gene occurred with statistical significance (17:19167157 T>C and 17:19180869 A>G both with $p = 0.012$).

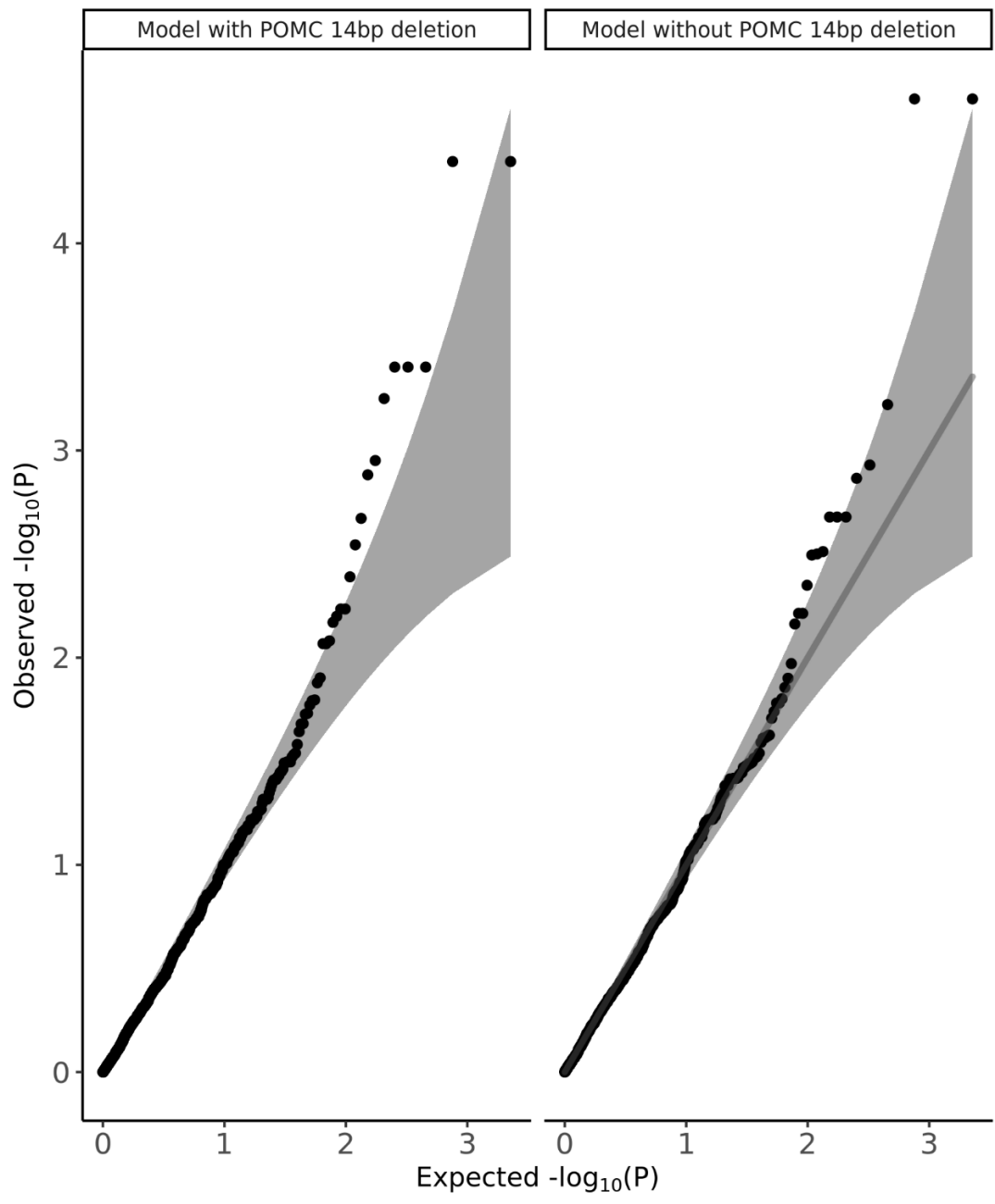


Figure 2. Q–Q plot for association studies with body condition score in Labrador retriever dogs. The results were obtained using two logistic regression models: one with the genotype for the 14-bp deletion at the *POMC* gene included as covariate, and one unadjusted for the effect of the *POMC* gene. Both models included age, sex, and neutering status as covariates. The most significant values in both models were obtained for intronic variants at positions 17:19167157 and 17:19180869 within the *ADCY3* gene, with the observed p-values similar

between the two models. The adjustment for the known effect of the deletion within the *POMC* has no effect on the inference on the *ADCY3* gene. The grey area indicates 95% confidence interval.

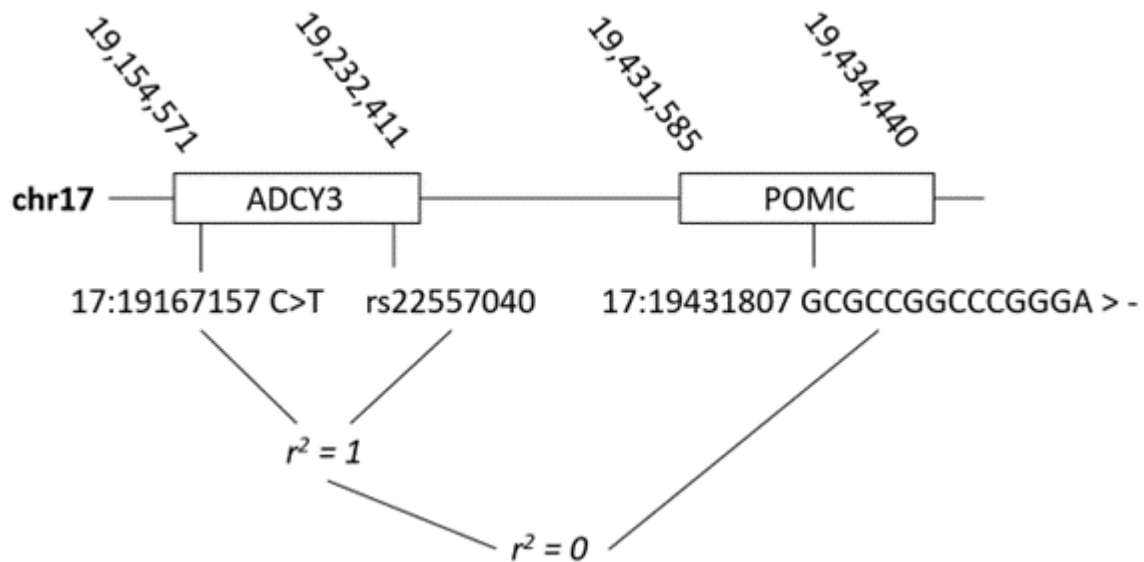


Figure 3. Chromosomal positions of *ADCY3* and *POMC* genes in the canine genome. Two variants of the *ADCY3* gene in perfect linkage equilibrium ($r^2 = 1.0$) proved to be associated with the body condition score. The variants are independent of the known effect of the 14-bp deletion in the *POMC* gene ($r^2 = 0.0$). The deletion is known to influence obesity in the Labrador retriever breed but proved statistically insignificant in the sample of Labrador retriever dogs dealt with in this study.

Table 1. Labrador retriever dogs: obese and control groups.

	Obese	Control
Body Condition Score	5	3–4
N	16	34
Males/females	5 / 11	13 / 21
Mean age in months (range)	65.1 (24–108)	50.2 (12–120)
Mean weight in kg (range)	42.2 (35–50)	33.3 (25–48.1)
Neutered dogs	4	8
Genotypes within the 14-bp deletion in the POMC gene (DD ¹ /H ² /WW ³)	1 / 4 / 11	0 / 8 / 26

¹Deleterious allele²Heterozygous³Wildtype allele**Table 2.** The 41 genes linked to monogenic obesity in humans, and their orthologs in the canine genome.

HUGO gene ID	Ensembl gene ID (CanFam3.1)	Position
MC4R	ENSCAFG00000000090	1: 16131589-16133079
NTRK2	ENSCAFG00000001380	1: 74449060-74777032
DYRK1B	ENSCAFG00000005428	1: 113644100-113828488
NR0B2	ENSCAFG00000012261	2: 73234586-73236206
PAX7	ENSCAFG00000015539	2: 79815748-73236206
PCSK1	ENSCAFG00000007882	3: 13233594-13274094

MAGEL2	ENSCAFG00000010136	3: 36363930-36365870
ABLIM3	ENSCAFG00000018323	4: 59690735-59798383
GHR	ENSCAFG00000018579	4: 67022252-67290473
LEPR	ENSCAFG00000018600	5: 44688109-44775636
CDH15	ENSCAFG00000019846	5: 64258741-64277190
SH2B1	ENSCAFG00000017219	6: 18371832-18380962
SDCCAG8	ENSCAFG00000015803	7: 34396345-34631462
TTC8	ENSCAFG00000017478	8: 60061732-60115075
MKS1	ENSCAFG00000017464	9: 32860995-32879338
WDPCP	ENSCAFG00000003119	10: 62877527-63316345
TRIM32	ENSCAFG00000003516	11: 70462007-70463974
PHIP	ENSCAFG00000002804	12: 39904603-40032194
SIM1	ENSCAFG00000003538	12: 58485823-58553192
VPS13B	ENSCAFG00000000507	13: 1101610-1871225
LEP	ENSCAFG00000001672	14: 8116122-8131395
BBS9	ENSCAFG00000003161	14: 45200458-45643645
BBS10	ENSCAFG000000031800	15: 19331876-19335583
CEP290	ENSCAFG00000006027	15: 29194983-29280429
CPE	ENSCAFG00000008861	15: 61321227-61414789
ADCY3	ENSCAFG00000004090	17: 19154571-19232411
POMC	ENSCAFG00000004149	17: 19431585-19434440
ALMS1	ENSCAFG00000008827	17: 49301606-49513625
BBS12	ENSCAFG00000003998	19: 17538346-17540487
BBS7	ENSCAFG00000004128	19: 18280520-18315825

PPARG	ENSCAFG00000004991	20: 6050357-6207981
UCP3	ENSCAFG000000042759	21: 24277896-24288639
TUB	ENSCAFG000000006892	21: 31566130-31625101
MKKS	ENSCAFG000000005651	24: 11898236-11913740
MC3R	ENSCAFG000000011887	24: 41492371-41494033
GNAS	ENSCAFG000000023756	24: 43643405-43658657
KSR2	ENSCAFG000000009865	26: 13987827-14395111
RYR3	ENSCAFG000000008056	30: 1180359-1533619
ARL6	ENSCAFG000000009111	33: 4800917-4839635
CEP19	ENSCAFG000000013046	33: 29735351-29741128
BBS5	ENSCAFG000000041315	36: 14207014-14233633
MSTN	ENSCAFG000000009398	37: 729172-734362

Poznań, 6 lipca 2023

Oświadczenie

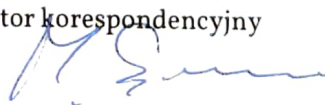
Niniejszym oświadczam, że udział **Mateusza Sypniewskiego** w publikacji

Sypniewski M, Szydłowski M. 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.* 2023 Jun 8;10(6):390. doi: 10.3390/vetsci10060390.

wynosi 90% i obejmował:

- opracowanie koncepcji badań w zakresie wykorzystania dostępnych danych fenotypowych i molekularnych, wykorzystaniu zestawu genów kandydujących, dobór metod bioinformatycznych i metod statystycznych
- samodzielne wykonanie analizy bioinformatycznej
- samodzielne wykonanie analizy statystycznej
- przygotowanie manuskryptu wraz wykresem i tabelą
- współredagowanie ostatecznej wersji publikacji.

prof. dr hab. Maciej Szydłowski
autor korespondencyjny



Poznań, 17 października 2023

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że udział **Mateusza Sypniewskiego** w przygotowaniu manuskryptu

Sypniewski, M.; Szydłowski, M. Variants in *ADCY3* gene are associated with body condition score in Labrador Retrievers. Artykuł zgłoszony do czasopisma spełniającego wymogi Rady Dyscypliny Zootechniki i rybactwo UPP (data zgłoszenia: 21.08.2023, na dzień 17.10.2023 w trakcie recenzji).

wynosi 90% i obejmował:

- opracowanie koncepcji badań w zakresie wykorzystania dostępnych danych fenotypowych i molekularnych, wykorzystaniu zestawu genów kandydujących, dobór metod bioinformatycznych i metod statystycznych
- samodzielne wykonanie analizy bioinformatycznej
- samodzielne wykonanie analizy statystycznej
- przygotowanie manuskryptu wraz wykresami i tabelami
- współredagowanie ostatecznej wersji manuskryptu.



prof. dr hab. Maciej Szydłowski
autor korespondencyjny