

## Między paszą a genomem – nutrigenomika zwierząt gospodarskich

Barbara Niwińska<sup>1</sup>, Waldemar Majka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, 32-083 Balice k. Krakowa*

<sup>2</sup>*Zakład Doświadczalny IZ PIB Rudawa Sp. z o.o., ul. ks. kard. Albina Dunajewskiego 91, 32-064 Rudawa*

### Nutrigenomika

Intensywny rozwój analitycznych i badawczych metod z zakresu nauk biologicznych, chemicznych, matematycznych i informatycznych przyczynił się do licznych odkryć naukowych oraz wzrostu liczby wyników prac eksperymentalnych. Jednym z kierunków badań, wykorzystujących te osiągnięcia, jest analiza interakcji genomu z czynnikami żywieniowymi, określana jako nutrigenomika. Termin „nutrigenomika” (ang. *nutrigenomics*) na stałe do literatury naukowej wprowadził Jim Kaput, definiując go następująco: „*Nutrigenomika jest nauką, zajmującą się analizą obustronnego oddziaływania między czynnikami pokarmowymi i procesami zachodzącymi w genach/komórkach*” (Kaput i Rodriguez, 2004). Celem badań nutrigenomicznych jest poprawne „czytanie” sekwencji DNA językiem składników chemicznych pokarmu na poziomie molekularnym (Nagarajan i Pop, 2013). Prowadzenie kompleksowych badań w tym zakresie umożliwia połączenie wiedzy z zakresu genomiki, proteomiki i metabolomiki przy pomocy narzędzi bioinformatycznych (Seo i in., 2013).

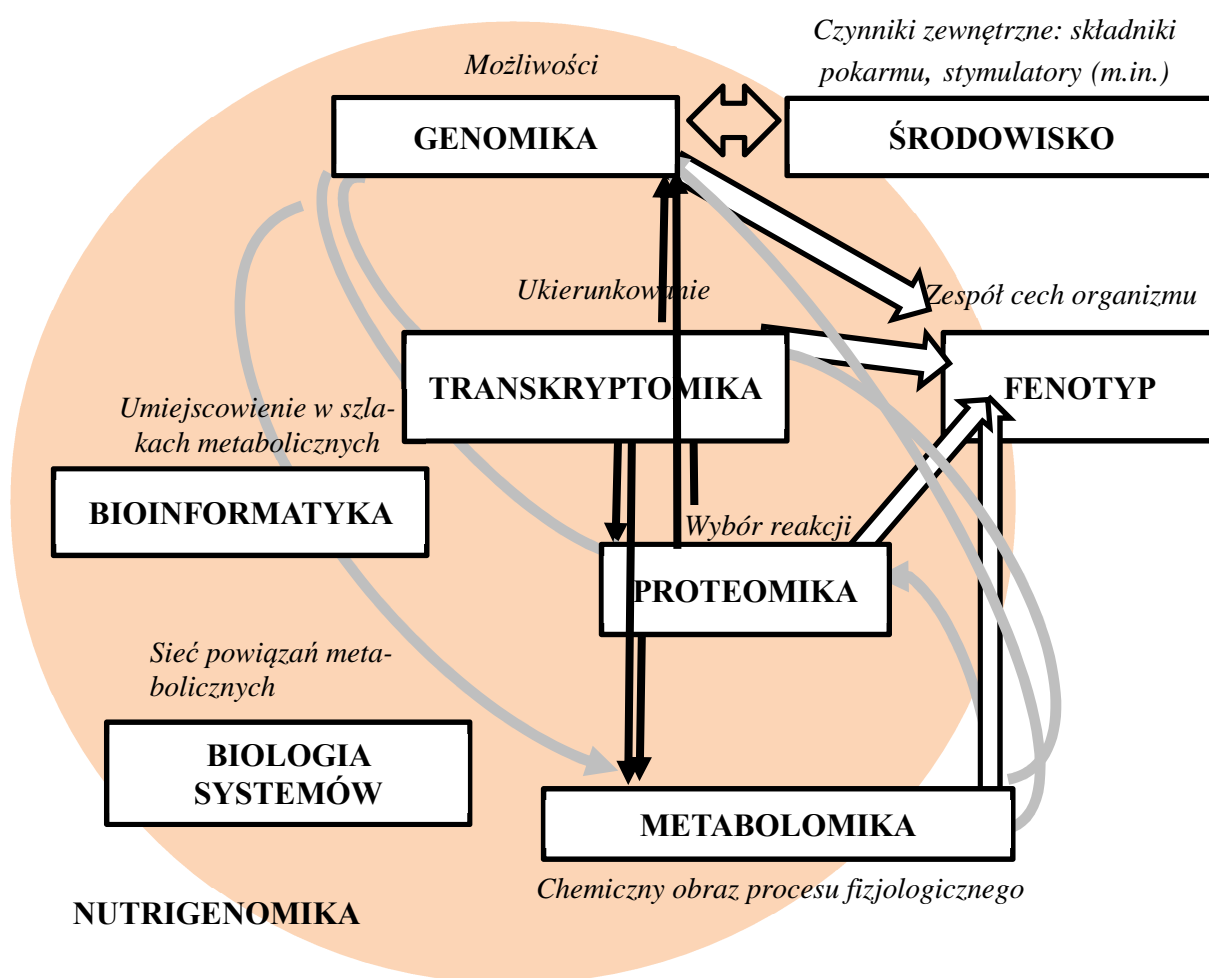
Według definicji T.A. Browna (Brown, 2009), **genomika** jest nauką, obejmującą badania genomów i wzajemnych oddziaływań w obrębie genomu w aspekcie całej biochemii i biologii komórki. Genom to kompletna informacja genetyczna organizmu, potrzebna do powstania i utrzymania go przy życiu; w przypadku eukariotów zawarta jest w sekwencji nukleotydowej kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Ge-

nom zawiera wszystkie geny, stanowiące jednostki dziedziczności, tj. odcinki DNA, kodujące kwas rybonukleinowy (RNA) i białko. Wykorzystanie informacji biologicznej genomu oraz aktywności białek następuje w procesie ekspresji genomu. W pierwszym etapie ekspresja ta uwalnia do komórki informację, zawartą w genomie poprzez transkryptom, stanowiący zbiór cząsteczek RNA, powstający w drodze syntezy kopii aktywnego w danych warunkach genu (transkrypcja sekwencji nukleotydowych DNA na sekwencję nukleotydową RNA). W następnym etapie ekspresji genów, w drodze translacji (przełożenie sekwencji nukleotydów na sekwencje aminokwasowe, peptydowe i polipeptydowe białek) powstaje proteom. Stanowi on zestaw funkcjonalnych białek komórki, określający, jakie reakcje biochemiczne w danym momencie komórka może przeprowadzać. Badania nad składem jakościowym i ilościowym białek proteomów oraz nad wzajemnymi oddziaływaniami między białkami stanowią przedmiot **proteomiki**. Metabolity to endogenne lub egzogenne związki o niskiej masie cząsteczkowej (<1000 daltonów), o różnorodnych właściwościach chemicznych i fizycznych, obecne w danym systemie biologicznym (strukturach komórkowych, komórkach, tkankach, organach, organizmach lub gatunkach). Kompletny zbiór metabolitów, występujący w danej próbie biologicznej w danym czasie, w odpowiedzi na konkretny składnik pokarmu (metabolom) to obszar badań **metabolomiki**.

Budowanie hipotetycznych algorytmów,

obrazujących dynamiczne powiązania między szlakami metabolicznymi i ekspresją genów, a następnie ocena prawdopodobieństwa ich poprawności w oparciu o rzeczywiste wyniki eksperymentalne na drodze analizy zależności w układzie pełnej funkcjonalności układu biologicznego w danym czasie, przy wykorzystaniu technik informatycznych, statystycznych i matematycznych, to biologia obliczeniowa (ang. *biocomputation*), stanowiąca młodszą

dzieliznę **bioinformatyki**. W odniesieniu do interakcji między genotypem a składnikami diety, dane biologii obliczeniowej obejmują szlaki metaboliczne w różnej skali, np. w obrębie struktur komórkowych, komórek i układów komórek. Schemat struktury multidyscyplinarnej nauki, jaką jest nutrigenomika, obrazujący wzajemne powiązania między genomiką, proteomiką, metabolomiką i bioinformatyką, przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Schemat powiązań między genomiką, proteomiką, metabolomiką i bioinformatyką w strukturze nutrigenomiki  
 Fig. 1. Schematic of the relationships between genomics, proteomics, metabolomics and bioinformatics in the nutrigenomics structure  
 (opracowano wg Ghormade i in., 2011)

### **Gromadzenie i katalogowanie informacji**

Liczba prac eksperymentalnych z zakresu genomiki, proteomiki i metabolomiki wzrasta lawinowo, a wyniki tych prac są gromadzone w repozytoriach, których dostępna online postać to różnorodne tzw. bazy danych. Każdego roku pojawia się ponad 100 nowych baz danych z zakresu biologii molekularnej (Gruca, 2010), ale niektóre z nich nie wytrzymują próby czasu, nie nadążając za informacją naukową. Aktualna baza kwasów nukleinowych, prowadzona przez Oxford University (Nucleic Acids Research Database) obejmuje 1552 bazy danych (Fernández-Suárez i in., 2014). Zasoby odnośnie wyłącznie sekwencji DNA różnych organizmów wzrastają w ciągu roku 5-krotnie, a liczba wyników biologicznych prac eksperymentalnych podwaja się w ciągu 9 miesięcy (Baza Ingenuity, Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA).

W odpowiedzi na potrzebę opisaną różnorodnych zależności w procesach biologicznych, w tym również przemian nutrigenomicznych, opracowywane są bazy integrujące genomikę, proteomikę i metabolomikę (określane jako bazy multi-omics). Najbogatszym zbiorem multi-omics jest baza MetaCyc, podzbiór bazy BioCyc Pathway/Genome Databases (Caspi i in., 2012). Baza MetaCyc zawiera dane, opisujące 2260 szlaków metabolicznych u 2600 organizmów (z dnia 16.01.2015).

Poniżej przedstawiono listę najważniejszych bioinformatycznych baz danych, zawierających informacje uwzględniane w badaniach nutrigenomicznych, prowadzonych na zwierzętach gospodarskich:

1. Bazy danych sekwencji nukleotydowych (wg Bensona i in., 2014):  
współpraca International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC),
  - a. GenBank: NCBI – National Center for Biotechnology Information, USA,
  - b. EMBL-Bank: EMBL Nucleotide Sequence Database,
  - c. DDBJ: DNA Data Bank of Japan;
2. Bazy danych sekwencji białkowych:
  - a. GenPept: NCBI,
  - b. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database,
  - c. PIR: Protein Information Resource,
  - d. UniProtKB: współpraca UniProt

Knowledgebase, European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) i PIR;

3. Bazy danych metabolitów:
  - a. HMDB: Human Metabolome Database,
  - b. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,
  - c. PubChem: NCBI,
  - d. ChEBI: EMBL-EBI,
  - e. PDB: Protein Data Bank bazy Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB),
  - f. UniProt,
  - g. GenBank;
4. Bazy danych o szlakach metabolicznych (bazy multi-omics):
  - a. MetaCyc: Metabolic Pathway Database bazy BioCyc Pathway/Genome Databases (PGDBs),
  - b. Reactome: **Pathway Database**,
  - c. SMPDB: Small Molecule Pathway Database,
  - d. IPA: Ingenuity Pathway Analysis.

### **Genomika zwierząt gospodarskich**

Imponujący postęp, który osiągnięto dzięki międzynarodowej współpracy w ramach realizacji w latach 1990–2003 projektu „Human Genome Project”, przyczynił się do podejmowania tego rodzaju wyzwań w odniesieniu do zwierząt gospodarskich (Cassar-Malek i in., 2008). W tym bardzo skomplikowanym obrazie nutrigenomiki największe zainteresowanie nauk medycznych wzbudziła możliwość opracowania „indywidualnej diety”, która jak lek zapobiegnie konkretnej chorobie człowieka. Aktualne badania obejmują choroby zespołu metabolicznego, nowotworowe i psychiczne (Ferguson, 2009).

Wzorem organizacyjnego systemu prowadzenia badań nad genomem człowieka przez powołanie międzynarodowego konsorcjum (International Human Genome Sequencing Consortium), również badania nad genomami zwierząt gospodarskich były realizowane w ramach międzynarodowych organizacji, zrzeszających międzynarodowe zespoły naukowe.

Aktualne wyniki tych badań wraz z wykazem organizacji, realizujących badania przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie aktualnych wyników sekwencjonowania genomów, genów i białek najważniejszych gatunków zwierząt domowych

Table 1. List of the current sequencing results for the genomes, genes and proteins of major species of domestic animals

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome, z dnia 30.01.2015 r.)

Organizm <i>Organism</i>	Rozmiar <i>Size</i> (Mb <sup>1</sup> )	Liczba – <i>Number of</i>		Data ostatniej modyfikacji <i>Last modified</i>	Organizacja <i>Organization</i>
		genów <i>genes</i>	białek <i>proteins</i>		
<i>Bos taurus</i> (bydło – <i>cattle</i> )	2670,04	36101	52035	2014/12/09	The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium
<i>Sus scrofa</i> (świnia – <i>pig</i> )	2808,53	34633	38370	2013/09/29	The Swine Genome Sequencing Consortium
<i>Gallus gallus</i> (kura – <i>chicken</i> )	1046,93	21158	32182	2011/02/24	Poultry Genome Committee
<i>Ovis aries</i> (owca – <i>sheep</i> )	2589,83	48452	44976	2012/12/02	International Sheep Genome Consortium
<i>Capra hircus</i> (koza – <i>goat</i> )	2635,85	25537	27960	2013/09/30	International Goat Genome Consortium
<i>Equus caballus</i> (koń – <i>horse</i> )	2474,93	25390	32352	2014/04/25	The Genome Assembly Team

<sup>1</sup>Mb – 10<sup>6</sup> par zasad (jednostka) – <sup>1</sup>Mb - 10<sup>6</sup> base pairs (unit).

### Kierunki badań nutrigenomicznych na zwierzętach gospodarskich

Kierunki badań nutrigenomicznych oraz ich zaawansowanie zależą od gatunku zwierząt gospodarskich. Badania na bydło (*Bos taurus*) koncentrują się głównie na wyjaśnieniu reakcji genów na czynniki żywieniowe w procesach metabolicznych, wpływających na stan zdrowotny, rozwój i funkcjonowanie gruczołu mlekowego, rozwój i funkcjonowanie przewodu pokarmowego oraz walory prozdrowotne mleka i mięsa. Jako przykład aktualnych osiągnięć w dziedzinie nutrigenomiki bydła można przedstawić wyniki pracy zespołu naukowego Uniwersytetu w Illinois (Moisá i in., 2014). Celem badań była analiza wpływu wieku odsadzenia i intensywności żywienia energetycznego (udział skrobi) na ekspresję genów, biorących udział w metabolizmie lipidów u opasanego bydła (opasy: czysto rasowe Angus i mieszańce Angus × Simental). Posługując się bazą IPA wybrano 35 genów z grup: aktywatorów i represorów adipogenezy, adipokin, desaturaz i gliceroneogenezy. Ekspresję genów badano w mięśni *longissimus*. Oznaczono także koncentrację takich biomarkerów metabolizmu lipidów, jak: glukoza, niezestryfikowane kwasy

tłuszczowe, hormon wzrostu, leptyna i insulino-podobny czynnik wzrostu-1. Graficzny obraz zależności jako prawdopodobny model transkrypcji w kierunku adipogenezy (za autorami publikacji) przedstawiono na rysunku 2.

Badania wykazały, że wiek odsadzenia i skład dawki pokarmowej są czynnikami programującymi skład mięśni szkieletowych w opasie bydła, a proces ten jest kontrolowany przez izotyp gamma receptora aktywowanego proliferatorami peroksysomów (PPARG), przy udziale transaktywatora transkrypcji CEBPA [CAAT (składnik promotora podstawowego)/ wzmacniające białko wiążące (C/EBP), izotyp alpha]. Z praktycznego punktu widzenia producentów mięsa wołowego dla amerykańskich konsumentów, którzy akceptują steki z mięsa wołowego o zawartości tłuszczu nie niższej niż 3,5%, wyniki dostarczają dowodów, że zarówno wczesne odsadzenie, jak i karmienie paszą z wysokim udziałem skrobi powinny być uwzględniane przy produkcji akceptowanej przez rynek wołowiny.

W hodowli i chowie świni domowej (*Sus scrofa*) wieprzowina jest najważniejszym produktem. W zakresie badań nutrigenomicznych poszukuje się dróg doskonalenia jej walorów smakowych.

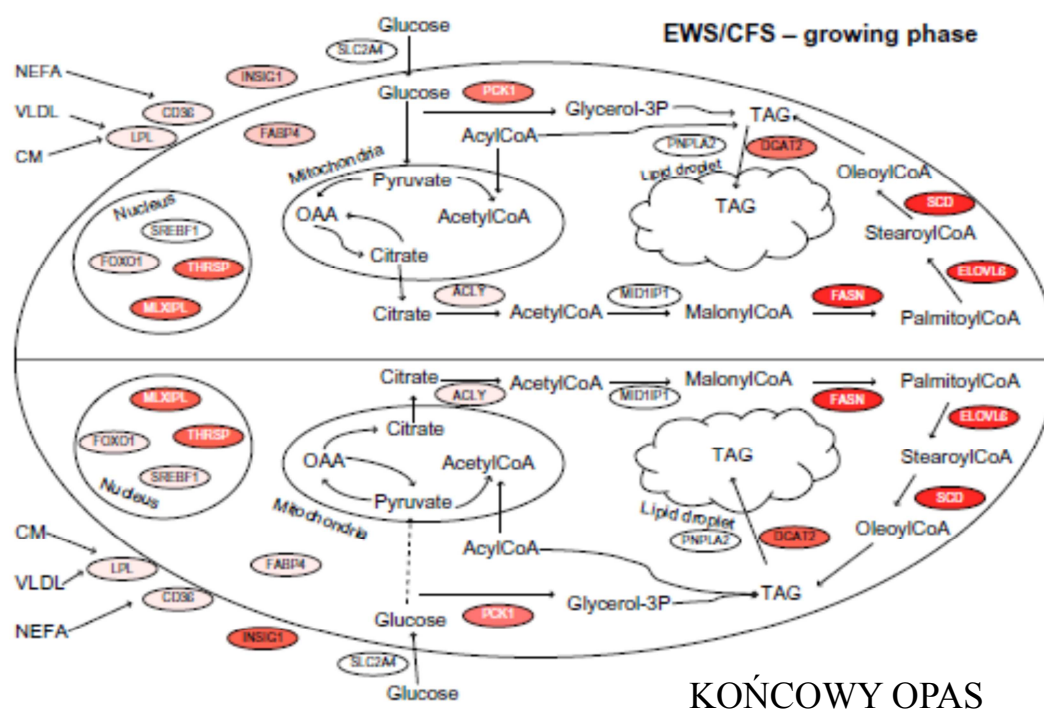
Wyznacznikiem w ocenie sensorycznej jakości mięsa wieprzowego jest zawartość tłuszczu śródmięśniowego, dodatnio skorelowana ze smakiem, soczystością i kruchością mięsa. W 2013 r. zespół naukowców irlandzkich przedstawił wyniki analizy ekspresji genów profilu genowego *Musculus semimembranosus* w reakcji na karmienie paszą deficytową w białko w końcowym okresie tuczu (Hamill i in., 2013). Obniżenie zawartości białka o około 30% w porównaniu do paszy, pokrywającej zapotrze-

bowanie na ten składnik zgodnie z normami, zwiększyło prawie dwukrotnie zawartość tłuszczu śródmięśniowego w badanym mięśniem.

Spośród analizowanych genów 351 charakteryzowała obniżona a 191 podniesiona ekspresja. Autorzy, posługując się bazą IPA sklasyfikowali aktywne geny, a następnie zidentyfikowali ścieżki metaboliczne, w których uczestniczyły.

Poniżej przedstawiono wybrane wyniki badań ww. autorów (tab. 2).

## OKRES WZROSTU

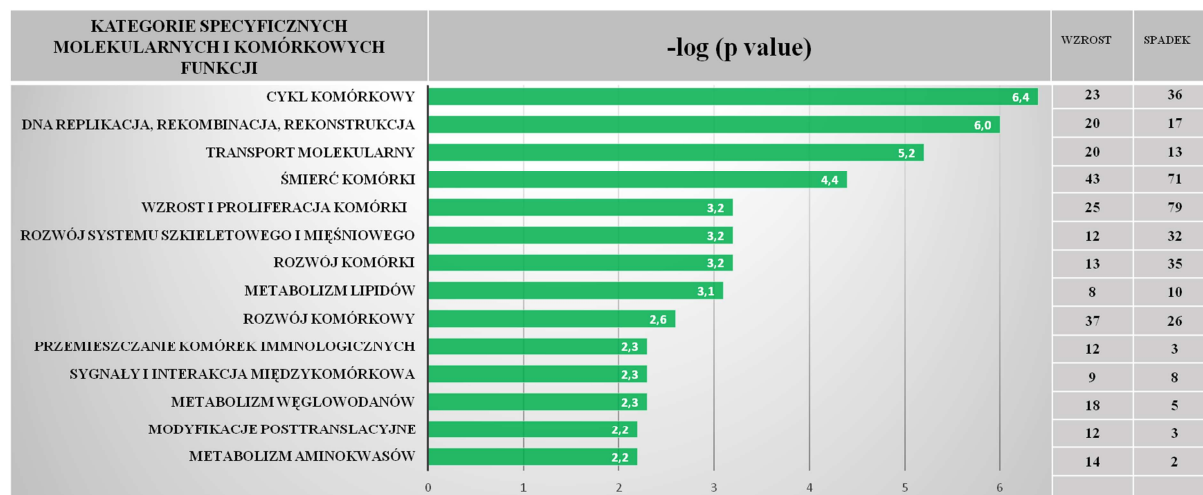


Rys. 2. Przepuszczalny model transkrypcji podczas fazy wzrostu oraz w końcowym okresie opasu. Oznaczenia: poziom ekspresji genów oznaczono kolorami: czerwony – wysoka, biały – dodatnia, ale nieistotna statystycznie, NEFA – niezestryfikowane kwasy tłuszczowe, VLDL – lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości, CM – chylomikrony (wg Moisa i in., 2014)

Fig. 2. Putative model of transcriptional adaptations during the growing and finishing phase. Notes: Expression level of genes is marked with color: red color – high expression, white color – slightly expressed. NEFA – non-esterified fatty acids, VLDL – very low density lipoprotein, CM – chylomicron (Moisa et al., 2014)

Tabela 2. Wybrane molekularne i komórkowe funkcje genów o podniesionej lub obniżonej ekspresji w profilu genowym mięśnia *M. semimembranosus* tuczników, żywionych paszą deficytową w białko (Hamill i in., 2013)

Table 2. Selected molecular and cellular functions of up-regulated or down-regulated genes in the genetic profile of *M. semimembranosus* of fatteners receiving protein-deficient feed (Hamill et al., 2013)

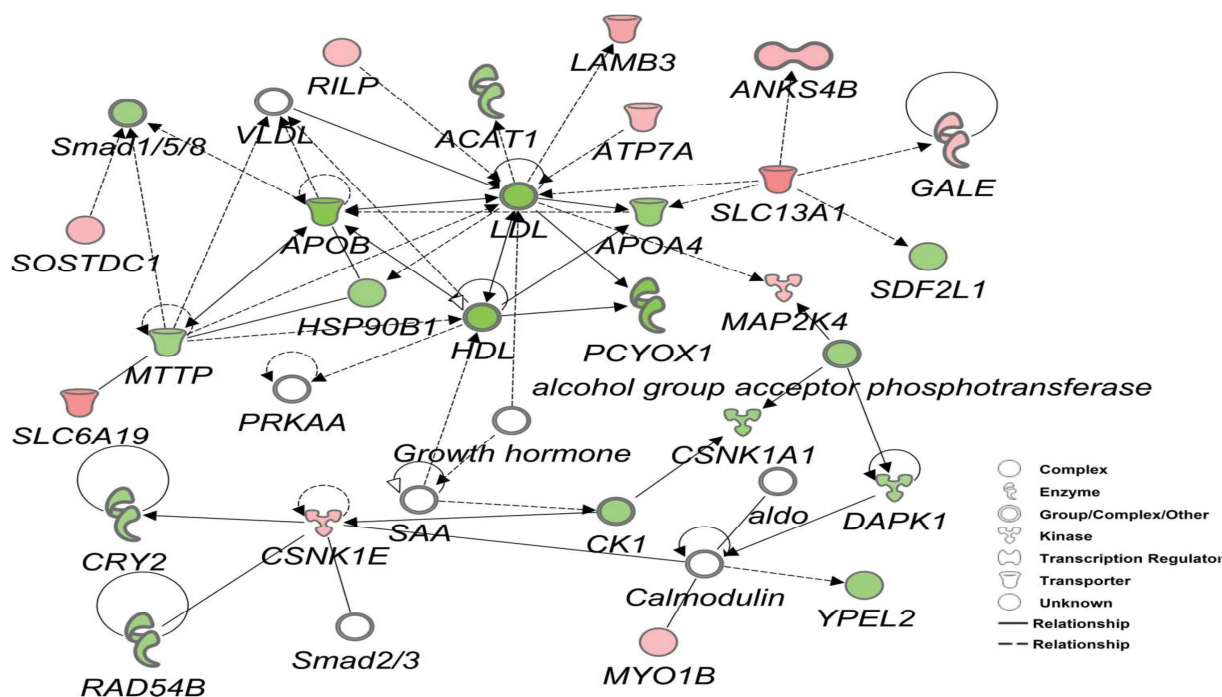


Wyniki analizy nutrigenomicznej wskazały, że reakcja na poziomie molekularnym mięśnia *M. semimembranosus* na dawkę pokarmową deficytową w białko jest dwukierunkowa. Jeden kierunek obrazuje zwiększoną aktywność genów, włączonych w syntezę i rozkład lipidów, a drugi zmniejszoną aktywność genów włączonych we wzrost komórek i tkanki mięśniowej. Praktyczny wniosek jest jednoznaczny – żywiąc tuczniki w końcowym okresie tuczu dawkami o deficytowej zawartości białka, producent uzyska korzystny efekt, jakim jest lepsza jakość wieprzowiny, ale równocześnie musi uwzględnić obniżenie wydajności mięsnej zwierząt.

Badania nutrigenomiczne na kurach (*Gallus gallus*) są najbardziej zaawansowane, a zakres badań obejmuje wiele kierunków. Ważny kierunek stanowi poszukiwanie czynników żywieniowych, modyfikujących procesy lipogenezy, metabolizmu i syntezy cholesterolu oraz odpowiedzi immunologicznej. Równocześnie prowadzone są badania nad wpływem pojedynczych składników pokarmowych oraz substancji

biologicznie czynnych. W 2013 r. Brennan i in. (2013) przedstawili wyniki badań nad wpływem mannanooligosacharydów, pochodzących ze ściany komórkowej drożdży na ekspresję genów profilu genetycznego jelita czczego 6-tygodniowych broilerów.

Stwierdzono, że w efekcie podawania mannanooligosacharydów aktywność 928 genów uległa zmianie, w tym 456 charakteryzowała obniżona a 472 podwyższona ekspresja, w porównaniu do aktywności genów jelita broilerów kontrolnych, nie otrzymujących tego składnika. Określono następujące kategorie funkcji biologicznych, w których uczestniczyły aktywne geny: odpowiedź zapalna, odpowiedź anty-drobnoustrojowa, hematopoeza, metabolizm lipidów, synteza białka oraz choroby zakaźne. Na podstawie funkcji biologicznych aktywnych genów autorzy opracowali graficzny obraz nutrigenomicznych zależności (rys. 3). Zarówno kategorie funkcji biologicznych, jak i sieć nutrigenomicznych zależności opracowano przy pomocy bazy IPA.



Rys. 3. Sieć powiązań nutrigenomicznych w jelicie czczym 6-tygodniowych brojlerów, otrzymujących mannanooligosacharydy w paszy (w odniesieniu do kontroli). Oznaczenia: kolor czerwony – wzrost ekspresji, zielony – hamowanie ekspresji genów (wg Brennan i in., 2013)

Fig. 3. Network of nutrigenomic relationships in the jejunum of 6-week-old broilers given feed mannanooligosaccharides (relative to control) – Red colour represents up-regulation and green – represents down-regulation relative to the control (Brennan et al., 2013)

Zdaniem autorów, przedstawione zależności w ekspresji genów profilu genetycznego jelita ujawniły, że suplementacja paszy mannanooligosacharydami wywołuje reakcje biologiczne, związane z równoczesnym wzrostem odporności oraz poprawą wykorzystania energii paszy w procesach wzrostu ptaków. Wyniki analizy molekularnej potwierdzają i obrazują korzystną rolę mannanooligosacharydów w poprawie zdrowotności i produktywności intensywnie tuczonych ptaków.

### Podsumowanie

W kręgu zainteresowań nauk rolniczych najważniejsze kierunki badań nutrigenomicznych obejmują możliwości poprawy efektywności produkcyjnej zwierząt gospodarskich oraz poprawy właściwości prozdrowotnych produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego. Wydaje się, że wzrost liczby badań nutrigenomicznych oraz towarzyszący mu rozwój analitycznych technik molekularnych przełoży się na spełnienie tych oczekiwań w najbliższym czasie.

### Literatura

- Benson D.A., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2014). GenBank. Nucleic Acids Res., 42: D32–D37. Database issue.
- Brennan K.M., Graunard D.E., Xiao R., Spry M.L., Pierce J.L., Lumpkins B., Mathis G.F. (2013). Comparison of gene expression profiles of the jejunum of broilers supplemented with a yeast cell wall-derived mannan oligosaccharide versus bacitracin methylene disalicylate. Brit. Poultry Sci., 54, 2: 238–246.
- Brown T.A. (2009). Genomy. P. Węgleński (red.), Wyd. Nauk. PWN, ISBN 978-83-01-15634-3.
- Caspi R., Altman T., Dreher K., Fulcher C.A., Subhraveti P., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Mueller L.A., Ong Q., Paley S., Pujar A., Shearer A.G., Travers M.T., Eerasinghe D., Zhang P., Karp P.D. (2012). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. Nucleic Acids Res., 40: D742–D753.
- Cassar-Malek I., Picard B., Bernard C., Hocquette J.F. (2008). Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. Aust. J. Exp. Agr., 48: 701–710.
- Ferguson L.R. (2009). Nutrigenomics approaches to functional foods. J. Am. Diet. Assoc., 109: 452–458.
- Fernández-Suárez X.M., Rigden D.J., Galperin M.Y. (2014). The 2014 Nucleic Acids Research Database Issue and an updated NAR online Molecular Biology Database Collection. Nucleic Acids Res., 42: D1–D6, Database issue.
- Ghormade V., Khare A., Baghel R.P.S. (2011). Nutrigenomics and its applications in animal science. V. R. F., 2, 3: 147–155.
- Gruca A. (2010). Bioinformatyczne bazy danych. Wyd. Polsko-Japońska Wyższa Szkoła Technik Komputerowych. Seria: Podręczniki akademickie, Warszawa.
- Hamill R.M., Aslan O., Mullen A.M., O’Doherty J.V., McBryan J., Morris D.G., Sweeney T. (2013). Transcriptome analysis of porcine *M. semimembranosus* divergent in intramuscular fat as a consequence of dietary protein restriction. BMC Genomics, 14: 453.
- Kaput J., Rodriguez L.R. (2004). Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. Physiol. Genomics, 16: 166–177.
- Moisá S.J., Shike D.W., Faulkner D.B., Meteer W.T., Keisler D., Looor J.J. (2014). Central role of the PPAR $\gamma$  Gene Network in coordinating beef cattle intramuscular adipogenesis in response to weaning age and nutrition. Gene Regul. Syst. Bio., 8: 17–32.
- Nagarajan N., Pop M. (2013). Sequence assembly demystified. Nat. Rev. Genet., 14: 157–167.
- Seo S., Larkin D.M., Looor J.J. (2013). Cattle genomics and its implications for future nutritional strategies for dairy cattle. Animal, 7: 1, 172–183.

## BETWEEN FEED AND GENOME – NUTRIGENOMICS OF FARM ANIMALS

### Summary

Nutrigenomics is the science dedicated to analysis of the interface between the nutritional environment and cellular/genetic processes. Comprehensive research in this area can be performed by combining the knowledge of genomics, proteomics and metabolomics, using bioinformatics. The results of numerous experiments in the fields of these sciences are stored in the repositories, available online in the form of a variety of databases. The bases that integrate knowledge regarding the nutrigenomics processes (multi-omics databases) are used in the interpretation of the results of research on livestock animals. The purpose of advanced nutrigenomics study in cattle, pigs and chickens is to improve the efficiency of their production and to modify product composition by increasing the content of components with health-promoting effects in humans.