

M13

Klasė 11-12

Skonio receptorių evoliucijos bioinformatinė analizė



Atlikimas 80 min.

Ivadas

Šiuo pratybų metu susipažinsime su skonio receptoriais, jų šeimomis bei bioinformatiniais metodais, kuriais galima analizuoti skonio receptorių evoliuciją. Pratybose yra 12 užduočių, kurios pateiktos trimis grupėmis. Pirmoji užduočių grupė skirta susisteminti bendrą informaciją apie skonio receptorius, antrojoje užduočių grupėje analizuojama skonio receptorių evoliucija, o trečiojoje užduočių grupėje ieškoma sąsajų tarp erdinės balytymo struktūros bei balytymo sekos.

Bioinformatika - tai mokslas, analizuojantis biologinę informaciją. Dažniausiai analizuojamos biomolekulių sekos (DNR nukleotidų, balytymų aminorūgščių sekos ir t.t.). Bioinformatika leidžia susisteminti tiesiogiai žmogaus protui bei akiai neaprëpiamus duomenis ir gauti mokslinę informaciją, pvz. naujų balytymų atsiradimo mechanizmus.

Būtinas pasiruošimas

Programinė įranga

Naudosime nemokamą atviro kodo programinę įrangą Jalview, kurią galime atsiisiusti iš puslapio: <http://www.jalview.org/download.html>.

Balytymų sekų duomenys

Pratyboms atliliki reikalingi sekų duomenys pateikiami failu T1Receptorai.fa.

Teorinis ivadas

Penki pagrindiniai skoniai

Skonis yra viena iš mūsų penkių juslių. Žmogus gali jausti penkis skonius: saldumą, rūgštumą, kartumą, sūrumą bei umami. Pastarasis skonis buvo identifikuotas tik 2000-aisiais metais. Skonį pajuntame, kuomet maisto molekulė susijungia su skonio receptoriumi, esančiu ant skonio svogūnėlio paviršiaus. Skonio svogūnėliai yra jutiminiai organai, išsidėstę mūsų liežuvio, dalies gomurio bei gerklės paviršiuje. Priešingai, nei ilgai buvo manoma, nėra tokų liežuvio dalių, kurios jaustų tik vieną skonį - kiekvienas skonio svogūnėlis turi 50-150 receptorinių ląstelių su skirtingais skonio receptoriais.

Penki skoniai leidžia nustatyti būtinų gyvybiniams procesams druskų (sūrumas), energiškai vertingų anglavandeniu (saldumas) bei vertingų aminorūgščių (umami) buvimą maiste. Taip pat skonio jutimas leidžia išvengti galimai nuodingų sugedusių vaisių valgymo (jie tampa rūgštūs) ar augalinį toksinų (dauguma jų kartūs). Taigi, skonio potyrio reikšmė gyvūnui adaptuotis prie aplinkos bei išgyventi yra akivaizdi.

Manoma, kad gyvūnai turi ir daugiau nei penkis skonio jutimus, kuriuos sukelia specifiniai junginiai (mentolis, krakmolas, riebalai).

Skonio receptorių šeimos

Yra keletas skonio receptorių šeimų. Geriausiai ištyrinėtos - kartaus skonio receptorių šeima (T2R balytymai, koduojami TAS2R geno), bei saldaus ir rūgštus skonio receptorių šeimos (T1R balytymai, koduojami TAS1R genų).

Kartaus skonio receptoriai

Kartus skonis yra nemalonus, kartais net pykinantis ar sukeliantis vėmimą. Manoma, kad kartaus skonio jutimas leidžia išvengti galimai nuodingų maisto medžiagų (pvz., augalų alkaloidų) vartojimo ir yra labai svarbus saugant mūsų gyvybes.

Yra daugybė skirtinį rūšių kartaus skonio receptorių: žmogaus genome nustatyti 25 skirtinės kartaus skonio receptoriai, pelėje - net 33.

M13

Klasė 11-12

Skonio receptorių evoliucijos bioinformatinė analizė

Nauji kartaus (bei kitų skonių) receptoriai atsiranda genų duplikacijos būdu. Veikiant mutagenams, atsiranda kelios identiškos to paties geno kopijos. Jvykus geno duplikacijai, iš karto sumažėja evoliucinė spaudimas: vienai receptoriaus kopijai mutavus, kita jo kopija toliau gamina funkcionalų balytmą, tad likusi geno kopija gali evoliucionuoti labai greitai.

Jvykus mutacijai, tolesni jvykiai gali plėtotis dviem kryptimis:

1. Mutacija gali visiškai eliminuoti balytumo funkciją - toks genas taps pseudogenu (neaktyvaus geno kopija). Žmogaus genome nustatyti penki kartaus skonio pseudogenai.
2. Mutacija gali suteikti receptorui savybes, kurios padės gyvūnui išlikti. Tokia mutacija įsitvirtins ir kitose kartose, atsiras naujo tipo receptorius.

Kartaus skonio receptoriaus struktūra

Kartaus skonio receptorius yra transmembraninis balytumas. Tai reškia, kad šis balytumas yra įsiterpęs ląstelės membranoje. Kiekvienas kartaus skonio receptorius yra sudarytas iš trijų dalių:

- ląstelės išorėje esanti dalis (ląstelės išorės domenas), kuris tiesiogiai susijungia su skonio potyrių sukeliančia molekule;
- transmembraninis domenas, kuris yra įsitvirtinęs ląstelės membranoje ir veikia tarsi balytumo inkaras;
- ląstelės vidaus domenas, kuris saveikauja su kitais balytmais, atsakingais už tolesnį signalo perdaivinamą nervams. Šie, savo ruožtu, informaciją apie juntamą skonį perduos į smegenis.

Saldaus skonio receptorius

Iki 1990-ųjų metų buvo abejojama, ar saldaus skonio receptoriai apskritai egzistuoja. Tačiau 2001-aisiais metais buvo parodyta, kad pelės, turinčios skirtinges TAS1R3 geno variantus, skirtinges megsta saldų maistą. Vėliau buvo parodyta, kad T1R3 balytumas sudaro kompleksą su panašiu balytumu T1R2, suformuodamas dviejų dalių saldumo receptorių žinduoliuose.

Žmogaus saldumo receptorius reaguoja į eilę cukrų: sacharozę, fruktozę, gliukozę. Šie receptoriai taip pat gali reaguoti ir į kitokio pobūdžio chemines medžiagas: kai kurias aminorūgštis, saldiklius (sachariną, aspartamas ir kt.). Įdomu tai, kad saldumo potyris gali smarkiai skirtis net tarp artimų gyvūnų rūšių: pavyzdžiu, Pietų Amerikos beždžionėms aspartatas nėra saldus, tuo tarpu Senojo pasaulio primatams (įskaitant ir žmogų), aspartatas sukelia saldumo potyrių. Saldumo potyris svarbus gyvūnams, kurių ratione yra vaisių, turinčių daug cukrų. Katės ir vištos yra visiškai praradę saldaus skonio receptorius bei saldumo jutimą. Šiuo atveju genai, kodujantys saldaus skonio receptorių T1R2, sukaupė daug funkcijų trikdančių mutacijų, todėl tapo neveikliais pseudogenais. Evoliucija buvo nepajėgi eliminuoti gene besikaupiančias mutacijas, nes nei katės, nei vištos nesimaitina vaisiais. Todėl saldaus skonio potyris šiemis gyvūnams išlikti nėra aktualus.

Umami skonio receptorius

Umami skonio receptorius yra panašus į saldaus skonio receptorius, tik umami receptoriuje T1R2 balytumas yra pakeistas T2R1. Umami skonio receptorius reaguoja beveik į visas iš 20 aminorūgščių ir į mažus peptidus.

M13

Klasė 11-12

Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

Užduotys

1. Kaip žinduoliui padeda išlikti kartumo, saldumo ir umami skonio pojūčiai? Kodėl katės nejaučia saldumo? Kaip manote, ar katė turi umami skonio receptorius?

2. Užbaikite šią lentelę:

Skonis	Susiję genai	Susiję baltymai
Umami	TAS1R1 + _____	_____ + T1R3
Saldumas	_____ + TAS1R3	_____ + _____
Kartumas	_____	_____

T1R sekų analizė

Šio pratimo tikslas - analizuoti panašumus tarp umami ir saldumo skonio receptorijų baltymų aminorūgščių sekų (T1R variantų) bei suvokti, kaip vystosi nauji skonio receptoriai. Jums pateikiti duomenys - septyniolikos T1R skonio receptorijų aminorūgščių sekos. Tai - dviejų žuvų (dygliažuvė bei fugu), paukščio (višta), sterblinio (oposumas) ir dviejų žinduolių (šuo ir žmogus) T1R sekos.

Analizę atliksime atviro kodo programa JalView. Iš pradžių Jūs sukursite daugybinį sekų palyginį - tokį sekų išdėstymą, kuo met panašūs sekos fragmentai išrikiuojami vienas virš kito. Remiantis gautu palyginiu, sukursime filogenetinį medij. Jame parodysime, kurios sekos yra tarpusavyje panašiausios. Taip pat išanalizuosime, kaip aminorūgščių sekoje užkoduotas baltymo išsidėstymas laštelių membranoje.

1) Pirmiausia reikia atsidiaryti analizuojamas sekas su Jalview programą.

Nueikite į puslapį <http://www.jalview.org/download.html> ir paleiskite Jalview programą. Tam paspauskite mygtuką **Launch Jalview Desktop**. Paleidus programą, kartu atsivers ir langai su pavyzdiniais duomenimis:

Get the latest Jalview Desktop application:

- If you have [Java](#) installed, just click [Launch Jalview Desktop](#) (which is also at the top of page)
Webstart can be slow the first time you launch Jalview, [take a look below](#) for more help.
- Alternately, download an installer for your system from the [InstallAnywhere Jalview Installers page](#).
InstallAnywhere is a Java program installation system. It will work out which operating system you have, and present you with the package it considers most appropriate. You can download the Jalview application installation on its own, and optionally download a copy of the Java Virtual Machine which actually runs Jalview.

Problems ? Take a look at the [FAQs](#).

Downloads for deploying the latest [JalviewLite applet](#):

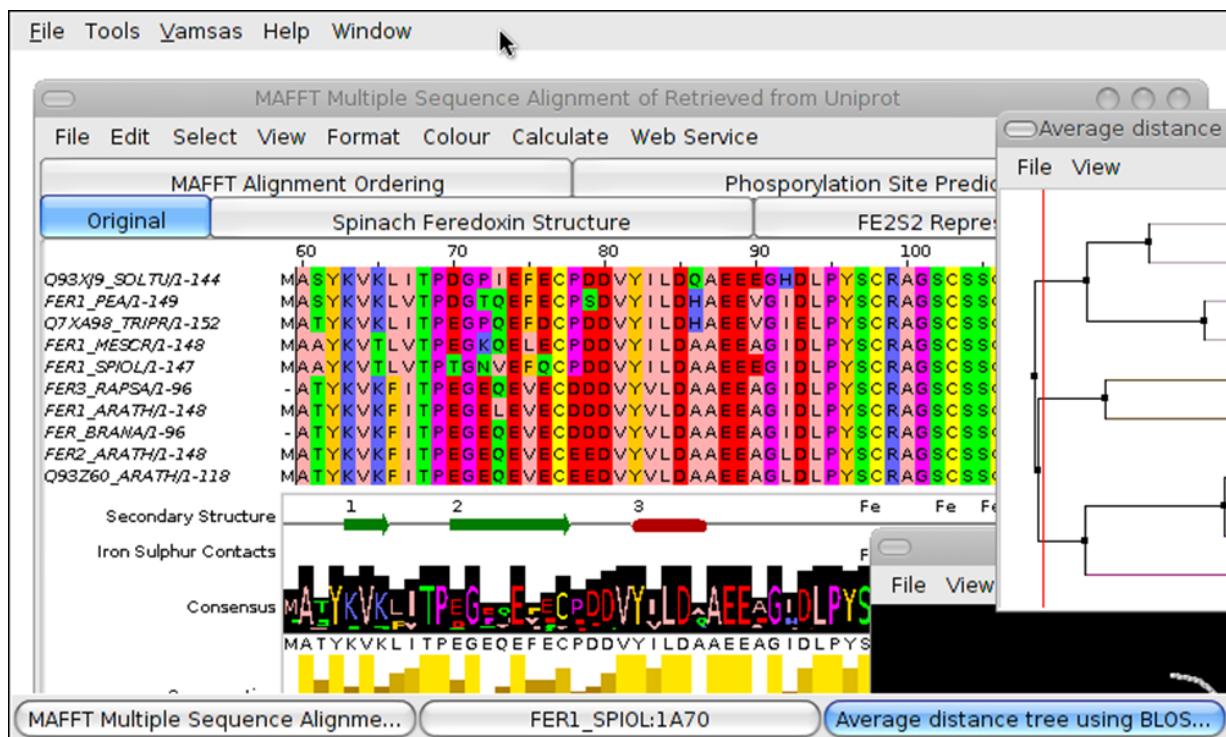
- You will need the following to deploy JalviewLite on your page:
 - Compiled jars: [jalviewApplet.jar](#) ([jalviewApplet.jar with debugging symbols](#))

1 pav. Jalview pradžios puslapio vaizdas.

M13

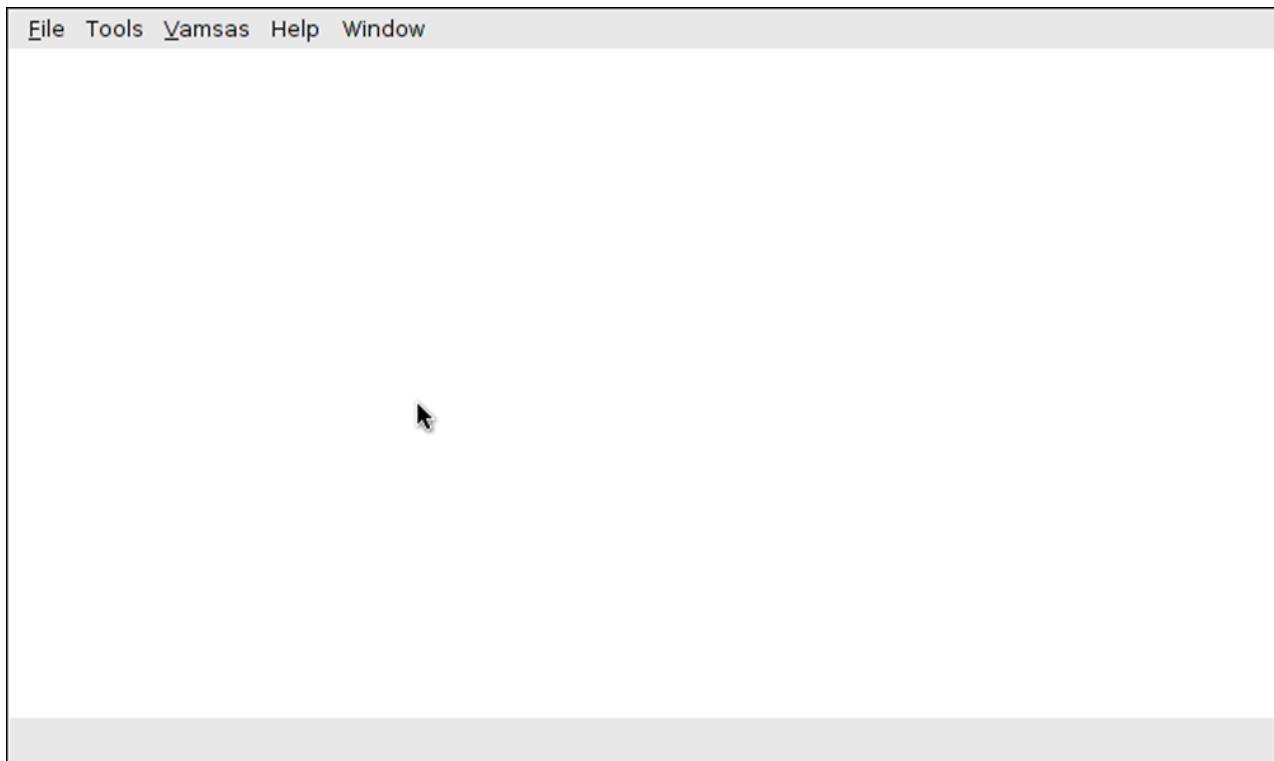
Klasė 11-12

Skonio receptorų evoliucijos Bioinformatinė analizė



2 pav. Jalview lango vaizdas su pavyzdiniais duomenimis.

2) Uždarykite visus atsivérusius vidinius langus. Pradedant dirbti su mūsų analizuojamomis sekomis, programos langas turi būti toks:

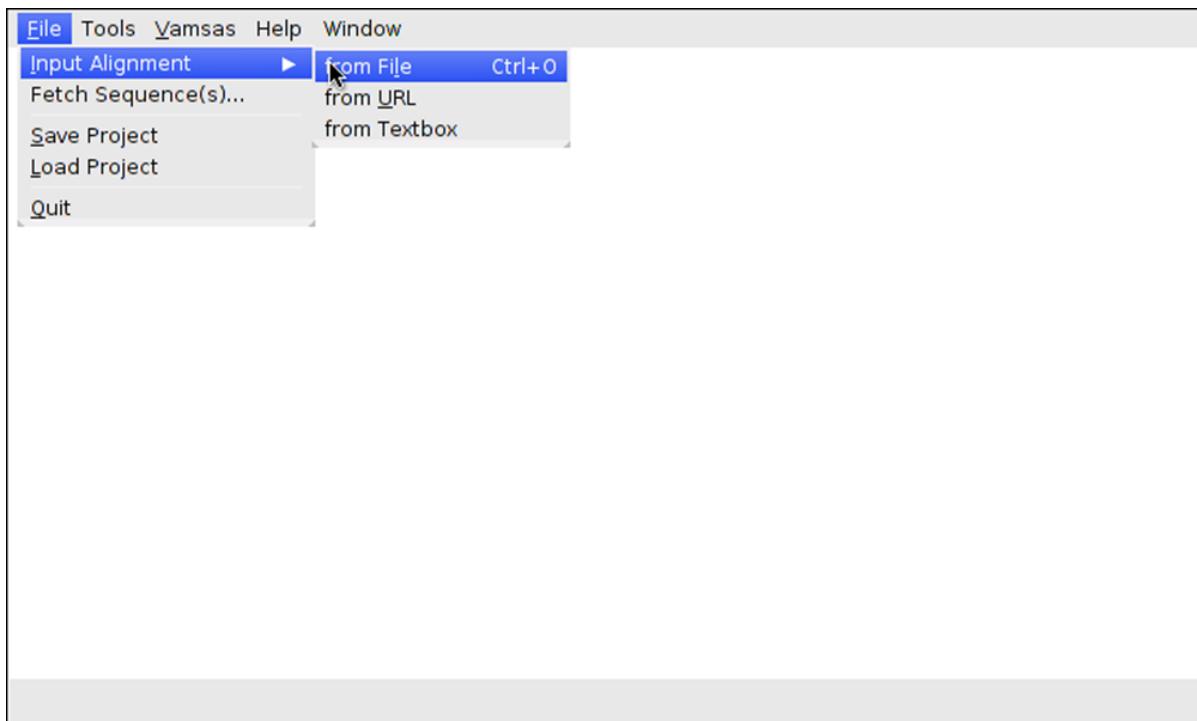


3 pav. Jalview lango vaizdas prieš darbo pradžią.

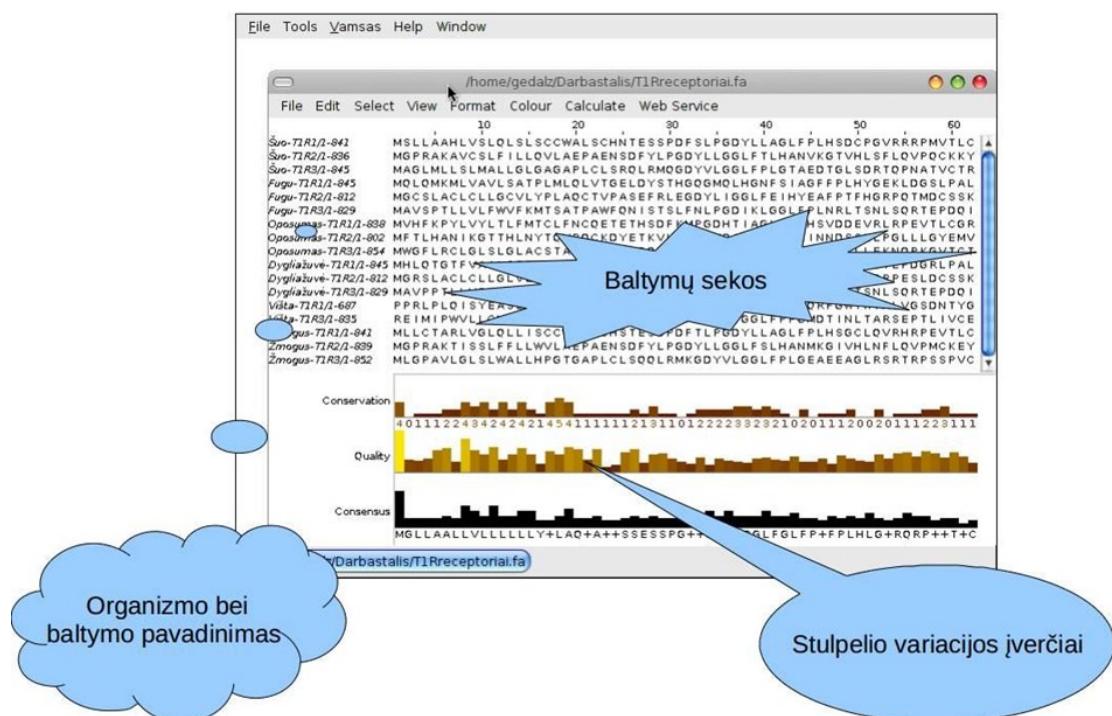
M13

Klasė 11-12

Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

3) Tuomet atidarykite failą **T1Receptorai.fa****4 pav.** Failo atidarymo procedūros Jalview programoje vaizdas.

Atidarę failą turėtumėte gauti vaizdą, panašų į šį:



5 pav. Failo, atidaryto Jalview programoje, vaizdas su paaiškinimais. Kairėje yra organizmo bei balytymo pavadinimai. Dešinėje (viena virš kitos) - balytymų sekos, kuriose aminorūgštys pažymėtos vienraigžiais kodais.

M13

Klasė 11-12

Skonio receptorijų evoliucijos

Bioinformatinė analizė

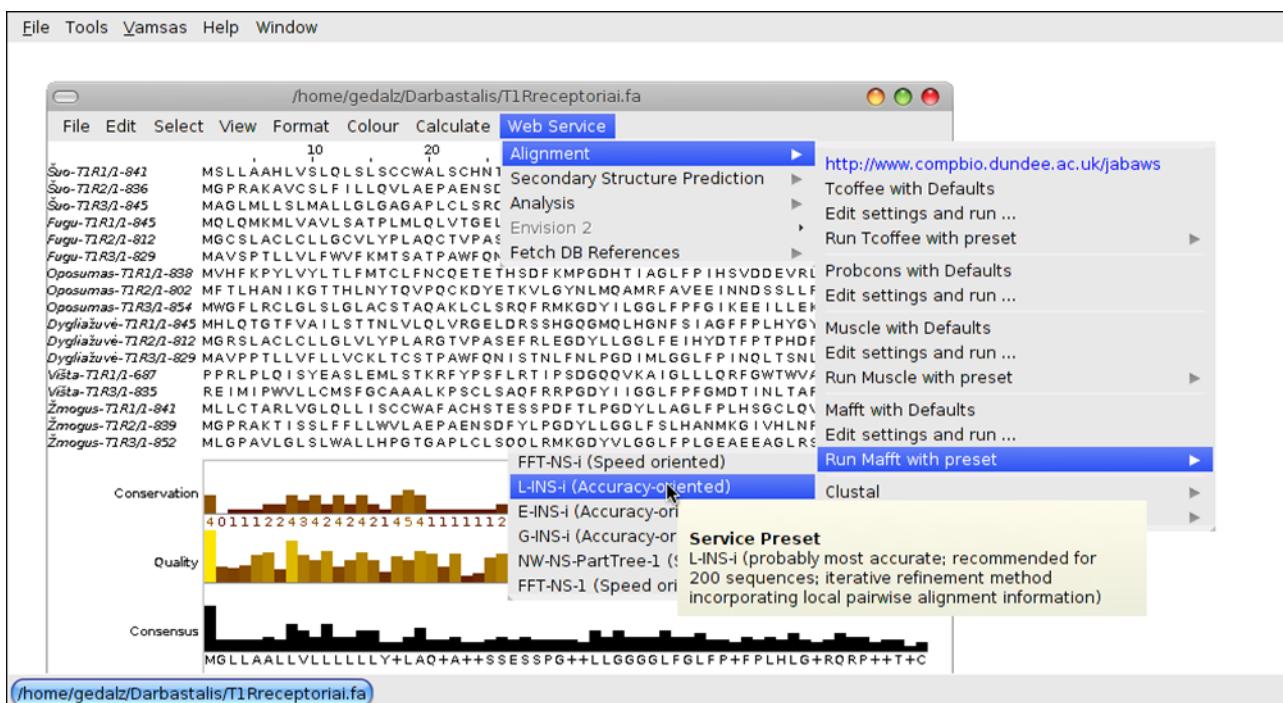
Aminorūgščių vienraidžiai kodai:

Aminorūgštis	Žyminti raidė
Alaninas	A
Argininas	R
Asparaginas	N
Aspato rūgštis	D
Cisteinas	C
Glutamo rūgštis	E
Glutaminas	Q
Glicinas	G
Histidinas	H
Izoleucinas	I

Aminorūgštis	Žyminti raidė
Leucinas	L
Lizinas	K
Metioninas	M
Fenilalaninas	F
Prolinas	P
Serinas	S
Treoninas	T
Triptofanas	W
Tirozinas	Y
Valinas	V

Balymų sekos programos lange išdėstytos viena virš kitos - taip gaunami raidžių stulpeliai. Lango apačioje yra pateikti stulpelių variacijos įverčiai. Kuo įverčiai didesni, tuo stulpelyje dažniau pasikartoja ta pati raidė, t.y. atitinkamoje pozicijoje dažniau pasitaiko ta pati aminorūgštis. Tolimesnei receptorijų aminorūgščių sekų analizei atlikti reikia gauti balymų sekų palyginj - sekas išdėstyti vieną virš kitos taip, kad raidės stulpeliuose kuo mažiau varijuotų ir balymų sekose būtų sugreintos panašausios sritys.

4) Darbui reikalingą palyginj gausime naudodami vieną tiksliausią balymų lyginimo algoritmu Mafft L-INSI-i:



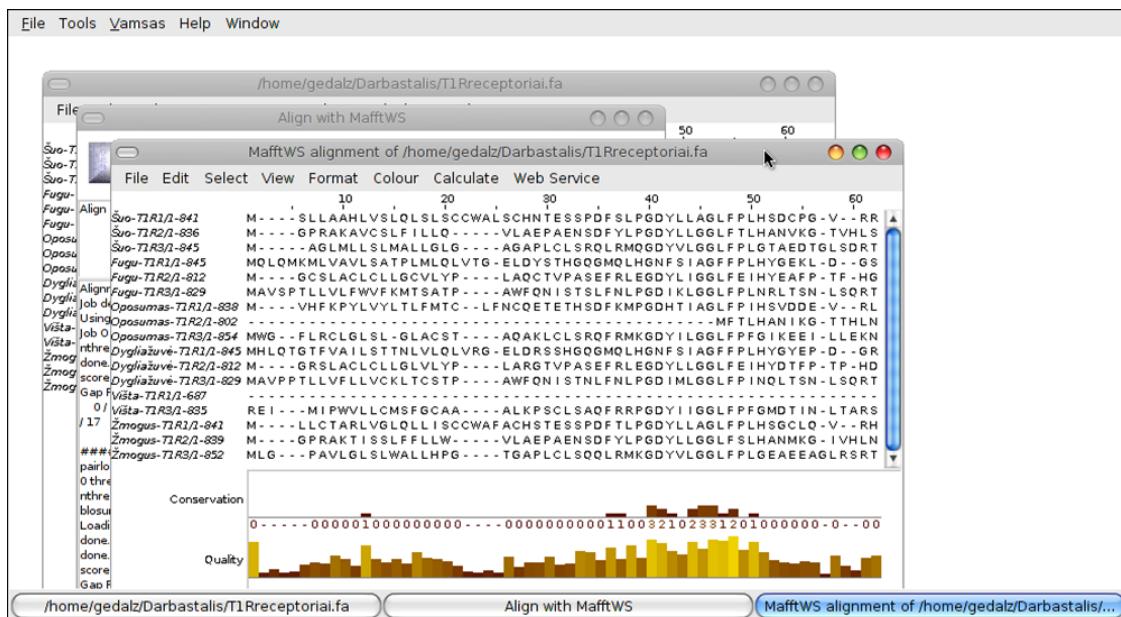
6 pav. Algoritmo pasirinkimo palyginio skaičiavimui procedūros vaizdas.

M13

Klasė 11-12

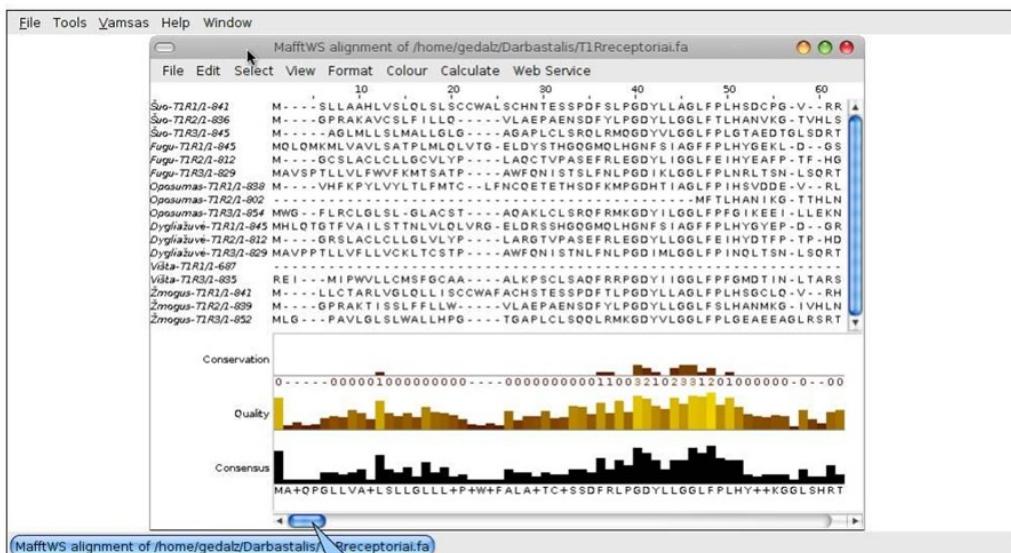
Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

Kuri laiką teks palaukti, bioinformatikoje kantrybė svarbi. Gavus iš Mafft tarnybinės stoties duomenis, atsiveria langas, kuriame sekos jau yra tinkamai sulýgiotos:



7 pav. Palyginio lango su foniniais langais vaizdas.

5) Toliau dirbsime tik su gautu daugybiniu palyginiu. Du ankstesnius langus uždarykite. Turėtumėte gauti panašų vaizdą:



žymeklis

8 pav. Palyginio lango be foninių langų vaizdas.

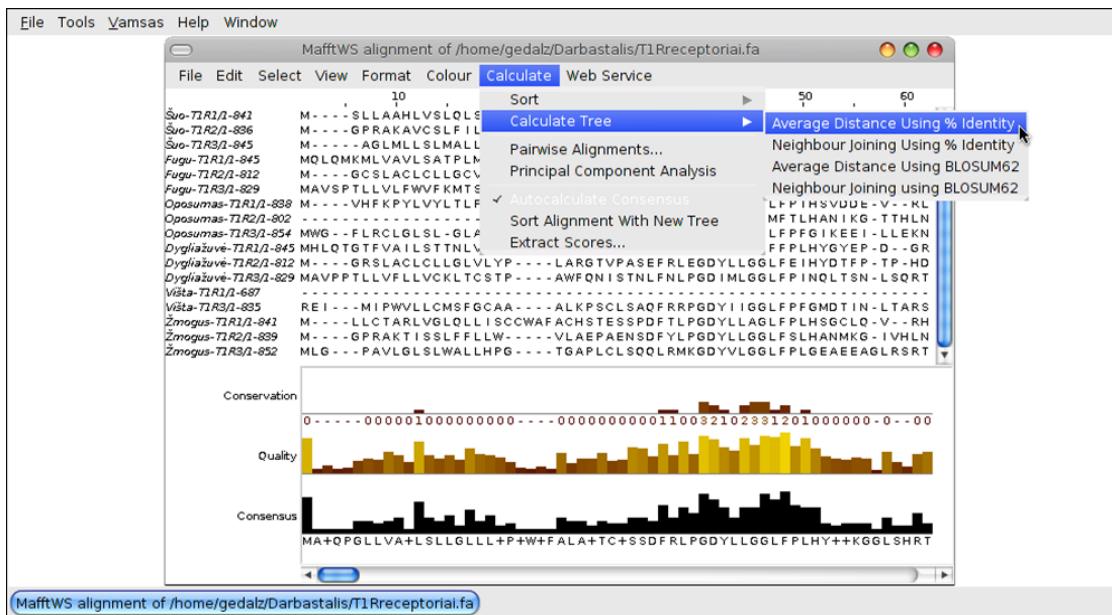
Atkreipkite dėmesį, kad matome tik dalį gauto palygino, paméginkite su žymekliu pažvelgti ir j kitas palygino dalis.

M13

Klasė 11-12

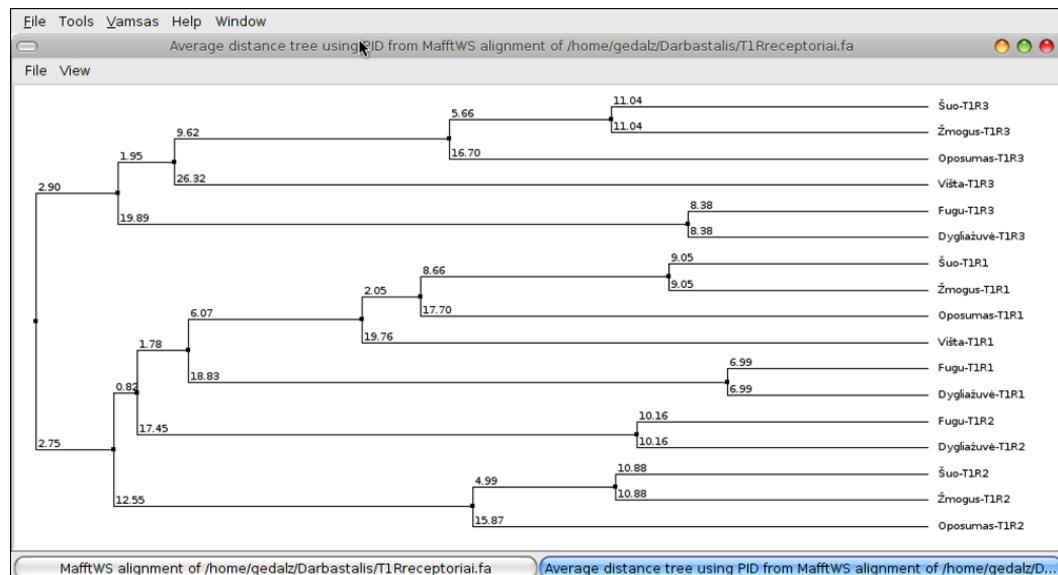
Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

6) Remiantis šiuo palyginiu, paméginkime gauti receptorijų filogenetinį medži:



9 pav. Filogeninio medžio skaičiavimo procedūros vaizdas.

Gautasis filogenetinis medis turėtų atrodyti taip:



10 pav. Gauto filogeninio medžio vaizdas.

Medž sudaro paeiliui einantys atsišakojimai į dvi grupes. Tos dvi grupės padalijamos dar į dvi grupes (tai daroma kelis kartus) iki tol, kol prieinami medžio lapai - konkrečios baltymų sekos. Ties kiekvieno atsišakojimo pradžia yra pateiktas santykis šakos ilgis. Šakos ilgis yra tiesiogiai proporcingas laikui, prieš kurį buvo atsišakota nuo bendro protėvio. Kuo šaka ilgesnė, tuo anksčiau evoliucijos eigoje buvo atsiskirta nuo bendro protėvio.

Dabar atlikite užduotis, susijusias su filogeneze. Jalview programos lango neuždarykite - analizę dar pratęsime.

M13

Skonio receptorių evoliucijos Bioinformatinė analizė

3. Medyje turėtų būti matomi trys baltymų klasteriai (labiau tarpusavyje susijusios grupės). Kurie genai yra kiekviename klaseryje? Galite šias grupes pažymėti atspausdintame medyje.

4. Visi analizuojami baltymai yra labai panašūs vienas į kitą (galite tuo įsitikinti žiūrēdami į baltymų sekas, aminorūgščių poziciniai skirtumai nėra dideli). Evoliuciją tyrinėjantys biologai mano taip esant dėl to, kad visi baltymai kilo iš bendro kamieno. Kur filogenetiniame medyje būtų visų skonio receptorių baltymų bendrasis protėvis?

5. Kurios grupės skonio receptorių baltymų pora (T1R1 ir T1R2, T1R1 ir T1R3 ar T1R2 ir T1R3) yra panašiausia tarpusavyje? Kodėl?

6. Remiantis filogenetiniu medžiu nustatykite, kurie baltymai yra panašesni tarpusavyje: dygliažuvės T1R1 ir fugu T1R1 ar žmogaus T1R3 ir šuns T1R3?

7. Užbaikite lentelę, kuriuos genus turi nurodyti gyvūnai:

Organizmas	T1R1	T1R2	T1R3
Dygliažuvė	V		
Fugu			
Šuo			
Žmogus			
Oposumas			
Višta			

8. Kaip jūs manote, kuris gyvūnas (greičiausiai) negali jausti saldaus skonio? Kodėl taip manote?

M13

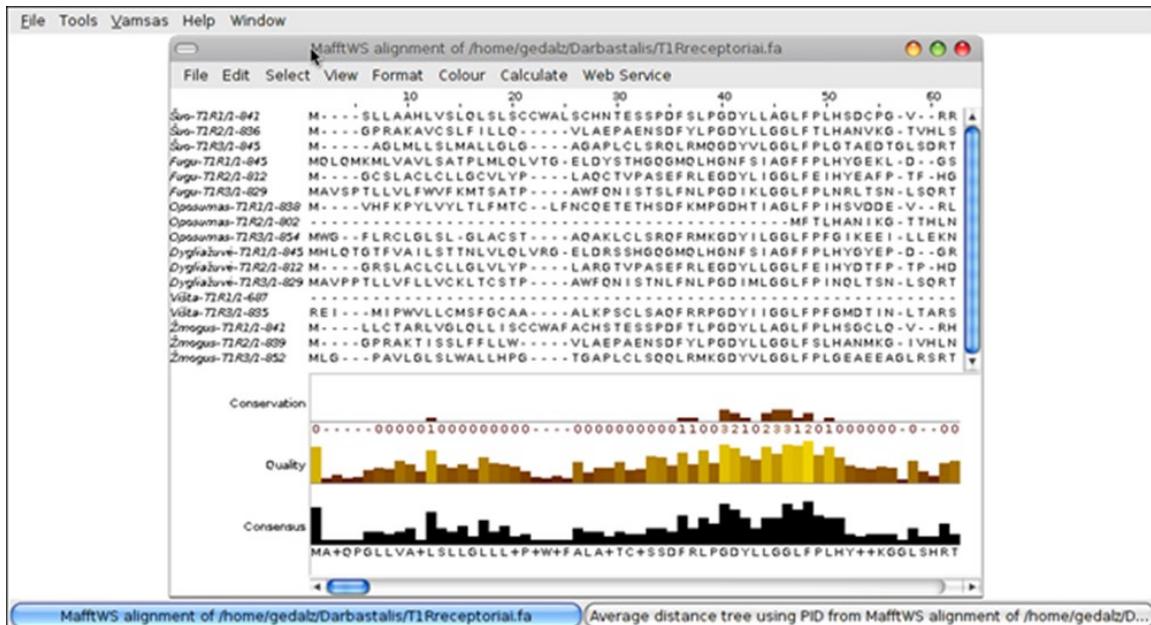
Klasė 11-12

Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

Sekos ir erdvinių struktūros ryšys

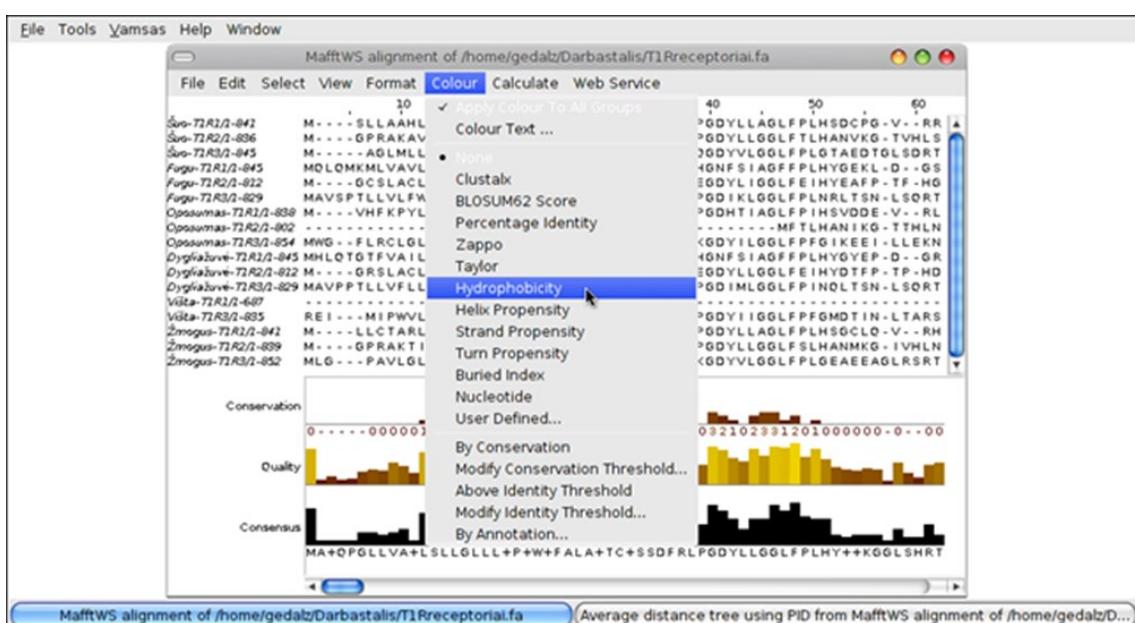
Balymo erdvinei (tretinei) struktūrai susidaryti reikalinga informacija yra užkoduota balymo pirminėje struktūroje - jo aminorūgščių sekoje. Analizuodami T1 receptorijų sekas, raskime akivaizdžias sąsajas tarp aminorūgščių sekos ir balymo erdvinių susiklostymo (erdvinės struktūros).

Gržkite į sekų palyginimo langą:



11 pav. Palyginio lango vaizdas.

- 7) Patyrinėkime, kaip išsidėsčiusios aminorūgštis duotuose balytymuose. Nuspalvinkime aminorūgščių simbolius pagal hidrofobiškumą.



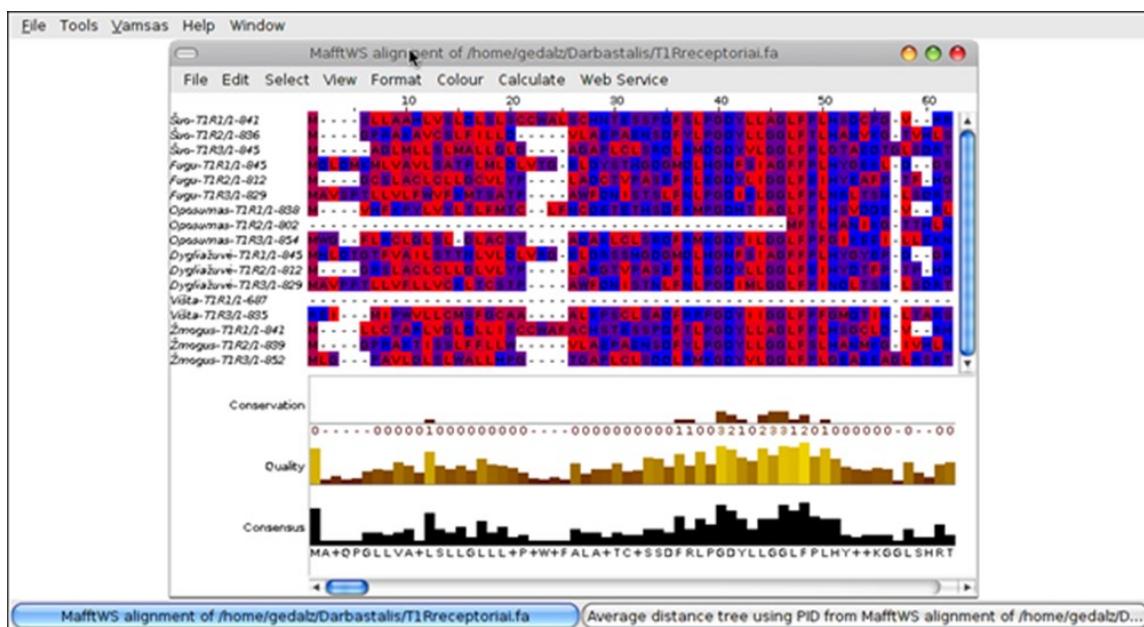
12 pav. Aminorūgščių nuspalvinimo pagal hidrofobiškumą procedūra.

M13

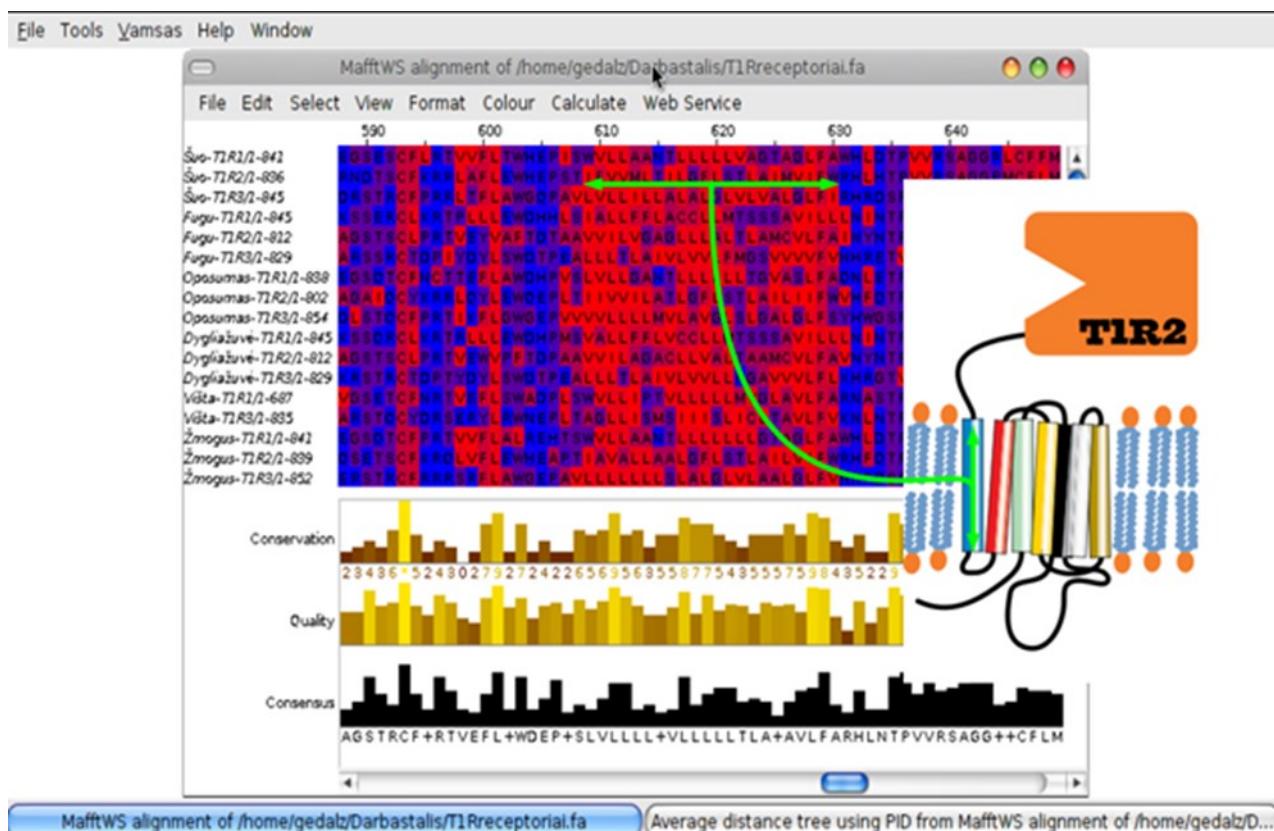
Klasė 11-12

Skonio receptorijų evoliucijos Bioinformatinė analizė

Turėtumėte gauti panašų vaizdą:

**13 pav.** Palygino su nuspavintomis aminorūgštims pagal hidrofobiškumą vaizdas.

Kuo aminorūgštis geriau tirpsta riebaluose (hidrofobiškesnė), tuo raudonesne spalva ji pažymėta. Kuo labiau ji tirpsta vandenyje (hidrofiliskesnė) - tuo aminorūgštis spalva yra mėlynesnė. Citoplazminę membraną T1R baltymo spiralė perskrodžia septynis kartus - yra septyni sekos fragmentai, kurie išsidėsto membranos viduje. Tam, kad baltymo vija galėtų išsilaikyti plazminėje membranoje, ji turi būti sudaryta iš hidrofobinių („bijančių vandens“) ir gerai tirpstančių riebaluose aminorūgščių.

**14 pav.** Išskirtas baltymo fragmentas įsitvirtinantis plazminėje membranoje.

M13

Skonio receptorijų evoliucijos

Bioinformatinė analizė

9. Paméginkite identifikuoti gautame palyginyje septynis palyginio sekos fragmentus, kurie parodo kertančias plazminę membraną baltymo spirales. Nurodykite šių hidrofobinių rajonų koordinates, remdamiesi gautu palyginiu (dešimčių pozicijų tikslumu). Pirmasis toks rajonas jau pažymėtas:

Hidrofobinio fragmento numeris	Fragmento pradžia (palyginio stulpelio nr.)	Fragmento pabaiga (palyginio stulpelio nr.)
1	610	630
2		
3		
4		
5		
6		
7		

10. Kodėl, vykstant evoliucijai, hidrofobiniai sekų fragmentai (kaip matote iš sekų palyginio) išlieka?

Papildoma literatūra

- Sean B. Carroll, *The making of the fittest. DNA and the ultimate forensic record of evolution*, 2009. ISBN: 978 1847247247.
Šioje knygoje populiariai pateikiami evoliucijos molekuliniai įrodymai.
- Lindell Bromham, *Reading the story in DNA: A beginner's guide to molecular evolution*, 2008. ISBN: 978 0199290918.
Tai įtraukianti knyga apie molekulinę evoliuciją, be sudėtingų matematinių formulų aiškinanti esminius molekulinės evoliucijos mechanizmus.

Rekomenduojama mokslinė literatūra

- Fischer, A. et al (2005) Evolution of bitter taste receptors in humans and apes. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3) 432-436. doi: 10.1093/molbev/msi027.
- Li, X. et al (2005) Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genetics*, 1, 27-35. doi:10.1371/journal.pgen.0010003.
- Shi, P. and Zhang, J. (2006) Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (2) 292-300. doi: 10.1093/molbev/msj028.
- Chandrashekhar, J. et al (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 288-294. doi:10.1038/nature05401.
- Breelin, P. and Spector, S. (2008) Mammalian taste perception. *Current Biology*, 18 (4) R148-R155. doi:10.1016/j.cub.2007.12.017.