



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymo(si) metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

## BIO 323. BIOFIZIKA

Laboratorinis darbas

### BALTYMŲ 3D STRUKTŪROS ANALIZĖS PRADMENYS

#### TIKSLAS

Susipažinti su baltymų, besiskiriančių funkcinėmis savybėmis, struktūriniais skirtumais.

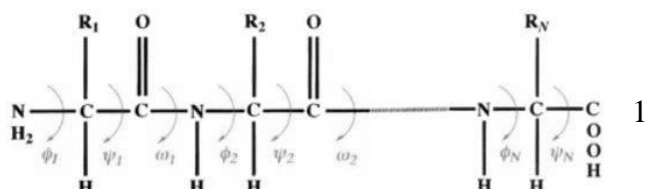
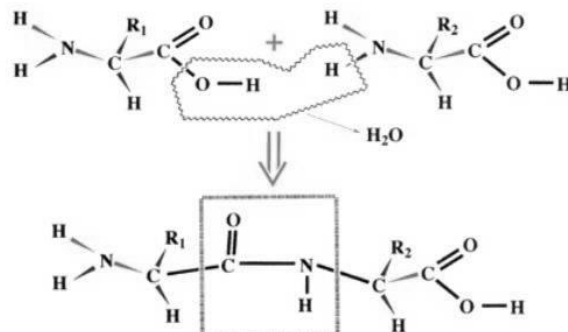
#### UŽDUOTYS

Palyginti dviejų pateiktų baltymų pirminę, antrinę, tretinę struktūras, nustatant amino rūgščių sudėtį bei jų išsibarstymą,  $\alpha$  ir  $\beta$  struktūrų dominavimą, prostetinių grupių buvimą ar nebuvimą, jų padėtį ir orientaciją baltyme. Išskirti būdingiausius baltymų struktūrų skirtumus.

#### TEORINĖ DALIS

##### Baltymų sandara, konformacijos

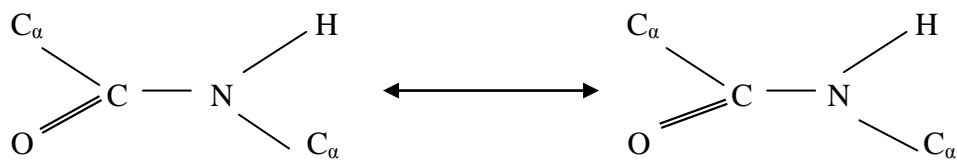
Baltymai yra gamtiniai polimerai, sudaryti iš  $\alpha$ -amino rūgščių liekanų, susijungusių peptidiniais ryšiais. Baltymų santykinės molekulinės masės kinta nuo 20 000 iki kelių milijonų.



Amino rūgštys polipeptiduose ir baltymuose yra sujungtos peptidinėmis jungtimis. R- grupių seka grandinėje sudaro **baltymo pirminę struktūrą** (1 pav.).

Organinių molekulių erdvinės struktūros, kurias galima gauti vieną iš kitos, sukant tam tikras atomų grupes apie pasirinktas kovalentines jungtis, vadinamos *konformacijomis*. Atominių grupių sukimosi greitis priklauso nuo temperatūros. Esant kambario temperatūrai, sukimosi dažnis yra  $10^{10}$  Hz. Todėl junginius, kuriuose vyksta konformaciniai kitimai, galima išsivaizduoti kaip dinaminį rotamerų mišinį. Teoriškai polimero molekulės konformacijų skaičius yra labai didelis, tačiau tirpale daugelis konformacijų negali realizuotis. Svarbus, konformacijų skaičių ribojantis veiksnys yra polimero koncentracija. Išgarinus tirpiklį, kai kurių polimerų molekulės įgyja vieną ir tą pačią konformaciją. Šis reiškinys vadinamas *kristalizacija*.

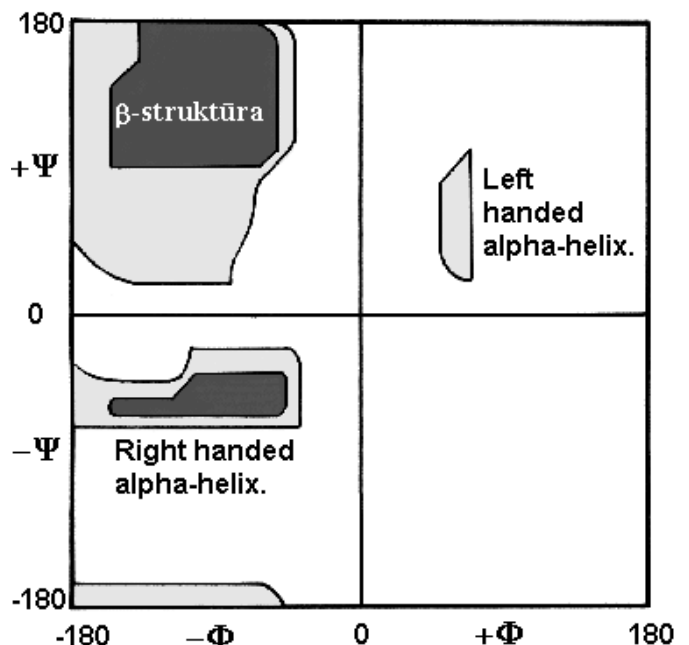
Polipeptidinės grandinės konformacijų skaičių riboja sunkus kaimyninių grupių sukimasis apie peptidinę jungtį, nes peptidinė jungtis 30–40% yra dviguba jungtis:



1 pav. Polipeptidinės grandinės susidarymas.

Dipeptidų ir polipeptidų tam tikrų konformacijų susidarymo priežastis yra atominių grupių sukimasis apie kovalentines jungtis N- $C_{\alpha}$  ir C- $C_{\alpha}$ . Pirmasis žymimas  $\Phi$ , o antrasis  $\Psi$ . Polipeptidinės grandinės konformacijas aprašo  $\Phi$  ir  $\Psi$  kampų pasiskirtymo diagrama- Ramačandrano diagrama (3 pav.). Sritis  $\alpha_L$  apibrėžia reikšmes, esančias kairiojoje, o sritis  $\alpha_R$ - dešiniojoje  $\alpha$ - spiralse; C sritis jungia a. r. l. orientacijos kampų reikšmes lygiagrečiojoje ir antilygiagrečiojoje  $\beta$ -struktūroje. Kai kurių polipeptidų molekulės, esant tam tikrai temperatūrai ir tirpalo pH, įgyja  $\alpha$ -spirales konformaciją.

Keičiant šiuos veiksnius,  $\alpha$ - spirale suyra, tarp aminorūgščių radikalų susidaro atsiktinės van der Valso bei vandenilinės jungtys, polipeptidinė grandinė susisuka į kamuoliuką. Šis procesas vadinamas konformaciniu spiralė- kamuoliukas virsmu. Pvz. poligliutamato rūgšties molekulei (PGR) iki pH=5 būdinga  $\alpha$ -spirales konformacija, toliau pH kitimo diapazone spiralė staigiai pradeda irti ir išsivyniojusios polipeptidinės grandinės a.r.l. radikalai susisuka į naują



konformaciją, kuri dažniausiai yra negrįžtama. Polipeptidinėje grandinėje amino rūgštys gali sukurti apie N-Ca ir Ca-C jungtis. Šis sukimasis vaizduojamas kampais  $\Phi$  (phi) ir  $\Psi$  (psi).

Atomai laikomi kietomis sferomis, atitinkančiomis jų van der Waals-o spindulius. Baltos sritys atitinka konformacijas, kuriose atomai polipeptide atsидuria arčiau nei jų van der Waals-o spindulių suma. **Tai draudžiamų konformacijų sritys visoms amino rūgštims išskyrus gliciną.** Raudonos sritys – **leidžiamų konformacijų sritys.** Geltonos sritys – leidžiamų konformacijų sritys, gautos skaičiavimuose naudojant truputį mažesnius atomų van der Waals-o spindulius.

Baltymų denatūracija - tai ketvirtinės, tretinės bei antrinės struktūros suirimas, kai lieka nepakitusi pirminė struktūra. Baltymų denatūraciją sukelia cheminiai bei fizikiniai poveikiai - temperatūros svyravimai, pH kitimai, mechaniniai dirgikliai, spinduliavimo energija, cheminių junginių įtaka ir kt. Globulės denatūracija yra dviejų žingsnių procesas: pirmasis- globulės irimas, antrasis-  $\alpha$  ir  $\beta$  konformacijų irimas. Ir globulės, ir sintetinių polipeptidų spiralės konformacinių kitimų galutinis

3 pav. Baltymų Ramačandrano diagrama.

produktas yra statistinis kamuoliukas. Ši konformacija dažniausiai yra negrįžtama.

Baltymai skirstomi į struktūrinius (atlieka atraminę, statybinę funkcijas) ir funkcinus (fermentai). Struktūrinių baltymų funkcionalumą lemia jų matmenys, amino rūgščių sudėtis. Funkciniams baltymams labai svarbi tretinė struktūra, prostetinių grupių orientacija, aminorūgščių tarpusavio sąveika. Struktūrinių ir funkcinų baltymų struktūriniai ypatumai lemia jų termodinamines charakteristikas. Analizuojant baltymų domenų (lokusų, turinčių specifines  $\alpha$  ir  $\beta$  struktūras) bei baltymų pirminę struktūras, nustatomi baltymų homologiniai panašumai, pagal kuriuos formuojamos sisteminės baltymų šeimos, turinčios struktūrinių ir funkcinų panašumų.

Jau suformuota ir pastoviai atnaujinama baltymų sekų ir tretinių struktūrų duomenų bazė "Protein Data Bank" (PDB). Kiekvienas ištirtas baltymas turi savo PDB kodą (pvz.: 1ATJ, 3BHT ir kt.). Duomenų bazę galima rasti internete (<http://pdb.cryst.bbk.ac.uk>). Naudojantis išplėstine ar paprasta šios duomenų bazės paieškos sistemomis, galima atsisiųsti ieškomo baltymo kristalografinę struktūrą.

Baltymų, kaip ir daugelio kitų makromolekulių, 3D struktūros dažniausiai pateikiamos \*.ent arba \*.pdb bylose. Jose saugoma informacija apie aminorūgščių numeraciją, aminorūgščių atomų koordinatas Dekarto koordinatų sistemoje, kita papildoma informacija.

Bylų formatus galima peržiūrėti, redaguoti jų atvaizdavimą, atlikti analizę internete nemokamai platinamomis programomis. Naudojantis programomis, skirtomis baltymų 3D struktūrų peržiūrai/redagavimui, galima analizuoti baltymų 1-nes, 2-nes ir 3-nes struktūras, atstumus tarp aminorūgščių ar atomų,  $\alpha$  ir  $\beta$  struktūras ir t.t. Šie duomenys svarbūs tiriant baltymų tirpumą

skirtinguose tirpaluose, paviršiaus krūvį, aktyvaus centro atvirumą tirpikliui ir kitus erdvinius bei struktūrinius faktorius, lemiančius baltymų funkcijų termodinaminius aspektus.

#### DARBO PRIEMONĖS:

1. Personalinis kompiuteris
2. MSI WebLab ViewerLite programa
3. SWISS-PdbViewer programa
4. Baltymų 3D struktūros (.pdb bylos)

#### TYRIMO METODIKA

Darbe tiriama baltymų pirminė, antrinė, tretinė ir ketvirtinė struktūros. Nustatoma amino rūgščių sudėtis bei jų pasiskirstymas,  $\alpha$  ir  $\beta$  struktūrų dominavimas, prostetinių grupių buvimas, jų padėtis ir orientacija baltyme. Išskiriami būdingiausi baltymų struktūrų skirtumai. Tam naudojami nemokami programiniai paketai MSI WebLab ViewerLite ir SWISS-PdbViewer.

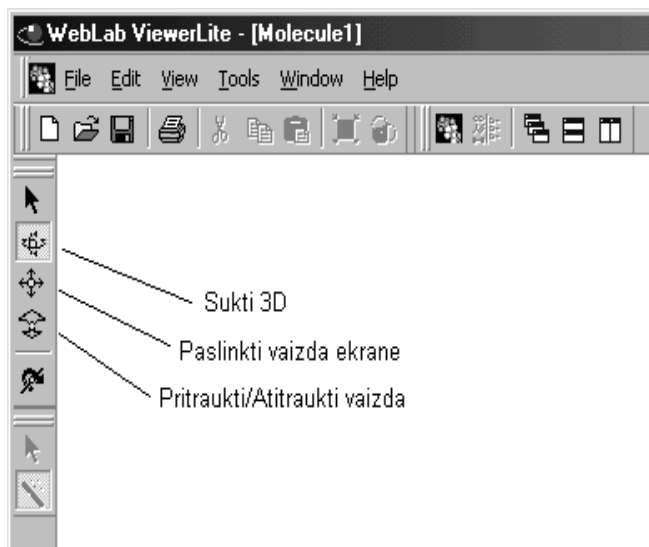
#### TYRIMO OBJEKTAI:

1. Hemoglobino 3D struktūra;
2. Porino 3D struktūra.


#### DARBO EIGA

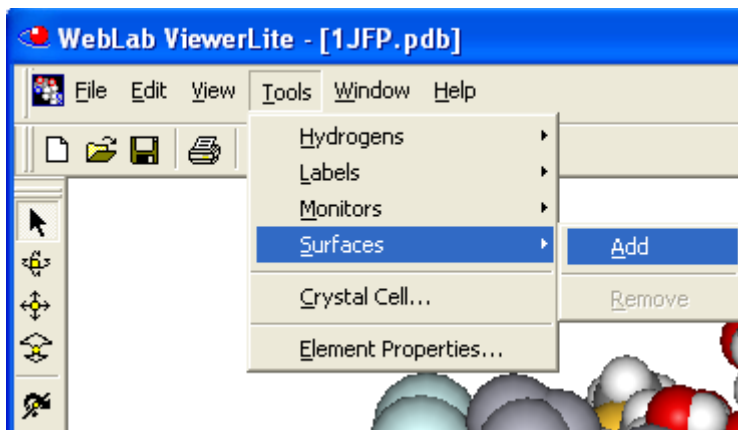
##### 1. Baltymų matmenų (apytiksliai) nustatymas.

Atsidarome MSI WebLab ViewerLite (toliau WebLab) programą (4 pav.) ir užkrauname pirmą nurodytą baltymą (*baltymų struktūras pateiks dėstytojas*). Atsiminkite, kad molekulių struktūra bus pavaizduota nerodant vandenilio atomų. Norint molekulės struktūrą matyti su vandenilio atomais, WebLab Meniu, esančiame programos lango viršuje, pasirenkame "Tools" → "Hydrogens" → "Add".



4 pav. MSI WebLab ViewerLite programos langas.

Spaudžiame F6 arba meniu, esančiame kairėje pasirenkame  ("Rotate (F6)"). Sukinėdami molekulės modelį, vizualiai išsirenkame vieną nuo kito labiausiai nutolusius atomus. Pažymime juos: nuspaudžiame "Shift" klavišą su pele pažymime atomus, tarp kurių matuosime atstumą. Pažymėti atomai nusidažo geltona spalva. WebLab valdymo panelėje išsirenkame "Tools" → "Monitors" → "Distance". Pažymėtus atomus susijungs linija, ant kurios bus pateiktas atstumas tarp jų angstromais ( $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$ ).



5 pav. MSI WebLab ViewerLite programos meniu.

Tokiu būdu surandame baltymo vizualų aukštį, plotį ir storį.

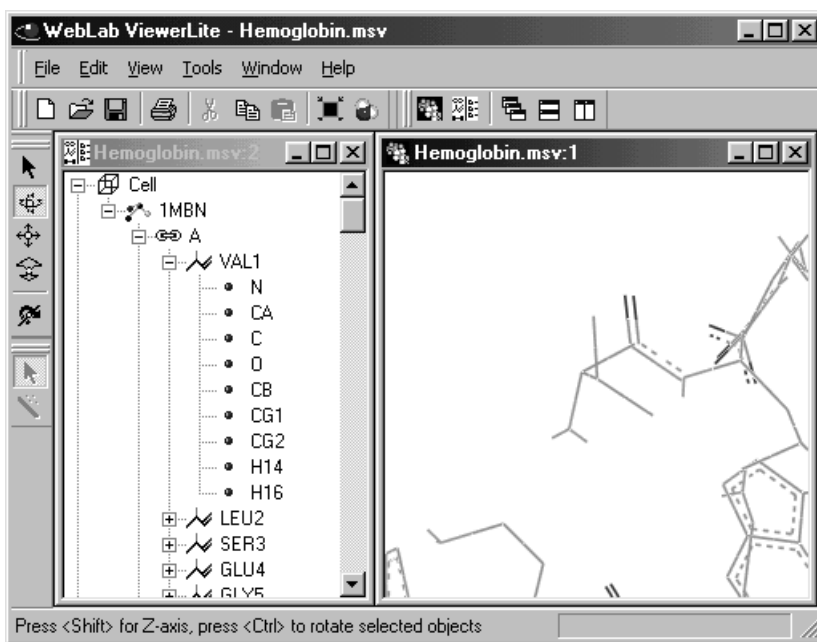
Neužmirškite, kad atstumas matuojamas tarp pasirinktų atomų centrų. Todėl realūs molekulės (šiuo atveju baltymo) išmatavimai bus truputį didesni. Tuo galite įsitikinti įsijungę baltymo molekulės paviršiaus vaizdavimą. Tam WebLab Meniu pasirenkame "Tools" → "Surfaces" → "Add" (5 pav.).

Atsižvelgę į atomų van der Waals-o spindulius, patikslinkite gautus baltymo matmenis (aukštį, plotį ir storį).

## 2. Baltymų amino rūgščių kiekio ir grandinių skaičiaus nustatymas.

WebLab valdymo panelėje atsidarome meniu "Window" → "New Hierarchy Window" arba klaviatūroje spaudžiame "Ctrl+H" (6 pav.).

Atidaromas naujas langas, su amino rūgščių specifikacija. Kiekviena atskira peptidinė grandis išsiskirs skirtinga antrašte, kurios sąraše bus sunumeruotos amino rūgščių liekanos. Amino rūgščių pavadinimai atitinka



6 pav. Amino rūgščių specifikacijos langas.

standartinę triraide amino rūgščių specifikaciją.

**Pastaba:** *Atkreipkite dėmesį į tai, kad į sąrašą gali būti įtrauktos ne tik amino rūgštys, bet ir kitos organinės ar neorganinės medžiagos.*

### 3. Baltymų prostetinių grupių identifikacija ir apibūdinimas.

Atidarytame hierarchiniame lange (2 punktas) šalia amino rūgščių specifikacijos yra pateiktos ir kitos į baltymo struktūrą įeinančios organinės bei neorganinės medžiagos. Jų pavadinimas paprastai nesutampa su amino rūgščių triraiziais pavadinimais, tuo išsiskirdamas iš jų. Kartais šios medžiagos apibūdinamos "HETATM" įrašu.

Išanalizuokite kiek ir kokių prostetinių grupių yra baltyme.

### 4. Baltymų $\alpha$ ir $\beta$ struktūrų nustatymas ir apibūdinimas.

WebLab lange, vaizduojančiame trimatę baltymo struktūrą, spaudžiame dešinį pelės klavišą. Naujame meniu išsirenkame "Display style". Lange atsiras kitas langas su skiltimis "Atom" ir "Protein". "Atom" skiltyje, "Display style" zonoje nustatome "Off" (*atomų ir jungčių struktūra nebus rodoma ekrane*). "Protein" skiltyje, zonoje "Display style" nustatome "Solid Ribbon" (*šioje vietoje nustatomas baltymo antrinės struktūros atvaizdavimo būdas*), o "Coloring" zonoje parenkame "Colored by" menu su "Secondary Type". Tada spaudžiame "OK". Baltymas bus atvaizduotas juosta, nuspalvinta pagal antrinės struktūros tipą.

« Įvertinkite  $\alpha$  spiralių ir  $\beta$  struktūrų skaičių. Paeksperimentuokite ir išsiaiškinkite kitas baltymo vaizdavimo galimybes. Pvz., pažymėkite hidrofobines sritis, paskui hidrofilines. Kuo skiriasi jų išsidėstymas?

### 4. Hemoglobino hemo grupės lokalizacijos nustatymas bei vandenilinių jungčių apibūdinimas.

Užkrauname hemoglobino struktūros bylą (Hemoglobin.msv). Įjungiamo vandenilinių jungčių vaizdavimą "Tools" → "Monitors" → "HBond". Randame hemo grupę.

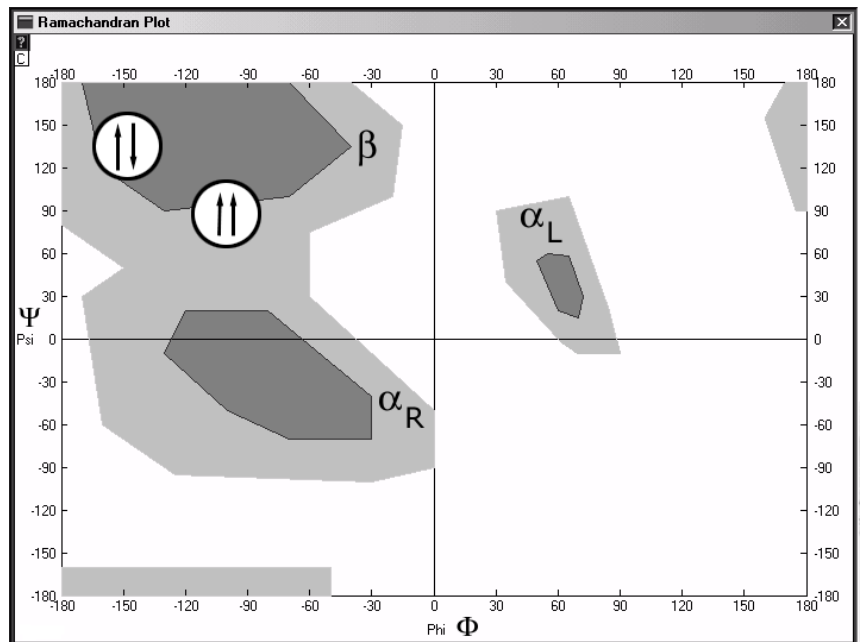
Kaip hemo grupė prisijungusi prie hemoglobino baltymo pagrindinės grandinės?

Suskaičiuoti vandenilines jungtis, kuriomis hemo grupė yra susijungusi su baltymo grandine. Tarp kokių atomų kiekviena iš šių jungčių yra susidariusi? Atomu žymėjimą spalvomis galite pasitikrinti per "Tools" → "Element properties". Pvz., deguonies atomai pažymėti raudonai, azoto - mėlynai ir t.t.

Pašalinkite deguonies atomą, prisijungusį prie hemo grupės. Kas pasikeitė?

## 5. Baltymų Ramačandrano diagramų palyginimas.

7 paveiksle pateikta bendra Račamandrano diagrama. Paleidžiame “Swiss PDB viewer” programą ir atsidarome baltymo bylą. Spaudžiame “Ctrl+A”, taip pažymėdami visas baltymo amino rūgštis. Atsidarome “Window” menu ir pasirenkame “Ramchandran Plot” (Ctrl+R). Naujai atsiradusiame lange (kaip 3.5 pav.), šalia apibendrintų kampų zonų, kurios reprezentuoja  $\alpha$  ir  $\beta$  struktūrų kampų pasiskirstymą, bus išsibarstę taškeliai, t.y. konkrečios baltymo amino rūgščių kampų vertės.



7 pav. Amino rūgščių specififikacijos langas.

« Aprašykite pagrindines baltymo  $\Phi$  ir  $\Psi$  kampų zonas. Aprašykite kampų zonas, kurios nepriklauso standartinėms zonoms, pateikite tose zonose labiausiai paplitusias amino rūgštis.

## 6. Baltymų struktūrinių skirtumų palyginimas.

« Palyginkite abiejų baltymų 1-5 punktuose surinktą informaciją. Palyginimą pateikite papunkčiui.

### **LITERATŪRA:**

- 1) Saulis G. Biofizika. Studijų medžiaga. - VDU, Kaunas, 2008. 191 p. (CD formatas)
- 2) M. Venslauskas, Biofizika. Kaunas: KMA. 1996.
- 3) M.B. Jackson, Molecular and Cellular Biophysics, Cambridge University Press, Cambridge, 2006. -512 p.