

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 0

Serie 1

Vážení přátelé biologie,

otevíráte první sérii zcela nového korespondenčního semináře zaměřeného na biologii, kterým bychom rádi zaplnili mezeru mezi korespondenčními semináři, kdy již téměř deset let se můžeme těšit korespondenčním seminářem chemickým a několik desetiletí semináři z fyziky a matematiky, avšak seminář, který by komplexně pokrýval biologickou tematiku, stále chybí.

Hlavním cílem našeho semináře je přinést Vám obraz skutečných problémů, které se řeší v biologii a projasnit Váš pohled na témata, která jsou v rámci středoškolské výuky předkládána neúplně či zamlženě. Naučíte se efektivně zpracovávat různé informační zdroje, mnohdy i cizojazyčné. Nabyté vědomosti jistě využijete, budete-li se zabývat přírodními vědami na vysoké škole, ale hodit se budou i pokud se budete účastnit naší či dokonce mezinárodní biologické olympiády. Navíc si můžete poměřit svoji „biologickou zdatnost“ s ostatními.

Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na internetové stránce Biozvěstu

<http://web.natur.cuni.cz/~vosolsob/krouzek/bios.html>, nebo zadejte „Biozvěst“ do Google. Nejdříve je třeba přihlásit se ke Google skupině „Řešitelé Biozvěstu“ Biozvest-resitele@googlegroups.com,

<https://groups.google.com/d/forum/biozvest-resitele>, vyplnit přihlášku a následné odesílání úloh se provádí prostřednictvím služby „Disk“ (dřívější „Dokumenty“) na Google.

Kdybyste měli jakýkoliv problém s uvedeným postupem, pošlete řešení na adresu biozvest@gmail.com.

V případě, že byste se ocitli bez internetu, můžete využít i klasickou poštu

Stanislav Vosolsobě
Katedra experimentální biologie rostlin
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Viničná 5
128 44 Praha 2

opravené řešení však dostanete naskenované e-mailem. Nelekejte se, když Vám přijdou úlohy na první pohled příliš těžké, ponořte se do informačních zdrojů a uvidíte, že na vše lze někde nalézt odpověď. Není nutné abyste vyřešili všechny úlohy, stačí odeslat libovolně velký fragment. Oceňujeme, pokud přiložíte jakékoliv připomínky (např. úloha byla příliš lehká/těžká, nesrozumitelná, nudná), úlohy se pokusíme tvořit k Vaší maximální spokojenosti.

Veškeré dotazy či připomínky směrujte na adresy biozvest@gmail.com či vosolsob@natur.cuni.cz

Uzávěrka 1. série proběhne v neděli 4.11.2012 o půlnoci.

Úlohy můžete vypracovat přímo do zadání jednotlivých úloh, které se objeví ve Vašich sdílených dokumentech. Hotovou úlohu pojmenujte

Ročník-Série-Úloha-Jméno_Příjmení,

např. **0-1-2-Bioslav_Biomilný** v případě druhé úlohy první

série aktuálního ročníku. Poslední Vámi provedená změna by měla být ze dne uzávěrky. Z technických důvodů ukládejte úlohu ve formátu .doc.

Neboť nelze systémově blokovat kooperaci mezi řešiteli a navíc kooperace je základem úspěchu při vědecké práci, akceptujeme i skupinově řešené úlohy, v názvu a hlavičce úlohy však vyjmenujte všechny řešitele a tito řešitelé mohou odevzdat dohromady pouze jednu úlohu, všem bude přičten identický počet bodů. Případné spoluautory mimo řešitelé semináře taktéž uvádějte do hlavičky úlohy.

V každé sérii se můžete těšit na dvě standardní úlohy, jednu praktickou a jednu naučnou, v tomto ročníku bude věnována bioinformatice.

Mnoho zdarů při řešení Vám za kolektiv autorů přeje

Stanislav Vosolsobě

Úloha 1: Slavníkovci

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 10

Kdyby v českém dávnověku nedošlo k vyvraždění rodu Slavníkovců Přemyslovci, ale k opačné události, nemuselo být hlavní české město v Praze, nýbrž v místě tehdejší tvrze Slavníkovců. Dnes se v její těsné blízkosti rozkládá významná národní přírodní rezervace.

- 1) Kdy, kde a za jakých okolností došlo ke genocidě Slavníkovců?
- 2) Jaká rezervace se zde rozkládá a co je předmětem ochrany?
- 3) Chráněný biotop je významným a velmi cenným fenoménem této části české krajiny. Jaké mohlo být jeho rozšíření v minulosti a jaké by bylo jeho přirozené rozšíření v české krajině (v hypotetické krajině bez vlivu člověka)?
- 4) Objasněte vznik tohoto biotopu v souvislosti s říční aktivitou.
- 5) Aktivita velkých řek se během čtvrtohorních cyklů významně mění, patrným důsledkem těchto cyklů je existence říčních teras. Popište a vysvětlete jak se liší aktivita řek v glaciálu a interglaciálu, jaký typ aktivity panuje současnosti a proč?
- 6) Z výše zmíněné rezervace byl popsán nový druh orchideje. O který druh se jedná, jaké je jeho rozšíření a jaký je hlavní znak, kterým se liší od příbuzných druhů rodu?
- 7) Uveďte nejvýznamnější zločiny na přírodě, které byly (či jsou) konány v této lokalitě.

Úloha 2: Typický experiment

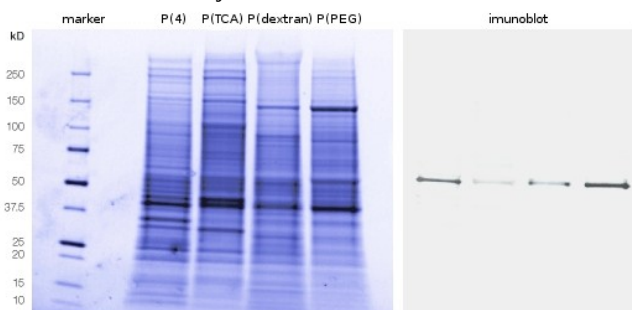
Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 20

Při hledání významu genu *X* v buňkách suspenzní kultury BY-2 jsme pátrali po vnitrobuněčné lokalizaci jím kódovaného proteinu *X*. Buňky suspenzní kultury jsme odfiltrovali od růstového media, zmrazili v tekutém dusíku a rozdrtili je ve třetí misce. Poté jsme k homogenisátu přidali pufr, který stabilizuje pH, upravuje osmotickou aktivitu a obsahuje inhibitory proteáz. Vše jsme centrifugovali 10 minut při 4 000 g za teploty 4°C. Na dně centrifugační kyvety se usadil pelet P₄ a nad ním zůstal supernatant S₄. Supernatant S₄

jsme přelili do nové kyvety a centrifugovali hodinu při 30 000 g při 4°C. Získali jsme frakce P₃₀ a S₃₀. K supernatantu S₃₀ jsme přidali trichloroctovou kyselinu (TCA), vznikl bílý precipitát P_{TCA}, který jsme oddělili od zbytku roztoku centrifugací. Pelet P₃₀ jsme důkladně resuspendovali ve fosfátovém pufru a navrstvili do kyvety nad vrstvy roztoků dextransu a polyethylenglykolu (PEG). Vše jsme důkladně promíchali a nechali přes noc stát při 4°C, kdy se obnovilo fázové rozhraní mezi roztoky dextransu a PEG. Obě fáze jsme druhý den naředili fosfátovým pufrům a podrobili centrifugaci (tentokrát 1 hodinu při 100 000 g a 4°C). Získali jsme pelety P_{dextran} a P_{PEG}.

Všechny čtyři získané pelety (P₄, P_{TCA}, P_{dextran}, P_{PEG}) jsme rozpustili za tepla v pufru s SDS a močovinou a provedli jsme proteinovou elektroforezu. Díky tomu, že jsme si předtím připravili protilátku proti našemu proteinu, mohli jsme provést po elektroforese western blot a detekovat, ve které frakci je náš protein obsažen. Výsledek elektroforezy a následné imunodetekce je na obrázku.



- 1) Co je kultura BY-2, z jakého organismu byla odvozena, za jakým účelem a k čemu se využívá dnes?
- 2) Proč se k homogenisátu přidávají inhibitory proteáz?
- 3) V jaké podobě se budou vyskytovat membránové organely po homogenisaci?
- 4) Popište princip centrifugace, které všechny parametry ovlivňují sedimentační rychlost částic?
- 5) Co vyjadřuje jednotka g a jak souvisí s rychlostí rotace, objasněte pojmy rcf a rpm.
- 6) Specifikujte složení peletu P₄ a supernatantu S₄ z hlediska organel, sacharidů, lipidů, proteinů a nukleových kyselin.
- 7) Stejným způsobem charakterisujte frakce P₃₀ a S₃₀.
- 8) Co se stalo po přidání TCA k S₃₀?
- 9) Za jakým účelem jsme prováděli extrakci P₃₀ systémem PEG-dextran, jaký je její princip a co obsahují frakce P_{dextran} a P_{PEG}?
- 10) Proč jsme celou dobu pracovali při 4°C?
- 11) Na základě výsledného obrázku stanovte, ve které části buňky se zkoumaný protein X vyskytuje. Zkuste objasnit, proč byl protein detekován ve více frakcích.

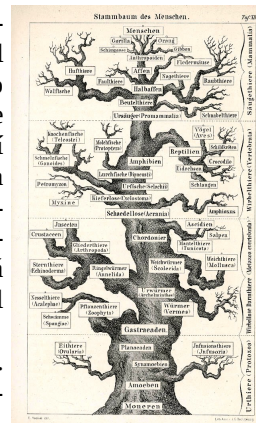
Úloha 3: Fylogenetika

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 10

Podobností mezi různými druhy organismů si lidé všimli od nepaměti. Už v Bibli jsou rozlišovány hlavní třídy organismů (rostliny, ryby, ptáci, savci,...) a zároveň již i tehdejší mudrci intuitivně vnímali hierarchie mezi různými skupinami dle komplexity jejich tělní stavby a vysvětlovali to stářím těchto skupin (tj. dobou stvoření). Biosféra si o podob-

nou hierarchisaci přímo žádá a podobný systém organismů vytvořil již Aristoteles a k dokonalosti ho dovedl Carl von Linné, přestože nebyl tehdy ještě vysloven základní postulát fylogenetiky - Darwinova evoluční teorie. Dle té jsou si zákonitě všechny organismy genealogicky příbuzné, z čehož vyplývá jejich podobnost a tudíž má smysl hledat strom jejich příbuznosti.



- 1) Který z velikánů biologie 19. století (a mimo jiné i významný inspirátor secese) prvně znázornil evoluci organismů v podobě statného stromu?
- 2) Nejstarší fylogenetické rekonstrukce byly často zakládány pouze na jednom znaku a mnohdy nebyly přesné. Proč se může mýlit strom založený na jednom znaku? Jak se nazývají situace, kdy jsou si organismy v konkrétním znaku podobné, ale přesto si nejsou příbuzné?
- 3) Až po polovině 20. století se fylogenetika stává objektivní vědou a předchozí systémy vytvářené dle intuice a letitých zkušeností taxonomů mohou být kriticky a hodnoceny. Nový progresivní proud se nazývá kladistika. Kdo byl zakladatelem kladistiky?
- 4) Jaké jsou požadavky na znaky používané při rekonstrukci fylogeneze - objasněte termíny „homologický znak“, „ancestrální“, „odvozený“ a „outgroup“.
- 5) Jak se vypořádává kladistika při rekonstrukci fylogeneze se základním problémem uvedeným v otázce 2?
- 6) Příbuznost je z podobnosti vyvozována dle kritéria maximální parsimonie. Popište tento princip. (Inspirace k úvahám na dlouhé zimní večery: musí tento princip vždy reflektovat realitu, nebo může evoluce probíhat i jinak?)
- 7) Co znamená „parsimonně informativní znak“? Skutečnou tvorbu stromu si vyzkoušíte v následující úloze.

Úloha 4: Fylogenetika v praxi I

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 10

Nyní si budete moci vyzkoušet rekonstrukci fylogeneze na vlastní kůži. Vyberte si optimálně deset druhů, rostlin, hub či zvířat (nemusíte je určovat), nasbírejte je a pokuste se na nich najít co možná největší množství znaků, které by měly splňovat podmínku homologičnosti a být parsimonně informativní. Znaky vyplňte do tabulky tohoto typu:

Druh	květy modré	květy červené	chlupy na listu	chlup trojčipý	chlup jednoduchý	barva květů (špatně!!!)
A	1	0	1	1	0	modrá
B	1	0	1	0	1	modrá
C	0	1	1	0	1	červená
D	0	0	1	1	0	zelená
E	0	1	0	0	0	červená

Vždy používejte binární kódování znaků (0/1). Všimněte si, jakým způsobem jsou kódovány znaky o barvě - nesprávná forma je v poslední, sloupečku. Proč jsme nezavedli sloupeček „barva květů zelená“? Dále nezapomeňte přidat do tabulky druh, který bude sloužit jako outgroup. Výrobě stromu z dat se budeme věnovat v příští sérii.

Úloha 5: Databáze

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 8

Nejcharakterističtější rysem současné biologie je kumulace obrovského množství informací, například dat ze sekvenčních projektů, dat o rozšíření organismů či konečných vědeckých článků. Veliký rozvoj biologie je podmíněn skutečností, že většina dat je volně sdílena prostřednictvím internetových databází. U sekvenčních dat je zveřejňování podmínkou, pokud chtějí autoři publikovat vědeckou práci založenou na těchto datech. Vědecké práce jsou buď volně přístupné nebo zpoplatněné, vždy je však zveřejněn minimálně jejich abstrakt. Databáze mohou být taktéž zpoplatněny (např. k ústřední databázi vědeckých prací „Web of Science“ se dostanete pouze v institucích, které ji mají předplacenou), velké množství databází je však zdarma a veřejná dostupnost dat o genetických sekvencích umožňuje, že takřka kdokoliv se může z domova věnovat bioinformatickému výzkumu na nejvyšší úrovni, i Vy. Jak se to dělá, Vám naznačíme v následujícím seriálu.

The screenshot shows the NCBI search results for the query 'actin'. The search was performed across multiple databases, including PubMed, GenBank, and UniProt. The results are displayed in a grid format, showing the number of records found in each database. For example, PubMed has 85685 records, GenBank has 1261, and UniProt has 1102. The interface also includes filters for 'All Databases', 'Human Genome', and 'GenBank'.

Nejvíce zajímavých informací se skrývá v databázi amerického Národního centra pro biotechnologické informace (www.ncbi.nlm.nih.gov, do Google stačí zadat „ncbi“). Naleznete zde rozbalovací nabídku „All database“ a vyhledávací okénko. Při výchozím nastavení vyhledáváte ze všech integrovaných databází, můžete však specifikovat, např. hledání proteinů, knih a pod. Zkusíme zadat název „actin“ a zjistit, co je v databázích o tomto cytoskeletálním proteinu (první obrázek).

The screenshot shows the search results for 'actin' in the NCBI database. The results are displayed in a list format, showing the number of records found in each database. For example, PubMed has 85685 records, GenBank has 1261, and UniProt has 1102. The interface also includes filters for 'All Databases', 'Human Genome', and 'GenBank'. The search results are sorted by 'Default order' and show 1 to 20 of 182306 results. The first result is 'actin 5C, isoform C [Drosophila melanogaster]' with a 376 aa protein. The second result is 'actin 5C, isoform D [Drosophila melanogaster]' with a 376 aa protein. The third result is 'actin 5C, isoform B [Drosophila melanogaster]' with a 376 aa protein. The fourth result is 'actin 5C, isoform A [Drosophila melanogaster]' with a 376 aa protein. The interface also includes a 'Filter your results' section with a dropdown menu set to 'All (182306)' and a 'Top Organisms' section with a tree view showing various organisms like Escherichia coli, Homo sapiens, and Mus musculus.

V horním rámečku je soupis dostupných literárních pramenů – PubMed a on-line knih o aktinu, v dolním rámečku jsou shromážděny výsledky z prohledávání databází genových sekvencí (Nucleotide), sekvenovaných fragmentů ex-

primovaných mRNA (EST), proteinů a dalších.

Klikneme-li například do sekce „Protein“, objeví se nám veškeré anotované proteiny s názvem „actin“ (druhý obrázek). Výběr můžete omezit dle taxonomického soupisu na pravé straně. Pokud například omezíte výpis jen na *Arabidopsis*, zjistíte, že je v genomu několik různých homologů genu, actin-1 až actin-12. Pokud klikneme např. na actin-12, otevře se nám podrobný výpis, kde na konci spatříme vlastní sekvenci proteinu:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEE78168.1>). Pro další práci se sekvencí klikneme na odkaz „FASTA“ (třetí

The screenshot shows the NCBI protein page for actin-12 [Arabidopsis thaliana]. The page displays the protein's name, GenBank accession number (AEE78168.1), and a link to the FASTA format. The FASTA format sequence is shown as follows:

```
>gi|332644647|gb|AEE78168.1| actin-12 [Arabidopsis thaliana]
MADGEDIQLVCDNGTMVKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHTGVMVGMQKDAYVGDQAQSKRGILTLK
YP I E H G I V N N W D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E F N T P A M Y V A I Q A
V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G V A L P H A I L R D L A G R D I T D H L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I
V R D M K E K L S Y I A L D Y Q E L E T S K T S S S V E K S F E L P D Q G V I T I G A E R F R C P E V L F Q P S I M I G E M N P G I H E T T
Y N S I M K C D V D I R K D L Y G N I V L S G G T M F G G I G R M S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S
L S T F Q Q M W I A K A E Y D E S G P S I V H R K C F
```

obrázek) a získáme sekvenční data v nejpoužívanějším formátu fasta, který je tvořen hlavičkou s názvem začínajícím znakem „>“ a na dalších řádcích je vlastní sekvence:

```
>gi|332644647|gb|AEE78168.1| actin-12 [Arabidopsis thaliana]
MADGEDIQLVCDNGTMVKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHTGVMVGMQKDAYVGDQAQSKRGILTLK
YP I E H G I V N N W D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E F N T P A M Y V A I Q A
V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G V A L P H A I L R D L A G R D I T D H L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I
V R D M K E K L S Y I A L D Y Q E L E T S K T S S S V E K S F E L P D Q G V I T I G A E R F R C P E V L F Q P S I M I G E M N P G I H E T T
Y N S I M K C D V D I R K D L Y G N I V L S G G T M F G G I G R M S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S
L S T F Q Q M W I A K A E Y D E S G P S I V H R K C F
```

Sekvenci v tomto formátu si zkopírujeme do poznámkového bloku a můžeme přidat další sekvence oddělené volným řádkem. Soubor sekvencí uložíme a příponu .txt přepíšeme na .fst, aby bylo jasné, že se jedná o sekvence (stále je však soubor otevíratelný v poznámkovém bloku).

Pro pohodlnou práci se sekvencemi ve formátu fasta je dobré nainstalovat si některý vhodný program, např. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), ve kterém uvidíme jednotlivé aminokyseliny či nukleotidy barevně zvýrazněny. Program disponuje velkou řadou funkcí, jejichž použití si ukážeme přístě.

The screenshot shows the BioEdit Sequence Alignment Editor interface. The window displays a multiple sequence alignment of actin protein variants. The sequences are color-coded by amino acid type: red for basic, green for acidic, blue for hydrophobic, and yellow for polar. The alignment shows the following sequences:

```
sars          S G F R K M A F P S G K V E G C M V Q V T C G T T I L N G L W L D D T V Y C P R V I C T A E D M L H P H Y E D L L I R K S
lp9uF        S G L R K M A Q P S G L V E P C I V R V Y G N H V L N G L W L G D V E I C P R H V I A S D T T R V - I H Y E N E M S S V R
HumanCoV229e S G L R K M A Q P S G F V E K V R V Y G Y G N V L N G L W L G D V E I C P R H V I A S D T T R V - I H Y E N E M S S V R
Feline IPV   S G L R K M A Q P S G V E K C I V R V Y G N V L N G L W L G D V E I C P R H V I A S D T T R V - I H Y E N E M S S V R
Porcine EDV  S G L R K M A Q P S G V E K C I V R V Y G N M A L N G L W L G D V I M C P R H V I A S S T T S T - I D Y D A L S V L R
Murine HV    S G I V K M V S P T S K V E P C I V S V T Y G N M I L N G L W L D D K V Y C P R H V I C S A D M T D P D Y P N L L C R V T
Bovine CoV   S G I V K M V N P T S K V E P C I V S V T Y G N M I L N G L W L D D K V Y C P R H V I C S A D M T D P D Y P N L L C R V T
Avian IBV    S G F K L V S P S A V E K C I V S V Y R G N H L N G L W L G D T T Y C P R H V L K F S G D Q - - - W D V L N L A N
```

A nyní si vyzkoušíte práci s databází sami. Zaměříme se na protein keratin, který je jedním ze základních stavebních prvků živočišného organismu.

- 1) Například na anglické Wikipedii si prostudujte, jaké bohatství typů keratinu se vyskytuje v lidském těle.
- 2) Vyhledejte pro každou skupinu lidských keratinů některý z proteinů v databázi ncbi a uložte si sekvence ve formátu fasta. Obsah souboru zkopírujte do řešení úlohy.
- 3) Porovnejte, jak výrazně se jednotlivé proteiny, které vznikly prapůvodně z jediného předka, liší.

