

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 7

Série 3

Milé řešitelky, milí řešitelé,

venku už je předjaří v plném proudu a s ním nastává i druhá polovina letošního ročníku Biozvěstu. V úlohách třetí série se můžete těšit na rostliny, bezobratlé i obratlovce, chybět nebude ani exkurz do historie – tentokrát věnovaný důležitému milníku molekulární biologie. Doufáme, že praktická úloha pro vás bude povzbuzením vyjít z budov ven a sledovat jarní proměny přírody opravdu zblízka.

A s nadcházejícím se jarem se blíží také letošní Expedice Biozvěstu – letos v termínu 29. 5. – 3. 6. 2020. Letos bude naší základnou [chalupa Padouchov](#). Těšit se tedy můžete na Ještědský hřeben a jeho okolí, chalupa samotná pak leží přímo na okraji Nového pralesa – místa, kde díky drobným dárčům dochází k proměně bývalé smrkové monokultury v přírodní les, který se snad časem stane pralesem. Expedici budete mít jako odměnu za aktivní řešení všech sérií Biozvěstu zadarmo.

A kdo už plánuje svůj program na prázdniny, nezapomeňte, že z biologických akcí je tu také [Letní Arachne](#) – přihlašování již probíhá.

Jak řešit

Veškeré pokyny k řešení semináře získáte na [internetové stránce Biozvěstu](#) (nebo zadejte „Biozvěst“ do Google). Na stránce také naleznete přihlášku, kterou vyplíte (pouze v případě, že je tato série vaše první řešení v rámci aktuálního ročníku; přidat se můžete kdykoli v průběhu roku). Úlohy vám budeme zasílat automaticky na e-mailovou adresu uvedenou v přihlášce. Pokud budete chtít ukončit odběr novinek o Biozvěstu, napište nám e-mail.

Dále se k nám můžete připojit prostřednictvím [Facebooku](#), [skupina „Biozvěst“](#), kde lze probírat aktuality a diskutovat dle libosti.

Vaše řešení nám posílejte na adresu biozvest@gmail.com

Nejpraktičtější formou řešení bude prostý text v e-mailu, ale přijímáme veškeré formáty příloh. Každou úlohu pište do samostatného e-mailu a v předmětu uveďte

Ročník-Série-Úloha-Jméno_Příjmení,

např. 7-3-5-Bioslav_Biomilný v případě páté úlohy třetí série aktuálního ročníku. Moc nám pomůže, když uvedený zápis dodržíte (na jeho základě si došlá řešení filtrujeme).

Uzávěrka 3. série: pondělí 30. 3. 2020 o půlnoci.

Vyhodnocení vašich řešení dostanete 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. Dobré tipy k řešení naleznete také na stránce Biozvěstu v sekci „Návody“. Není nutné, abyste kompletně vyřešili všechny úlohy a asi se to ani nikomu nepodaří, stačí odeslat libovolně velký fragment. Vždy ale odpovídejte svými slovy; překopírování textu odjinud je velmi ošemetné. Když už se k němu uchýlíte, vždy uveďte zdroj.

Oceníme, pokud připišete jakékoliv nápady či 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 simonova.jasna@gmail.com (na druhé adrese máte větší šanci na rychlé zodpovězení otázky), nebo na e-mailové adresy autorů konkrétních úloh. Kontakty naleznete na webu Biozvěstu.

Biodiverzitě a řešení Biozvěstu zdar!

Jasna Simonová & kolektiv autorů

Úloha 1: Rostlina jako (ne)dobytná pevnost

Autor: Marek Kasner

Počet bodů: 17

Rostliny jakožto přisedlé (tzv. sesilní) organismy se potýkají s různými problémy, které představují mimo jiné i ostatní organismy snažící se využít jejich těla. Pokud rostlina neobsahuje různé jedovaté látky, případně nemá trny a jiné ochranné morfologické struktury, mohli bychom ji milně považovat za bezbrannou. Pokud jste herbivor, tak máte možná pravdu. Pokud jste ale patogen a snažíte se dostat dovnitř rostlinných pletiv a buněk, tak vězte, že vás čeká nesnadná cesta. Rostlina se dokáže bránit dost urputně a při boji proti cizím uchvatitelům neváhá jít přes mrtvoly.

1. Abychom si lépe představili, jak se rostliny brání proti patogenům, je dobré si uvědomit, že se jejich obrana v určitých aspektech liší od imunitního systému např. nás lidí (obratlovců). Jaké jsou tedy tyto zásadní obecné rozdíly imunitních systémů? Zaměřte se hlavně na to, jaké buňky jsou v obraně rostliny nebo vaší obratlovčí imunity zahrnuté a jakými nástroji se brání. Zkuste imunitní buňky obratlovce porovnat s typickou rostlinnou buňkou. Zamyslete se, jestli si váš imunitní systém poradí lépe s již prodělanou chorobou a jak tomu může být u rostliny. Jmenujte alespoň dva rozdíly.
2. Patogenů existuje nespočetné množství druhů a můžeme s velkou pravděpodobností prohlásit, že každý rostlinný druh je napadán minimálně jedním druhem patogenu.
 - a. Jak byste definovali patogen?
 - b. Z jakých vyšších taxonomických skupin (doména, říše, popřípadě třídy, nebo nebuněčné skupiny) většinou patogeny rostlin pocházejí? Jmenujte alespoň čtyři a u každého uveďte příklad jednoho zástupce (druhu nebo rodu).
3. Nyní již víme, co rostlinu může potenciálně napadnout. Většina skupin využívá pro vniknutí do rostlinných buněk a pletiv specializované struktury. Jedna skupina (taxonomické kategorie jako v předchozí otázce) se ale do rostlinných buněk sama o sobě dostat neumí.
 - a. O jakou skupinu patogenů se jedná a proč nemohou do rostlinné buňky z vnějšího prostředí vniknout samostatně?
 - b. Jak tedy do buněk pronikají? Popište alespoň jeden způsob.
4. První obrannou linií rostliny je mechanická bariéra na povrchu pokožkové (epidermální) vrstvy.
 - a. O jaké dvě struktury těchto buněk se jedná především?
 - b. Jaká látka, která je nejvíce v jedné z těchto struktur zastoupena, zaručuje rostlinným buňkám pevnost?
 - c. Existuje nějaké místo, kterým je možno tuto obranu obejít a dostat se přes epidermis hned do hlubších vrstev pletiv?
5. Při pokračování v cestě za živinovým bohatstvím skrytým v buňkách musí patogen nejdříve interagovat s cytoplazmatickou membránou buňky. Ta ale pomocí různých receptorů rozpoznává jako otisky prstů molekuly specifické pro různé patogenní organismy. Těmito charakteristickým molekulárním strukturám se říká obecně PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns). Po rozpoznání se spustí různé ochranné reakce. Popište, na základě přítomnosti které látky (PAMP) by rostlina mohla poznat, že se jedná o houbový patogen. Jakou látku by v obranné reakci konkrétně proti němu použila (při obranné reakci dojde mj. i k zesílení buněčné stěny rostliny).

6. Chránit se dříve, než se něco stane, se na první pohled může jevit jako výhodné. Štěstí přeci přeje připraveným. Nebo ne? Zkuste zdůvodnit, proč rostlina neprodukuje ochranné látky dřív, než patogen začne vnikat do buňky. Napište alespoň jeden důvod. Mohlo by vám pomoci si zjistit, co se v takové buňce vlastně po vniku patogenu děje.
7. V přírodě se často setkáváme s následujícím jevem, který ale bez určitých znalostí bývá špatně vysvětlován. I když níže popsané okem pozorovatelné symptomy mohou být zaměnitelné za jiná vysvětlení a laboratorní vybavení na chemický rozbor s sebou nosí málokdo, z následujícího popisu byste měli na řešení přijít. V přírodě ale i pouhé pozorování takového jevu většinou prozradí stejný příběh. Na listech se objevily zaschlé oblasti, které jsou nepravidelně rozmístěny na listu. Po rozboru jiného listu této rostliny bylo zjištěno zvýšené množství kyseliny salicylové, ale jinak se rostlina jeví jako zdravá a bez známek infekce jakýmkoliv patogenem. Co se v rostlině odehrálo? Jedná se o dva specifické jevy. Vysvětlete a konkrétně pojmenujte popsané jevy a jejich důsledky.
8. Velmi zajímavá je čeleď Petaluridae s nejasným taxonomickým postavením, jejíž zástupci patří k největším vážkám na světě. Čím jsou unikátní jejich larvy?
9. Ještě v roce 2007 nám byla vážka *Trithemis kirbyi* nejbližší známá ze severní Afriky. V několika následujících letech ovšem rychle expandovala na sever. V současné době tvoří ve Španělsku souvislou populaci od jihu až k Pyrenejím, v roce 2018 byly jednotlivé nálezy hlášeny dokonce neda-leko Lyonu (střední Francie). Podobně expandují na sever i další druhy, třeba šídlo hnědé (*Anax ephippiger*) nebo vážka červená (*Crocothemis erythraea*).
 - a. Co může být příčinou takto rychlých expanzí?
 - b. Jaké vlastnosti vážek takové expanze umožňují?

Úloha 2: Na vážkách

Autor: Vojtěch Waldhauser

Počet bodů: 14

Vážky (Insecta: Odonata) jsou starobylý řád hmyzu. Pohybuje se na naší planetě téměř 300 milionů let, tedy od období permu, příbuzné řády se objevily již v karbonu. Na světě žije téměř 5000 druhů vážek. To se může zdát jako vysoké číslo, oproti některým jiným hmyzím řádům, jako jsou motýli či brouci, to je ale jen zlomek. Navzdory tomu jsou díky své velikosti a pestrým barvám často objektem zájmu profesionálních i amatérských fotografů a entomologů.

1. Vážky jsou často ochránářsky významné organismy, některé patří mezi tzv. deštníkové druhy. Co to znamená? A jaké druhy vážek, žijící v ČR, mezi ně patří?
2. Morfologicky a velikostně jsou vážky opravdu rozmanité, najdeme mezi nimi jak obry, tak trpaslíky. Uveďte největšího a nejmenšího zástupce vážek v ČR.
3. Partenogeneze není u hmyzu neobvyklá, v rámci řádu Odonata se takto ale rozmnožuje jediný druh.
 - a. Který to je?
 - b. Čím je u tohoto druhu unikátní stavba křídla?
4. Abychom mohli vážky studovat, musíme se naučit dobře rozeznávat jednotlivé druhy. To u nich jde, v porovnání s ostatními řády hmyzu, poměrně snadno. Pokuste se s využitím libovolných znaků sestavit jednoduchý určovací klíč k samcům našich klínatek, tedy zástupcům čeledi Gomphidae. Najdete je na obrázcích 1–4. Veškeré potřebné znaky jsou na fotografiích viditelné, přesto doporučuji pro lepší představu využít internet.
5. U klínatek ještě zůstaneme, často totiž mají velmi pozoruhodné larvy. Na obrázcích 5–7 najdete larvy tří druhů klínatek obývajících řeky v Namibii. Každá z nich disponuje jinou životní strategií: sprawlers („povaleči“, žijí mezi kameny), shallow burrowers (zahrabávají se do mělkých sedimentů) a deep burrowers (zahrabávají se hluboko do sedimentu). Na základě obrázků 5–7 se pokuste každé larvě přiřadit její životní strategii a vysvětlit, jak jí její morfotyp v dané níce pomáhá.



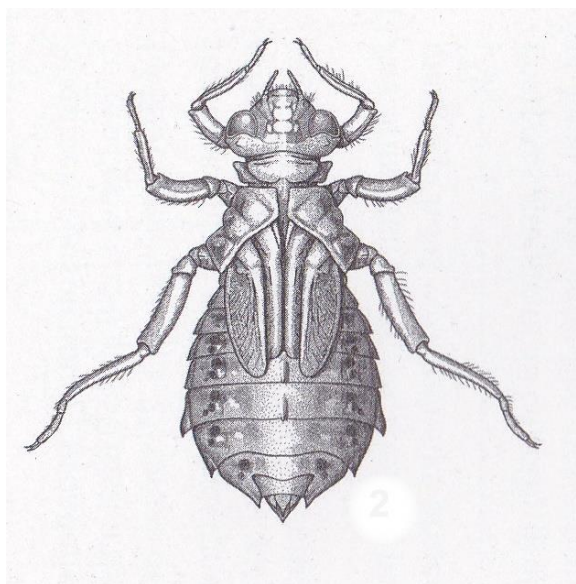
Obr. 1: Klínatka obecná (*Gomphus vulgatissimus*), foto autor



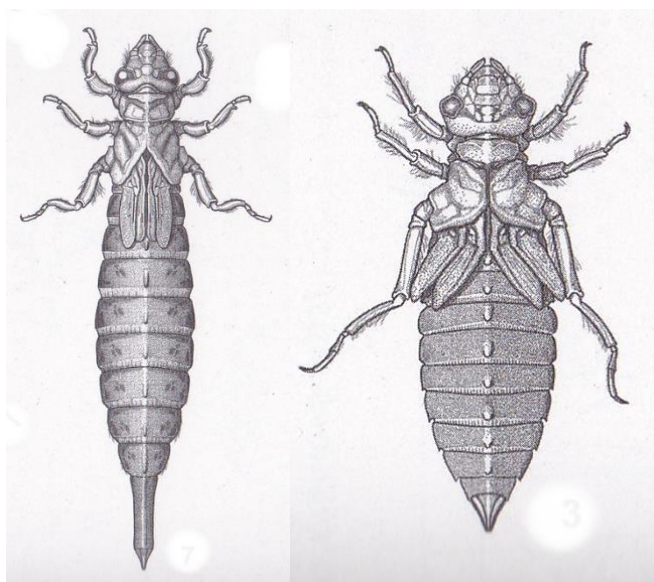
Obr. 2: Klínatka vidlitá (*Onychogomphus forcipatus*), foto autor



Obr. 3: Klínatka rohatá (*Ophiogomphus cecilia*), foto autor

Obr. 4: Klínatka žlutohřbetá (*Stylurus flavipes*), foto Martin Waldhauser

Obr. 5: Larva klínatky, kresba Ole Müller



Obr. 6 a 7: Larvy klínatky, kresba Ole Müller

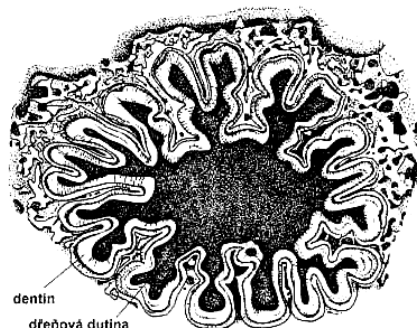
Úloha 3: Prastaří obojživelníci

Autor: Jakub Vácha

Počet bodů: 13

Obojživelníci jsou bezesporu krásní a fascinující tvorové. Z nepochopitelného důvodu ale stále většina populace preferuje při výběru domácího mazlíčka křečku nebo kočku. Mnohem větší pochopení pro obojživelníky naštěstí mají evoluční biologové, zabývající se obratlovci. Abychom se jim však i my dostali na zoubek, musíme se podívat na ty nejstarší, pochopitelně už zkamenělé.

1. Jak název napovídá, recentní obojživelníci žijí část života ve vodě a část na souši, ale ne vždy tomu tak bylo. S největší pravděpodobností se obojživelníci vyvinuli z vějířoploutvých (*Rhipidistia*). Které dva žijící druhy patří mezi nejbližší příbuzné této skupiny?
2. Důvodů, proč se vědci domnívají, že se obojživelníci vyvinuli právě z vějířoploutvých, je celá řada. Jedním z nich je přítomnost neobvyklého znaku zobrazeného na obr. 8. Jak se tato struktura jmenuje?

Obr. 8: Znak přítomný u *Rhipidist*. Převzato ze Schultz (1970).

3. V jakém prostředí (ekosystému) a kdy žili první obojživelníci a jejich přímí předci?
4. Pokuste se zamyslet nad tím, jaké byly hlavní důvody přechodu některých vějířoploutvých na souš, své odpovědi co nejpodrobněji vysvětlete.
5. V okolí městečka Boskovice, nedaleko od Brna, paleontologové už řadu let zkoumají zajímavé obojživelníky patřící do skupiny *Seymouriamorpha*, která je uvažována jako jedna z možných linií vedoucích k plazům.
 - a. Jaký rod živočichů paleontologové nacházejí v okolí Boskovic?
 - b. U nálezů tohoto rodu však máme drobný problém týkající se vývojových stádií. O jaký problém se jedná? Uveďte i zdroj, ze kterého jste čerpali.
6. Podle některých názorů žili živočichové, o kterých jste se dozvěděli v otázce 5.a, podobným způsobem života jako další, současně žijící, obojživelník. Zmíněný recentní obojživelník má své jméno odvozené od aztéckého božstva vyobrazovaného jako psa. Tento bůh bývá označován jako strážce slunce, bůh noční oblohy, dvojčat, podivností, monster a bývá spojován i s blesky a smrtí. Překvapivé je, že i přes spojení tohoto obojživelníka s bohy Aztékové tento druh běžně pojídali. Aktuálně je tento živočich chráněn.
 - a. Jak se správně (česky i latinsky, pozor na velká písmena a kurzívu) jmenuje recentní obojživelník popsáný v úvodu otázky?
 - b. Jakou zvláštnost ve vývoji naprosté většiny jedinců tohoto druhu můžeme pozorovat?
 - c. Myslíte si, že přítomnost tohoto fenoménu u živočichů z otázky 5.a by mohla být řešením záhady z otázky 5.b? Svou odpověď zdůvodněte.

7. V průběhu historie Země území České republiky díky kontinentálnímu driftu porůznu cestovalo a v různých obdobích se tedy nacházelo v různých klimatických pásmech. Dokonce jsme slepení z několika kusů, jeden z nich například patřil možná k Africe. Jaké podnebí a ekosystémy u nás podle vás byly ve spodním permu, když se tu plazilo zvířátko z úlohy 5? Uveďte zdroje, ze kterých vycházíte (bez uvedeného zdroje nebude odpověď uznána).

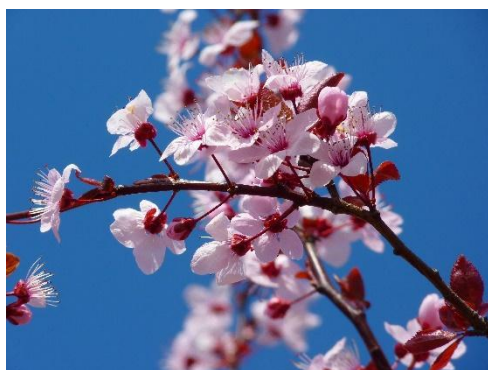
Úloha 4 (experimentální): Ty kytky ale blázní! (fenologické pozorování)

Autor: Jasna Simonová

Počet bodů: 30

Přestože jaro začíná oficiálně až 20. března, některé rostliny začínají rašit mnohem dříve. Zvláště v posledních letech, kdy teploty neklesají příliš pod nulu, můžeme někdy ve městech pozorovat rozkvetlé stromy téměř kdykoli v průběhu zimy. Přestože máme tendenci spojovat si takovéto anomálie především s probíhající klimatickou změnou, záznamy o podobných klimatických extrémech máme v prostředí českých zemí i z celého minulého tisíciletí. Pojďme se na načasování rašení rostlin v našem okolí podívat podrobněji.

Tomu, kdy se rostliny (i živočichové) „rozhodnou“, že nastal ten správný čas probudit se ze zimního spánku, vyrašit, rozkvést či rozmnožovat, se věnuje fenologie. Tedy podle definice *nauka o časovém průběhu významných životních projevů organismů v závislosti na komplexu podmínek vnějšího prostředí, zejména na počasí a klimatu* (Meteorologický slovník). A těmi významnými životními projevy (takzvanými fenologickými fázemi či fenofázemi) může být právě rašení, kvetení, zrání plodů či opadávání listů (obr. 9 a 10). V naší úloze se zaměříme na fenologické fáze rostlin. Praktickou část úlohy zpracujte pomocí protokolu, vzorový protokol najdete na [webových stránkách Biozvěstu](#).



Obr. 9: Květ třešně. LoggaWiggler, Wiki Commons.

1. Fenologie se věnuje tomu, kdy je z hlediska rostlin ten „pravý čas“. Ale podle čeho rostliny mohou poznat, že „pravý čas“ nastal? Na jaké prostorové škále se projevují faktory prostředí, které rostliny vyhodnocují (tj. je daný faktor jiný pro různé strany jednoho stromu či v zásadě stejný pro celou republiku)?
2. Jakými konkrétními mechanismy rostliny tyto faktory prostředí vnímají?
3. Co je to *suma efektivních teplot*? Jak souvisí s načasováním fenologických fází?
4. Proč některé rostliny kvetou dříve, než jim začnou rašit listy? Uveďte příklad.

5. Vyberte si pět stanovišť, na kterých budete provádět fenologické pozorování – sledovat, kdy vámi vybrané rostliny vstoupí do jednotlivých fenofází. Stanoviště by pro vás měla být dobře dostupná – bude třeba je pozorovat dvakrát týdně (v přiměřeném časovém rozestupu). Na stanovišti musí především růst vhodné druhy rostlin. Vyberte si stanoviště tak, abyste na nich rostly alespoň dva druhy rostlin, které jsou sledované na webovém portálu [Fenologické fáze](#) a zároveň sledované druhy rostlin zvolte tak, abyste alespoň na třech stanovištích pozorovali stejný druh rostliny. Na každém stanovišti pozorujte alespoň dva druhy rostlin, od každého druhu rostliny alespoň dva jedince. K pozorování jsou jednodušší dřeviny a zejména stromy, může být však zajímavé pozorovat i některé byliny. Pozorované jedince rostlin si označte – například barevným provázkem/bavlnkou.
6. Vyberte si nejdůležitější faktory prostředí, které podle vás ovlivňují načasování fenofází rostlin na vašich stanovištích. Pro každé stanoviště popište faktory, které se v čase nemění. Zamyslete se, jak by bylo nejvhodnější měřit faktory, které se v čase mění. Podle možností měření je samozřejmě také vhodné určit polohu stanovišť. Můžete využít data Českého hydrometeorologického ústavu ([portal.chmi.cz](#)) či projektu Intersucho ([www.intersucho.cz](#)). Data ohledně proměnlivých faktorů měřte nebo zaznamenávejte ve vhodné frekvenci v průběhu celého pozorování.
7. Stanoviště pravidelně navštěvujte dvakrát týdně po dobu čtyř týdnů. Zaznamenávejte fenofáze podle popisů uvedených na portálu Fenologické fáze. Období před rašením pupenů označte jako dormanci. Svá pozorování vhodně zdokumentujte. Popište vybraná stanoviště, jejich polohu a zjištěné faktory prostředí, které průběh fenofází podle vás ovlivňují. Popis stanovišť je vhodné doplnit fotografiemi. Pozorování časového průběhu fenofází zaznamenejte do tabulky.
8. Podařilo se vám vybrat vhodné faktory prostředí, podle kterých rostliny poznají, „že už je čas“? Pokuste se pomocí sledovaných faktorů vysvětlit rozdíly mezi stanovišti (a především mezi stejným druhem rostliny na více stanovištích). Jaké rozdíly jsou mezi průběhem fenofází u různých druhů rostlin? Průběh vámi zaznamenaných fenofází také můžete porovnat s výsledky z jiných částí republiky dostupných na webovém portálu Fenologické fáze.



Obr. 10: Květy lísky obecné (*Corylanus avellana*). Antti Bilund, Wiki Commons.

Úloha 5 (seriálová): Dixitque physicus, fiat lux et facta est lux

Autor: Václav Bočan

Počet bodů: 28

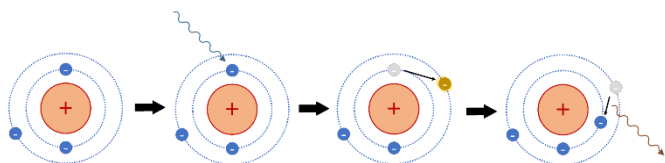
„Pravil vědec, budiž světlo, a bylo světlo.“

Analogií biblického citátu začínáme seriálovou úlohu 3. série 7. ročníku Biozvěstu, která pokračuje v tématu historických milníků. Místo víry ale budeme řešit vědu, jejíž **vývoj nejde kupředu stále stejnou rychlostí, ale spíše skokově**: Čas od času se objeví nová převratná myšlenka nebo revoluční metoda, která umožní zkoumat dosud nezkoumatelné. Přesně takovým nástrojem otevírajícím nespočet nových možností je pro biologie **GFP**.

1. Rozepište zkratku plnými slovy.

Fyzikální podstata fluorescence

Abychom mohli pochopit a ocenit přínos GFP k rozvoji vědeckého poznání, musíme porozumět principu tzv. **fluorescence**. Troše fyziky se tedy nevyhneme, nebude ale složitá. **Fluorescence spočívá v absorpci (pohlčení) fotonů (částic světla) nějakou molekulou**. Protože platí zákon zachování energie, nesmí se energie absorbovaného fotonu nikam ztratit – proto u jednoho z elektronů, který se v molekule nachází, dojde k **excitaci**. To znamená, že díky přijaté energii fotonu přeskóčí na jinou (vyšší) energetickou kvantovou hladinu. Co přesně je kvantová hladina nám může být pro tentokrát fuk; důležité ale je, že takový elektron je vybuzený a nestabilní – chce se vrátit zpátky. Takový stav označujeme jako excitovaný. Než ale elektron přeskóčí nazpět do původního stavu, musí se své přebytečné energie zase nějak zbavit, aby učinil zadost zákonu zachování energie. **Provede to vyzářením (emisí) jiného fotonu do okolí**. Až potom se může náš elektron navrátit zpátky. Princip lépe pochopíte z obr. 11. Laicky shrnuto, fluorescence je jev, kdy posvítíme na nějakou látku a ona nám svítí nazpátek.

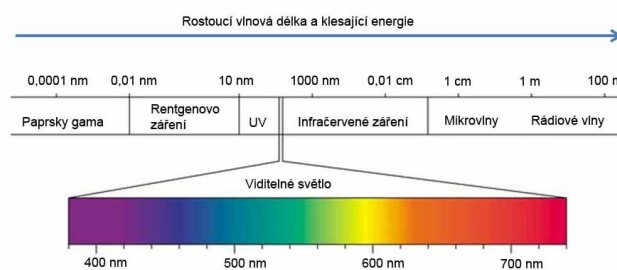


Obr. 11: Fluorescence na schématu. K atomu s kladným jádrem (na obrázku neúměrně velkým) a zápornými elektrony kolem přiletí foton (modrá šipka). Foton je pohlčen jedním z elektronů. Elektron se získanou energií excituje (znázorněno změnou barvy na oranžovou) a přeskóčí na vyšší hladinu (kružnice vzdálenější od jádra). Excitovaný stav je ale nestabilní, proto elektron po chvíli (v řádech pikosekund) přebytečnou energii vyzáří ve formě světla (červená šipka) a vrací se zpět. (kresba autor)

To, že barva obou šipek představujících foton na obr. 11, se liší, není náhoda. U konkrétní molekuly (třeba GFP) totiž **může docházet k excitaci pouze určitým světlem** – takovým, které dodá elektronu přesně tu energii, již potřebuje pro přeskok do vyšší hladiny. S jiným světlem (přesněji elektromagnetickým zářením o jiné energii) k fluorescence docházet nebude. Záření s plynule rostoucí energií od nicotné (rádiové vlny) po ničivou (paprsky gama) tvoří celé **elektromagnetické spektrum** (obr. 12). V něm nás nyní zajímá pouze viditelné světlo. Když molekulu excitujeme například modrým světlem, barva vyzá-

řeného záření bude třeba červená jako v případě obr. 11, každopádně ale jiná než u excitačního paprsku. Pohledem na obr. 12 se přesvědčte, že červené světlo má menší energii než modré. Jak je možné, že se absorbuje modrý foton o vysoké energii a vyzáří červený foton o nižší energii? Co zákon zachování energie? Ten stále platí, protože chybějící energie se neztratila, jen se kromě červeného světla uvolnila do okolí v podobě tepla. Během fluorescence se tedy molekuly vždycky trochu zahřívají.

2. Viditelné světlo tvoří pouze nepatrnou část celého elektromagnetického spektra. Přesto je naprosto zásadní pro mnoho i zcela nepříbuzných skupin organismů (savci, hmyz, zelené rostliny...). Zamyslete se, proč zrovna tento maličký výsek prakticky nekonečného spektra má tak velkou relevanci v biosféře na Zemi.
3. „Viditelné“ světlo je poněkud zavádějící označení. Co tu může být za problémy? Doložte na příkladech.
4. Jaký termín označuje „vzdálenost“ (rozdíl ve vlnové délce) mezi absorbovaným a vyzářeným elektromagnetickým zářením?



Obr. 12: Elektromagnetické spektrum. (LabGuide.cz)

Objev GFP

Teď už rozumíte základním principům fluorescence, takže se můžeme vrátit ke slavné molekule GFP.

GFP bylo objeveno v roce 1961. Tehdy dvaatřicetiletý Japonec Osamu Shimomura již dva roky pobýval na univerzitě v americkém Princetonu, kam byl pozván díky svým zkušenostem z výzkumu bioluminiscence lasturnatek rodu *Cypridina*. Jeho úkolem bylo zkoumat bioluminiscenci mořských medúz *Aequorea victoria* (obr. 13). Tato svítící průhledná medúza tvořila stotisícová zářící hejna v přístavu Friday Harbor na březích Seattlu ve státě Washington. Shimomura chtěl z těchto medúz izolovat látku, která byla za luminiscenci zodpovědná. Aby získal dostatečné množství, musel zpracovat tuny medúz. Dokonce si s kolegou dr. Johnsonem postavili speciální kráječku na medúzí klobouky, aby mohl vzorky získat rychleji (obr. 14). Dnes se nám zdá rozřezání 50 000 medúz jako velmi drastický způsob výzkumu, v tehdejších dobách to však byla jediná možnost. Medúzy nepoložily klobouky na oltář vědy zbytečně: Podařilo se vyizolovat **aequorin**, látku zodpovědnou za bioluminiscenci medúz. GFP bylo izolováno jako vedlejší produkt vlastně náhodou.

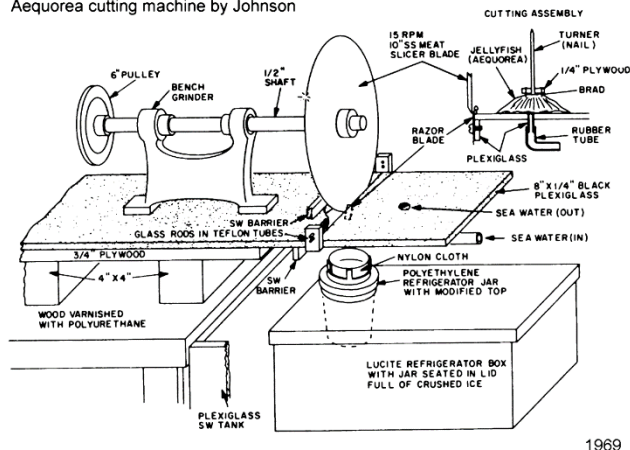
5. K čemu hlavně je medúze bioluminiscence dobrá?
6. Jaký je váš názor na etiku experimentů Osama Shimomury? Povolili byste takový experiment i v současné době? Proč ano/ne?
7. Co a proč se stane, když vyizolovaný čistý protein aequorin polejeme
 - a. mořskou vodou,
 - b. destilovanou vodou?

8. Aequorin a GFP jsou v tělech *Aequorea victoria* funkčně velmi těsně spjaté.
- Stručně vysvětlíte souvislost funkce GFP a aequorinu.
 - Popište teoretický vzhled medúzy, která kvůli mutaci neprodukuje GFP.
 - Popište teoretický vzhled medúzy, která kvůli mutaci neprodukuje aequorin.



Obr. 13: Medúza *Aequorea victoria*. (O. Shimomura 2005)

Aequorea cutting machine by Johnson



Obr. 14: Řezací stroj na klobouky. (O. Shimomura 2005)

GFP v biologickém výzkumu

Shimomura se ve svém výzkumu o GFP prve zajímal spíše okrajově. Většinu své pozornosti věnoval studiu aequorinu. GFP se dostalo do popředí zájmu vědců až začátkem devadesátých let, ačkoli několik prací se jím zabývalo i dříve. Přesná podoba fluorescenčního centra molekuly (tzv. chromoforu, doslova nosič barvy) byla známá už od roku 1979. Nezbytným krokem pro masivní rozšíření GFP bylo zaklonování genu pro GFP, to bylo v roce 1992. Výzkum pak nabral raketové tempo: 1994 – Umělá produkce GFP v živých systémech, 1994/5 – první pokusy o vylepšení molekuly GFP, 1996 – určení struktury proteinu, ...

Množství prací, které se GFP věnují, plně odpovídá jeho **obřímú významu pro biologický výzkum**. Nejvíce aplikací našlo GFP na úrovni buněk a tkání. Díky metodám genetického inženýrství dnes není problém do buněk pěstovaných *in vitro* vnést cizí gen, podle kterého buňky začnou vyrábět protein. GFP se nám v tomto případě hodí jako tzv. **reportér**: Pouze buňky s úspěšně vneseným plazmidem budou ve fluorescenčním mikroskopu svítit. Můžeme však zajít i dál: sekvenční aminokyselin v GFP můžeme přidat na konec genu pro

jiný protein, který nás zajímá (vytvoříme tak tzv. **fúzní protein**). Pokud studujeme například DNA polymerázu, můžeme buňku donutit ji produkovat s GFP „značkou“. Pomocí fluorescence pak uvidíme místa v buňce, kde se DNA polymeráza nachází (tedy jádro a případně semiautonomní organely).

Možnosti, jak využít fluorescenční značky, jsou omezené prakticky jen představivostí. Pro ilustraci následuje neúplný výčet toho, co všechno lze s GFP dělat: Odhalení lokalizace proteinu v buňce, vizualizace konkrétní organely (mitochondrie, jaderné membrány...), sledování dynamiky v buňce (např. přeskládání cytoskeletu, pohyb váčků), výzkum sekreční dráhy (jak buňka vylučuje), zobrazení reakce buňky na stresové podmínky, sledování změn v průběhu dělení... Opravdu, je toho hodně! **GFP se stalo rutinní, avšak zcela nepostradatelnou součástí mnoha oborů biologie a biochemie.**

9. Najděte a přiložte obrázek chromoforu v GFP (uveďte zdroj). Jak tato chemická struktura vzniká a co je k tomu potřeba?

10. Rozhodli jste se zkoumat protein α -tubulin. Připravili jste plazmid, podle kterého budou vaše buňky vyrábět fúzní protein

α -tubulin–GFP. Své vzorky jste zároveň obarvili fluorescenční barvou DAPI. Schematicky (ale barevně správně) nakreslete a slovně popište, jak budou vypadat vaše buňky ve fluorescenčním mikroskopu

- v G1 fázi buněčného cyklu,
- v anafázi buněčného cyklu.

Nové, lepší

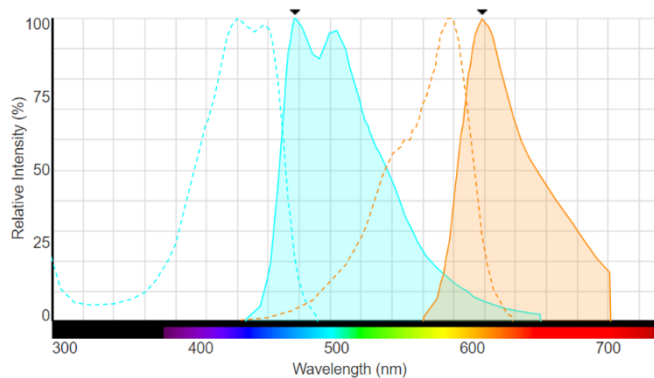
Ačkoli je GFP samo o sobě úžasnou molekulou (vyniká třeba svou stabilitou, je-li už jednou vytvořeno), biologii přestalo velmi záhy stačit. Původní **wild-type** (přírodní, z přírody izolovaná) **forma** má totiž řadu vlastností a parametrů **daleko od optima**: Špatně se produkuje v savcích (lidských) buňkách, vytvoření a „uzrání“ molekuly trvá dlouho (vizte otázku 9), má nízký kvantový výtěžek (poměr intenzity vyzářeného a absorbovaného světla, „jak moc to svítí“) ... Mnoho z těchto problémů tkví ve faktu, že se pokoušíme produkovat protein z mořského bezobratlého s tělesnou teplotou prostředí v evolučně vzdáleném savci (nebo jeho buňkách) s teplotou daleko vyšší. Kromě odstranění těchto negativ by bylo užitečné mít i **širší paletu barev** – mám-li různé značky, můžu zároveň označit víc věcí v buňce. Vědci proto začali vytvářet nové anebo lepší varianty GFP. Pomocí záměny některých aminokyselin za jiné byla vytvořena varianta **enhanced GFP (EGFP)**, která původní wild-type formu GFP překonává ve všech ohledech zmíněných výše. Když tedy dnes biolog řekne „Označil jsem svůj protein pomocí GFP,“, má ve skutečnosti na mysli právě EGFP.

Jinak barevné varianty GFP byly vytvořeny v raných 90. letech během pokusů o vylepšení ostatních vlastností. Často totiž stačí zaměnit jedinou aminokyselinu, aby se výrazně změnilo absorpční či emisní spektrum. **Absorpční spektrum** je graf závislosti míry pohlcování fotonu na vlnové délce, **emisní spektrum** je pak graf závislosti počtu vyzářených fotonů na jejich vlnové délce (obr. 15). Dnes jsou dostupné desítky barevných variant odvozených původně z GFP, ale existují i jiné fluorescenční proteiny, které s GFP nemají nic společného (obr. 16). Pokud jsou fluorofory (fluorescenční molekuly) dobře nakombinované, lze jeden vzorek označit pěti i více značkami (běžný počet je ale do tří včetně).

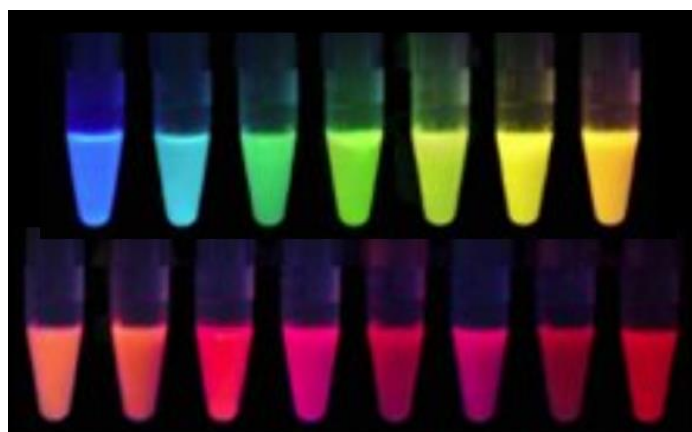
Kromě vylepšení stávajících vlastností nebo změny barvy se GFP podařilo modifikovat tak, aby získalo **zcela nové funkce**. Varianta, která se nazývá **pHluorin**, dokáže (jak název napovídá) měřit pH prostředí, ve kterém se molekula nachází. Se správnou kalibrací je tak možné změřit pH uvnitř buněk či jednotlivých organel, což je s makroskopickými sondami téměř nemožné. pH totiž ovlivňuje kvantový intenzitu fluorescence pHluorinu v různých vlnových délkách jinak. Jiná varianta GFP dokáže měřit **koncentraci Ca^{2+}** v prostředí. Fluorescence této varianty GFP je silně potlačena, pokud v roztoku žádný vápník není. Se správnou kalibrací pak lze velmi přesně měřit koncentraci vápenatých iontů např. během přenosu nervových vzruchů. Existují i modifikace pro měření koncentrace chloridových a měďnatých iontů. Ještě zmiňme jednu variantu, a to **superfolder GFP**. Tato mutace GFP je extrémně stabilní a bez problémů svítí i v jinak velmi nevhodných podmínkách pro fluorescenci.

11. Určete, kterým proteinům patří oba páry absorpčních a emisních spekter na obr. 15.

12. Proč není dobrý nápad označit jeden vzorek zároveň proteiny Tangerine a Tomato? K jakému nežádoucímu jevu může dojít? Náповěda: Podívejte se na vlnové délky.



Obr. 15: Příklad absorpčních (čárkovaná čára) a emisních (plná čára) spekter dvou proteinů. (Zdroj bude uveden v autorském řešení)



Obr. 16: Ukázka dostupných fluorescenčních proteinů.
(chm.bris.ac.uk/motm/GFP/GFPh.htm)

Závěrem

Objev GFP byl skutečně historický milník v biologii. Díky nevídanému rozvoji optických technologií potřebných pro fluorescenční mikroskopii (přesné broušení čoček, výkonost laserů, citlivost kamer) umíme pozorovat dokonce jednotlivé fotony. Naše vzorky tedy mohou obsahovat pouhé jednotky fluorescenčních značek, avšak stále je uvidíme. Velmi dynamickou oblastí rozvoje jsou tzv. **superrezoluční metody**,

kteří umožňují dosáhnout nevídaného rozlišení. Široká paleta variant poskytuje nástroje pro zodpovězení všemožných otázek, které by snad biolozy mohly zajímat. Velikou předností využití fluorescenčních značek je možnost mikroskopovat **živé buňky** (slabina elektronové mikroskopie) s **nepřekonatelnou citlivostí** (vidíme jednotlivé fotony). Není divu, že zkratka GFP se vyskytuje ve více jak 40 000 odborných článcích. A dalších několik tisíc přibývá každý rok.

