

Biologický korespondenční seminář



Biozvěst

Ročník 7

Série 5

Milé řešitelky, milí řešitelé,

je tu pro Vás mimořádná pátá letní série úloh! Možná máte nyní kvůli distančnímu studiu více času, možná vám chybí všemožné biologické akce, které byly kvůli pandemii Covid-19 zrušeny či přesunuty a proto jsme pro Vás připravili další úlohy. V letní terénní úloze budete mít možnost podrobněji poznat život na rozkvetlé louce. Čeká Vás také úloha zaměřená na fyziologii dýchání, s medvídkem Pú a jeho kamarády se pokusíte vyřešit záhadu bezhlavého rytíře a přímo z biochemické úrovně se budete věnovat krvi a hemoglobinu. Seriálová úloha je tentokrát zaměřena více prakticky a věnuje se sekvenaci DNA a jejímu významu pro moderní taxonomii.

Na samém konci prázdnin se potom můžete těšit na terénní expedici, která se bude konat 31.8.-1.9.2020 na chalupě Padouchov na Ještědském hřebenu. Výběr na expedici bude probíhat podle umístění po čtvrté sérii a vyhlášení celkových výsledků. Na expedici samotné potom proběhne předání cen a diplomů. Informace k přihlašování vám zašleme emailem po vyhodnocení čtvrté série.

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 řešená 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](#), [skupiny „Biozvěst“](#), kde lze probírat aktuality a diskutovat dle libosti.

Vaše řešení nám pošlete 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. **7-5-1-Bioslav_Biomilný** v případě páté úlohy čtvrté série aktuálního ročníku. Moc nám pomůže, když uvedený zápis dodržíte (na jeho základě si došlá řešení filtrujeme).

Uzávěrka 5. série: pondělí 17. 8. 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.

Přejeme vám krásné a biodiverzitou naplněné léto!

Jasna Simonová & kolektiv autorů

Úloha 1: Od nádechu po výdech

Autor: Kateřina Čermáková

Počet bodů: 21

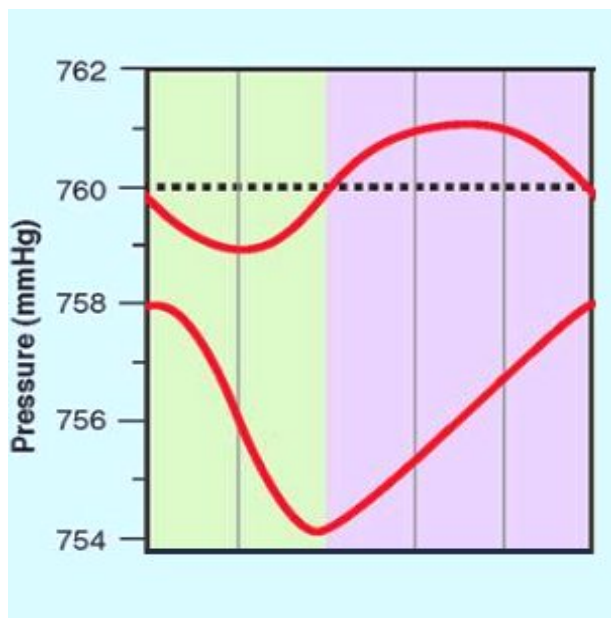
Aerobní metabolismus je v porovnání s tím anaerobním výrazně efektivnější a umožňuje nám udržení našeho energeticky náročného životního stylu a složité tělesné stavby, o kterých si anaerobní organismy mohou pouze nechat zdát. Za naši složitost však platíme jistou daň. Naše buňky se staly na dostatečném přísunu kyslíku životně závislými a bez něj velmi brzy hynou. Proto je pro zachování integrity našich těl naprosto zásadní vlastnit spolehlivý a efektivní způsob, jak naše tkáně tímto životodárným plynem zásobovat. Tuto roli přebírá naše dýchací soustava v těsné spolupráci se soustavou vaskulární. Říká se, že člověk ocení hodnotu věcí až když je ztratí. Pro kyslík a dýchání toto platí dvojnásob. Přeji vám však, abyste po vypracování této úlohy dokázali ocenit půvab dýchání a transportu dýchacích plynů, aniž byste museli zažít jejich nedostatek.

1. Každý jednotlivý plyn, jenž je ve vzduchu obsažen, působí určitým parciálním (částečným) tlakem. Celkový tlak směsi plynů je roven prostému součtu parciálních tlaků všech složek směsi.

Parciální tlak pro konkrétní plyn ve směsi je dán součinem podílu (frakce), již plyn tvoří, a celkového tlaku směsi.

- Ačkoliv kyslík tvoří nezanedbatelnou součást dnešní atmosféry, v historii Země dosahoval ještě vyšších koncentrací, než je tomu dnes. V pozdním karbonu to zřejmě bylo i 35 %, což patrně umožnilo existenci tehdejších gigantických forem suchozemských členovců. Co bylo zdrojem tohoto nárůstu kyslíku? Jak se lišil (v %) atmosférický parciální tlak kyslíku (za předpokladu stejného celkového atmosférického tlaku) v karbonu v porovnání s dnešní dobou? Uveď celý výpočet.
 - Změnil se obvykle parciální tlak kyslíku ve vzduchu po průchodu horními cestami dýchacími? Zdůvodni.
 - Zatímco na souši je vydatný zdroj esenciálního kyslíku všude kolem nás, ve vodním prostředí nastává pro člověka s jeho přísunem problém. Ani s dýchacími přístroji však nemusí být ponor zcela bezproblémový. Z jakého důvodu může mít rychlé vynoření se zadrženým dechem až život ohrožující důsledky? Mohou stejným neduhem trpět například i kytovci, kteří se na dlouhou dobu potápějí i do větších hloubek než člověk? Jak se s touto překážkou mořští savci vypořádávají?
2. Výměna dýchacích plynů mezi tělem a okolím, ventilace, je děj částečně automatický a částečně řízený vůlí. Generátor dýchacího rytmu je lokalizován v prodloužené míše. Činnost tohoto tzv. dýchacího centra je modulována aferentací (přívodem informací) z mnoha dalších míst na těle.
- Je jasné, že spotřeba kyslíku může i v průběhu krátké doby výrazně kolísat například v závislosti na aktivitě, ale i dalších faktorech. Tělo proto potřebuje nějakou zpětnou vazbu, zda je ventilace dostatečná a není třeba upravit její rytmus. Co detekují receptory, které tuto zpětnou vazbu zprostředkovávají a kde v těle jsou lokalizované?

- b. Z vlastních zkušeností jistě dobře víte, že dýchání mohou modulovat i podněty, jež nejsou předmětem zpětné vazby. Uveďte 4 příklady této aferentace.
- c. Volné potápění (angl. free-diving), je skupina vodních sportovních disciplín, kdy při ponoru není využíváno potápěčské dýchací vybavení a zásobu životně důležitého kyslíku si potápěč s sebou nese jen ve svém těle. Signalizace z receptorů zmíněné v předchozí otázce však po čase začnou člověka nutit k vynoření a následnému nádechu. V honbě za pokročením free-divingových rekordů se však mohou potápěči uchýlit k velmi nebezpečné praktice, která pocit potřeby nádechu oddálí. O jakou praktiku se jedná, jak funguje a v čem spočívá její nebezpečí?
3. V rámci respiračního cyklu se pravidelně střídá fáze výdechu (expiration) a nádechu (inspiration), v průběhu kterých dochází ke změnám různých tlaků. S tím souvisí také následující graf (obr. 1), který zobrazuje průběžné změny pleurálního (v prostoru mezi pohrudnicí a poplicnicí) a intrapulmonárního (uvnitř plic) tlaku (červené křivky) v průběhu jednoho respiračního cyklu v porovnání s tlakem atmosférickým (tečkovaná horizontální čára).



Obr. 1: Změna tlaků v alveolech a pleurální šterbině v průběhu respiračního cyklu. – <https://basicmedicalkey.com/physiology-of-the-respiratory-system/>

- a. Napiš, která ze dvou křivek (horní či dolní) musí náležet intrapulmonárnímu tlaku a zda je inspirace zobrazena v zelené nebo červené části grafu. Proč je důležité, aby byl takovýto rozdíl v pleurálním a intrapulmonárním tlaku?
- b. Za jakých okolností by se mohly pleurální a pulmonární tlaky vyrovnat a jaký to má následný dopad na dýchání?
- c. K dechu se vážou nejrůznější plicní objemy a kapacity - inspirační a expirační rezervní, dechový apod. Většinu z nich lze změřit přístrojem, který se nazývá spirometr, neboť objemy vdechovaného a vydechovaného vzduchu lze kvantifikovat velmi snadno. I přes maximální usilovný výdech však v plicích stále zůstává asi litr a čtvrt vzduchu. Tento objem nazýváme tzv. reziduálním plicním objemem. Jen těžko však bu-

deme měřit objem něčeho, co přes veškerou snahu zůstává v plicích, ačkoliv někdy může být užitečné znát i tento parametr. Jakým způsobem byste reziduální plicní objem změřili?

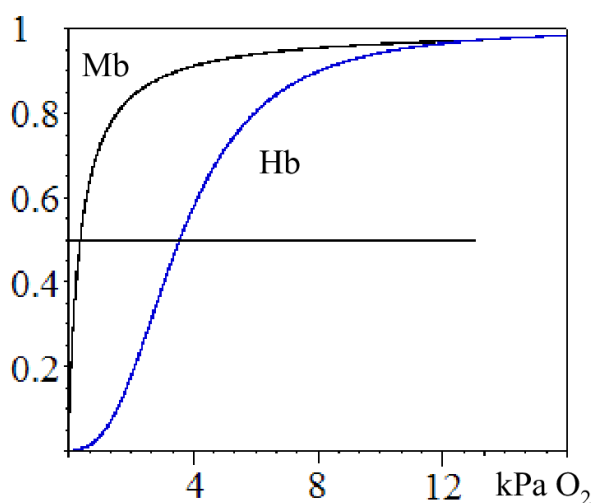
- d. V některých situacích si pacienti dostatečnou výměnu dýchacích plynů nemohou zajistit sami. V takových situacích je člověk odkázán na umělou plicní ventilaci. Moderní plicní ventilátory vhánějí pacientovy do plic vzduch přetlakem. Proslulé “železné plíce” dnes již patří do medicínské historie a jistě pacientovi příliš pohodlí nezajišťovaly (viz. obr. 2), přesto v minulosti sehrály významnou roli při záchraně životů např. pacientů po dětské obrně. Na jakém principu železné plíce pracovaly?



Obr. 2: Železné plíce. – Wikimedia commons

4. Plicní sklípky mají jen tenkou stěnu, přesto nekolabují a ochotně drží svůj tvar který v podstatě odpovídá “otevřené bublině”. Za to vděčí tenkému filmu na jejich vnitřním povrchu. Jaká je chemická podstata látek, z nichž se skládá tento film, který zodpovídá za důležitou část elasticity plic. Jakým způsobem brání kolapsu alveolů?
5. Aby byla krev v plicích správně okysličována, je nutné, aby byl zároveň přiváděn dostatečný objem vzduchu do alveolů (V) i dostatečné prokrvení plic - perfuze (Q). V ideálním případě by homogenně v celých plicích mělo platit, že $V/Q \approx 1$. Tento poměr zajišťuje optimální okysličování. Při odchylování se od tohoto poměru (ať již v celých plicích či v lokálně nehomogenních oblastech plic) se snižuje efektivita okysličování. Vlivem fyzikálních jevů, jakými jsou gravitace a hydrostatický tlak, se jistá nehomogenita a narušení tohoto poměru nachází i v plně zdravých plicích.
- a. Pokud se lokálně sníží perfuze, mohlo by pomoci přivést do dané oblasti alespoň více kyslíku (navýšit lokální ventilaci)? Zdůvodni.
- b. Tělo disponuje nástroji, jak se nehomogenitám alespoň částečně bránit. Jaký mechanismus je za to zodpovědný? Jak funguje?
6. Po difúzi do krevního řečiště je kyslík v omezené míře transportován po těle i ve volně rozpuštěné formě, což však nemá šanci pokrýt jeho spotřebu ve tkáních. Drtivá většina proto po těle putuje navázána na notoricky známý transportní metaloprotein - hemoglobin. Vztah mezi parciálním tlakem kyslíku a saturací (“obsazeností”) proteinu vyjadřuje tzv. disociační (saturační) křivka. Obr. 2

ukazuje saturační křivky pro dva proteiny vázající kyslík - hemoglobin (Hb) a myoglobin (Mb).



Obr. 3: Vazebné křivky hemoglobinu (Hb) a myoglobinu (Mb). – https://www.researchgate.net/figure/Black-line-Mb-fractional-saturation-curve-as-a-function-of-O2-partial-pressure-This_fig8_36418060

- Na první pohled zaujme odlišný tvar vazebné křivky hemoglobinu a myoglobinu. Čemu hemoglobin vděčí za tento tzv. sigmoideální tvar disociační křivky? Z jakého důvodu je tento tvar disociační křivky výhodný?
 - Proč je výhodné, aby byla saturační křivka myoglobinu posunuta vzhledem k hemoglobinu doleva?
 - Vyvíjející plod v těle matky disponuje specifickým typem hemoglobinu, označovaným jako HbF, který je, již od prenatálního věku, postupně nahrazován hemoglobinem HbA. Jak se bude disociační křivka fetálního hemoglobinu lišit od HbA?
 - I saturační křivka totožných molekul hemoglobinu však není vždy úplně stejná a může být vlivem více faktorů prostředí posunuta doleva či doprava, což je důležité i za fyziologických podmínek proto, aby uvolňování kyslíku z hemoglobinu efektivně probíhalo právě tam, kde je kyslík třeba. Napište 4 takové faktory a u každého uveďte, kterým směrem křivku posouvá.
7. Oxid uhličitý vznikající při metabolismu snadno difunduje přes buněčné membrány z buněk a následně do krevních kapilár. Zde je částečně transportován i fyzikálně rozpustitelný, větším dílem však putuje chemicky vázán - na hemoglobin nebo plazmatické proteiny (karbaminoHb, karbaminoproteiny) a v podobě bikarbonátu (HCO_3^-).
- Reakce $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ probíhá v těle v obou směrech do určité míry i spontánně. Protože rychlost spontánní reakce není dostatečná, je nutná enzymatická katalýza. Enzym plnící tento účel je jedním z vůbec nejrychlejších enzymů v našem těle - za vteřinu jedna molekula enzymu katalyzuje až 106 reakcí. Velikost těla u savců koreluje s aktivitou tohoto enzymu. O jaký enzym se jedná, kde je lokalizovaný a jak lze vysvětlit korelaci jeho aktivity v těle s tělesnými rozměry?
 - Proč bude krev z žil vykazovat mírně vyšší hematokrit (podíl erytrocytů na celkovém objemu krve) v porovnání s krví tepennou?
 - Kde bude koncentrace CO_2 ovlivňovat pH výrazněji, v mozkomíšním moku nebo krvi? Proč?
8. Objem spotřebovaného kyslíku se liší od objemu vydaného CO_2 . Podíl $V(\text{vydaný } \text{CO}_2)/V(\text{spotřebovaný } \text{O}_2)$ označujeme jako tzv. respirační kvocient (RQ). Ten není konstantní, ale může být ovlivněn například stravováním. Stravu s jakou převládající složkou (v sušině :-)) byste doporučili horolezci, který se vydává na náročný výstup na nepálskou Kančendžegu? Jak takové strava ovlivní RQ? Vysvětlíte.

Úloha 2: Medvídek Pú a hlava bezhlavého rytíře

Autor: Markéta Staňková

Počet bodů: 13

Za jednoho deštivého a pošmourného dne se zvířátka ze Stokorcového lesa sešla u Sovy, aby si vyprávěla příběhy. První začal Medvídek Pú, který ostatním vyprávěl o záhadném medovém hrnci, který sotva se naplnil, hned zas byl prázdný. Druhý příběh patřil Tygroví. Ten se ponořil do povídačky o prastarém dubu, který už po staletí roste mezi borovicemi na okraji lesa. Ve větrných dnech se zde prý ozývají nářky a o úplňku se zjevuje bezhlavý rytíř zoufale hledající svoji hlavu. Jen příběh dovyrával, přestalo pršet. A vysvitlo slunce. Vyděšené tváře zvířátek pookřály a už se nezdálo, že byl příběh vůbec kdy děsivý. Klokánek Roo se podíval z okna a než stačil říci, že by si mohli jít hrát ven, Kryštůfek Robin už organizoval hrdinnou výpravu za rytířovou hlavou. A kde jinde ji hledat, než právě u prastarého dubu. Hrdinové skládající se z Prasátka, Medvídky Pú, Klokánky Roo, Ijáčka, Tygra, Sovy a Králíčka vyrazila včele s Kryštůfkem Robinem a hromadou náčiní k dubu. Po hodině kopání objevili truhlu. Uvnitř ní byla hlava, ale jediné co z ní zbylo, byla již časem vybělená lebka. Zvířátka při nálezů zajásala. Jenže když se pak zamýšlela nad tím, co je bezhlavý rytíř vlastně za zvířátko, žádné nevědělo. Kryštůfek Robin vzal lebku do ruky a zkusil se podívat na zuby. „Mám nápad!“ zvolal Kryštůfek. „Sepíšeme si zubní vzorce a uvidíme, komu bude ten jeho podobnější!“.

- Vzorec zubů lebky v Kryštůfkových rukách je 3133/2123=36. Co nám tato čísla vlastně říkají?
- Shoduje se tento vzorec se zubním vzorcem některého ze zvířátek? Do odpovědi napiš zubní vzorce všech zvířátek (vč. Kryštůfka) a rozhodni, jestli se s některým z nich shoduje, a může tak patřit do stejného řádu.
Jako další znak, na který si Sova vzpomněla, že může být klíčový k vyřešení jejich problému, je tvar stoliček. Vždycky ji totiž fascinovalo, jakých tvarů mohou savčí zuby dosahovat. Jiné zuby mají masožravci, jiné všežravci a ještě úplně jiné býložravci.
- Zvládneš popsat, jak se mohou stoličky u savců s různým typem potravy lišit? Jaké zuby bys očekával/a u vyjmenovaných skupin? Zkus k nim přiřadit alespoň jednoho zástupce z ČR a roztrdit do nich i zvířátka ze Stokorcového lesa.
- U Králíčka se můžeme setkat s přizpůsobením i jiných zubů, než stoliček. Které to jsou, k čemu slouží a čím jsou specifické?
- Zde je ona lebka z truhlice (obr. 4–9), zvládneš určit alespoň do rodu, komu patří? Zkus popsat i znaky, který-

mi ses při určování řídil/a. LCB (délka lebky) je zhruba 53 mm. Čím se náš bezhlavý rytíř živil, než přišel o hlavu a jak se to dá poznat?

Znajíce již odpověď na své otázky, stála teď zvířátka v kroužku a přemýšlela, jak by s tou hlavou měla vlastně naložit. Tygr navrhnul, že vyskočí na nejvyšší větev stromu a nechá ji tam, aby si ji pak rytíř mohl vyzvednout. Ale jelikož všechna zvířátka chtěla onoho rytíře vidět, tuto možnost zavrhl. Jenže čekat tady do tmy, až rytíř sám přijde, to se jim také nechtělo, a Prasátko se při té představě až celé roztrásl. V tom si Kryštůfek Robin vzpomněl na různá zaříkávadla, která často četl v pohádkách a rozhodl, že nějaké takové musí vymyslet, a určitě se jim pak rytíře podaří přivolat. Oči všech spočinuly na Medvídkovi Pú. Ten tedy začal skládat. Jenže jak měl plnou hlavu zubů, kostí a lebek, podepsalo se to i na jeho tvorbě.

6. Pomoz prosím Púovi vymyslet zaříkávadlo, ať to stihnou ještě před večerem. Využij jeho inspiraci lebkou.

Hotovo zvířátka měla chvilku před svačinou a poté, co se najedla, pustila se do zachraňování. Stoupala si do řady, Kryštůfek stál s lebkou uprostřed, a společně pronesla ono zaříkávadlo. Obloha se zatáhla, zafoukal vítr a před nimi se zjevila osoba bez hlavy. Při prvním pohledu zvířátka pochopila, že lebku zvládla určit správně. Rytíř přistoupil ke Kryštůfkovi. Lebka zacvakala a už se vznesla k osamoceným krčním obratlům, dvakrát se protočila a rytíř nadobro zmizel.



Obr. 4–9: Lebka neznámého zvířátka.

Úloha 3: Běžný den v živote biochemika

Autor: Jana Hannelová

Počet bodů: 21

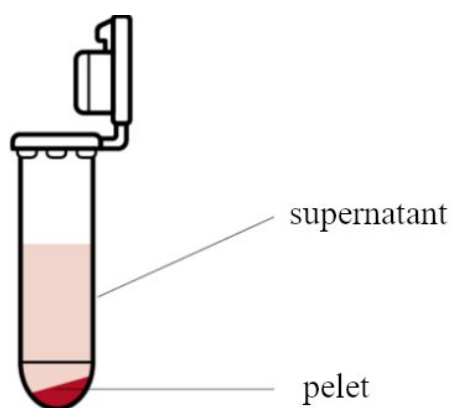
Krv je zložená z množstva buniek suspendovaných v krvnej plazme. Najpočetnejšou skupinou týchto buniek sú erytrocyty, nazývané aj červené krvinky, ktorých najdôležitejšia úloha je zásobovať tkanivá kyslíkom. Sú bikonkávneho tvaru, čo im dodáva flexibilitu, a preto sú schopné prejsť aj kapilármi užšími, ako je ich priemer (približne $7\mu\text{m}$). Ľudské erytrocyty, na rozdiel od väčšiny buniek, nemajú mitochondrie, jadro, Golgiho aparát ani endoplazmatické retikulum. Ich cytoplazma obsahuje takmer výhradne hemoglobín (Hb), čo je heterotetramér obsahujúci 4 hemové skupiny, v ktorých je koordinačnou väzbou naviazané železo. Jeho koncentrácia v krvi sa pohybuje v rozmedzí od 130 - 176 g/l pre mužov a 120 - 160 g/l pre ženy. Nízke hodnoty hemoglobínu majú rôzne príčiny a môžu naznačovať prítomnosť rôznych chorobných stavov.

V tejto úlohe sa pozrieme na to, ako sa dá koncentrácia hemoglobínu experimentálne určiť v laboratóriu, pričom sa taktiež bližšie oboznámime s niekoľkými laboratórnymi technikami bežne používanými v praxi.

1. Zanietený študent biochémie Bioslav Biomilný sa vo svojom voľnom čase rozhodol určiť koncentráciu hemoglobínu vo vzorke krvi, ktorú sa mu potajomky podarilo ukradnúť z laboratória. Ako múdry študent vie, že sa nejedná len o samotnú krv, ale že do nej bola pridaná ešte jedna látka, ktorá je nevyhnutná na jej uskladnenie (vzorka krvi sa skladala z 9ml krvi a 1ml neznámej látky). Vašou prvou úlohou bude zistiť:

- O akú látku sa jedná (stačí všeobecne)?
- Aká je jej funkcia?

V prvom kroku je potrebné oddeliť erytrocyty od zvyšku krvi. To sa dá efektívne dosiahnuť použitím centrifúgy, čo je prístroj, ktorý dokáže oddeliť látky na základe ich hustoty použitím sedimentačného princípu. Centrifugálne zrýchlenie spôsobí, že hustejšie častice sa usadia na dne skúmavky (táto časť sa nazýva pelet), pričom tie s menšou hustotou ostanú vo vrchnej časti (nazývanej supernatant) (Obr.10).



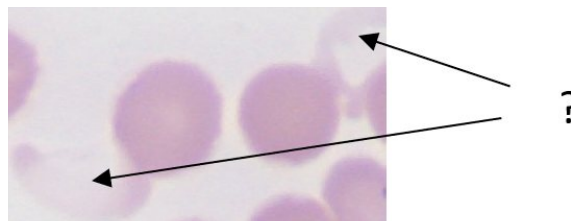
Obr. 10: Výsledok centrifugácie. – <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/centrifugation/safe-use-of-centrifuges/basics-in-centrifugation/>

Bioslav prepipetoval 2ml krvi do centrifugačnej skúmavky a túto vzorku centrifugoval 5 min (3000 rpm, 1000 g). Po ukončení centrifugácie odstránil supernatant a 0,5ml

peletu následne rozsuspendoval v 5ml destilovanej vody. 1ml tohto roztoku následne centrifugoval 2 min. použitím mikrocenrifúgy (ktorá je silnejšia ako klasická cenrifúga a vie vyvinúť väčšie zrýchlenie – 13000 rpm, 11500 g). Po centrifugácii Bioslav opatrne oddelil supernatant červenkastej farby od svetlejšie zafarbeného peletu a premiestnil ho do čistej skúmavky. 0,5ml tohto supernatantu následne rozsuspendoval v 4,5ml destilovanej vody, čím získal 5ml zásobného roztoku pre ďalšiu analýzu.

2. Na základe týchto informácií skúste povedať:

- Čo obsahoval pelet a supernatant po prvej centrifugácii (3000 rpm, 1000 g)?
- Čo sa stalo s peletom po jeho rozsuspenderovaní v destilovanej vode a prečo?
- Čo obsahoval pelet a supernatant po druhej centrifugácii (13000 rpm, 11500 g)? (Pomôcť vám môže obrázok 11.)

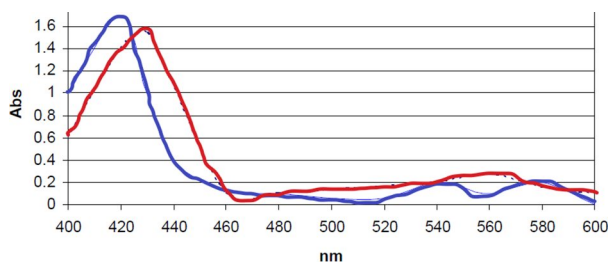


Obr. 11: Štruktúry označené otáznikom sa nachádzajú v pelete po druhej centrifugácii.. Čo podľa Vás zobrazujú? – Zdroj uveden: v autorskom riešení.

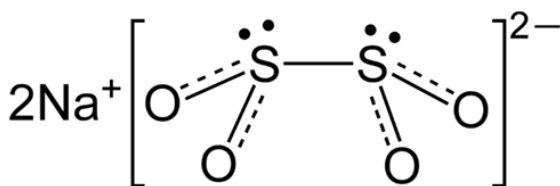
Jedná z nevýhod kariéry biochemika je, že chemické zlúčeniny, ktoré sú predmetom ich každodennej práce, sú tak malé, že je veľmi ťažké ich vizualizovať. Bioslava ale tento fakt neodradil, pretože pozná rýchlu a pomerne ľahko realizovateľnú techniku, pomocou ktorej sa vie presvedčiť, že sa mu naozaj podarilo zo vzorky krvi izolovať hemoglobín. Jedná sa o spektroskopiu, čo je, jednoducho povedané, fyzikálna metóda, ktorá nám umožňuje zistiť molekulárnu štruktúru určitej látky pomocou absorpcie, rozptylu alebo emisie elektromagnetického žiarenia danou látkou. Elektromagnetické žiarenie je spektrum vln s rôznou vlnovou dĺžkou a energiou, zahŕňajúc extrémne krátke vysokoenergetické vlny (napríklad röntgenové vlny) a taktiež vlny s veľkou vlnovou dĺžkou a nízkou energiou, ako napríklad rádio vlny. Súčasťou elektromagnetického žiarenia je aj viditeľné svetlo, ktorého vlnová dĺžka je v rozmedzí od 400 nm do 700 nm. Rôzne látky absorbujú elektromagnetické žiarenie rôznej vlnovej dĺžky, čo je spôsobené tým, že absorbované žiarenie musí mať zodpovedajúcu energiu na to, aby spôsobilo excitáciu danej látky z nižšej do vyššej energetickej hladiny. Zjednodušene by sa dalo povedať, že na základe toho, ktoré vlnové dĺžky elektromagnetického žiarenia daná látka absorbuje, vieme určiť jej molekulárnu štruktúru. Spektrofotometer je prístroj, ktorý nám vie povedať nie len to, aké vlnové dĺžky daná látka absorbuje, ale aj s akou relatívnou intenzitou, čo sa nazýva spektrum danej látky.

Bioslav sa rozhodol získať absorpčné spektrum hemoglobínu, ktorý sa mu podarilo izolovať. Zásobný roztok, ktorý si pripravil zo supernatantu po 2. centrifugácii, napipetoval do kyvety pre meranie v spektrofotometri. Po následnej analýze pomocou spektrofotometra získal jedno zo spektier zobrazené na obrázku 3. Bioslav sa rozhodol

experimentovať ďalej. Do zásobného roztoku pridal niekoľko mg látky, ktorej chemická štruktúra je zobrazená na obrázku 13. Po analýze v spektrofotometri získal trochu odlišné spektrum v porovnaní s tým prvým, ktoré je tiež zobrazené na obrázku 12.



Obr. 12: Dve rozličné absorpčné spektrá hemoglobínu získané analýzou v spektrofotometri. – Zdroj uveden v autorskom riešení.



Obr. 13: Neznáma chemická látka. – Zdroj uveden v autorskom riešení.

3. Vašou úlohou je zistiť:

- Čo obsahovala prvá vzorka pripravená zo zásobného roztoku?
- Ktoré spektrum zodpovedá prvej analýze vzorky?
- Ako sa nazýva látka na obrázku a čo spôsobilo jej pridanie do vzorky?
- Čo obsahovala druhá vzorka po pridaní neznámej látky?
- Ktoré spektrum zodpovedá druhej analýze vzorky?

Spektroskopia nám neposkytuje len informácie o štruktúre danej látky na základe toho, aké vlnové dĺžky absorbuje, ale je to tiež často používaná technika na zistenie koncentrácie danej látky v roztoku. V tejto časti si priblížime techniku nazývanú UV-visible spektroskopiou. Ako napovedá už samotný názov, táto technika je vhodná na analýzu látok, ktoré absorbujú elektromagnetické žiarenie v oblasti ultrafialového a viditeľného svetla. Jej princíp spočíva v tom, že látka, ktorú skúmame, je osvetlená monochromatickým svetlom (svetlom s určitou vlnovou dĺžkou), ktoré daná látka absorbuje najlepšie, pričom túto hodnotu získame použitím spektrofotometra. Svetlo absorbované danou látkou, čiže absorbanca A , je dekadický logaritmus pomeru svetla, ktorým je látka osvetlená a svetlom, ktoré látkou nie je absorbované. Našťastie sa týmto výpočtom nemusíme zaoberať, kdeže ten je priamo realizovaný samotným spektrofotometrom, ktorý nám poskytne už výslednú absorbanciu A . Koncentráciu látky vieme následne vypočítať použitím Beer-Lambertovho zákona (Obr. 5), ktorý hovorí o tom, že absorbanca je priamo úmerná koncentrácii danej látky c [mol/l], hrúbky kvety l [cm] a veličine nazývanej molárny absorpčný koeficient ϵ [M⁻¹·cm⁻¹], čo je absorbanca 1M roztoku danej látky pri určitej vlnovej dĺžke v kvete s hrúbkou 1cm (jej hodnoty pre rôzne látky môžeme nájsť v odbornej literatúre).

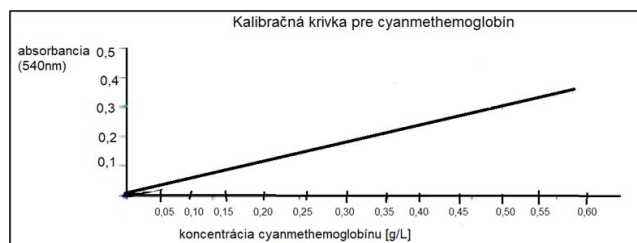
$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

$$A = \epsilon c l$$

Obr. 14: Beer-Lambertov zákon. A – absorbanca, ϵ – molárny absorpčný koeficient, c – koncentrácia, l – hrúbka kvety, I_0 – prichádzajúce svetlo, I – odchádzajúce svetlo

- Bioslav sa rozhodol zistiť koncentráciu hemoglobínu v krvi použitím spektrofotometrie.
 - Skúste sa zamyslieť nad tým, akému problému môže Bioslav čeliť pri zisťovaní koncentrácie hemoglobínu vo svojej vzorke? (pomôcka: skúste sa zamyslieť nad princípom spektroskopie opísaným vyššie a taktiež sa skúste pozrieť na obrázok 14)
 - Ako tento problém vyrieši pridaním činidla nazývaného cyanmet (alkalický roztok hexakynoželezitanu draselného $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a kyanidu draselného KCN)?
 - Pri pipetovaní vzorky do kvety použil Bioslav Pasteurovu pipetu, pomocou ktorej nie je možné napipetovať presný objem látky. Dopustil sa takto chyby a mal by použiť automatickú pipetu, s ktorou vie odmerať presný objem alebo objem skúmanej látky môžeme pri analýze v spektrofotometri zanedbať? Svoju odpoveď zdôvodnite.
- V poslednej otázke sa budeme venovať výpočtu koncentrácie hemoglobínu v našej vzorke krvi. Bioslav si pripravil vzorku nasledovne: 1ml zásobného roztoku zmiešal s 10ml činidla cyanmet. Lenže ako správny biochemik vie, že pred samotným použitím spektrofotometra na skúmanie konkrétnej vzorky je nevyhnutné ho nakalibrovať, keďže aj samotná kveta a iné látky, ktoré obsahuje náš roztok, do istej miery absorbujú alebo rozptyľujú elektromagnetické žiarenie. To dosiahneme použitím takzvaného „blanku“ (z angličtiny = prázdny). (Poznámka: analogicky to môžeme porovnať k váženiu múky pri pečení. Najprv na váhu položíme prázdnu nádobu, váhu následne vynulujeme a až potom môžeme odvážiť požadované množstvo múky.)
 - Uveďte, ako má Bioslav pripraviť správny blank na kalibráciu spektrofotometra.
 - Po kalibrácii spektrofotometra si Bioslav uvedomil, že má ďalší problém. Nikde v odbornej literatúre nevedel nájsť molárny absorpčný koeficient cyanmethemoglobínu, čo znamená, že nebude môcť použiť Beer-Lambertov zákon na výpočet koncentrácie. Keďže je ale veľmi šikovný a vynaliezavý študent, prišiel na to, že koncentráciu hemoglobínu vie zistiť aj iným spôsobom, a to použitím kalibračnej krivky, ktorú si môže zostaviť.

A to tak, že odměříte absorpční 3 roztoků cyanmethemoglobínu s známou koncentrací, které má k dispozici. Na základě těchto hodnot následně sestavíte kalibrační křivku, která je zobrazená na obrázku 15. Vašou úlohou je teraz pomocí této křivky určit koncentraci cyanmethemoglobínu v [mol/l] v skúmanej vzorke, ktorej absorpční je 0.3 (cyanmethemoglobín má relativnú molekulovú hmotnosť takú istú ako hemoglobín, čo je $M_r = 68\,000$). Výsledok zaokrúhlite na 1 desatinné miesto.



Obr. 15: Kalibračná krivka pre cyanmethemoglobín.

- c. Pomocou predchádzajúceho výpočtu koncentraciu cyanmethemoglobínu sa následne pokúste vypočítať koncentraciu hemoglobínu v nezriedenej vzorke krvi, s ktorou Bioslav pracoval. (Pomôcka: zoberte do úvahy všetky riedenia, ktoré uskutočnil)
- d. Na základe tejto koncentrácie posúďte, či je pacient, ktorého krv sme analyzovali, zdravý alebo trpí nejakým ochorením. Ak áno, uveďte, ako sa nazýva stav, kedy má koncentrácia hemoglobínu v krvi takúto hodnotu.

Úloha 4 (experimentálna): Všetní den na louce

Autor: Stanislav Vosolsobě

Počet bodů: 20

Všetny děje v přírodě podléhají denním cyklům a povětrnostním vlivům. Nejlépe to lze pozorovat na květech a jejich opylovačích. Poznat principy přírodních procesů je v tomto případě velmi snadné, stačí si sednout do louky, vzít lupu a pozorovat. Takže vzhůru do toho! Nejlepší je být v přírodě od samotného rozbřesku, takže pokud nemáte možnost bydlet někde v přírodě, zabalte spacák a přespěte přímo na místě!

Cílem květů je přenést pyl, hmyz zase potřebuje pyl a nektar jako potravu. Ale příroda nemá jen přívětivou tvář. Vlhkost ve formě rosy či deště - to jsou všechno faktory, které nesvědčí ani pylu, ani hmyzu. A podobně nemá smysl aby rostlina kvetla v noci, když její opylovači létají ve dne...

Vášim úkolem bude vybrat si na vaší lokalitě (může to být klidně i zahrada či trocha vegetace v parku) několik druhů rostlin a zjistit, v jakou část dne otevírají květy a kdy pak otevírají prašníky. Zároveň sledujte i aktivitu hmyzu - létá hmyz po celý den, nebo v některé hodiny častěji? A jak se rostliny a hmyz chovají, pokud je zima, pošmourno nebo dokonce prší?

Rostliny si označte štítky a květy, které se otevřely, si můžete označit tečkou lihovým fixem, abyste měli dobrý přehled, kolik květů se otevírá daný den. Otevření prašníků lze sledovat lupou nebo dotykem prstu, zda-li se na něm zachytává pyl. Aktivitu hmyzu můžete sledovat třeba tak, že si

po určitou dobu (10 - 20 minut) budete zapisovat, kolik jedinců spatříte na vymezené ploše (třeba 5x5 metrů). Chcete-li získat zvláště precizní data, můžete dokonce zaznamenávat i jednotlivé návštěvy na vybraných rostlinách. Nemusíte hmyz určovat přesně, stačí do hlavních skupin (včela, čmelák, pestřenka,...). Dále si zaznamenávejte stav počasí: oblačnost se udává jako pokryvnost v osminách plochy oblohy (a je dobré rozlišit nízkou, střední a vysokou oblačnost). Nemáte-li měřicí přístroj, vítr, teplotu a vlhkost zaznamenejte alespoň pociťově (nebo převezměte data z nějaké blízké meteostanice, viz <http://portal.chmi.cz/aktualni-situace/aktualni-stav-pocasi/ceska-republika/stanice/grafy-automatickych-stanic>).

A pokud je vegetace mokrá od rosy či deště, zaznamenejte i to.

1. Uveďte některé příklady toho, jak může být pyl v květu chráněn před povětrnostními vlivy.
2. Popište u vámi vybraných rostlin, zda-li je jejich pyl v květech chráněn či nikoliv. Ideální je sledovat v rámci vašeho pokusu oba typy, ale s nekrytými se lépe dělá dlouhodobé pozorování, protože nemusíte destruovat květ a navíc je jejich reakce na počasí zajímavější.
3. Popište a doložte grafy, jak se během dne vyvíjí květ (otevření okvětních plátků, prašníků, růst blizen). Snažte se najít odpověď na tyto otázky: Preferuje rostlina určitou denní dobu pro aktivaci květu? Jak dlouho je květ konkrétního druhu aktivní? Kdy se otevírají tyčinky a jak dlouho poskytují pyl opylovačům? ...
4. Podobné pozorování proveďte i pro hmyz. Kdy se hmyz probouzí? A kdy chodí spát? Pokuste se vytvořit graf denní aktivity hmyzu na základě frekvence jeho pozorování na vymezené ploše.
5. A pokud globální oteplování dá a budete mít v létě štěstí na alespoň jeden den ošklivého počasí, opakujte pozorování i tehdy. Zkoumejte, zda-li létá hmyz, jak se květy otevírají a zda-li je uvolňován pyl z prašníků
6. Pozorování shrňte diskuzí, pokuste se vyvodit nějaké obecně platné a zajímavé poznatky. Nalézáte nějakou souvislost mezi aktivitou hmyzu a rostliny? Jak moc může rostlinu ovlivnit nenadálé špatné počasí a jak vůbec na počasí rostlina reaguje?
7. Pokuste se vytvořit stručné shrnutí vašich výsledků do několika vět (bodů), které popíší, to hlavní, co jste zjistili a doplňte to obrazovým schématem, grafem a podobně, který ilustruje hlavní výsledek (například denní aktivitu při špatném a pěkném počasí; inspiруйте se tím, co se nazývá "graphical abstract" v odborných článcích). Tento výstup pak rádi převezmeme do autorského řešení, aby ukazoval nejzajímavější výsledky vašich experimentů.

Úloha 5 (seriálová): Sekvence DNA a její význam pro moderní taxonomii a fylogenetiku.

Autor: Albert František Damaška

Počet bodů: 25

K poznání světa byla vždy velmi významná znalost organismů, které ho obývají. Abychom mohli organismy zkoumat a přemýšlet o nich v kontextu, je třeba vědět, které vlastně existují - a tušit, jaké jsou mezi nimi příbuzenské vztahy. Druhý fenomén, tedy příbuzenské vztahy mezi

jednotlivými druhy a vyššími systematickými skupinami organismů, zkoumá fylogenetika, a jako taková mohla vzniknout až v druhé polovině 19. století. Právě tehdy totiž první myslitelé (v čele s Charlesem Darwinem a Russellem Wallacem) přišli s myšlenkou, že všechny organismy na světě pochází z jednoho společného předka, a jsou si tedy všechny nějak příbuzné. Naopak popis organismů a jejich pojmenování, tedy taxonomie, je disciplínou daleko starší. V současné podobě existuje už od poloviny 18. století, kdy švédský botanik Carl Linné vymyslel přehledný způsob rozřazení druhů organismů do taxonomických kategorií (druh, rod, čeleď, řád, třída, kmen a podobně) a pro každý druh pak zavedl jednoduché označení pomocí dvou jmen, kdy jedno je vlastní rodu (vyšší systematické jednotce než druh), do kterého organismus náleží, zatímco druhé je v rámci daného rodu vlastní pouze příslušnému druhu.

1. I před Linnéem měly samozřejmě organismy svá jména, přestože v jejich pojmenování byl značný nepořádek. Pojmenování živých jsoucenců je totiž potřeba nejen pro vědce, kteří je studují, ale do značné míry i pro všechny ostatní lidi. Pojmenování organismů mohli vnímat lidé jako součást lidského poslání už dávno před naším letopočtem. Pokuste se ve vám dobře známých literárních pramenech najít co nejstarší text, který vyzývá lidi k pojmenování a klasifikaci organismů.

Poté, co se do světa výzkumu biodiverzity vkradly myšlenky evoluční biologie, začali systematictí biologové pátrat po tom, jak jsou si organismy příbuzné. Cílem jejich snažení postupně začalo být vysvětlení jejich evoluce, nalezení jejich předků ve fosilním záznamu, i vysvětlení, jak se vyvíjely které znaky. V současné době se snažíme, aby systematické kategorie, do kterých organismy zařazujeme, odpovídaly jejich příbuznosti a odrážely jejich evoluční původ – proto se snažíme jména přiřazovat pouze celým evolučním liniím, které obsahují hypotetického společného předka a všechny jeho potomky. Takovým skupinám říkáme monofyletické a pátrání po tom, co do které z nich patří, je důvodem toho, proč v poslední době došlo k tolika změnám v systematice organismů. Současní vědci mají totiž vzhledem k technologickému pokroku posledních let při výzkumu organismů k dispozici nástroje, o kterých se předchozím generacím ani nesnilo. Při zkoumání evolučního původu druhů mohou čerpat data nejen z morfologie (jak organismy vypadají), ale i z genomu (tedy přímo ze sekvencí DNA).

2. Přestože sekvenace DNA není pro systematiku organismů nikterak všespásná, a bylo by chybou úplně zapomenout na morfologii, mají genetické znaky oproti morfologickým několik značných výhod. Jmenujte alespoň dvě výhody molekulárních znaků oproti morfologickým a svůj názor vysvětlete.

Genetické metody v systematické biologii umožňují v současnosti nejen fylogenetickou analýzu, ale používají se i pro identifikaci druhů. K tomu slouží tzv. DNA barcoding. Při něm se ze zkoumaného organismu sekvenuje vždy jeden konkrétní lokus (úsek genetické informace), a následně je srovnán se sekvencemi stejného lokusu od známých organismů v genetických databázích. Tímto způsobem můžeme zjistit nejen to, zda je náš organismus novým, dosud neznámým druhem, ale také například, z kterého organismu pochází vzorek tkáně, který jsme odebrali.

3. Jaké lokusy se obvykle používají pro DNA barcoding u živočichů, a jaké u rostlin? Zjistěte nejen, o které konkrétní

ní geny se jedná, ale uveďte také, zda se jedná o geny jaderné, mitochondriální či plastidové.

Práci s genetickými databázemi, která je denním chlebem molekulárního systematika, si můžete velmi snadno vyzkoušet sami, protože veškerá genetická data, která jsou publikována v odborných časopisech, musí být do těchto databází zařazena. Mezi významné databáze barcodingových dat tak patří například evropská databáze BOLD (<https://www.bold-systems.org/index.php>) nebo americká databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), která je rozsáhlejší, a na rozdíl od BOLDu slouží k uchovávání všech, tedy nejen barcodingových genetických dat. Vyhledávání v databázi není těžké – chcete-li získat sekvenci barcodu nějakého organismu, stačí napsat do vyhledávacího pole v záhlaví GenBanku latinský název organismu a klíčové slovo „barcode“ – a získáme výsledky. Pokud jsme naopak již získali sekvenci neznámého původu a chceme ji srovnat s daty v databázi, použijeme k tomu nástroj, který se nazývá BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Protože GenBank je rozsáhlá databáze a obsahuje i data o sekvencích proteinů, musíme nejprve zvolit možnost Nucleotide BLAST. Následně se nám objeví následující screen:

Obr. 16: Webové rozhraní NCBI Blast.

„Zlaté bioinformatické pravidlo“ nám říká, že ať už použijeme jakýkoli webový nástroj, do největšího pole se vkládá sekvence. Proto právě do něj vložíme znění naší neznámé sekvence, případně ho načteme jako soubor ve formátu FASTA (viz dále). Pak už stačí jen vydat se do terénu, získat vzorky, sekvenovat DNA a následně bádat – podobně, jako to udělal Bioslav.

Instant poté, co byly otevřeny zahrádky restaurací, opustil Bioslav po karanténě laboratoř a vydal se do města poohlédnout se po svačině. Pojednou ho u jednoho z okének překvapila vcelku nezvyklá chuť párků. Nenápadně odebral do připravené lahvičky s čistým ethanolem vzorek a po návratu do laboratoře z něj extrahoval DNA. Následně provedl dvě PCR, přičemž jednou použil primery pro barcoding živočišné a jednou pro barcoding rostlinné DNA. Obě reakce PCR byly

úspěšné a na jejich konci se Bioslavovi podařilo amplifikovat úseky DNA potřebné pro barcoding. Oba vzorky proto poslal do sekvenační laboratoře a získal následující sekvence.

```
>BiomilnyB_seq1.fasta
AGTGTGGGGTTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGAC
TTATTATACTCCTGACTATGAAACCAAAGATACTGATATCT
TGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCAGGAGTTCCGCCT
GAAGAAGCAGGTGCCGCGGTAGCCGCCGAATCTTCTACTGG
TACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGTCTTG
ATCGTTACAAAGGGCGATGCTACGGCCTTGAACCTGTTGCT
GGGGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCCTT
AGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACATGTTTACTT
CCATTGTCGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCT
CTACGTCTGGAGGATTTGCGAATCCCTACTGCTTATATTA
AACTTTCCAAGGTCCGCCTCATGGCATCCAAGTTGAGAGAG
ATAAATTGAACAAGTATGGTTCGTCCTTATTAGGATGTACT
ATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAATTATGGTAG
AGCTGTTTATGAATGTCTT
```

```
>BiomilnyB_seq2.fasta
ACCCNNNNNTACTATTTGGAGCCTGAGCGGGAATAGTAGG
CACCGCACTAAGTATTTTAATTCGAGCAGAATTAGGTCAAC
CAGGTGCACTTTTAGGAGATGACCAATTTACAATGTTATC
GTAAGTGGCCATGCTTTTGTATATAATTTTCTTCATAGTAAT
ACCAATAATAATTGGAGGCTTTGGAACTGACTTGTCCAC
TAATAATTGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCACGAATAAAT
AATATAAGTTTTTGACTTCTACCACCATCATTTCTCCTTCT
CCTAGCATCATCAATAGTAGAAGCAGGAGCAGGAACAGGAT
GAACAGTCTACCCACCTCTAGCCGGAATCTAGCCCATGCA
GGAGCATCAGTAGACCTAACAATTTTCTCCCTTCATTTAGC
TGGGGTGTCGTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACCA
CCATTATCAACATGAAACCCCCAGCCATAACACAATATCAA
ACTCCACTATTTGTCTGATCCGTACTTATTACAGCCGTGCT
ACTCCTATTATCACTACCAGTACTAGCCGAGGCATTACTA
TACTACTAACAGACCGCAACCTAAACACAACCTTTCTTTGAC
CCCCTGAGGAGGAGACCCAATTTCTCTACCAACACCTATT
C
```

- Proč Bioslav nepoužil k PCR rovnou kousek párku? Vysvětlete, v čem je lepší DNA izolovat ze vzorku přímo namísto použití kousku materiálu (přestože i to může fungovat).
- Jakým způsobem zjistil Bioslav, že PCR proběhla úspěšně a podařilo se amplifikovat produkt? Jakou metodu sekvenace DNA použili v sekvenační laboratoři pro zpracování vzorků, které Bioslav poslal? Stručně vysvětlete, jak obě metody fungují.
- Hned na začátku druhé sekvenace vypadá na první pohled několik pozic zvláštně – místo písmen označujících baze DNA zde máme několikrát písmeno N. Co to znamená?
Sekvence, které zde vidíte, jsou předloženy ve formátu FASTA. Jedná se o nejjednodušší formát elektronického uložení sekvenčních dat. FASTA je jednoduchý textový soubor s textem sekvenace, kde každá sekvenace je vždy opatřena prvním řádkem s hlavičkou. Hlavička začíná symbolem >, za kterým je uveden název sekvenace. Žádné jiné informace, než hlavičku a samotný text sekvenace, soubor FASTA nenabízí.
- Pomocí nástroje BLAST vyhledejte v databázi GenBank, z jakých organismů byl vyroben párek, jehož neobvyklá chuť přiměla Bioslava k analýze DNA.

Na předchozí krátké úloze jste si vyzkoušeli, jak může vypadat jednoduchá taxonomická práce s genetickými daty. V praxi je ale samozřejmě využití molekulárních dat v systematice organismů mnohem složitější a širší možnosti, kde nám mohou pomoci, je mnohem větší. Na základě genetických dat můžeme například, jak jsme již naznačili výše, provést fylogenetickou analýzu. V takovém případě použijeme jednotlivé pozice v genomu jako znaky, a na základě toho, jak se od sebe v sadě genetických znaků organismy liší, se následně pomocí sofistikovaných analýz pokusíme odvodit jejich evoluční historii.

- Abychom mohli vůbec sekvenace srovnávat, je nutné nejprve ze všech sekvencí, které máme pro analýzu k dispozici, provést tzv. alignment. Zjistíte, co to je, a proč je to tak nesmírně důležité. U kterých úseků DNA bude nejspíš alignment jednoduchý, a u kterých naopak složitý?

Ani poté, co jsme provedli alignment, ale nemáme vyhráno. Pokud z našich genetických dat chceme zjistit fylogenezi organismů, ze kterých jsme je získali, čeká nás ještě dlouhá cesta, vždy navíc s nejistým cílem. Nejprve musíme mít důvod myslet si, že geny, které jsme pro analýzu vybrali, ponese fylogenetický signál, tedy, že jejich analýzou skutečně můžeme fylogenezi zjistit. Dále je třeba pro analýzu zvolit vhodnou metodu. Ani u těch nejlepších dat totiž ke kvalitním výsledkům zpravidla nepovede prosté srovnání toho, jak jsou si jednotlivé sekvenace podobné. Na některých pozicích totiž mohlo dojít k více záměnám (substitucím – tedy mutacím, při kterých se jedna báze změnila v jinou). My však vidíme jen stav po poslední z těchto záměn – přestože se nám tedy zdá, že došlo k jedné (či žádné) záměně, ve skutečnosti může daná pozice mít za sebou bouřlivou evoluci.

- Popište, jaké vlastnosti by například měl mít gen, který ponese fylogenetický signál. Při rozhodování pomněte veličiny, jako je mutační rychlost, samotný vzhled sekvenace (z jakých je bází) či třeba selekční tlak, pod kterým gen je.
- Vzhledem ke struktuře a funkci DNA nejsou všechny záměny stejně pravděpodobné – k některým dochází zkrátka mnohem snáze a častěji, než k jiným. Před sebou vidíte alignment dvou sekvencí, ve kterém je vyznačeno několik záměn, ke kterým během evoluce obou organismů došlo. Sekvence jsou protein-kodující, první pozice v alignmentu je zároveň první pozicí v kodonu. Seřaďte záměny od nejpravděpodobnější po nejméně pravděpodobnou a své rozhodnutí vysvětlete. Při rozhodování nezapomeňte použít tabulku genetického kódu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	C	C	G	T	A	G	T	C	T	T	G	A	G	G	
A	C	T	G	T	T	C	T	C	T	A	G	A	G	C	

Metody, kterými se pokoušíme dopátrat se fylogenetických stromů, jsou často velmi složité a jejich vysvětlení je rozhodně nad rámec této úlohy. Podívejme se tu však alespoň na některé problémy, se kterými se molekulární fylogenetik při své práci potýká. Jeden z nich jsme si zde již představili – jde o nesprávný výběr genů pro analýzu, přesněji výběr genů s nedostatečným fylogenetickým signálem. V současné době překotného technického rozvoje se tak stává stále jednodušším tento problém částečně obejít použitím extrémně velkého množství genů, případně rovnou celých genomů. Takové analýze pak říkáme fylogenomika. Problémem v analýze ale

může být i nedostatečný či nevhodný sampling, tedy výběr druhů, které jsme do analýzy zařadili. Když už pak fylogenetický strom konečně získáme, je vždy nezakořeněný, to znamená, že v něm nevidíme, jakým směrem se evoluce ubírala. Proto jej musíme zakóřenit, a to tak, že do analýzy zahrneme také genetická data z organismů, které nepatří do skupiny, kterou zkoumáme. Linie, které nepatří do naší zkoumané skupiny, ale vně, pak označíme jako outgroup a místo, kde je outgroup umístěn ve fylogenetickém stromě, pak budeme považovat za jeho kořen.

11. Sekvenace celých genomů probíhá výrazně jiným způsobem než sekvenace jednotlivých lokusů DNA. Jmenujte 2 z metod sekvenace DNA, které se v současnosti používají k sekvenaci celých genomů. Která z těch, které jste jmenovali, je v současnosti nejlevnější?

12. Pokud zkoumáme fylogenezi skupiny s malým počtem druhů (jako jsou například medvědi), je nejlepší sampling takový, kdy do analýzy zahrneme data ze všech známých druhů. Pokud však zkoumáme skupinu komplikovanější, s větším až obřím počtem druhů (jako jsou například mandelinkovití brouci, motýli, cévnaté rostliny či eukaryota) zařadit všechny známé druhy je nejen technicky nemožné, ale mohlo by to do analýzy dokonce vnést šum. Představte si, že jste od školitele dostali za úkol ve své diplomové práci rámcově zjistit fylogenezi tesaříkovitých brouků (Cerambycidae). Klasická systematika této skupiny je velmi dobře zpracována a na základě dostupných informací se zdá, že všechny hlavní skupiny tesaříků by mohly být monofyletické. Protože jste ale dostali za úkol provést analýzu fylogeneze na základě sekvencí celých genomů (což je velmi drahé) a máte jen omezený rozpočet, můžete do své analýzy zařadit jen 10 druhů. Pokuste se navrhnout, které druhy tesaříků do analýzy zařadíte. Nebojte se, pokud neznáte systematiku tesaříků – její přehled najdete například zde <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id10991/>. Vysvětlíte, proč jste zvolili právě ty druhy, které jste zvolili.

13. Bioslav získal v letošním roce mnoho výzkumných grantů, ale nemožnost během koronavirové krize vycestovat do tropů způsobila, že bude mít problém rozpočet utratit. Jelikož neutracený rozpočet vadí grantové agentuře mnohem více než rozpočet utracený na něco jiného než původní výzkumný cíl, rozhodl se Bioslav v rámci karantenní prokrastinace zjistit fylogenezi pásnic (Nemertea), jejichž vzorky měl ze svých zámořských cest již dlouho v mrazáku. Když Bioslav z pásnic získal potřebná genetická data, začal se rozhodovat, jakými outgroupy skupinu zakóřenit. V nabídce měl genetická data z následujících organismů: háďátko (*Caenorhabditis elegans*), hlemýžď zahradní (*Helix pomatia*), lípa srdčitá (*Tilia cordata*), bakterie *Escherichia coli*, žížala obecná (*Lumbricus terrestris*), mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*), člověk (*Homo sapiens*), koronavirus SARS-CoV-2, trepka velká (*Paramecium caudatum*). Z těchto organismů si vybral dva. Které z nabízených organismů si Bioslav pro zakóření fylogeneze pásnic zvolil a proč jsou ostatní organismy nevhodné? Co by se mohlo stát, kdyby Bioslav zvolil pro zakóření své fylogeneze některý z nich?

V předchozích úkolech jsme si ukázali některá úskalí molekulární fylogenetiky a mnohé možnosti, které nám přináší. Řadu dalších problémů, se kterými se molekulární fylogeneze potýká, tu již prostudovat nestihneme – je to nad rámec této úlohy. Zároveň z této úlohy vidíte, že cesta za vysvětlením evoluce organismů není nikdy u konce, protože jsme zatím velmi daleko od toho, abychom získali všechna dostupná data od všech organismů. Ani pak ale hotovi nebudeme – i možnosti současných analýz jsou jen omezené a fylogenezi některých skupin organismů možná nedokážeme řádně rozklíčovat nikdy.

14. Najděte a vysvětlíte nějaký evoluční fenomén, který v historii nějaké linie mohl vést k tomu, že molekulární systematika nepovede k plnému rozřešení fylogeneze.

