

Praktická úloha č. 2 (90 minút, 45 bodov)**Téma: Molekulárna biológia – Aktívny transport v bunkách kvasiniek**

Fermentácia alfa-glukozidov (maltóza, maltotrióza) kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* je esenciálny proces napríklad pre odvetvia vinárstva a pekárstva. Metabolizmus alfa-glukozidov vyžaduje ich transport cez bunkovú membránu (ktorým sa zaoberá táto úloha) a následnú hydrolýzu v cytoplazme. Touto hydrolýzou vzniká glukóza, ktorá vstupuje do glykolýzy.

Nasledujúci experiment ilustruje princípy transportu alfa-glukozidov v bunkách kvasiniek. V experimente využijeme substrát *p*NPαG, ktorý sa štruktúrne podobá prirodzeným substrátom, a preto je rovnakým spôsobom transportovaný do bunky. Zároveň jeho rozštiepením v bunke vzniká produkt nazývaný *p*-nitrofenol, ktorého prítomnosť môžeme spektrofotometricky stanoviť. V praktickej úlohe využijete tento princíp na odlíšenie vzorky obsahujúcej substrát od kontroly, ktorá obsahuje len destilovanú vodu.

1. úloha: Pozorovanie aktívneho transportu alfa-glukozidov v kvasinkách

Pomôcky: Rukavice, nezmývateľná fixka, milimetrový papier, 2 mikroskúmavky, stojan na skúmavky, 2 skúmavky so 730 µl kvasinkovej suspenzie (suspenzia pozostáva zo 140 mg buniek v 50 mM sukcinátovom tmivom roztoku (pH 5.0)), 2 skúmavky na testovanie označené A a B – jedna z nich obsahuje roztok 40 mM *p*NPαG, druhá destilovanú vodu (NIE nevyhnutne v tomto poradí); mikropipety a zodpovedajúce špičky, nádoby na pevný a tekutý odpad, vortex (aspoň 1 pre každých štyroch súťažiacich)

Spoločné prístroje: Centrifúga, spektrofotometer, termoblok

Upozornenie: Postup obsahuje časované kroky, odporúčame začínať až po prečítaní všetkých.

1. Čisté mikroskúmavky si označte písmenami A a B a vaším číslom. Rovnako označte skúmavky s kvasinkovou suspenziou.
2. Napipetujte do skúmaviek s kvasinkovou suspenziou 430 µl vzorky na testovanie (do jednej A, do druhej B).
3. Ihneď po pridaní vzorky suspenzie sekundu vortexujte a následne ich odneste do termobloku, kde v nich bude reakcia prebiehať 35 minút pri teplote 30 °C. Nezabudnite si v tomto a ďalších časovaných krokoch odpísať presný čas z projektora, aby ste si vedeli odsledovať dobu trvania.
4. Po uplynutí 35 minút vzorky umiestnite do druhého termobloku pri teplote 95 °C na 10 minút.
5. Po uplynutí 10 minút umiestnite vzorky do stojana a nechajte schlaďiť na izbovú teplotu.
6. Po ochladení vzorky centrifugujte 1 minútu pri 3000 × *g* a odpipetujte supernatant do skúmaviek označených vaším číslom.
7. Odovzdajte skúmavky so supernatantom vedúcemu úlohy na spektrofotometriu. Hodnoty absorbancie oboch vzoriek si odpíšete zo spektrofotometra a napíšete do

odpovedového hárku spolu s určením, ktorá vzorka patrí bunkám narasteným na ktorom médiu.

Vyhodnotenie experimentu:

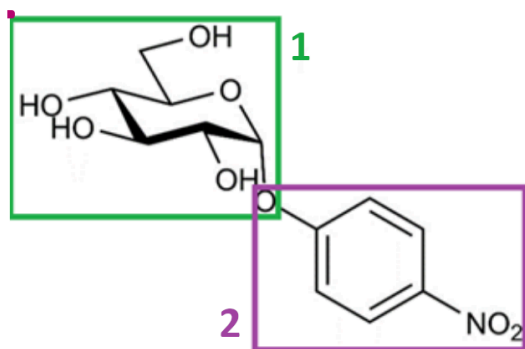
1.1. Uvedte do odpovedového hárku namerané hodnoty absorbancie.

1.2. Určte, ktorá vzorka obsahovala destilovanú vodu a ktorá pNPαG.

2. úloha: Analýza postupu a použitých chemikálií

2.1. Napíšte koncentráciu pNPαG, ktorú obsahovala suspenzia po pridaní vzorky s ním. Zaokrúhľte na dve desatinné miesta.

2.2. Na obrázku je vzorec pNPαG, molekuly skladajúcej sa z dvoch významných celkov označených 1 a 2. Po transporte do bunky je molekula rozštiepená a jedna z jej častí spôsobí nami merateľné zafarbenie roztoku. Označte správne tvrdenia:



a) Bunkou je metabolizovaná časť 2.

b) Pri interakcii s receptormi bunky je dôležitá chiralita časti 1.

c) Táto molekula obsahuje glykozidovú väzbu.

d) Ak má byť zafarbenie priamo úmerné transportu, je dôležité, aby štiepenie prebiehalo rýchlejšie alebo rovnako rýchlo než prenikanie molekúl do bunky.

3. úloha: Počítanie kvasiniek pod mikroskopom

Kedže v ďalšej úlohe budete počítat', aká je rýchlosť transportu pNPαG do bunky, potrebujete najprv získať údaj, koľko buniek sa nachádza v objemovej jednotke kvasinkovej suspenzie. Pre tento účel budete počítat' bunky kvasiniek pod mikroskopom v tzv. Bürkerovej komôrke.

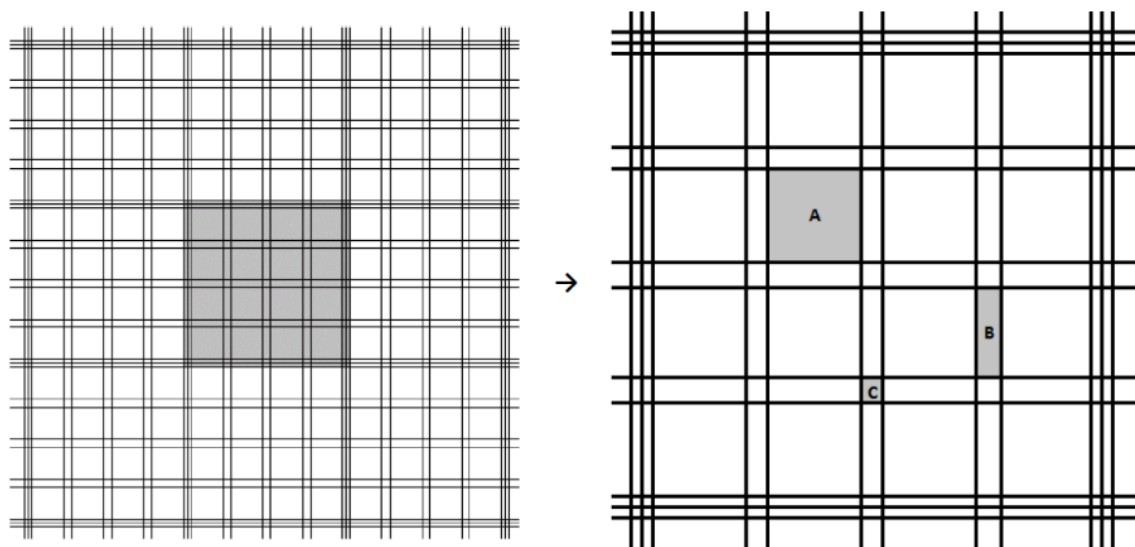
Pomôcky: Mikroskop, Bürkerova komôrka, krycie sklíčko, suspenzia buniek v mikroskúmvke (zriedená 10-krát oproti suspenzii z úlohy 1) označená Z, mikropipety a zodpovedajúce špičky, vortex.

Postup:

1. Na komôrku položte krycie sklíčko a jemne ho zaistite skrutkami.
2. Suspenziu buniek pár sekúnd vortexujte, aby bola homogénna.
3. Napipetujte 10 µl suspenzie do jednej z počítacích plôch tak, že špičku pipety opriete o okraj krycieho sklíčka. Pipetujete pomaly, pričom suspenzia by sa mala rovnomerne rozprestrieť na počítacej ploche pod krycím sklíčkom. Vyvarujte sa vzniku bublín.
4. Pozorujte pod mikroskopom pri celkovom zväčšení 400x.

Počítanie v Bürkerovej komôrke:

- Pre vyššiu presnosť spočítajte bunky v desiatich rôznych útvaroch B (viď obrázok) a výsledky spriemerujte.
- Do celkového počtu buniek v útvere sa počítajú tie, ktoré ležia celou plochou vnútri a tie, ktoré ležia na pravej alebo hornej strane útvaru. Bunky, ktoré ležia na ľavej alebo dolnej strane útvaru sa do celkového počtu nerátajú. V prípade pučiacich buniek sa ako samostatné bunky rátajú len púčiky, ktoré majú približne aspoň $\frac{1}{3}$ veľkosti materskej bunky.
- Objem útvaru B je $0,001 \text{ mm}^3$.

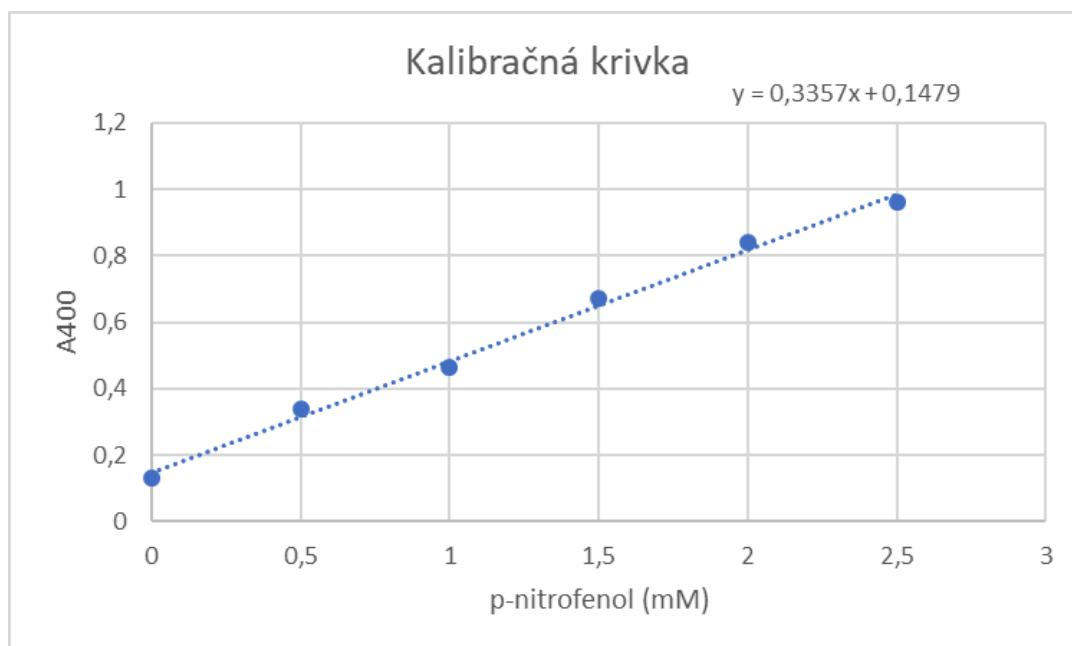


Zapíšte priemerný počet buniek v jednom útvere B a vypočítanú koncentráciu buniek v pôvodnej, nezriedenej suspenzii z úlohy 1 do odpovedového hárku.

4. úloha: Zisťovanie rýchlosti transportu na základe kalibračnej krivky.

Na konci prvej úlohy ste získali absorbanciu vašich neznámych vzoriek. Ak by ste odobrali niekoľko vzoriek v určitých časových intervaloch, mohli by ste určiť, ako sa v čase mení koncentrácia farebného produktu a určiť rýchlosť transportu. To bude teraz vašou úlohou na základe vopred pripravených dát.

V nasledujúcom grafe je tzv. *kalibračná krivka*, ktorá vyjadruje závislosť absorbancie od koncentrácie farebného produktu. Získali sme ju meraním absorbancie série vzoriek tejto látky so známou koncentráciou.



4.1. Biológ Dežo uskutočnil pokus ekvivalentný tomu z úlohy 1 (využívajúc rovnaký postup a materiály, ale odlišnú kvasinkovú suspenziu s 2×10^7 bunkami na ml) s tým rozdielom, že nechal viacero vzoriek obsahujúcich kvasinky aj substrát inkubovať rôzne dlho. S využitím kalibračnej krivky odčítajte, aká koncentrácia produktu zodpovedá hodnotám absorbancie v tabuľke z odpovedového hárku. Zaokrúhlite na dve desatinné miesta.

4.2. Na milimetrový papier vytvorte graf aktívneho transportu skúmanej látky kvasinkami vo vzorke za prebehnutý čas. Čas vyneste v sekundách a koncentráciu transportovanej látky v mM. Na milimetrový papier uveďte svoje súťažné číslo a odovzdajte ho spolu s riešením.

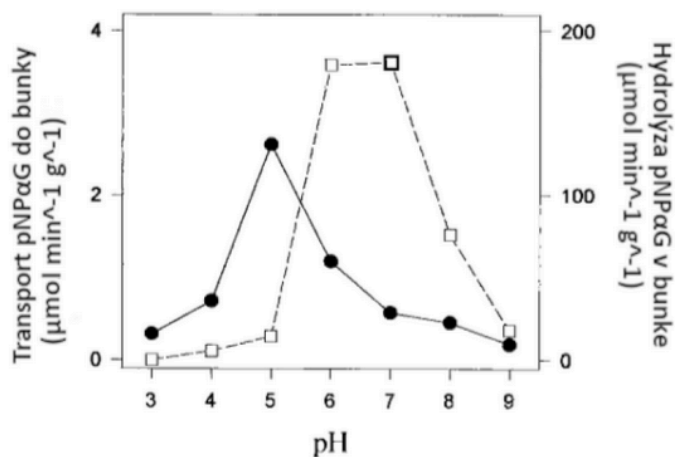
4.3. Z grafu vypočítajte rýchlosť stúpania koncentrácie vo vzorke v $\mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$. Zaokrúhlite na 2 desatinné miesta.

4.4. Vypočítajte rýchlosť transportu na jednu bunku *S. cerevisiae* v $\mu\text{mol} \times \text{bunka}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Počítajte s objemom 1,16 ml (730 μl suspenzia + 430 μl substrát), vami vypočítanou rýchlosťou stúpania koncentrácie a uvedenou koncentráciou buniek v suspenzii. Zaokrúhlite na 2 desatinné miesta.

5. úloha: Mechanizmus transportu

Na objasnenie mechanizmu transportu boli vykonané ďalšie podobné experimenty.

5.1 V prvom z nich (čierne krúžky v grafe nižšie) sa študoval vplyv pH na transport pNPαG do bunky. Experiment prebiehal tak, ako ste ho robili vy, ale v médiách s rôznym pH. V druhom experimente (biele štvorčeky) bola vykonaná séria meraní na zistenie pH optima hydrolýzy pNPαG v bunkách. V tomto prípade boli použité kvasinky s permeabilizovanou cytoplazmatickou membránou, do ktorých môže pNPαG pasívne vstupovať. Výsledky vidíte v priloženom grafe. Označte správne tvrdenia:



Určenie pH optima pre transport (krúžky) a hydrolyzu (štvorčeky) pNPαG.

- Pokles rýchlosti transportu pri pH nižšom ako optimum môže súvisieť s izoelektrickými bodmi aminokyselín transportného proteínu.
- pH cytosolu kvasiniek sa pohybuje medzi 6 a 7.
- Hydrolyza pNPαG môže prebiehať v lyzozómoch.
- Pri pH približne 5,2 experiment z úlohy 4 nefungoval.

5.2. Ďalej bola rovnako ako v úlohe 5.1 meraná hydrolyza pNPαG bežnými bunkami s nepoškodenou cytoplazmatickou membránou a permeabilizovanými bunkami s pridaním rôznych látok:

- pCMPS** – denaturuje niektoré proteíny nevratnou reakciou s ich cysteínovými zvyškami
- DCC** – inhibítor protónových púmp (H^+ P-ATPázy pumpujú H^+ von z bunky)
- FCCP** – umožňuje voľný prechod vodíkových kationov cez plazmatickú membránu

Permeabilizovanie buniek umožňuje voľný prechod všetkých uvedených molekúl cez membránu. pH zmesi s permeabilizovanými bunkami bolo však udržiavané neutrálne (pH = 7).

Pridaná látka	Aktivita buniek	Aktivita permeabilizovaných buniek
Kontrola	2.63 ± 0.24	192.5 ± 9.5
pCMPS	0.56 ± 0.01	25.6 ± 1.9
DCC	0.29 ± 0.02	186.1 ± 7.2
FCCP	1.23 ± 0.05	182.3 ± 8.6

Tabuľka nameranej hydrolyzy pNPαG ($\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{s}^{-1}$).

Čo vyplýva z týchto dát?

- Na hydrolyzu pNPαG je potrebné ATP.
- Aktivita protónových púmp je potrebná na transport pNPαG.
- Protónové pumpy obsahujú cysteínové zvyšky.
- Krok hydrolyzy pNPαG je rýchlejší než transport do bunky.

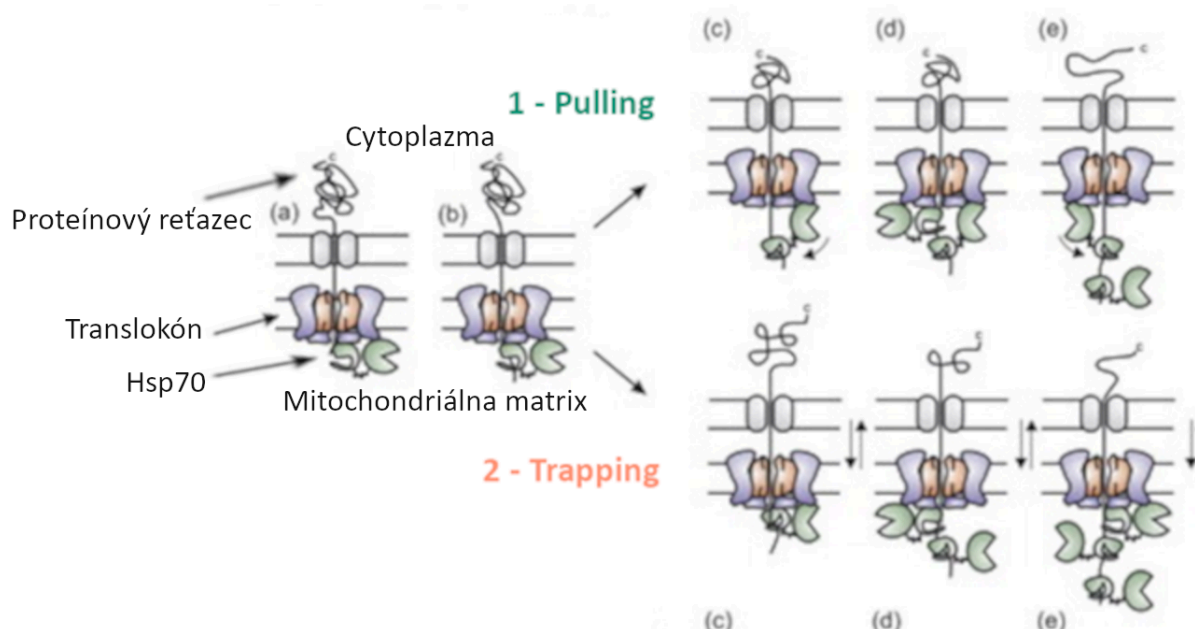
5.3. Čo by sa stalo ak by sme pridali malé množstvo NaHCO_3 (zásada) nie na konci, ale spolu s $p\text{NP}\alpha\text{G}$?:

- a) Zvýšila by sa spotreba ATP bunky.
- b) Zvýšila by sa efektívnosť enzymatickej hydrolýzy (pH optimum).
- c) Znížila by sa rýchlosť transportu.
- d) Zvýšil by sa elektrochemický gradient H^+ medzi bunkou a vonkajškom.

6. úloha: Iné typy transportu

Transport proteínov cez membrány je (napr. kvôli ich veľkosti) zložitejší, než transport malých molekúl. Proteíny transportované do mitochondrií prechádzajú cez špecializované proteínové komplexy na mitochondriálnych membránach, tzv. translokóny. Translokóny využívajú na presun proteínových reťazcov do vnútra mitochondrie prirodzené bunkové deje a spoluprácu iných faktorov, ako je napríklad proteín Hsp70. Vďaka termodynamickým procesom v bunke vykonávajú reťazce proteínov spontánny pohyb, ako aj spontánny folding/unfolding (skladanie/rozkladanie), pričom cez translokón dokážu prejsť len v „unfolded“ (rozloženej) konformácii. Boli navrhnuté dva spôsoby ako by v tomto procese mohol byť zapojený Hsp70 (viď schéma nižšie):

- **Pulling:** Hsp70 sa zvnútra mitochondrie naviaže na úsek proteínu tesne pri membráne a prejde konformačnou zmenou, ktorá ho od nej odsunie. Tým stimuluje unfolding preproteínu a jeho vťahnutie do vnútra mitochondrie.
- **Trapping:** Hsp70 sa zvnútra mitochondrie naviaže na úsek proteínu tesne pri membráne a len pasívne bráni jeho spätnému vysunutiu.



6.1. V nasledujúcej tabuľke vidíte niekoľko rôznych experimentov, ktoré by sa dali použiť na testovanie uvedených hypotéz. Vašou úlohou je rozhodnúť, ako by sa v prípade, že daná hypotéza platí, zmenila rýchlosť transportu proteínov do mitochondrií. Majte na pamäti, že pulling a trapping hypotéza sa vzájomne nevylučujú. Pre každý z experimentov uveďte do

príslušného políčka tabuľky, či by sme očakávali zrýchlenie (označte "+"), spomalenie (-), alebo rovnakú rýchlosť transportu (=).

Experiment	rýchlosť transportu	
	Ak pulling platí	Ak trapping platí
Transport takých proteínových reťazcov do mitochondrií, na ktorých mechanický unfolding je potrebná omnoho väčšia sila ako pri iných proteínoch.		
Nahradenie Hsp70 jeho mutantnou verziou, ktorá sa od transportovaného proteínu častejšie odpojí.		
Nahradenie Hsp70 protilátkami voči transportovanému proteínu.		
Nahradenie Hsp70 iným proteínom, ktorý má rovnaké väzobné a mechanické vlastnosti, ale je menší než priemer translokónu.		

KONIEC PRAKTICKEJ ÚLOHY

Číslo súťažiaceho:

Biologická olympiáda

Ročník: 60.

Školský rok: 2025/2026

Kolo: Celoštátne

Kategória: A

Teoreticko-praktická časť

Praktická úloha č. 2 (45 bodov, 90 minút)

Téma: Molekulárna biológia - Aktívny transport v bunkách kvasiniek

Odpoveďový hárok

Úloha 1:

1.1

Absorbancia vzorky A: _____

Absorbancia vzorky B: _____

1.2.

	pNPαG	Destilovaná voda
Vzorka A		
Vzorka B		

Úloha 2:

2.1:

Koncentrácia pNPαG vo finálnej suspenzii je _____ mM.

2.2:

A	B	C	D

Úloha 3:

Priemerný počet buniek v jednom útvare B je _____.

Koncentrácia buniek v **pôvodnej, nezriedenej** suspenzii je _____ buniek × ml⁻¹.

Úloha 4:

4.1. Tabuľka absorbancie koncentrácie vzoriek:

	15 min	60 min	75 min	90 min	120 min
A ₄₀₀	0,194	0,387	0,451	0,519	0,644
c (mM)					

Číslo súťažiaceho:

4.2. Graf na milimetrovom papieri odovzdajte spolu s týmto odpovedovým hárkom.

4.3. Rýchlosť stúpania koncentrácie je _____ $\mu\text{M} \times \text{s}^{-1}$.

4.4. Rýchlosť transportu do bunky je _____ $\mu\text{mol} \times \text{bunka}^{-1} \times \text{s}^{-1}$.

Úloha 5:

	A	B	C	D
5.1				
5.2				
5.3				

Úloha 6:

6.1:

Experiment	Rýchlosť transportu	
	Ak platí pulling	Ak platí trapping
Transport takých proteínových reťazcov do mitochondrií, na ktorých mechanický unfolding je potrebná omnoho väčšia sila ako pri iných proteínoch.		
Nahradenie Hsp70 jeho mutantnou verziou, ktorá sa od transportovaného proteínu častejšie odpojí.		
Nahradenie Hsp70 protilátkami voči transportovanému proteínu.		
Nahradenie Hsp70 iným proteínom, ktorý má rovnaké väzobné a mechanické vlastnosti, ale je menší než priemer translokónu.		