

55 Olimpiada Biologiczna

Pracownia 201/A – arkusz zadań

Czas trwania: 90 minut

Liczba punktów: 30

Rozwiązując zadania, możesz korzystać z wymienionego poniżej oprogramowania:

- ApE
- AliView
- Chimera
- domyślne składniki systemu operacyjnego, np. kalkulator, notatnik.

W każdym zadaniu samodzielnie wybierz odpowiedni program lub programy. Metoda rozwiązania zadania nie będzie oceniana, tzn. liczy się wyłącznie końcowy wynik.

Odpowiedzi **zapisz w pliku „odpowiedzi.txt”, w pustej linii pod numerem zadania**.

Uwaga!

- **Nie dodawaj dodatkowych wierszy w pliku i nie dodawaj nowych znaków do niepustych wierszy.**
- **Nie zmieniaj nazwy pliku „odpowiedzi.txt”.**
- **Sekwencje nukleotydowe zawsze zapisuj w orientacji 5'→3'.**
- **Sekwencje aminokwasowe zawsze zapisuj w orientacji od końca N do końca C.**

Fragment pliku „odpowiedzi.txt” przed udzieleniem odpowiedzi:

Zadanie 1.:

Zadanie 2.1.:

Zadanie 2.2.:

Zadanie 2.3.:

Zadanie 3.:

Fragment pliku „odpowiedzi.txt” po udzieleniu przykładowych odpowiedzi:

Zadanie 1.:

XYZ

Zadanie 2.1.:

ATCG

Zadanie 2.2.:

ATCG

Zadanie 2.3.:

ATCG

Zadanie 3.:

0

W katalogu „pliki” znajduje się siedem plików.

nazwa pliku	format	rodzaj	opis
AP029060_fragment.fasta	Fasta	DNA	Fragment genomu <i>Paludibacterium flexuosum</i>
dnaJ_Ecoli.fasta	Fasta	DNA	Otwarta ramka odczytu kodująca białko DnaJ u <i>Escherichia coli</i>
DnaJ.fasta	Fasta	białko	Zbiór dziewięciu sekwencji aminokwasowych białka DnaJ
DnaJ_aln.fasta	Fasta	białko	Przyrównane sekwencje z pliku DnaJ.fasta
AF-P08622-F1-model_v6.pdb	PDB	białko	Przewidywana przez AlphaFold struktura całego białka DnaJ <i>E. coli</i>
1BQ0_1.pdb	PDB	białko	Doświadczalnie określona struktura części białka DnaJ <i>E. coli</i> obejmująca całą domenę J
1EXK_1.pdb	PDB	białko	Doświadczalnie określona struktura części białka DnaJ <i>E. coli</i> zawierająca wszystkie motywy CXXCXGXG

Instrukcje obsługi programów

ApE

- Menu Edit
 - Find... – wyszukiwanie sekwencji.
 - Cut, Copy i Paste – „wytnij”, „kopiuj” i „wklej”.
 - Cut Rev-Com, Copy Rev-Com i Paste Rev-Com – „wytnij”, „kopiuj” i „wklej”, które podczas wykonywania tych czynności zmieniają sekwencję na odwrotnie-komplementarną.
 - Reverse-Complement – zmiana wybranej sekwencji na odwrotnie komplementarną.
- Menu ORFs
 - Find Next – wyszukuje następną otwartą ramkę odczytu.
 - Find Previous – wyszukuje poprzednią otwartą ramkę odczytu.
 - ORF Starts With – należy wykorzystać opcję Met.
 - Search Strand – określa nić DNA, w której będzie wyszukiwana otwarta ramka odczytu – Top: sekwencja w pliku; Bottom: sekwencja odwrotnie-komplementarna w stosunku do sekwencji w pliku; Both: obie sekwencje, zarówno Top, jak i Bottom
 - Minimum bp – minimalna długość otwartej ramki odczytu.
 - Translate – translacja *in silico* zaznaczonego fragmentu sekwencji.
 - Code – 1 Letter: jednoliterowe oznaczenia aminokwasów; 3 Letter: trzyliterowe oznaczenia aminokwasów.
 - Line numbers – None: brak oznaczeń pozycji reszt aminokwasowych; Left: oznaczenia pozycji tylko po lewej stronie; Right: oznaczenia pozycji tylko po prawej stronie; Both: oznaczenia pozycji po obu stronach.
 - DNA – None: brak sekwencji nukleotydowej; Above: sekwencja nukleotydowa nad sekwencją aminokwasową; Below: sekwencja nukleotydowa pod sekwencją aminokwasową.
- Menu Tools
 - Align sequences... – przyrównuje sekwencje nukleotydowe.
 - Reference sequence – należy wybrać sekwencję, do której inna sekwencja lub inne sekwencje będą przyrównywane.
 - Align to Windows – należy wybrać sekwencję, która będzie przyrównywana do sekwencji referencyjnej (w przypadku wyboru kilku sekwencji należy je wybrać, trzymając klawisz „control” na klawiaturze).
- Menu Help
 - Standard Genetic Code – wyświetla tabelę kodu genetycznego.
 - Amino Acid Info – wyświetla wzory aminokwasów wraz z jedno- i trzyliterowymi oznaczeniami oraz masą cząsteczkową.

AliView

Na dolnym pasku wyświetla się wybrana pozycja w sekwencji – Pos: pozycja w przyrównaniu (wliczane są wprowadzone przerwy); Pos (ungapped): pozycja w pierwotnej sekwencji (przerwy nie są wliczane).

- Menu Edit
 - Add sequences from file – dodaje kolejną sekwencję albo kolejne sekwencje z pliku w formacie Fasta.
 - Find – wyszukuje sekwencję, którą należy wpisać do okienka znajdującego się w prawym górnym rogu. W przypadku dowolnej reszty aminokwasowej należy wpisać kropkę. Przykładowo sekwencja „A...C” będzie oznaczać „alanina – trzy dowolne reszty aminokwasowe – cysteina”.
Naciśnięcie klawisza „enter” na klawiaturze służy do wyszukania kolejnej sekwencji spełniającej kryteria wyszukiwania.
- Menu View
 - Highlight consensus characters – kolorami zaznacza pozycje, które są konserwowane ewolucyjnie.

Chimera

- Tools
 - Structure Comparison
 - MatchMaker – dopasowuje struktury przestrzenne do siebie. W „Reference structure:” należy wybrać strukturę, która będzie matrycą, a w „Structure(s) to match:” należy wybrać strukturę lub struktury, które będą dopasowane do matrycy. W celu wybrania więcej niż jednej sekwencji należy przytrzymać klawisz „control” na klawiaturze.
 - Sequence
 - Sequence – wyświetla sekwencję aminokwasową białka. Zakreślenie wybranej sekwencji będzie powodowało oznaczenie korespondujących reszt aminokwasowych w wyświetlonej strukturze białka.

Wstęp do zadania

DnaJ to bakteryjne białko opiekuńcze z rodziny Hsp40 (ang. *heat shock protein 40*) o masie cząsteczkowej wynoszącej około 40 kDa, współdziałające z białkiem DnaK (Hsp70), kodowane przez gen *dnaJ*. Białko DnaJ rozpoznaje nieprawidłowo sfałdowane lub częściowo rozfałdowane białka, wiąże się z nimi i przekazuje je do układu chaperonowego, ułatwiając ich prawidłowe fałdowanie lub ponowne fałdowanie po stresie oraz zapobieganie agregacji. Charakterystyczną cechą DnaJ jest obecność domeny J, która stymuluje aktywność ATPazową DnaK. Te białka odgrywają ważną rolę zwłaszcza w odpowiedzi komórki na stres cieplny i inne warunki uszkodzające białka.

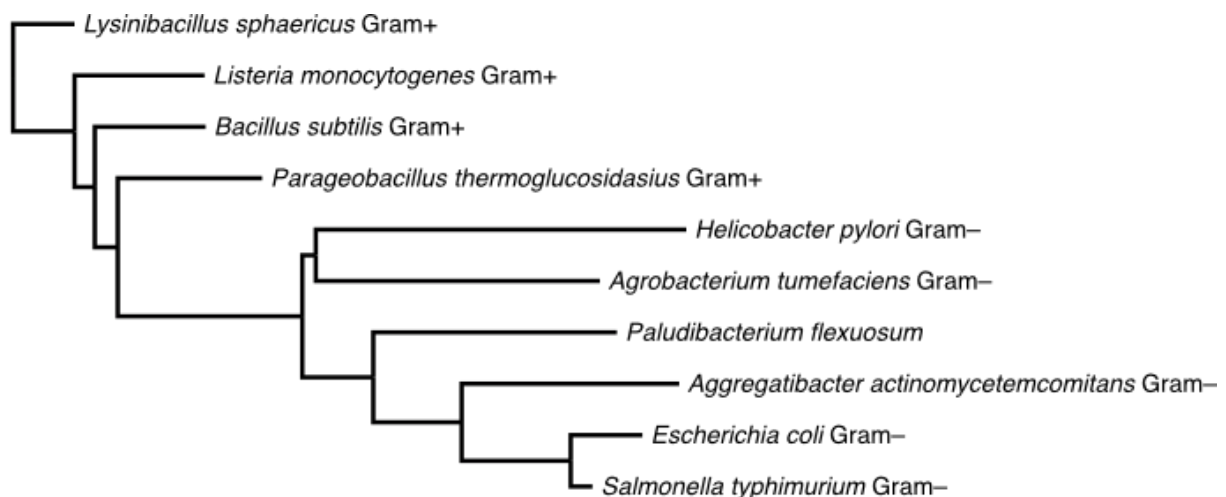
Domena J to charakterystyczny, silnie konserwatywny fragment DnaJ, odpowiedzialny za funkcjonalną współpracę DnaJ z DnaK. Zwykle ma około 70 aminokwasów, a najważniejszą cechą jest obecność silnie konserwowanego ewolucyjnie motywu HPD (histydyna–prolina–asparaginian), który jest kluczowy dla aktywności biologicznej tej domeny. Jest to motyw umożliwiający kontakt DnaJ z DnaK i stymulujący aktywność ATPazową tego chaperonu.

W strukturze pierwszorzędowej DnaJ występuje dodatkowo motyw: CXXCXGXG (C – cysteina, G – glicyna, X – dowolny aminokwas). Ten motyw uczestniczy w koordynacji Zn^{2+} w białku DnaJ i wspomaga jego oddziaływanie z niesfałdowanymi białkami.

W 2026 r. opisano nowy gatunek bakterii – *Paludibacterium flexuosum* sp. nov., w którego genomie również zidentyfikowano gen kodujący białko DnaJ.

Zadanie 1. (3 pkt.)

Poniżej przedstawiono drzewo filogenetyczne wybranych bakterii, w tym *Paludibacterium flexuosum*, otrzymane na podstawie sekwencji 16S rRNA. Przy nazwach gatunkowych podano, czy dany gatunek należy do grupy bakterii Gram-dodatnich (Gram+), czy – Gram-ujemnych (Gram–).



Określ, czy następujące wnioski są uprawnione na podstawie przedstawionego drzewa filogenetycznego. Wpisz T, jeśli wniosek jest uprawniony, albo N – jeśli nie jest uprawniony.

1.	Ostatni wspólny przodek <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella typhimurium</i> był najprawdopodobniej bakterią Gram-dodatnią.	T	N
2.	<i>Paludibacterium flexuosum</i> jest z wysokim prawdopodobieństwem bakterią Gram-ujemną.	T	N
3.	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> jest bliżej spokrewniony z <i>Helicobacter pylori</i> niż z <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .	T	N

Zadanie 2.

Znajdź we fragmencie genomu *P. flexuosum* otwartą ramkę odczytu kodującą białko DnaJ.

Uwaga: Nie zmieniaj orientacji sekwencji w pliku AP029060_fragment.fasta.

Zadanie 2.1. (2 pkt.)

Podaj sekwencję startera *forward* o długości 20 nukleotydów, który pozwoli zamplifikować metodą PCR wyłącznie pełną otwartą ramkę odczytu kodującą białko DnaJ u *P. flexuosum*. Starter *forward* wyznacza lewy kraniec amplifikowanej sekwencji.

Zadanie 2.2. (2 pkt.)

Podaj sekwencję startera *reverse* o długości 20 nukleotydów, który pozwoli zamplifikować metodą PCR wyłącznie pełną otwartą ramkę odczytu kodującą białko DnaJ u *P. flexuosum*. Starter *reverse* wyznacza prawy kraniec amplifikowanej sekwencji.

Zadanie 2.3. (1 pkt)

Podaj sekwencję nukleotydową kodującą motyw HPD w białku DnaJ u *P. flexuosum*.

Zadanie 3. (2 pkt.)

Podaj całkowitą liczbę reszt aminokwasowych w białku DnaJ u *P. flexuosum*. Liczbę podaj cyframi arabskimi.

Zadanie 4. (2 pkt.)

Podaj całkowitą liczbę kopii motywu CXXCXGXG w białku DnaJ u *P. flexuosum*. Liczbę podaj cyframi arabskimi.

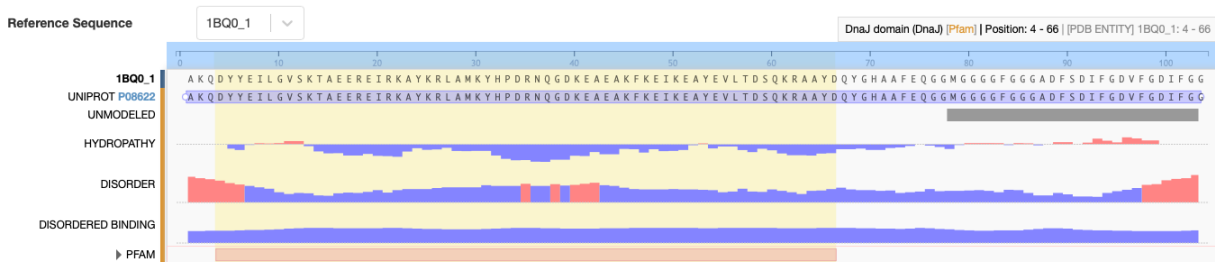
Zadanie 5. (3 pkt.)

Określ, czy następujące wnioski są uprawnione na podstawie przyrównania sekwencji aminokwasowych białka DnaJ. Wpisz T, jeśli wniosek jest uprawniony, albo N – jeśli nie jest uprawniony.

1.	Reszta aminokwasowa znajdująca się bezpośrednio za motywem HPD u bakterii Gram-dodatnich jest alifatyczna i hydrofobowa (I [izoleucyna] albo L [leucyna]), a u bakterii Gram-ujemnych – zasadowa (K [lizyna] albo R [arginina]).	T	N
2.	Występowanie motywu TPF (tryptofan–prolina–fenyloalanina) w białku DnaJ jest cechą charakterystyczną dla bakterii Gram-ujemnych.	T	N
3.	Motyw KFK (lizyna–fenyloalanina–lizyna) występuje w dwóch miejscach w białku DnaJ u <i>Lysinibacillus sphaericus</i> .	T	N

Zadanie 6.

Poniżej przedstawiono fragment rekordu 1BQ0_1 z bazy danych PDB. Według bazy PFAM, w której deponowane są informacje o domenach białkowych, na domenę J składają się reszty aminokwasowe 4–66 ze struktury 1BQ0_1.



Zadanie 6.1. (2 pkt.)

Podaj numer pierwszej reszty aminokwasowej domeny J w pełnej sekwencji aminokwasowej białka DnaJ *E. coli*.

Zadanie 6.2. (2 pkt.)

Podaj numer ostatniej reszty aminokwasowej domeny J w pełnej sekwencji aminokwasowej białka DnaJ *E. coli*.

Zadanie 7. (2 pkt.)

Określ, czy następujące wnioski są uprawnione na podstawie struktur przestrzennych białka DnaJ *E. coli*. Wpisz T, jeśli wniosek jest uprawniony, albo N – jeśli nie jest uprawniony.

1.	W białku DnaJ występują struktury drugorzędowe typu β -karkta.	T	N
2.	Białko DnaJ, według AlphaFold, występuje w formie homodimeru.	T	N

Zadanie 8. (2 pkt.)

Określ, w obrębie jakiej struktury lokalnej występuje większość reszt aminokwasowych motywu HPD w strukturze całego białka DnaJ *E. coli* przewidzianej za pomocą AlphaFold.

- A. α -heliks
- B. β -karkta
- C. nieustrukturyzowana lub inna niż α -heliks i β -karkta

Zadanie 9. (2 pkt.)

Określ, w obrębie jakiej struktury lokalnej występuje większość reszt aminokwasowych motywu HPD w określonej doświadczalnie niepełnej strukturze białka DnaJ *E. coli*.

- A. α -heliks
- B. β -karkta
- C. nieustrukturyzowana lub inna niż α -heliks i β -karkta

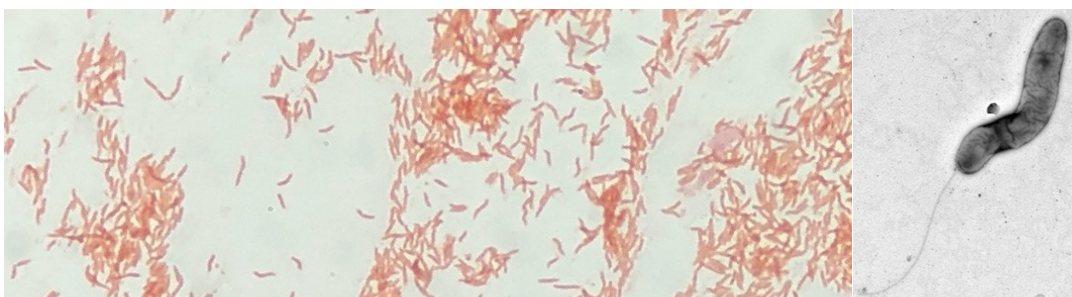
Zadanie 10. (2 pkt.)

Podaj liczbę reszt cysteiny biorących udział w koordynacji każdego z jonów Zn^{2+} w strukturze białka DnaJ *E. coli*. Liczbę podaj cyframi arabskimi.

Zadanie 11.

Poniżej podano przepis na barwienie komórek bakterii metodą Grama oraz umieszczono mikrofotografię wykonaną po przeprowadzeniu tej procedury dla komórek *P. flexuosum*. Obok umieszczono także mikrofotografię pojedynczej komórki z mikroskopu elektronowego.

1. Wszystkie komórki bakteryjne zabarwiają się fioletem krystalicznym.
2. Dodanie płynu Lugola powoduje, że fiolet reaguje z jodem, w wyniku czego tworzą się duże kompleksy złożone z barwnika i jodu. Na tym etapie obydwie typy komórek mają zabarwienie fioletowe.
3. Płukanie w alkoholu powoduje, że w komórkach Gram-dodatnich następuje zmniejszenie pustej przestrzeni w wielowarstwowych ścianach komórkowych. W rezultacie kompleksy fioletu krystalicznego z jodem nie mogą ulec wypłukaniu, co w przypadku 1–2 warstw u bakterii Gram-ujemnych nie jest przeszkodą i alkohol świetnie wypłukuje barwnik.
4. Po zakończonym płukaniu komórki Gram-dodatnie są fioletowe, zaś Gram-ujemne – bezbarwne.
5. Dodatkowym barwnikiem (np. safraniną lub fuksyną) można zabarwić komórki Gram-ujemne, co nie wpływa na barwy komórek Gram-dodatnich.



Zadanie 11.1. (1 pkt.)

Na podstawie mikrofotografii określ, czy *P. flexuosum* jest bakterią Gram-dodatnią, czy – Gram-ujemną.

- A. Gram-dodatnia
- B. Gram-ujemna

Zadanie 11.2. (1 pkt.)

Na podstawie mikrofotografii określ formę morfologiczną *P. flexuosum*.

- A. dwoinka
- B. gronkowiec
- C. krętek
- D. paciorkowiec
- E. pałeczka

Zadanie 11.3. (1 pkt.)

Na podstawie mikrofotografii określ, czy został użyty mikroskop elektronowy skaningowy, czy – transmisyjny.

- A. skaningowy
- B. transmisyjny

Koniec treści arkusza egzaminacyjnego

Możesz porównać strukturę pliku „odpowiedzi.txt” oraz „odpowiedzi_przyklad.txt”, żeby upewnić się, czy plik zawierający Twoje odpowiedzi ma właściwą strukturę.