

KONKURS BIOTECHNOLOGICZNY

II EDYCJA – ZADANIA

Zadanie 1 (10 pkt)

Opracowana przez Fredericka Sangera w latach 70. ubiegłego wieku metoda (nazwana metodą Sangera lub dideoksy) pozwoliła na szybkie i dokładne sekwencjonowanie długich odcinków DNA i zdobycie drugiej w jego karierze Nagrody Nobla z chemii (dzielonej z Walterem Gilbertem i Paulem Bergiem).

- A. Opisz i zilustruj zasadę działania metody Sangera. (3 pkt)
- B. Podaj przynajmniej 4 argumenty za tym, że metoda ta miała ogromne znaczenie dla rozwoju nauki. (2 pkt)
- C. *Human Genome Project (HGP)* – napisz jaki cel przyświecał temu projektowi i jakie były wnioski po jego ukończeniu. (2 pkt)
- D. *Next Generation Sequencing (NGS)* lub inaczej *high-throughput sequencing* to szereg nowoczesnych metod sekwencjonowania DNA. Wymień nazwy kilku z nich i napisz dlaczego przy ich użyciu można ludzki genom zsekwencjonować w 1 dzień, podczas gdy metodami Sangera i *shot-gun* genom ten sekwencjonowano ponad 10 lat (1990-2003). (3 pkt)

Zadanie 2 (5 pkt)

Student sporządził roztwór o objętości 100 ml o stężeniach końcowych składników: 10 mM HEPES, 500 μ M NaCl i 10 μ g/ml PMSF. Z roztworów wyjściowych pobrał 10 ml HEPESu, 1 ml NaCl i 100 μ l PMSF i uzupełnił wodą (88,9 ml). Podaj stężenia wyjściowych roztworów HEPES, NaCl i PMSF, których użył. Podaj stężenie HEPES w M, stężenie NaCl w mM i PMSF w mg/ml. Przedstaw sposób obliczenia.

Zadanie 3 (10 pkt)

Jednym z rodzajów biosensorów powinowactwa są immunosensory, których warstwy receptorowe są złożone z przeciwciał. Dzięki fragmentowi wiążącemu w przeciwciele możliwe jest utworzenie kompleksu przeciwciało – analit, a tym samym wykrycie określonej cząsteczki. Istnieje kilka możliwych konfiguracji immunosensorów, a jednym z rozwiązań jest zastosowanie tzw. układu kanapkowego przeciwciał. W takim przypadku analit ulega związaniu z przeciwciałem zaimobilizowanym na

powierzchni stałej np. przetwornika (czyli przeciwciałem pierwszorzędowym) oraz przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym np. ze znacznikiem fluorescencyjnym lub elektroaktywnym bądź enzymem.

Opracowano immunosensor w postaci układu kanapkowego do wykrycia białka CRP. W tabeli zostały zebrane sygnały odpowiedzi prądowej biosensora w zależności od stężenia wykrywanego białka. Sygnał prądowy powstał na skutek redukcji utlenionej formy 3,3',5,5' – tetrametylobenzydyny (TMB) powstałej w obecności enzymu - peroksydazy chrzanowej (HRP) dowiązanego do przeciwciała drugorzędowego oraz nadtlenu wodoru.

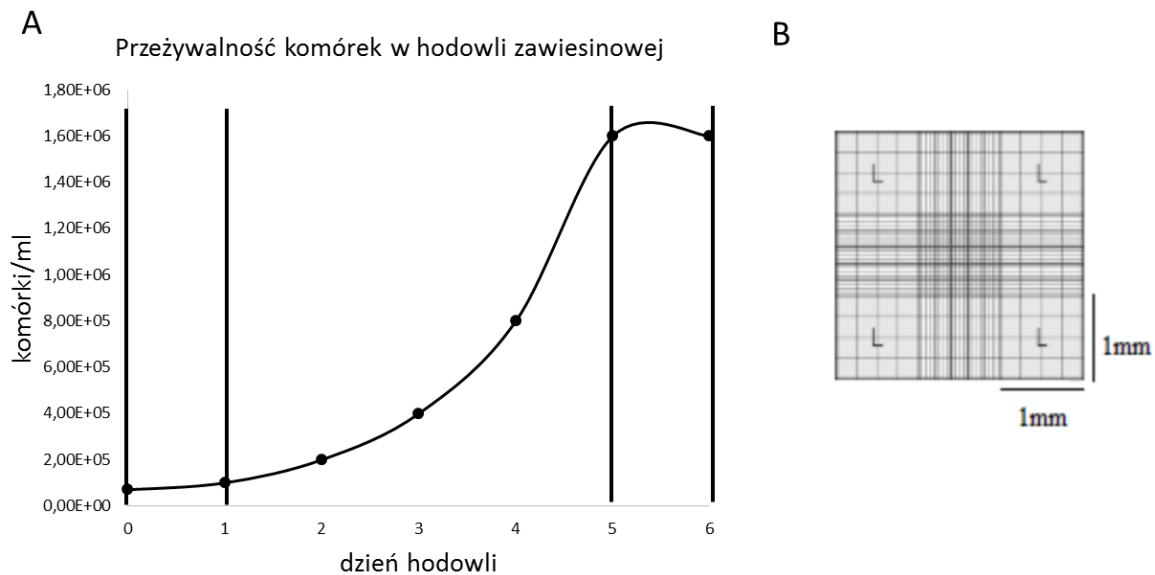
Stężenie białka [mg/L]	Prąd [μ A]
0,5	3,5
0,8	3,5
1,0	3,5
1,5	4,2
2,3	4,8
3,2	5,7
4,1	6,4
4,7	7,0
5,2	7,5
6,3	7,5

Na podstawie wyników zebranych w tabeli:

- A. Sporządź wykres zależności prądu od stężenia białka. Wyznacz równanie krzywej kalibracji dla prostoliniowego odcinka krzywej oraz podaj wartość współczynnika R^2 (podaj wartość do 4 miejsca po przecinku). (4 pkt)
- B. Określ, czy stężenie 6 mg/L mieści się w prostoliniowym odcinku krzywej kalibracji? Uzasadnij odpowiedź. Jakie stężenie białka odpowiada sygnałowi prądowemu o wartości 5,6 μ A? (3 pkt)
- C. Czy w przypadku sporządzania krzywej kalibracji dla białka CRP konieczne jest zachowanie stałego stężenia przeciwciała pierwszo- i drugorzędowego podczas konstrukcji warstwy receptorowej? Uzasadnij odpowiedź. (3 pkt)

Zadanie 4 (10 pkt)

Na wykresie przedstawiono przykładową krzywą wzrostu komórek rosnących w zawiesinie w hodowli *in vitro* (A) oraz siatkę komory zliczeniowej Neubauera (B).



- A. Nazwij i scharakteryzuj kolejne fazy wzrostu hodowli komórkowej rosnącej w zawiesinie. (2 pkt)
- B. Oblicz gęstość hodowli komórkowej, czyli liczbę komórek/ml, określonej za pomocą komory Neubauera i barwienia błękitem trypanu (preparat komórek do liczenia przygotowano w stosunku zawiesina komórek : błękit = 1:1, v:v). Średnia liczba komórek w kwadratach o wymiarach 1x1 mm wynosiła 50. Wysokość komory zliczeniowej wynosi 0,1 mm (rysunek B). (4 pkt)
- C. Oblicz jaką objętość komórek należy pobrać z butelki hodowlanej (hodowla o gęstości komórek obliczonej w punkcie B) i uzupełnić świeżą pożywką żeby uzyskać 25 ml takiej hodowli komórkowej, aby po 48 h inkubacji uzyskać jak najwięcej komórek będących w zakresie wykładniczej fazy wzrostu, przy założeniu, że zakres ten wynosi $2 \cdot 10^5$ - 10^6 komórek/ml, a czas cyklu komórkowego (czyli podwojenia liczby komórek) dla tej linii to 24 h. (4 pkt)

Zadanie 5 (10 pkt)

W kwasach nukleinowych występuje 5 zasad azotowych: adenina, tymina, cytozyna, guanina i uracyl, przy czym uracyl występuje tylko w RNA, a tymina tylko w DNA. Koszt energetyczny syntezy nukleotydu tyminowego (tymidylanu) znacząco przewyższa koszt syntezy urydylanu. Tymidylan bowiem powstaje w komórce w wyniku przeniesienia grupy metylenowej z kofaktora, N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu, na deoksyurydylan w reakcji katalizowanej przez enzym, syntazę tymidylanową. Aby tymidylan był dostarczany do syntezy DNA, musi nastąpić regeneracja kofaktora w kolejnych dwóch reakcjach, katalizowanych przez reduktazę dihydrofolianową oraz hydroksymetylotransferazę serynową. Cykl tych trzech reakcji nosi nazwę cyklu syntezy tymidylanu.

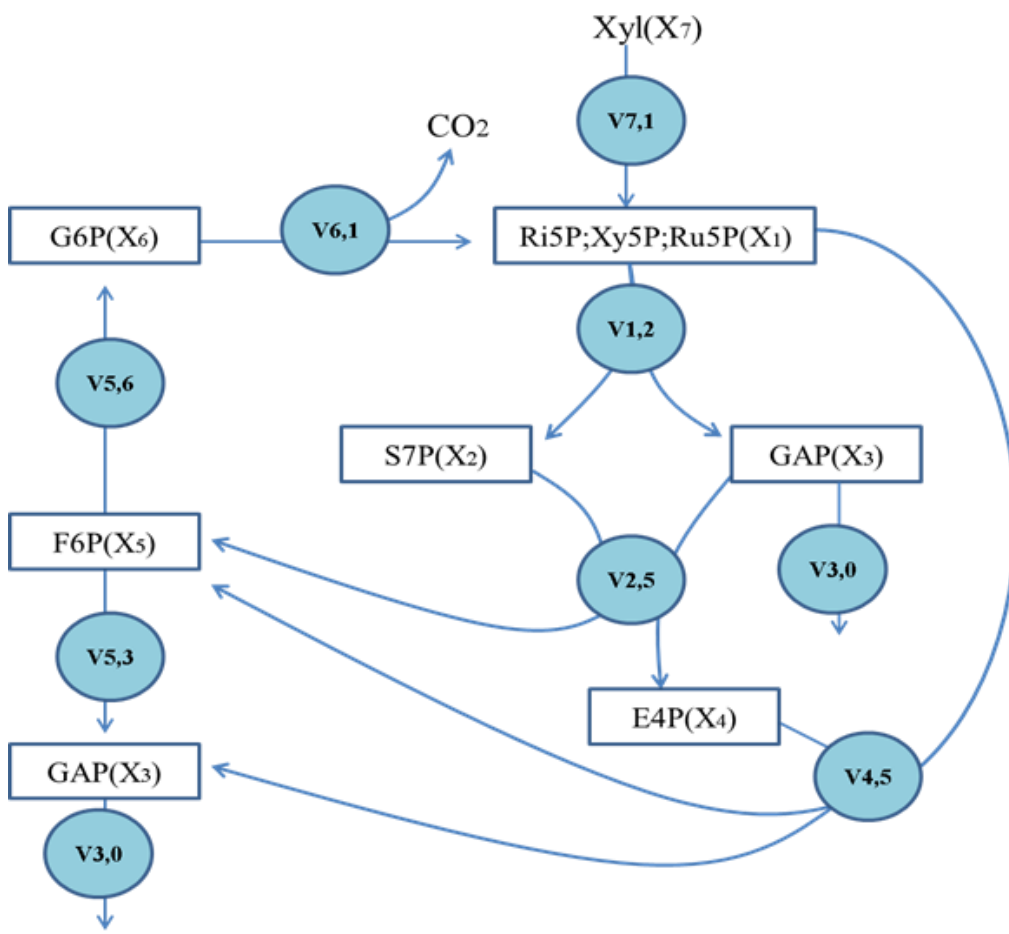
- A. Jak myślisz, dlaczego w DNA jest tymina, a nie uracyl? (2 pkt)
- B. Scharakteryzuj potencjalnie mutagenne dla komórki zmiany jakie mogą zachodzić w jej DNA. (3 pkt)
- C. Wymień enzymatyczne mechanizmy naprawcze DNA, funkcjonujące w komórkach eukariotycznych i krótko napisz na czym każdy z nich polega. (2 pkt)
- D. Wyjaśnij dlaczego DNA, a nie RNA jest nośnikiem informacji genetycznej oraz uzasadnij na czym mogła polegać przewaga ewolucyjna prakomórki, w której informacja genetyczna zapisana była w DNA, nad hipotetyczną prakomórką zawierającą materiał genetyczny w postaci RNA. (3 pkt)

Zadanie 6 (10 pkt)

Obecnie badania nad lekami prowadzone są z wykorzystaniem modeli komputerowych (*in silico*) procesów biologicznych. Utwórz model stechiometryczny szlaku pentozowego (wg. schematu 1). W szlaku dochodzi do wymiany węglowodanów o różnej liczbie węgla tak jak to przedstawiono w Tabeli 1. Tak więc, 2 cząsteczki X₁ potrzebne są do utworzenia 1 cząsteczki X₂ i 1 cząsteczki X₃. Dla odróżnienia poszczególnych katalizowanych przez enzymy reakcji, oznaczonych jako V w kółkach umieszczonych na strzałkach, dodane zostały numery wskazujące na przejście z substratu o określonym numerze do produktu o określonym numerze. Np. w reakcji V_{5,3} wykorzystywana jest 1 cząsteczka X₅, aby powstały 2 cząsteczki X₃. Zwróć uwagę, że X₃ występuje w dwóch miejscach szlaku, ale reprezentuje tę samą pulę metabolitu.

Tabela 1. Liczba atomów węgla w poszczególnych metabolitach w ścieżce pentozowej

Pula metabolitu	Liczba atomów węgla
X_1	5
X_2	7
X_3	3
X_4	4
X_5	6
X_6	6
X_7	5

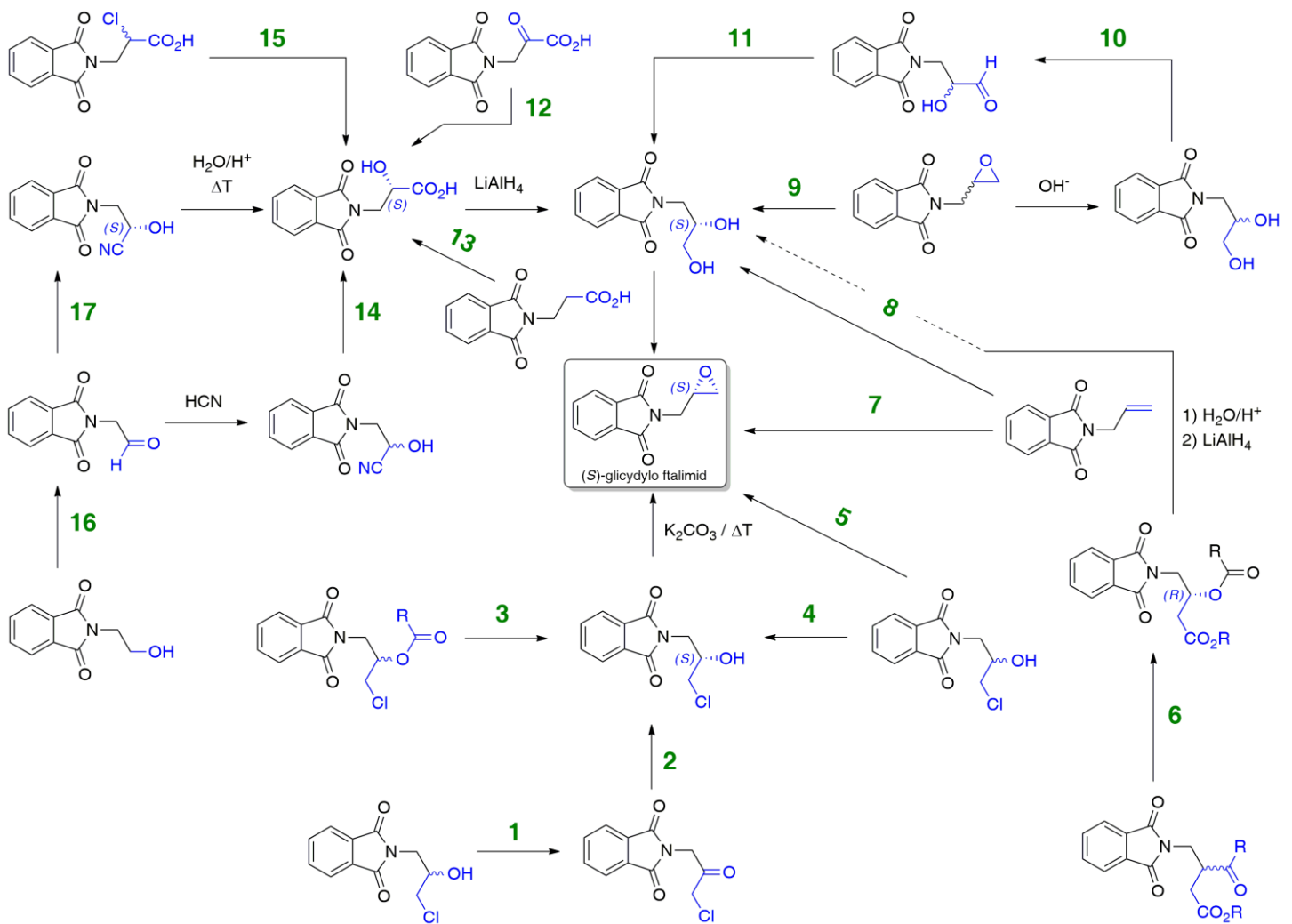


Schemat 1

Zadanie 7 (15 pkt)

Pewien biotechnolog, pracujący na co dzień w renomowanej firmie farmaceutycznej, dostał od swoich przełożonych zadanie zsyntetyzowania enancjomerycznie czystego (S)-glicydylo ftalimidu [(S)-2,3-epoksypropyloftalimidu lub 2-[(2S)-oksiran-2-ylometylo]-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu] będącego kluczowym związkiem pośrednim przy produkcji rivaroxabanu – substancji czynnej leku antykoagulacyjnego o handlowej nazwie Xarelto[®]. Dołącz do jego zespołu i pomóż mu zaprojektować ścieżkę chemoenzymatycznej syntezy ww. enancjomerycznego związku w taki sposób, aby było to możliwe z zastosowaniem poniżej wymienionych systemów biokatalitycznych. Zwróć proszę uwagę, że część enzymów, którymi dysponował biotechnolog, może zostać użyta przez Ciebie na różnych etapach zaproponowanej syntezy więcej niż tylko raz.

	System enzymatyczny	Numer reakcji
A	Lakaza / O ₂ / TEMPO [rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperdyn-1-oksylowy]	
B	Dehalogenaza halohydrynowa	
C	Nitrylaza / bufor pH<3,5	
D	(S)-hydroksynitrylaza + NaCN	
E	Ketoreduktaza (KRED) / NAD(P)H	
F	Monooksygenaza styrenowa (SMO) / O ₂ lub haloperoksydaza / H ₂ O ₂	
G	Dioksygenaza lub peroksydaza	
H	Lipaza / octan winylu	
I	Proteaza / H ₂ O lub lipaza / Bufor pH 7,5	
J	Dehydrogenaza alkoholowa z końskiej wątroby (LADH) / NADH	
K	Hydroksylaza epoksydowa / H ₂ O	
L	Cytochrom P450 lub monooksygenaza cytochromowa (P450-MOX)	
M	Reduktaza pirogronianowa / NADH ₂ lub drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
N	Monooksygenaza Baeyer–Villiger’a (BVMO) albo monooksygenaza fenyloacetonowa (PAMO) / O ₂ / NAD(P)H/H ⁺	



Zadanie 8 (5 pkt)

W przemyśle biotechnologicznym, poza czystością stosowanych szczepów, jałowością procesu czy składem stosowanej pożywki, niezwykle ważne jest odprowadzanie ciepła wydzielanego przez hodowane w procesie mikroorganizmy. Mikroorganizmy mają wąski przedział temperatur, w których mogą normalnie się rozwijać, bez ryzyka wystąpienia mutacji czy zmniejszenia wydajności otrzymywanego produktu. Ponadto, zbyt wysoka temperatura może prowadzić do ich śmierci.

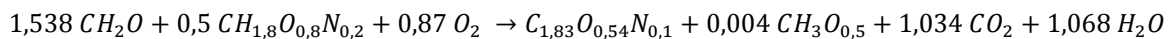
Serwatka kwaśna jest odpadem przemysłu mleczarskiego produkowanym rocznie w ilości 40-45 mln ton. Jej obciążenie dla środowiska jako odpadu wynika przede wszystkim z obecności laktozy, a BZT₅ wynosi $4 \div 5 \cdot 10^4$ mg O₂/l serwatki. Poszukiwane są więc sposoby jej utylizacji. Jednym z nich jest produkcja biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, przy jednoczesnej hydrolizie enzymatycznej

laktozy do glukozy i galaktozy. Aby proces produkcji biomasy był możliwie najbardziej wydajny, prowadzi się go w warunkach niskiego stężenia źródła węgla (glukozy), dbając jednocześnie o odpowiednie napowietrzenie. Zakłada się, że przy tak dobranych parametrach hodowli glukoza i galaktoza zużywane są jednocześnie i nie zachodzi represja pobierania galaktozy do komórek drożdży (tzw. represja kataboliczna).

Schemat reakcji:

glukoza + kwas glutaminowy + tlen → biomasa + etanol + dwutlenek węgla + woda

Równanie węglomolowe:



- A. Scharakteryzuj pojęcie BZT_n . Wytlumacz, co oznacza liczba w indeksie dolnym. (1 pkt)
- B. Na podstawie równania węglomolowego, oblicz ile gramów biomasy i alkoholu etylowego zostanie wyprodukowanych ze 100 litrów serwatki (gęstość serwatki wynosi $1,05 \text{ g/dm}^3$, zawartość laktozy 6%). Źródłem azotu w tym procesie są białka, obecne w serwatce. W równaniu przyjęto wzór węglomolowy kwasu glutaminowego, jako aminokwasu średnio najliczniejszego w białkach. Oblicz, ile ciepła zostanie wygenerowane w odniesieniu na mol O_2 . (4 pkt)

Zadanie 9 (5 pkt)

Ponad 95% światowej produkcji kwas cytrynowego (kwasu 2-hydroksypropano-1,2,3-trikarboksylowego), który ma szerokie zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym, zachodzi przy użyciu mikroorganizmów.

- A. Jakie mikroorganizmy wykorzystywane są do produkcji kwasu cytrynowego? (1 pkt)
- B. W jakim szlaku metabolicznym powstaje ten kwas? (1 pkt)
- C. Narysuj uproszczony (tylko nazwy związków) schemat metaboliczny biosyntezy kwasu cytrynowego. (3 pkt)

Zadanie 10 (5 pkt)

Od lat 80-tych ubiegłego wieku przy użyciu organizmów genetycznie modyfikowanych (GMO) produkowana jest insulina.

- A. Jakie GMO wykorzystywane są do produkcji insuliny? (1 pkt)
- B. Na czym polega strategia produkcji insuliny w jednej hodowli? (3 pkt)
- C. Dlaczego tworzone są analogi insuliny ze zmienionymi pojedynczymi aminokwasami, np. *insulina lispro*? (1 pkt)

Zadanie 11 (10 pkt)

Przygotowując sznycle po wiedeńsku na wykwintny obiad nie zwróciliśmy uwagi na leżącą obok blatu kuchennego, ulubioną serwetę naszej babci – białą, z czystego lnu. Usunięcie plam pozostawionych przez surowe mięso, jajka, masło i oliwę okazało się nie lada wyzwaniem, zwłaszcza że w zamieszaniu spadł nam jeszcze stół z syropem wiśniowym i razem z mąką przygotowaną do panierowania sznycli też wylądował na serwecie.

Podeszliśmy do zadania usunięcia śladów nieuwagi naukowo.

Starą lnianą ścierkę pocięliśmy na prostokąty, nanieśliśmy na nie sztuczne plamy:

- a. z resztek mięsa i krwi, które zostały na tłuczku,
- b. z syropu zmieszanego z mąką,
- c. z resztki jaj (zmieszane razem żółtko i białko) użytych do panierowania,
- d. z masła i oliwy.

Do uprania lnianych próbek postanowiliśmy użyć proszków, które poza detergentami, czyli związkami powierzchniowo czynnymi, zawierają enzymy. Były to:

1. Proszek z dodatkiem subtilizyny (EC 3.4.21.62) z *Bacillus subtilis*. Jest to endopeptydaza serynowa o bardzo szerokiej specyficzności substratowej.
2. Proszek z dodatkiem α -amylazy (EC 3.2.2.1). Amylaza ta katalizuje hydrolizę wewnętrznego wiązania 1,4- α -D-glikozydowego w polisacharydach złożonych z 3 lub więcej monomerów glukozy.
3. Proszek z dodatkiem lipazy (EC 3.1.1.3). Lipazy hydrolizują wiązania estrowe występujące w naturze w triacyloglicerolach.
4. Proszek z dodatkiem celulaz. Celulazy rozrywają wiązania 1,4- β -glikozydowe w celulozie. Ta klasa enzymów zawiera dwie grupy: endo-

celulazy zwane też endo-glukanazami (EG) (EC 3.2.1.4) i egzo-celulazy czyli celobiohydrolazy, CBH (EC 3.2.1.91).

Proszek 1 okazał się bardzo skuteczny w dwóch przypadkach

Proszek 2 dobrze zadziałał w jednym przypadku

Proszek 3 właściwie nie zadziałał, choć niektóre plamy zmieniły wygląd, a prostokąt zabrudzony masłem i oliwą nabrał niezbyt przyjemnego zapachu.

Proszek 4 okazał się zadziwiająco skuteczny: plamy na wszystkich próbkach Inianej tkaniny stały się mniej widoczne lub całkiem zniknęły, a cała powierzchnia prostokątów ze starej ścierki stała się jaśniejsza (bielsza) i gładsza.

A. Narysuj schematy reakcji katalizowanych przez:

- Subtilizynę
- α -Amylazę
- Lipazę
- Celulazy (3 pkt)

B. Napisz jakiego rodzaju związki chemiczne stanowią zdecydowaną przewagę w plamach a, b, c i d. (2 pkt)

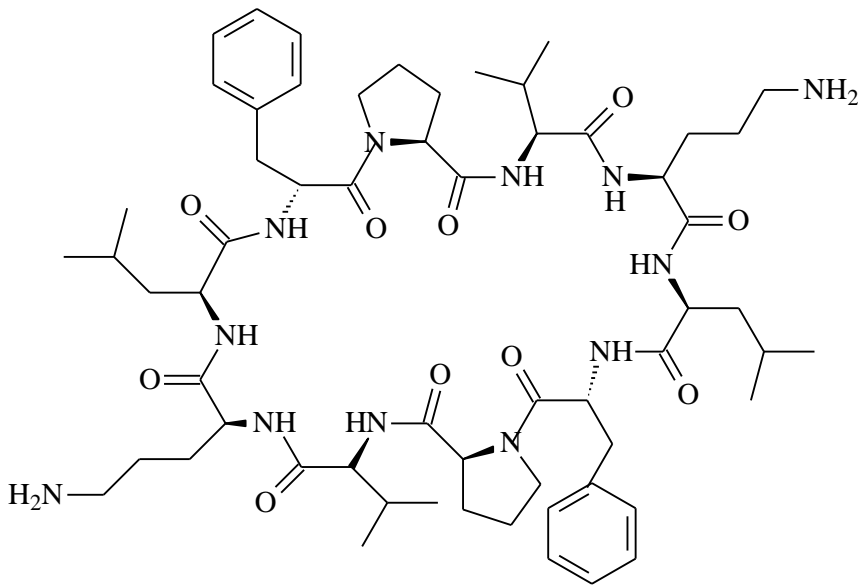
C. Uzupełnij tabelkę z wynikami eksperymentu (1 pkt).

Rodzaj enzymu	Prostokąty Inianej ścierki ze „sztucznymi” plamami			
	a	b	c	d
subtilizyna				
α -amylaza				
lipaza				
celulazy	+	+	+	+

D. Dlaczego proszki z lipazami mogą odpowiadać za nieprzyjemny zapach tkaniny w niektórych przypadkach? (2 pkt)

E. Napisz na czym polega proces prania tkanin w proszkach z dodatkiem celulaz. Czy jest to uniwersalny sposób usuwania plam z tkanin, czy też ma jakieś ograniczenia? (2 pkt)

Zadanie 12 (5 pkt)



Powyższy rysunek przedstawia związek wyizolowany z hodowli szczepu bakterii *Bacillus brevis*.

Naukowcy, którzy go wyizolowali po raz pierwszy zauważyli, że hodowla bakterii *Bacillus brevis* zmieszana z hodowlą gronkowca *Staphylococcus aureus* hamuje rozwój tego ostatniego i podjęli trud sprawdzenia jaka konkretnie substancja powoduje taki efekt.

- A. Do jakiej grupy związków chemicznych należy ta substancja? (1 pkt)
- B. Podaj wzory, konfigurację, nazwy poszczególnych związków – cegiełek, z których składa się cząsteczka wyizolowanej substancji (najlepiej je wcześniej narysuj). (2 pkt)
- C. Dlaczego, twoim zdaniem, komórki gronkowca złocistego nie mogły sobie poradzić ze związkiem wydzielanym przez komórki *Bacillus brevis*, chociaż powinny posiadać komplet enzymów zdolnych do hydrolizy wiązań zawartych w przedstawionej cząsteczce. (2 pkt)

Zadanie bonusowe (10 pkt) – są to dodatkowe punkty, które będą doliczone do punktów uzyskanych z zadań konkursowych

Biologia systemowa ma szerokie zastosowanie w projektowaniu celów terapeutycznych w walce z patogenami człowieka. Optymalny lek, to taki lek, który jest skuteczny w walce z infekcją, a jednocześnie nie zagraża florze bakteryjnej przewodu pokarmowego.

- A. Znajdź pięć szlaków metabolicznych u *E. coli*, które nie istnieją u *M. pneumoniae*. Wykorzystaj w tym celu bazę danych KEGG. Załącz odpowiedni zrzut z ekranu (PrintScr) i opisz poszczególne kroki prowadzące do identyfikacji tych szlaków. (5 pkt)
- B. Opisz jakie są konsekwencje braku tych ścieżek metabolicznych u *M. pneumoniae*. (5 pkt)

WAŻNE INFORMACJE

Ostateczny i nieprzekraczalny termin wypełnienia Kart Zgłoszeniowych (<http://www.konkursbiotechnologiczny.ch.pw.edu.pl/index.php/zgloszenie-uczestnictwa/>) oraz nadesłania rozwiązań zadań konkursowych (liczy się data stempla pocztowego) mija **15 lutego 2019 r.**

Rozwiązania zadań konkursowych prosimy przesyłać na adres:

Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
z dopiskiem „KONKURS BIOTECHNOLOGICZNY”