

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ВЫСШАЯ ШКОЛА ЭКОНОМИКИ

Факультет физики

Зачет по статьям

«Введение в молекулярную биологию»



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Москва
2021

Содержание

1. фи 29 DNA polymerase	4
1.1. Нормальное название	4
1.2. Абстракт	4
1.3. Картинки	4
2. PNA-DNAdC5 structure 2017	8
2.1. Нормальное название	8
2.2. Абстракт	8
2.3. Картинки	8
3. RecA	14
3.1. Нормальное название	14
3.2. Абстракт	14
3.3. Картинки	14
4. Engineering of a novel tri-functional enzyme with MnSOD, catalase and cell-permeable activities	18
4.1. Нормальное название	18
4.2. Абстракт	18
4.3. Картинки	19
5. The ribosome as a missing link in prebiotic evolution II: Ribosomes encode ribosomal proteins that bind to common regions of their own mRNAs and rRNAs	27
5.1. Нормальное название	27
5.2. Абстракт	27
5.2.1. Пояснения к вышеуказанному	27
5.3. Картинки	28
6. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability	30
6.1. Нормальное название	30
6.1.1. Пояснения к вышесказанному	30
6.2. Абстракт	30
6.3. Картинки	31
7. A Single Promoter Inversion Switches <i>Photorhabdus</i> Between Pathogenic and Mutualistic States	34
7.1. Нормальное название	34
7.2. Абстракт	34
7.3. Картинки	35
8.	40
8.1.	40
8.2.	40
8.3.	40

9.	41
9.1.	41
9.2.	41
9.3.	41
10.	42
10.1.	42
10.2.	42
10.3.	42
11.	43
11.1.	43
11.2.	43
11.3.	43
12.	44
12.1.	44
12.2.	44
12.3.	44
13.	45
13.1.	45
13.2.	45
13.3.	45
14.	46
14.1.	46
14.2.	46
14.3.	46
15.	47
15.1.	47
15.2.	47
15.3.	47
16.	48
16.1.	48
16.2.	48
16.3.	48
17.	49
17.1.	49
17.2.	49
17.3.	49
18.	50
18.1.	50
18.2.	50
18.3.	50

19.	51
19.1.	51
19.2.	51
19.3.	51
20.	52
20.1.	52
20.2.	52
20.3.	52
21.	53
21.1.	53
21.2.	53
21.3.	53

1. фи 29 DNA polymerase

1.1. Нормальное название

Специфический субдомен ДНК-полимеразы Ф29(фермент вируса Ф29) обеспечивает процессивность и способность замещения цепи.

1.2. Абстракт

Недавние кристаллографические исследования ДНК-полимеразы Ф29 обеспечили понимание процессивности и замещения цепи. (Здесь, процессивность ДНК полимеразы – среднее число нуклеотидов, присоединяемых ферментом за один акт связывания.) Специфическая вставка TPR2(названная так по концевой области белка) вместе с доменами, образует два тора, способных связываться с ДНК. Для анализа функциональной роли TPR2 была сконструирована мутантная версия с делецией аминокислот от 398 до 420. В результате биохимического анализа было выявлено, что снижается ДНК-связывающая способность, следовательно процессивность. Также удаление участка TPR2 лишает ДНК-полимеразу возможности выполнять замещение цепи, необходимое для синтеза ДНК.

1.3. Картинки

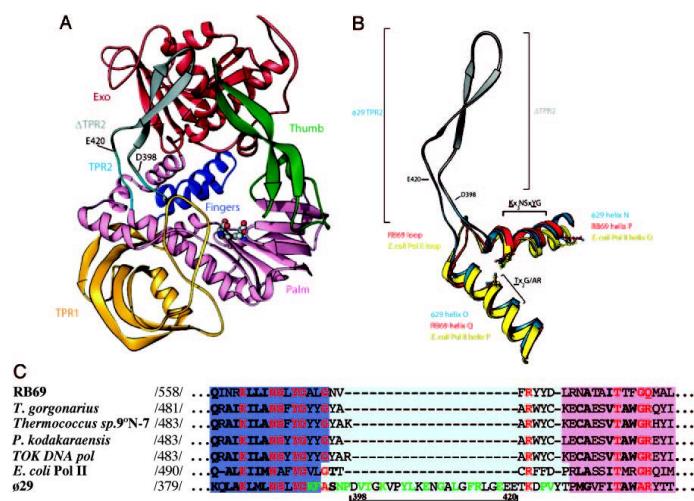


Рис. 1. 1A: структура днк полимеразы, показана локализация вставки TPR2; 1B: выравнивание структур мутантного варианта и дикого типа; 1C: выравнивание последовательностей нескольких бактерий и мутантной версии с делецией, выделены консервативные мотивы.

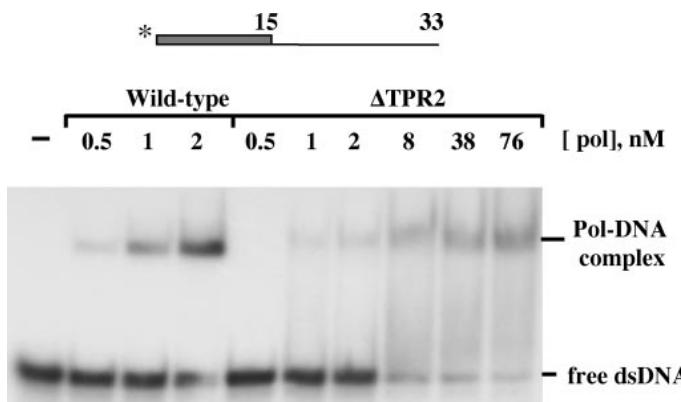


Рис. 2. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

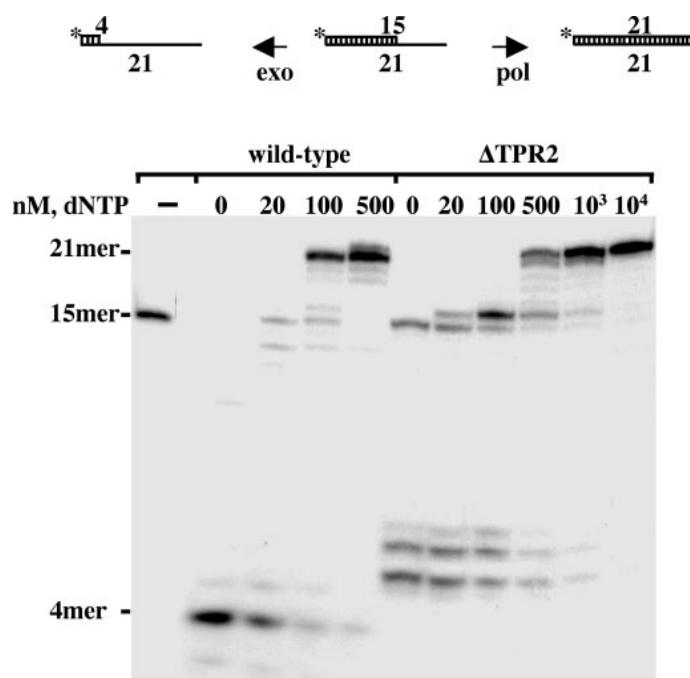


Рис. 3. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

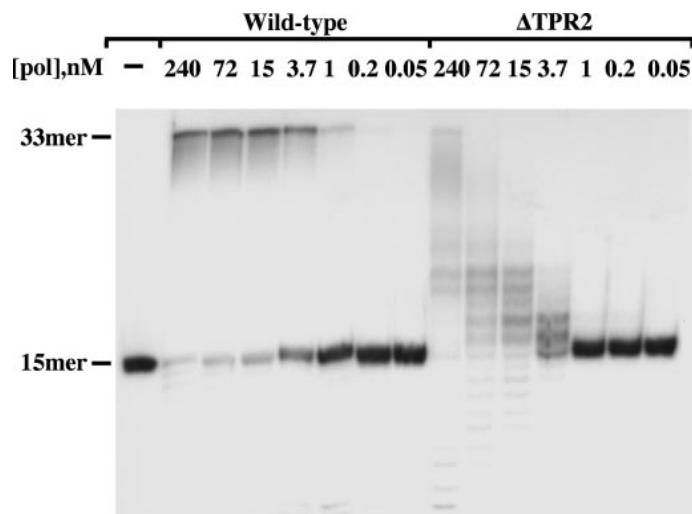


Рис. 4. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

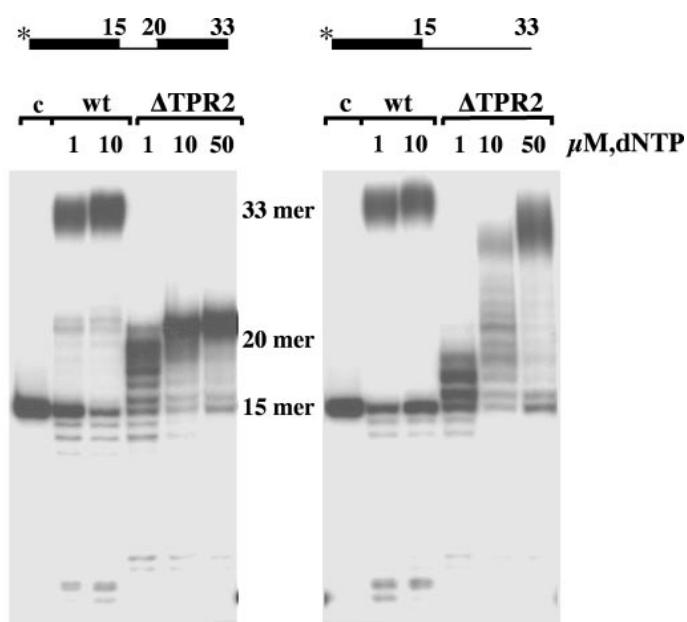


Рис. 5. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

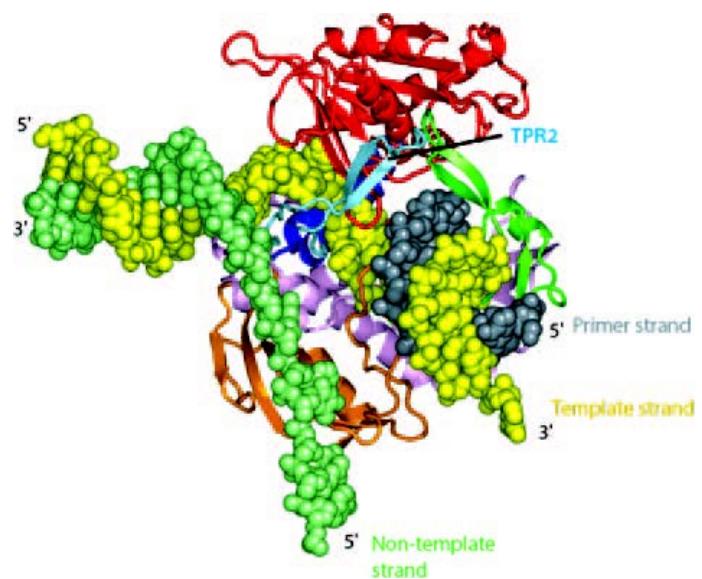


Рис. 6. Моделирование высокой процессивности и замещения цепи.

2. PNA-DNA*i*C5 structure 2017

2.1. Нормальное название

Гибридный ДНК и-мотив*: аминоэтилпролил-ПНК** (pC5***) повышает стабильность и-мотива ДНК (dC5).

*"и" от "интеркалированный". И-мотив - это одна из структур, держащихся на водородных связях, которые, наравне с двухцепочечной структурой, могут образовывать нити ДНК (также РНК, ПНК).

**пептидно-нуклеиновая кислота - это как ДНК, только вместо дезоксирибозы вставлен пептид. В данном случае это аминоэтилпролил.

***pC5 имеется в виде кусочек из 5 цитозинов в ПНК, которые соединяются водородными связями при образовании и-мотива. То же касательно dC5.

2.2. Абстракт

Этот отчет описывает синтез богатых цитозином последовательностей, а именно пентамеров цитозина в аминоэтилпролиловом ПНК, и их биофизическое исследование для формирования смешанных ДНК-аэпПНК и-мотивных комплексов с пентамерами цитозина в кислотной среде. Приведенные здесь исследования кругового дихроизма (КД), облучения в УФ, ЯМР, электроспрей масс-спектрометрии подтверждают образование стабильных гибридных ДНК-аэпПНК и-мотивов в кислотной среде. Следовательно, аэп-ПНК цитозин-богатые последовательности могут рассматриваться как потенциальные агенты для стабилизации ДНК и-мотива в живом организме (*in vivo*).

2.3. Картинки

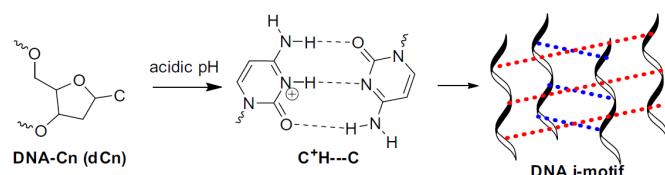


Рис. 7. Образование водородных связей между цитозинами ДНК в кислотной среде и формирование структуры под названием и-мотив.

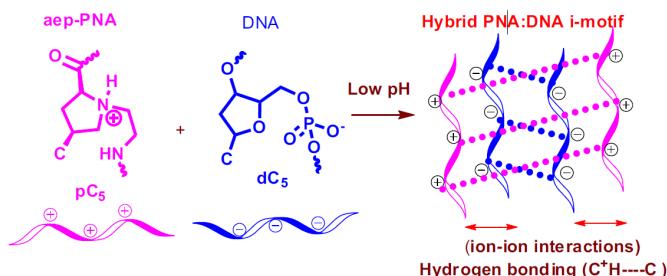


Рис. 8. Предполагаемая схема образования гибридного и-мотива.

Про картинку 8. Что нужно заметить (про это спросили при обсуждении статьи): гибридный и-мотив в теории более устойчивый за счет того, что сцеплен не только водородными связями, но и электростатически.

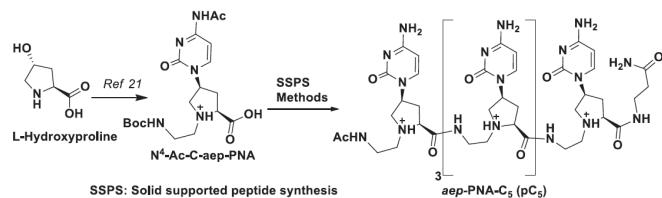


Рис. 9. Синтез цитозинового мономера аэп-ПНК и пентамера из цитозинов аэп-ПНК.

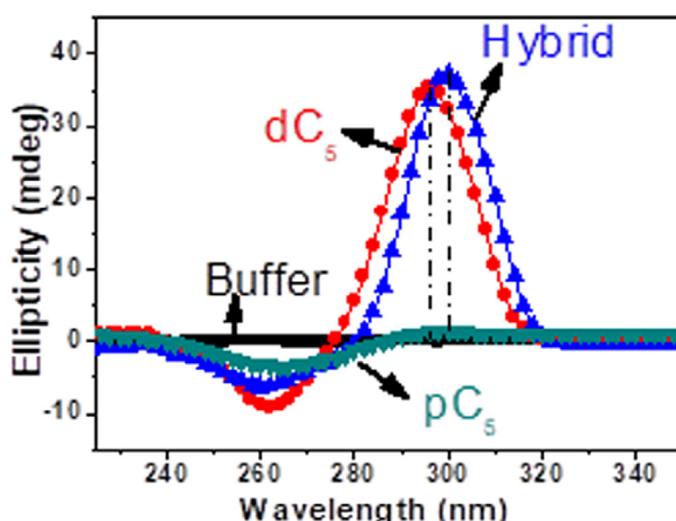


Рис. 10. КД-спектр (круговой дихроизм) цитозин-пентамеров аэп-ПНК (45 мМ), ДНК (45 мМ), смеси аэп-ПНК и ДНК 1:1 (по 22.5 мМ каждый) при 10 градусах Цельсия, pH 4.5.

Про картинку 10. Что на графике: эллиптичность от длины волны.

Что нужно заметить: графики для гибрида и ДНК похожи, а вот ПНК принципиально отличается, так как имеет только минимум. Это означает, что тетраплексы (и-мотивы) из аэп-ПНК не образовывались за счет слишком сильного взаимного отталкивания заряженных нитей аэп-ПНК. Максимум на графике гибрида сдвинут относительно максимума для ДНК. В целом, график подтверждает образование гибридного тетраплекса в растворе ДНК с аэп-ПНК.

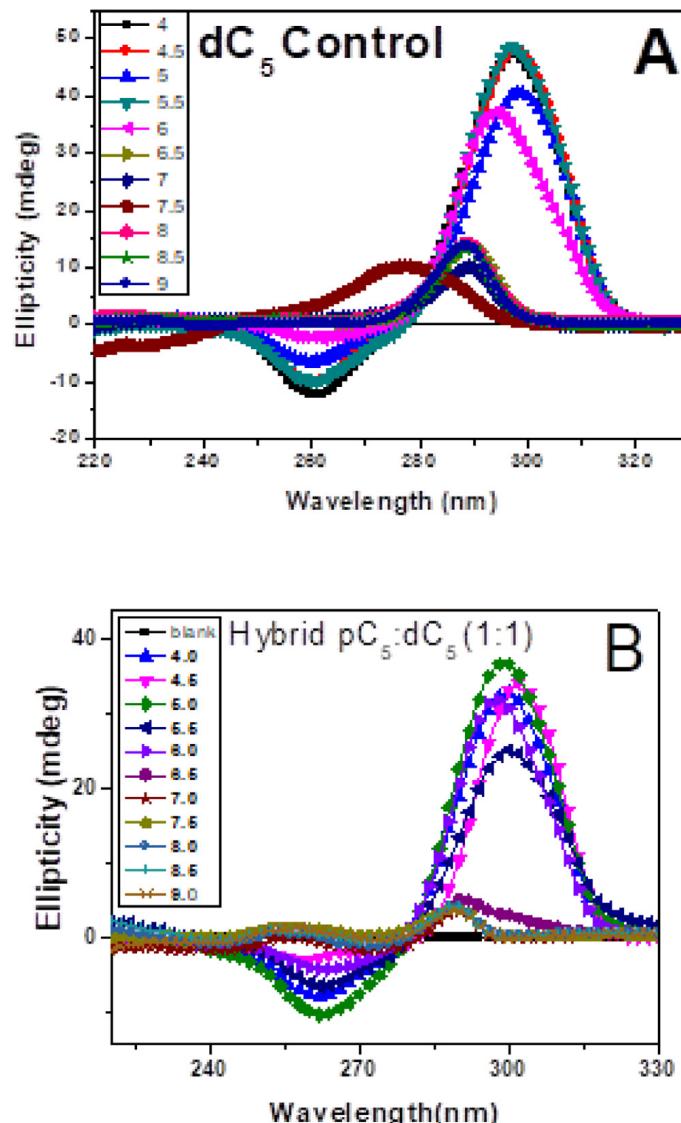


Рис. 11. КД-спектры при различных рН цитозин-пентамеров ДНК (45мМ) (на рис. А), смеси ДНК/аэп-ПНК (22.5 мМ каждый) (на рис. Б)

Про картинку 11. На что обратить внимание: эти спектры снимали, чтобы выявить оптимальный рН для образования и-мотивов из ДНК и гибрида аэп-ПНК/ДНК соответственно. Оптимально оказалось 4-6 рН (кислая-слабокислая среда).

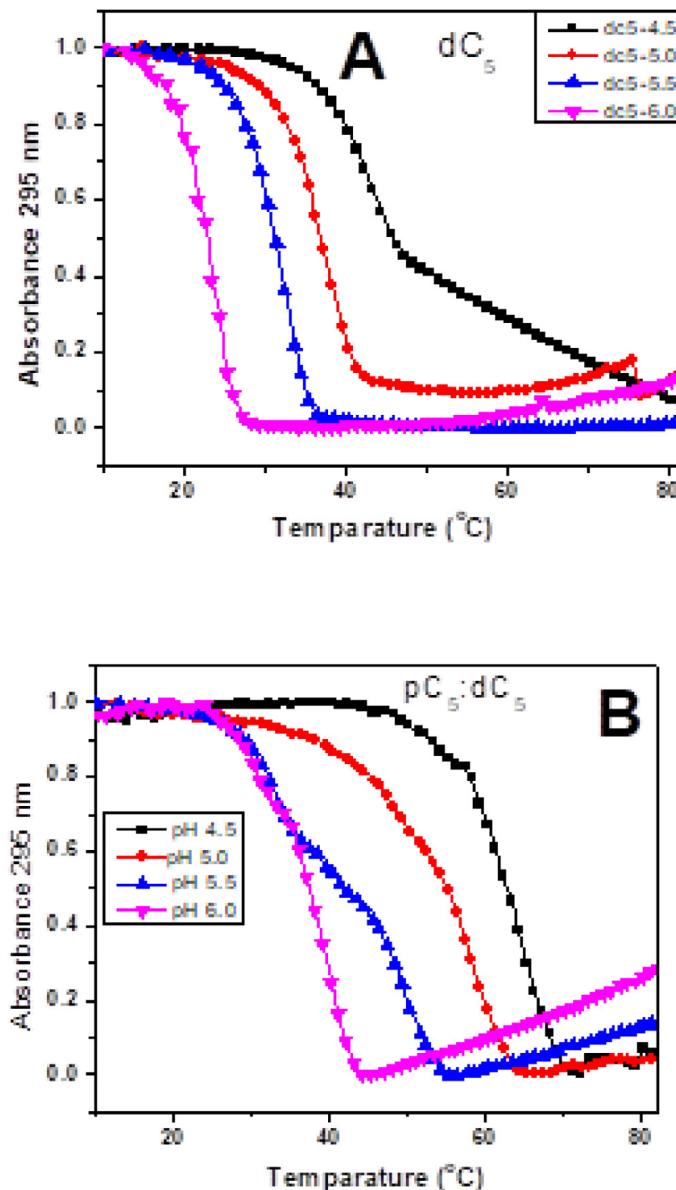


Рис. 12. Температурные профили плавления при различных рН при облучении УФ на длине волны 295 нм: цитозин-пентамеры ДНК (45.0 мМ), (В) цитозин пентамеры ДНК:аэп-ПНК (1:1) (22.5 мМ каждый).

Про картинку 12. На что обратить внимание: профили плавления на 300 нм в виде негативных сигмоид (общий вид кривых, которые мы видим на графиках) в целом характерны для тетраплексов ДНК (и-мотив - частный случай тетраплекса). Беря производную от данных кривых, можно обнаружить температуру плавления. Именно эти температуры выписаны в табл. 1.

Table 1
pH dependent UV-T_m/ΔT_m of dC₅/Hybrid dC₅:pC₅.

Entry	pH	T _m (°C) of dC ₅	T _m (°C) of dC ₅ :pC ₅ (1:1)	ΔT (°C) [*]
1	4.5	46.73	62.00	15.27
2	5.0	36.13	54.06	17.93
3	5.5	31.26	40.11	8.85
4	6.0	22.66	35.82	13.16

* ΔT_m is difference in T_m of dC₅ and dC₅:pC₅ (1:1).

Рис. 13. Зависимость температуры плавления T_m при облучении УФ при различных pH для ДНК и для гибрида ДНК/аэп-ПНК

Про картинку 13. Мы видим тенденцию, что при всех pH температура плавления для гибридного и-мотива выше, чем для ДНК и-мотива, что говорит о большей устойчивости гибрида.

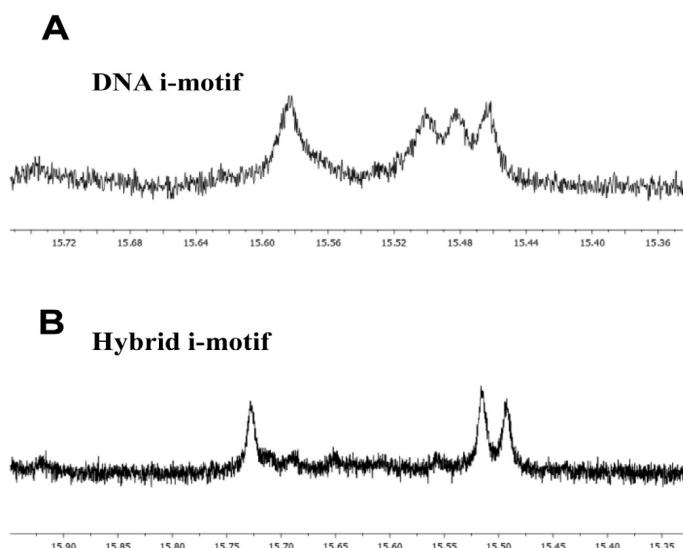


Рис. 14. Протонный магнитный резонанс водорода в связи H-N в протонированном цитозине при pH 4.5 при 25С (700 МГц) А) ДНК и-мотив (300 мМ), Б) гибрид ДНК/аэп-ПНК 1:1 (200 мМ каждый)

Про картинку 14. Что по осям совершенно неясно :) Но форма графиков характерна для тетраплексных структур из ДНК

Table 2
ESI-Mass analysis of pC₅/dC₅/hybrid dC₅:pC₅.

Entry	pC ₅ /hybrid pC ₅ :dC ₅ (calculated Mass)	Mass (Observed) [*]
1	dC ₅ (M _d) 1383.2760	1382.05 (M _d -H) ⁻
2	pC ₅ (M _p) 1375.6900	1376.71 (Mp+H) ⁺
3	Annealed-pC ₅ :dC ₅ (1:1); (pH 4.5)	1104.98 (2M _p +2M _d +10H) ⁵⁺ ; 1036.80 (2M _d +M _p +5H) ⁴⁺ ; 1382.39 (2M _d +M _p +5H) ³⁺ ; 1384.75 (2M _d +5H) ²⁺

* M_d: Molecular mass of DNA dC₅; M_p: Molecular mass of pC₅.

Рис. 15. Масс-спектрометрия электроспрейевой ионизации цитозин-пентамеров аэп-ПНК, ДНК, гибрида ДНК/аэп-ПНК

Про картинку 15. Собственно, есть три "входа" (соответственно, ПНК, ДНК и гибрид), обозначенных в первом столбце. Во втором - расчетная масса, в третьем - результаты измерений. Данные в третьем столбце - это интерпретация пиков с 7 картинки.

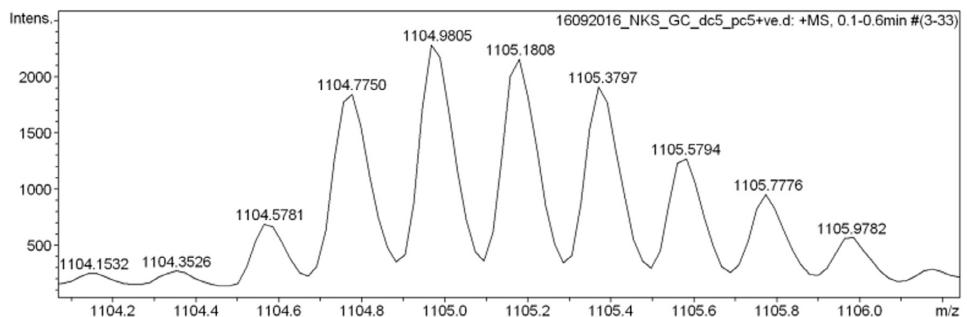


Рис. 16. Масс-спектр цитозин-пентамерного и-мотива ДНК/аэп-ПНК, полученный методом электроспрейевой ионизации.

Про картинку 16. Мы видим гребенку с шагом меньше 1 ам из-за изотопов.

3. RecA

3.1. Нормальное название

Выравнивание последовательности ДНК во время гомологической рекомбинации.

3.2. Абстракт

Гомологическая рекомбинация участвует в регуляризованном обмене генетической информацией между двумя различными молекулами ДНК, который идентичны или почти идентичны по своей последовательности, а также играет основную роль в восстановлении разрывов двухнитевой молекулы ДНК. Основной аспект гомологической рекомбинации - это способность белков, участвующих в рекомбинации, идеально выравнивать поврежденную ДНК с гомологичной (очень похожей) последовательностью, находящейся где угодно в геноме. Эта реакция известна как гомологический поиск и она похожа на таргетные поиски проводимые множеством других ДНК-связывающих белков. Здесь я коротко прохожусь по ранним исследованиям по механизму гомологического поиска и описываю более современные исследования. Основываясь на них, я подвожу итог, что эта модель включает в себя комбинацию межсегментального перехода, близко-действенного одномерного слайдинга (потом поясню за базар) и длино-зависящего микрогомологического распознавания чтобы эффективно выравнивать последовательности ДНК во время гомологического поиска. Также я предлагаю несколько будущих направлений для помощи в нашем понимании гомологического поиска.

3.3. Картинки

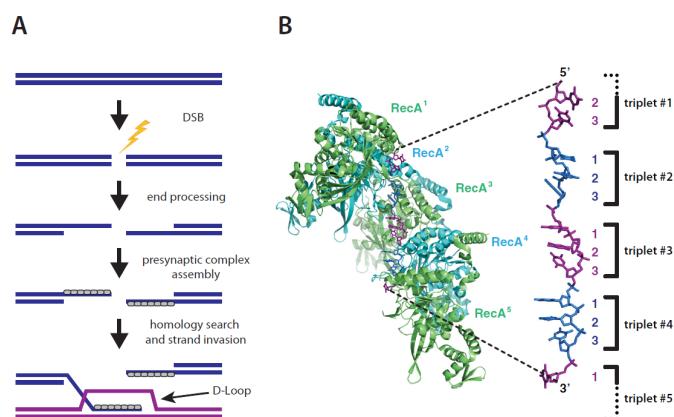


Рис. 17. А. Схематическое изображение первых стадий гомологической рекомбинации. Б. Кристаллическая структура RecA-ssDNA, которая показывает, как они связываются с триплексами (похожими на В форму, но не такими именно), образуя пресинаптический комплекс.

Про картинку 17 (А). Там ебнешься это все расписывать, поэтому суть простая: ДНК рвется подлетаю друзья-белки образуют пресинаптический комплекс, затем появляется вторая молекула, они ищут в ней нужную гомологию и образуют D-loop(залуп), из которого и начинают синтез нужной последовательности

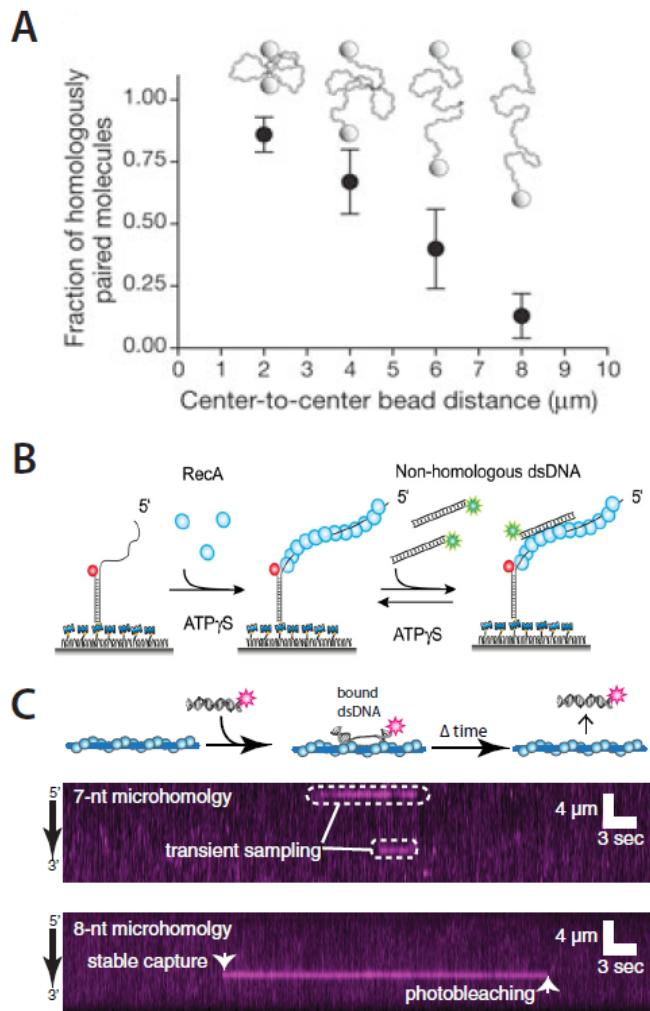


Рис. 18. А: График зависимости доли найденных гомологических спаренных молекул от расстояния между концами(подтверждающее, что гомологический поиск идет лучше для более спутанных молекул). Б: Картинка эксперимента по FRET (резонансная фотоскопия) исследованию гомологического поиска. В: Эксперимент показывающий, что переходное связывание найдено для ДНК с фрагментами, которые содержат меньше семи нуклеотидов в микрогомологии, а абсолютно стабильными являются фрагментами с 8ю нуклеотидами (стабильность аж до выщетания флюрофора)

Про картинку 18 (Б). Пресинаптические комплексы красились красными флюороформ, сам дуплекс красился зеленым, потом начинался процесс (запускали белок RecA) и потом запускались негомологические двунитевые молекулы ДНК. Когда два флюрофора приближались возникало свечение(он ссал в уши какой-то нефизичный бред). И дальше пихая туда разные ДНК получались зависимости частоты начала гомологической рекомбинации.

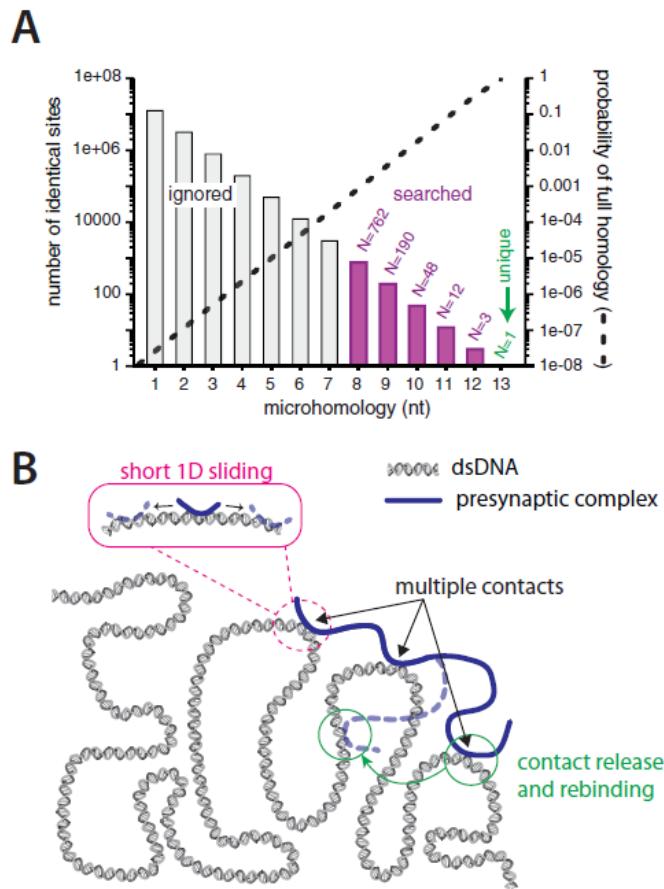


Рис. 19. А: Схематическая зависимость вероятности гомологического поиска от числа нуклеотидов внутри микрогомологии. Схематичное изображение основных принципов гомологического поиска: 1) одномерный сайдинг (скоростное (диффузионное?) скольжение в поисках нужных микрогомологий (розовый цвет), многоконтактность (синий цвет) и те самые интергементальные переходы (зеленый).

Про картинку 19 (А). Оказывается, что последовательности длинной меньше, чем 7 нуклеотидов, которые встречаются чаще (левая ось ординат), игнорируются при гомологическом поиске, а последовательность 8 и больше находятся, но очевидно, что вероятность полногот гомологического совпадения падает с увеличением длины микрогомологии.

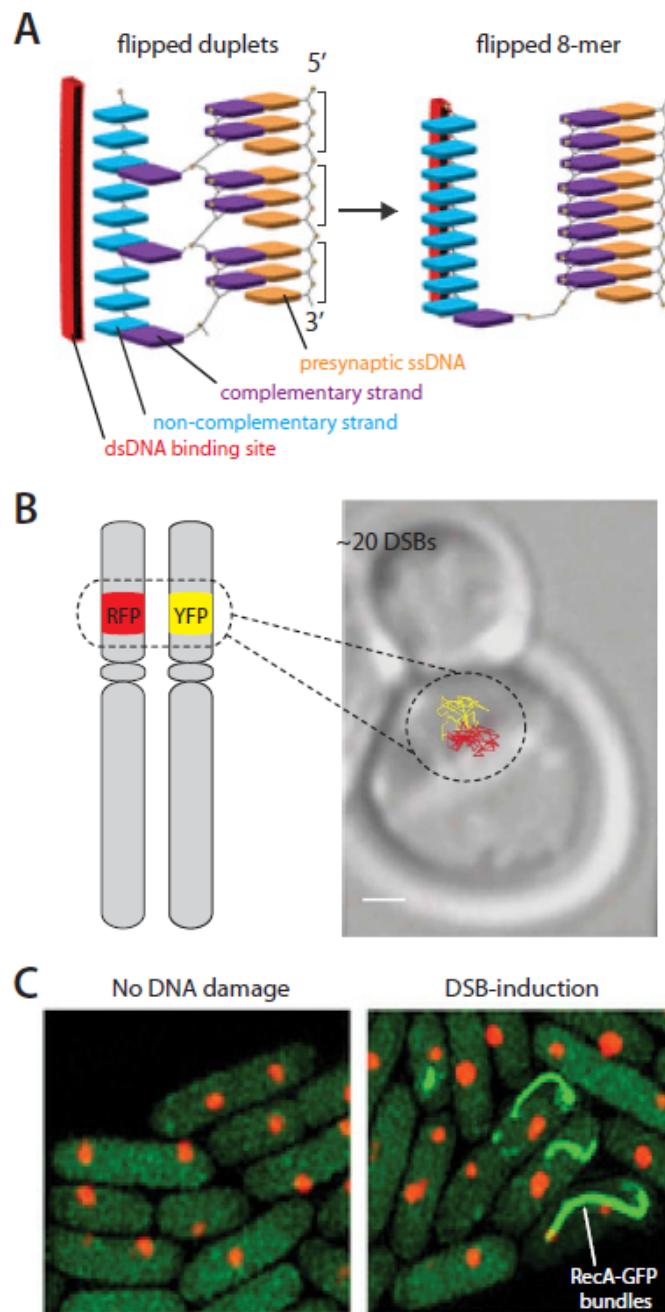


Рис. 20. А: Схематическое изображение взаимодействий дуплетов с образованием более устойчивых, связанных конфигураций. Б: Демонстрация диффузационного характера движения хромосом. В: С помощью флюоресценции показывается, что в поврежденном ДНК образуются RecA, которые ответственны за гомологическую рекомбинацию (зеленые) ВАУ!

4. Engineering of a novel tri-functional enzyme with MnSOD, catalase and cell-permeable activities

4.1. Нормальное название

Разработка нового полифункционального фермента, способного проникать в клетки млекопитающих, обладающего супероксиддисмутазной и каталазной активностями.

4.2. Абстракт

Кооперативное действие супероксиддисмутазы(SOD) и каталазы (CAT), проявляющееся в защите от окислительного стресса, является более эффективным, чем действие каждого из этих ферментов в отдельности. Химическая конъюгация этих двух ферментов позволяет получить молекулу с более высокой антиоксидантной активностью и, следственно, терапевтической эффективностью. Однако у химических методов спшивания белков есть следующие недостатки: потеря энзиматической активности, низкая гомогенность полученных продуктов, трудоемкость и необходимость очистки продукта от использованных реагентов. Тем не менее, не было доказано, что химически конъюгированные ферменты способны функционировать в заданных клетках-мишениях. В этом исследовании с помощью генной инженерии авторы впервые сконструировали и синтезировали бифункциональный фермент с супероксиддисмутазной и каталазной активностями. Чтобы позволить ферменту функционировать в клетке, был использован пептид Tat вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), способный проникать через клеточную мембрану. Совместная экспрессия генов каталазы с супероксиддисмутазой (марганецсодержащей) и TAT привела к спонтанной самосборке аминокислотных последовательностей в крупный белковый комплекс. В его состав предполагаемо входят следующие структурные элементы: один тетramer каталазы, четыре тетрамера марганцевой супероксиддисмутазы и двенадцать мономеров белка TAT. Белок был помещен внутрь клетки и продемонстрировал поразительную защитную реакцию на вызываемую паракватом клеточную гибель (по сравнению с отдельными ферментами или комплексом без TAT). Это исследование не только предлагает альтернативную стратегию синтеза мультифункционального белкового комплекса, но также иллюстрирует возможность для дальнейшего изучения агентов для терапии окислительного стресса и связанных с ним состояний.

4.3. Картинки

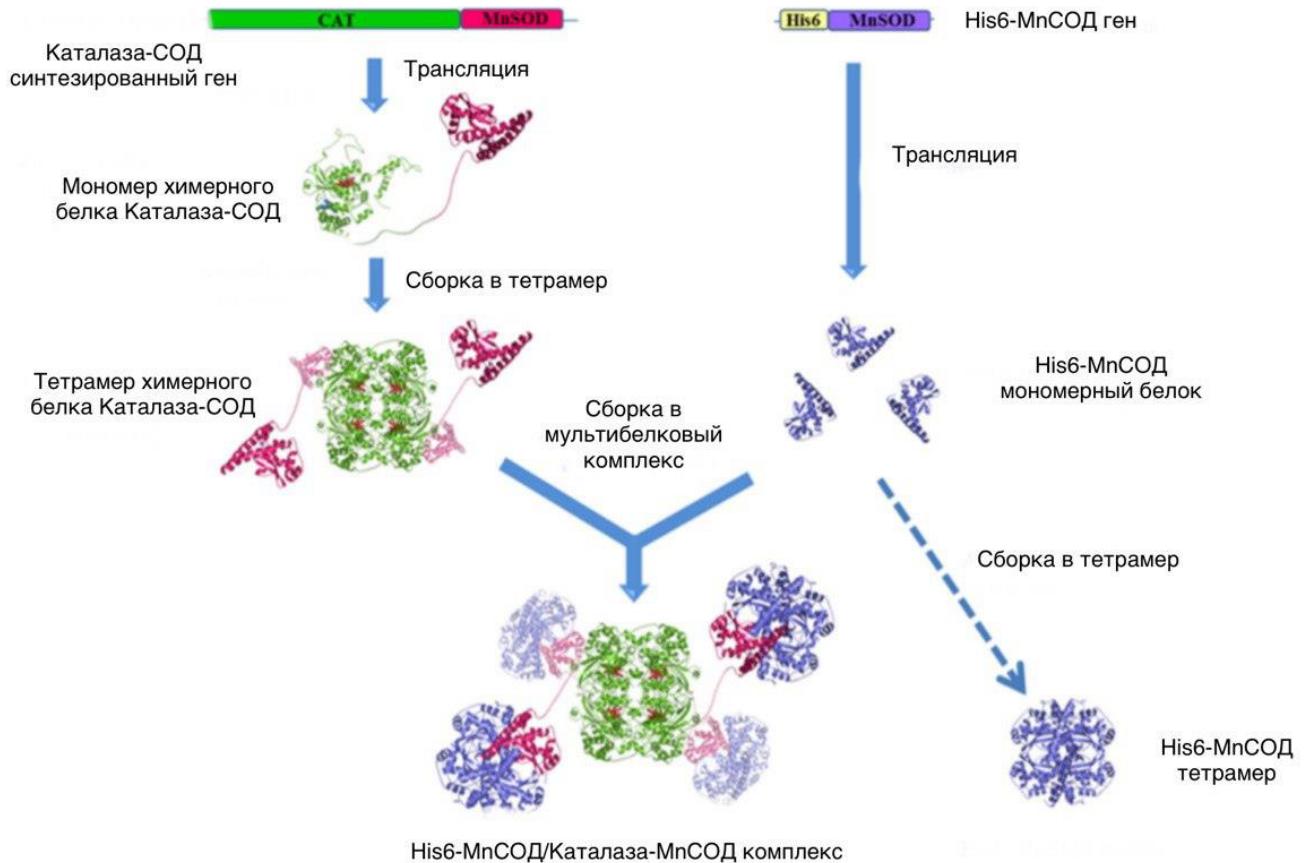


Рис. 21. Схематическое изображение стратегии конструирования бифункционального белка с супероксиддисмутазной и каталазной активностями. Совместная экспрессия химерного гена CAT-MnSOD с геном 6His-MnSOD позволяет получить мономер белка CAT-MnSOD и 6His-MnSOD. Затем два мономера собираются в большой мультимерный комплекс M/СМ белков или в тетramer 6His-MnSOD. Для получения трифункционального белка с функциями MnSOD и каталазы, а также способного проникать в клетку, ген 6His-MnSOD был заменен на химерный ген 6His-MnSOD-TAT.

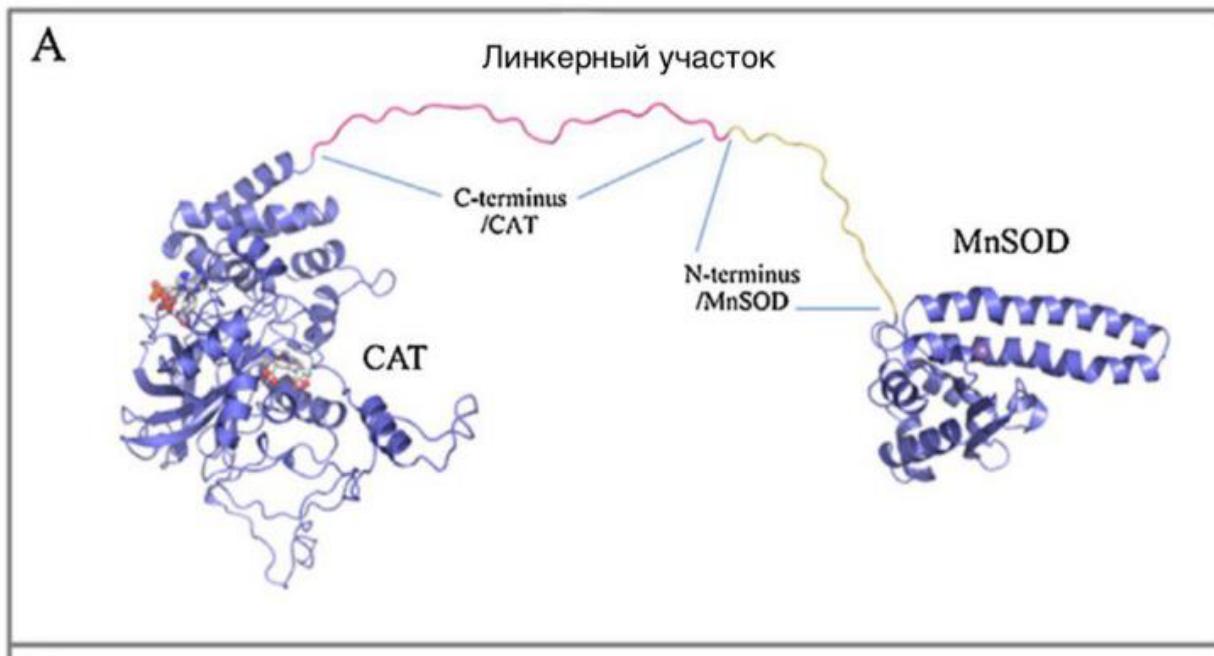


Рис. 22. Структурная модель химерного белка CAT-MnSOD (A). Модель одиночной цепи CAT-MnSOD. Линкер включает последние двадцать шесть C-концевых остатков 502-527 CAT и первые пятнадцать N-концевых остатков MnSOD

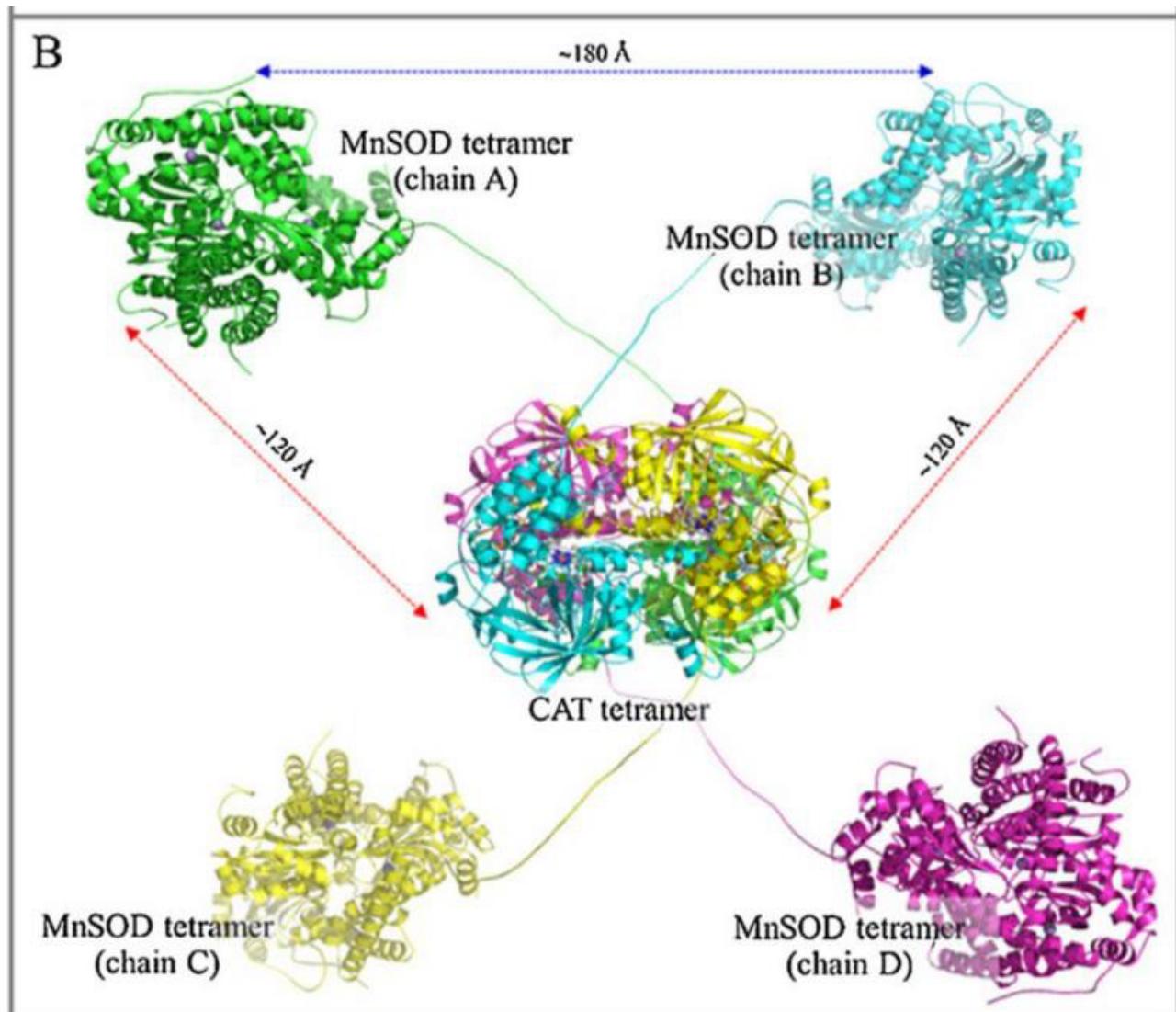


Рис. 23. (B). Модель тетрамерного CAT-MnSOD, построенная в соответствии с кристаллической структурой тетрамерной CAT человека (код pdb 1DGF). Определены расстояния до центра масс между MnSOD и CAT, а также между каждым соседним MnSOD. Гетероатомы, включая ионы гема, НАД и иона Mn^{3+} , показаны в шаровой модели.

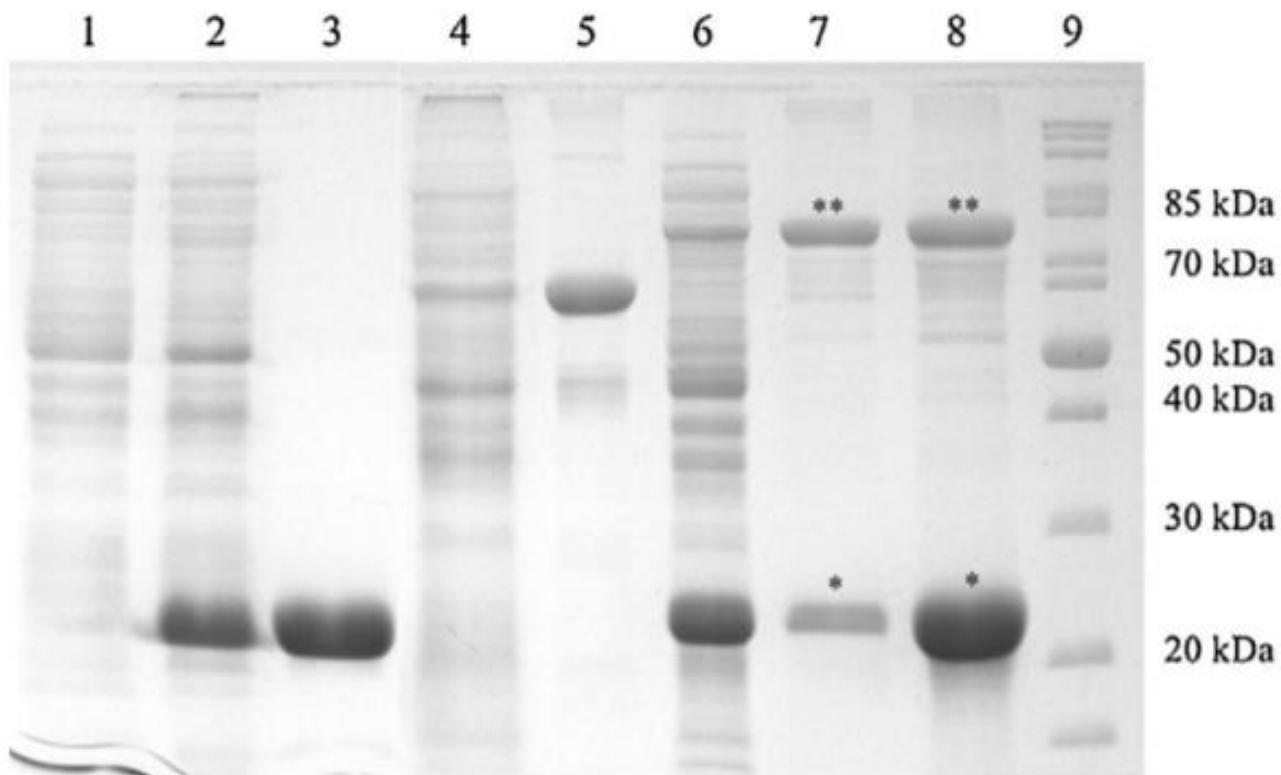


Рис. 24. Экспрессия и очистка нативных и химерных белков. Очищенные белки определяли с помощью электрофореза в ПААГ. Дорожка 1: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий контрольную плазмиду pETDuet-1, дорожка 2: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий pET46-MnSOD, дорожка 3: очищенный 6His-MnSOD, дорожка 4: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий pET46-CAT, дорожка 5: очищенный 6His-CAT, дорожка 6: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий pETDuet-MnSOD / CATMnSOD, дорожка 7: очищенный с помощью гель-фильтрационной хроматографии комплекс M/CM, дорожка: IMAC-очищенный белок, полученный в результате совместной экспрессии 6His-MnSOD и CM, дорожка 9: маркер молекулярной массы белка (* обозначает 6His-MnSOD и ** обозначает химерный белок CM).

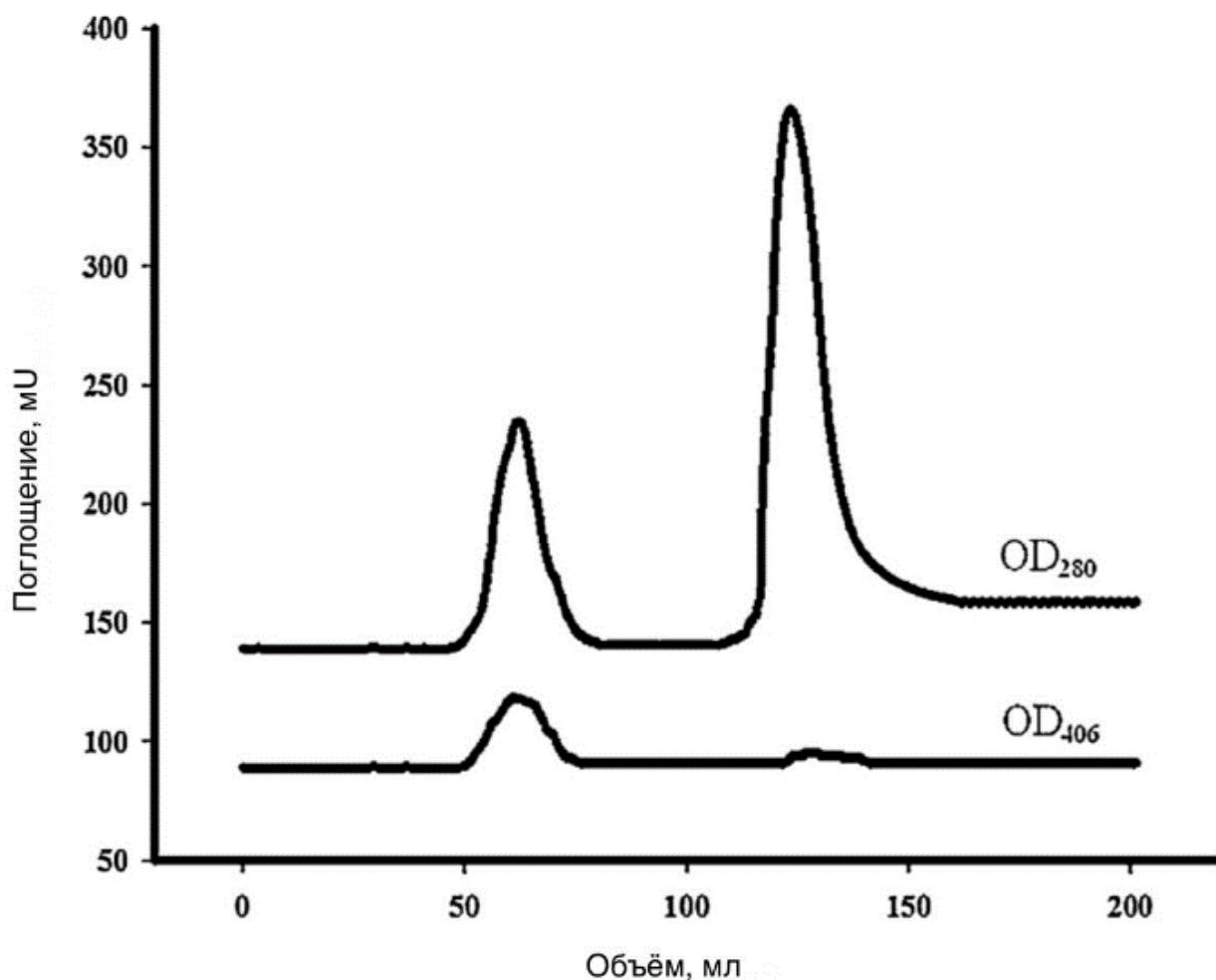


Рис. 25. Хроматограмма гель-фильтрационной хроматографии, выполненной на колонке для гель-фильтрации Sephadex G-25. Разделенные пики белков 6His-MnSOD и комплекса M/CM определяли по поглощению при 280 нм, а присутствие гема простетической группы отслеживали с помощью поглощения при 406 нм.

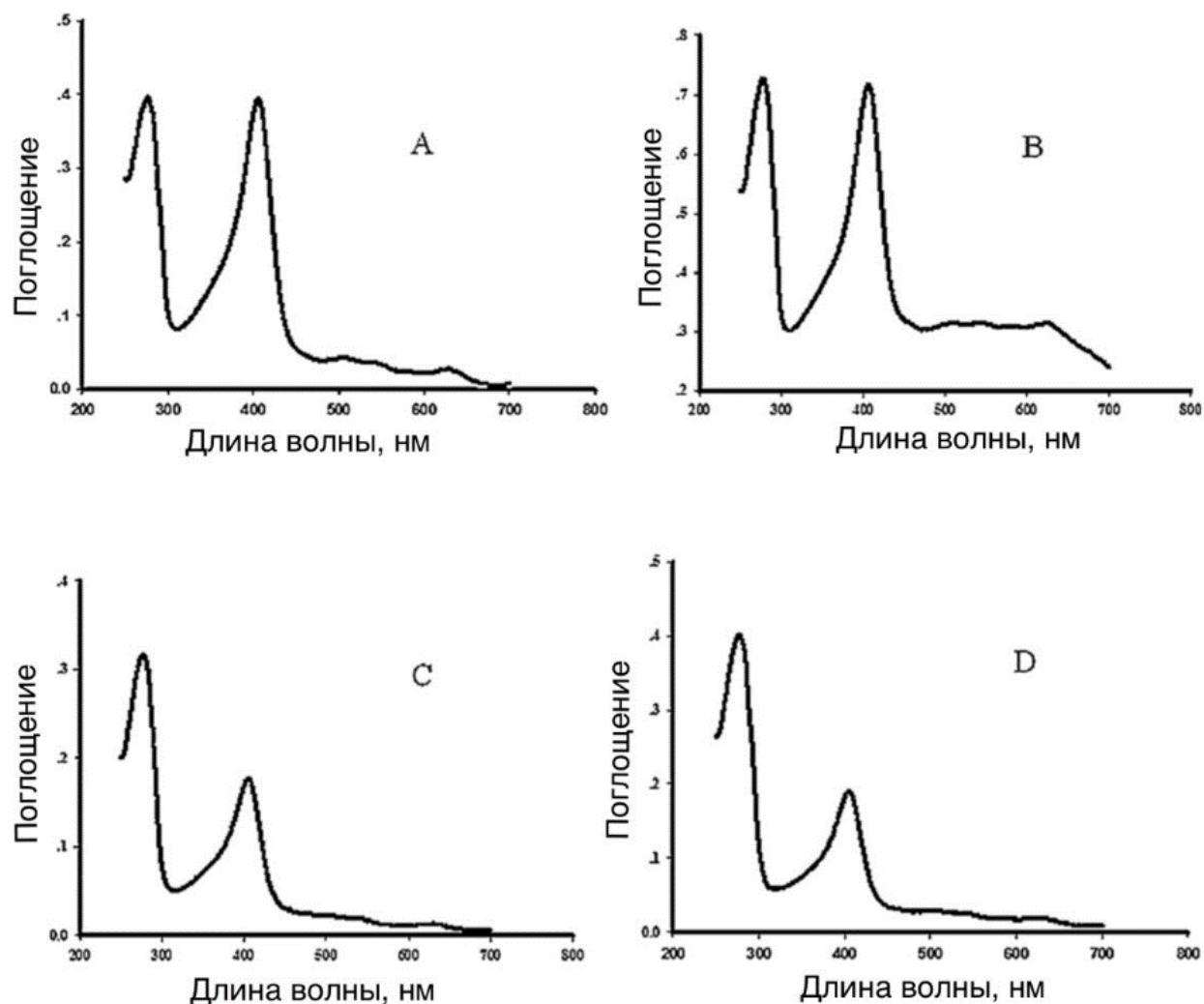


Рис. 26. Спектры поглощения очищенных белков (250–700 нм). Пик поглощения гема представлен при 406 нм. 6His-CAT (A); 6His-CAT-TAT (B); M/CM (C) и M-TAT/CM (D).

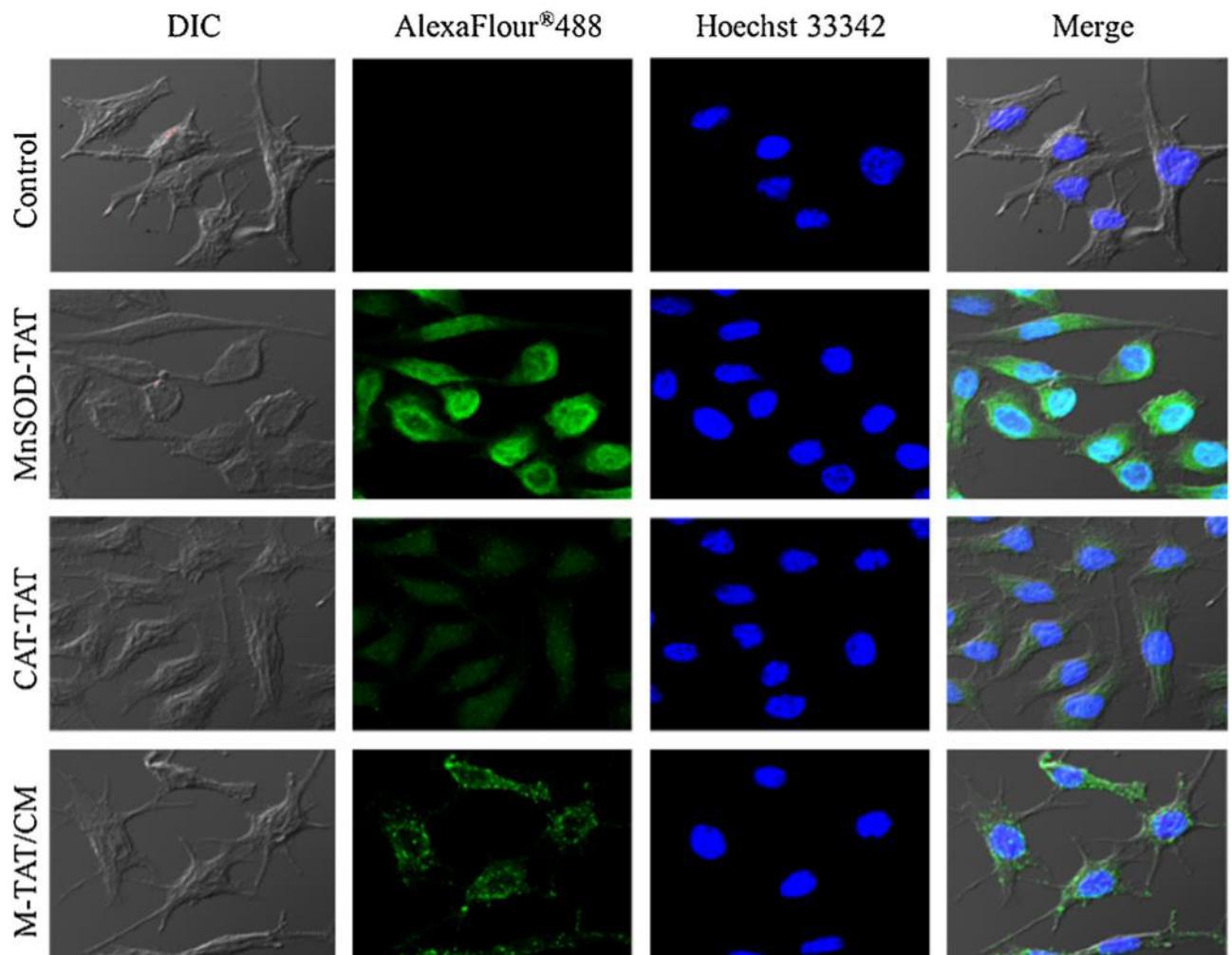


Рис. 27. Проникновение в клетки L929 6His-CAT-TAT, 6His-MnSOD-TAT и M-TAT/CM, меченых Alexa Flour 488®. Исследование и визуализация с помощью конфокальной микроскопии. Изображения были получены после обработки клеток L929 0,1 М раствором целевых белков в течение 1 часа. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342.

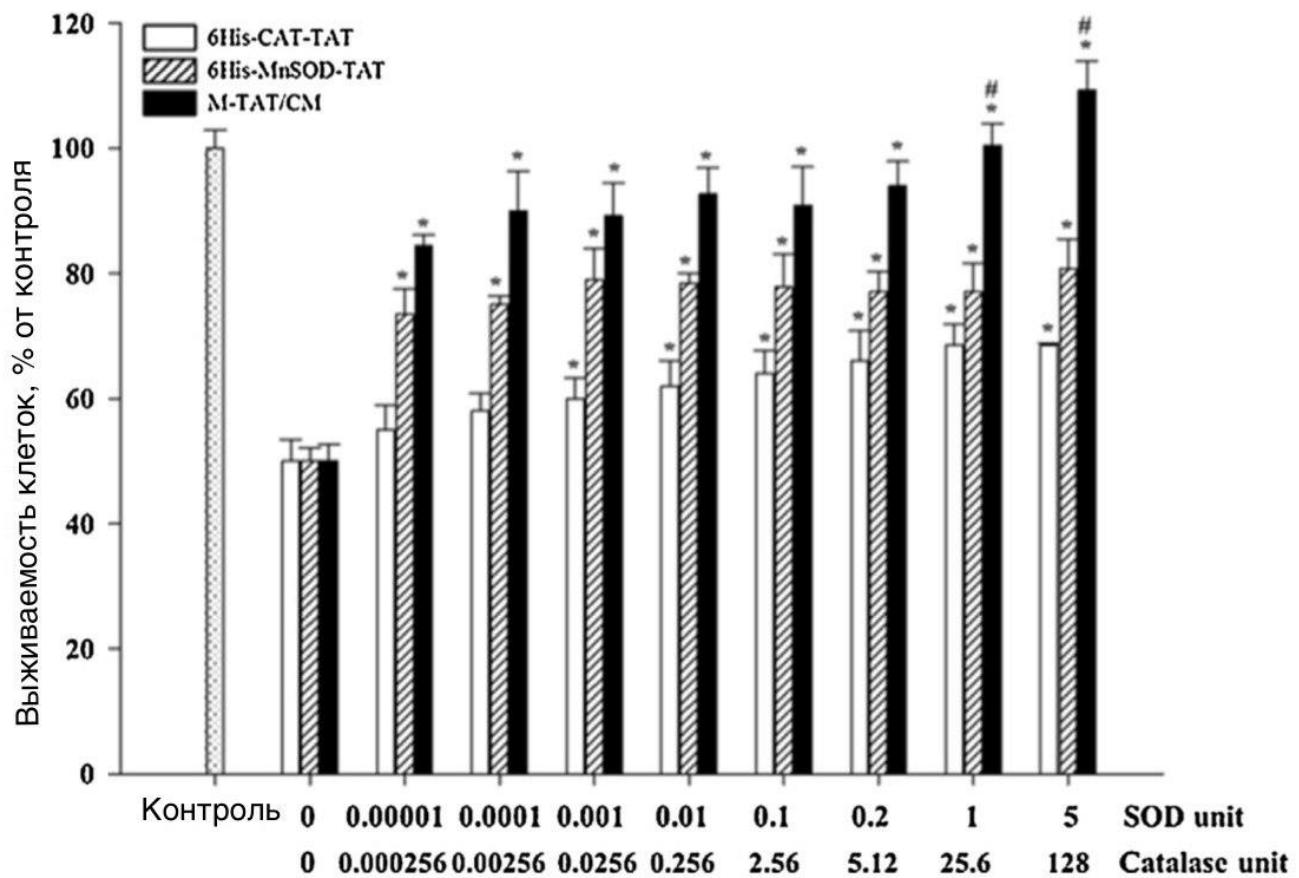


Рис. 28. Защитный эффект гибридных белков на оксидативный стресс, вызванный паракватом, в клетках L929. Клетки предварительно обрабатывали различными единицами белков в течение 1 часа. После удаления избытка белка клетки промывали и инкубировали с 30 мМ паракватом в течение 5 часов. Жизнеспособность клеток исследовали с помощью анализа MTS. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение в трех независимых экспериментах. Статистический анализ оценивали с помощью парного t-критерия, $p\text{-value} < 0.05$.

5. The ribosome as a missing link in prebiotic evolution II: Ribosomes encode ribosomal proteins that bind to common regions of their own mRNAs and rRNAs

5.1. Нормальное название

Рибосома как недостающее звено в эволюции пребиотиков II: рибосомы кодируют рибосомные белки, которые связываются с общими участками их собственных мРНК и рРНК.

5.2. Абстракт

Авторы предположили, что рибосома может представлять собой недостающее звено между пребиотической химией и первыми клетками. Одно из предположений, которое следует из этой гипотезы, которую мы здесь проверяем, заключается в том, что рибосомная РНК(рРНК) должна кодировать белки, необходимые для функционирования рибосом. Другими словами, рРНК также функционировала пребиотически как мРНК. Поскольку эти связывающие рибосомы белки (rb-белки) должны связываться с рРНК, но рРНК также функционирует как мРНК, отсюда следует, что rb-белки также должны связываться со своей собственной мРНК. Эту гипотезу можно противопоставить «нулевой» гипотезе, согласно которой rb-белки возникли независимо от последовательностей рРНК, и поэтому не должно быть необходимого сходства между рРНК, с которой связываются rb-белки, и мРНК, кодирующей rb-белок.

5.2.1. Пояснения к вышеуказанному

Они представляют 5 доказательств своей теории: 1) повсеместное связывание rb-белков с их собственными мРНК и аутогенный контроль их собственной трансляции, 2) более высокая, чем ожидалось, частота появления богатых аргинином модулей, связанных со связыванием РНК, которое происходит в белках, кодируемый рРНК, 3) факт, что рРНК-связывающие области rb-белков гомологичны своим мРНК-связывающим областям, 4) более высокая, чем ожидалось, встречаемость последовательностей rb-белка, кодируемый в рРНК, которые имеют высокую степень гомологии с их мРНК, по сравнению со случайному выбором других белков, 5) рРНК у современных прокариот и эукариот кодирует функциональные белки.

Ну и еще они предлагаются дальнейшие проверки гипотезы: (1) экспериментальное тестирование того, связываются ли белки, кодируемы рРНК, с рРНК в их кодирующими сайтах; (2) кодируются ли тРНК-синтетазы, которые, как известно, связываются со своими собственными мРНК, самими последовательностями тРНК; (3) и предсказание того, что гены архей и прокариот (основанные на ДНК) были построены вокруг «генов» рРНК, так что последовательности, связанные с рРНК, будут составлять неожиданно высокую долю этих генов.

5.3. Картинки

```

16S S4 bs rRNA 5'3' Frame 1 (17 aa)
10
rp S4 LKLSRREGTD
| : | | X | :
16S S4 bs LRASSRGNTT
10
16S S4 bs rRNA 5'3' Frame 2 (17 aa)
150
rp S4 EKAKKQSRVKAAL
| : | : | / | | :
16S S4 bs EEAPANSVPAAAV
10
16S S4 bs rRNA 3'5' Frame 1 (18 aa)
10
rp S4 LKLSRREGTDL
| : : | || | :
16S S4 bs LRITAAAGTEL
10
16S S4 bs rRNA 3'5' Frame 1 (18 aa)
160
rp S4 RVKAAL--ELA
| : | | : | | |
16S S4 bs RITAAAGTEL
10

30S S7 bs rRNA Frame 1 (41 aa) vs. S7 mRNA (P02359)
10 20
S7 rRNA AHTKRSDLARASGPHK
| | | | : | : | : |
S7 mRNA AVKKREDVHRMAEANK
140
30S S7 bs rRNA Frame 3 (41 aa) vs. S7 mRNA (P02359)
20 30
S7 rRNA ESKRTSSAS---SGLD-LQLDGSMKSE
: | : X / | : | : | \ | | | |
S7 mRNA DGKKSTAESIVYSALETLAQRSKGSE
40 50
30S S7 bs rRNA Frame 6 (41 aa) vs. S7 mRNA (P02359)
20
S7 rRNA ALYEVRLLSRGRF
| : | | | | \ | | |
S7 mRNA AFAHYRWLSSLRSFS

```

Рис. 29. Первая картинка

Тут они сравнивают последовательности рибосомальных белков на мРНК и пРНК. Сплошная линия - совпадает, пунктир - комплементарные, а крестик - не знаю).

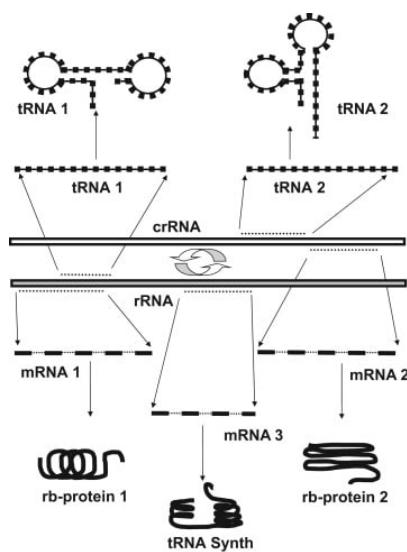


Рис. 30. Вторая картинка

Здесь нарисованы основные функции кодирования информации в этой теории. По центру - пРНК, может кодировать и мРНК и тРНК + может транскрибировать в комплементарную последовательность, которая также будет кодировать мРНК и тРНК.

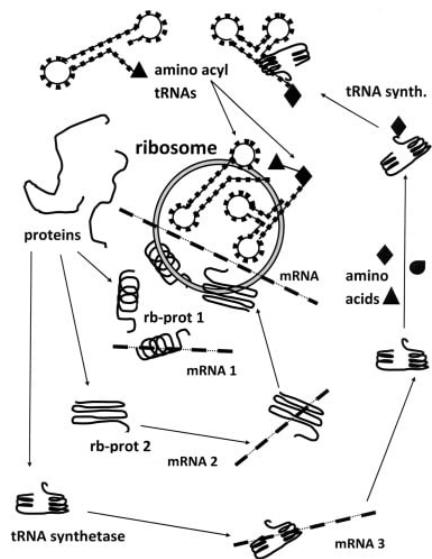


Рис. 31. Третья картинка

Здесь нарисовано, как компоненты второго рисунка взаимодействуют с целью создания функционирующей рибосомы, способной осуществлять трансляцию и просто метаболический контроль. рРНК (жирный серый кружок в центре) связывает рибосомальные белки. Эти rb-белки не только обеспечивают рибосомные функции, такие как помочь в связывании тРНК, но также автогенно регулируют свое собственное производство путем связывания с последовательностями мРНК, гомологичными их сайтам связывания рРНК. Некоторые из этих белков также выполняют дополнительные метаболические функции, такие как присоединение аминокислот к соответствующим тРНК для создания аминоацил-тРНК, которые используются рибосомой для синтеза пептидов или белков. Результатом этого является саморегулируемая система управляемой рибосомой репликации, транскрипции и трансляции, которая кодирует все компоненты, необходимые для репликации рибосомы.

6. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability

6.1. Нормальное название

Склонная к ошибкам ПЦР (полимеразная цепная реакция) грибковой(очной?) ксиланазы для улучшения её щелочной и термической стабильности.

6.1.1. Пояснения к вышесказанному

Ксиланаза – фермент, расщепляющий полисахарид(ксилан) в моносахарид(ксилоза).

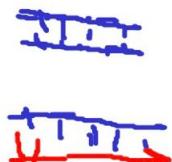
6.2. Абстракт

Случайный мутагенез был использован для улучшения щелочной и термической стабильности ксиланазы «название термофильных грибов». Были выполнены склонные к ошибкам ПЦР; продукты были клонированы в кишечную палочку и библиотека из 960 клонов была отобрана на ксилан-содержащей чашке петри. (ксилан=сахар=еда =>кто умеет его кушать выжил). Полученный грубый фильтрат был протестирован (screened) при 80С. При ph 10 Изначальная ксиланаза потеряла 80% актив-ти после 90 min на 80С и 70% на ph 10. Наиболее термостабильный же мутант G41 наборот сохранил 75% активности, а щелочно-стабильный G53 Анализ последовательностей выявил 4 замены аминокислот в G41 и одну в G53. Таким образом эти варианты обладают лучшими термическими/щелочными стабильностями и являются хорошими кандидатами для «ДНК-шафлингэз», чтобы создать в итоге крепкую ксилиназу для промышленности.

6.3. Картинки

*Здесь просто различные условия ПЦР –
ничего содержательного.*

Table 1. Mutagenic PCR conditions used for amplification of *xynA*



Condition	Mg ²⁺	Mn ²⁺	dNTPs	Programme	No. of cycles	References
A (control)	1.5	–	0.1	94 °C – 1 min 42 °C – 1 min 72 °C – 2 min	35	–
B	4.8	0.5	0.2 AG 0.8 CT			Matsumura & Ellington (2001)
C	1.5	–	0.04 AG 0.2 CT			Chen <i>et al.</i> (2001)
D ^{I*}	2	0.04	0.02 AG 0.2 CT	94 °C – 1 min 46 °C – 1 min 72 °C – 2 min	20	Xu <i>et al.</i> (1999)
D ^{II}	–	–	0.02 AG 0.2 CT 0.04 dITP		30	
E [†]	3.5	–	0.04 G	94 °C – 1 min 46 °C – 30 s 68 °C – 1 min	25	Diversify kit
F [†]	0.64	0.04 G				
G [†]	0.64	0.2 G				
H [†] (Control)	–	–	0.2 AGCT			

*Two microlitres of unpurified PCR product of D^I was used as template for D^{II}.

[†]Diversify Random Mutagenesis Kit (Clontech) conditions. Special Diversify dNTP mix with unspecified concentrations was used for conditions E, F and G.

Рис. 32. Первая картинка

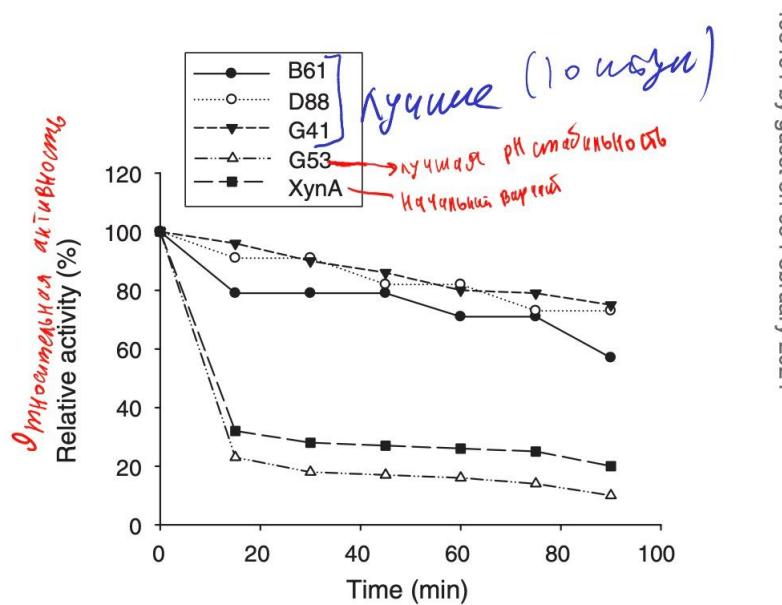


Fig. 1. Effect of temperature on the stability of wild-type XynA and its mutant progeny at 80 °C and pH 6.5. The remaining activities were expressed as percentages of the original activities, with each point representative of duplicate determinations.

Что делали?

Для каждого мутанта:

1. Нагреваем до 80С и держим время TIME
2. охлаждаем и замеряем активность
3. замеряем активность такого же мутанта, которого не помещали в 80С
4. делим одно на второе

Рис. 33. Вторая картинка

Видим, что некоторые мутанты теряют сравнительно с диким типом мало активности, кроме того лучший в 10 рН в 80 °C теряет еще больше.

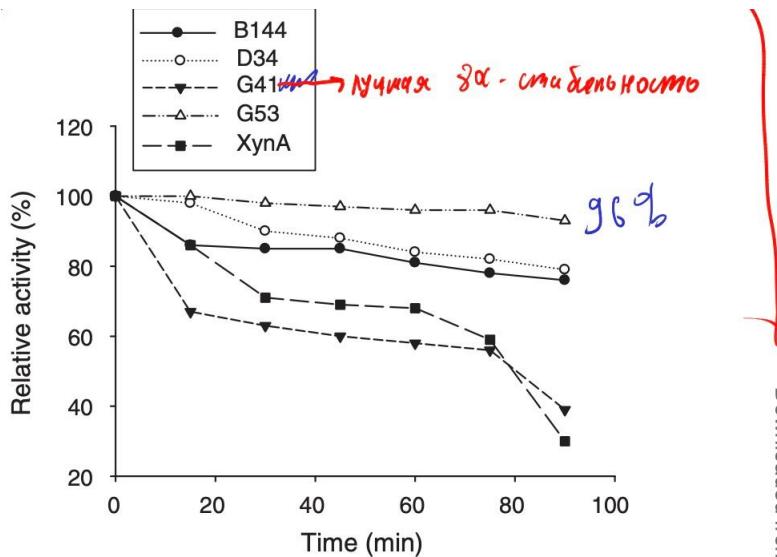


Fig. 2. Effect of alkalinity on the stability of wild-type XynA and its mutant progeny at pH 10 and 60 °C. The remaining activities were expressed as percentages of the original activities, with each point representative of duplicate determinations.

тут же не сгорает, но при 80°C , в $\text{pH} 10$.
тут же не сгорает — есть что не теряет, но при 80°C
~~которое~~ which is in complete contrast to the observations

Рис. 34. Третья картинка

Тут тоже самое, но не в 80 °C, а в 10 pH. Видим то же самое - есть что не теряет, но лучший 80 °C теряет сильно.

Рис. 35. Четвертая картинка

Сравнение последовательностей аминокислот оригинальной ксилианзы и лучшей по 80 °C и лучшей по 10 pH стабильности.

7. A Single Promoter Inversion Switches *Photorhabdus* Between Pathogenic and Mutualistic States

7.1. Нормальное название

Одна инверсия промотора приводит к переключении бактерии *Photorhabdus* между патогенным и мутуалистическим состоянием.

7.2. Абстракт

Популяции микробов случайным образом генерируют варианты с совершенно разными свойствами, такими как вирулентность (способность вызывать заболевания) или авибулентность, толерантность (чувствительность) к антибиотикам. Бактерии *Photorhabdus luminescens* имеют разнообразную жизненную историю, в которой они чередуются между патогенами к множеству насекомых и мутуалистами с их нематодами-хозяевами. В статье мы показываем, что патогенный вариант *P. luminescens* (форма P) переключается на вариант с меньшими (по размеру) клетками (форма M), чтобы инициировать мутуализм в кишечнике немато-хозяев (они в них живут). Стохастическая инверсия промотора вызывает переключение между двумя различными формами. Клетки M-формы намного меньше (одна седьмая объема), медленнее растут и менее биolumинесцентны, чем клетки P-формы; они также авибулентны и производят меньше вторичных метаболитов (продукты метаболизма, которые НЕ необходимы для жизни). Наблюдения за переключением формы отдельными клетками в нематодах показали, что форма M сохранялась в кишечнике материнской нематоды, и была первыми клетками, колонизировавшими инфекционное молодое (IJ - infective juvenile) потомство (нематод), а затем переключилась на P-форму в кишечнике IJ, которая дала возможность нематодам заражать следующий цикл насекомых.

7.3. Картинки

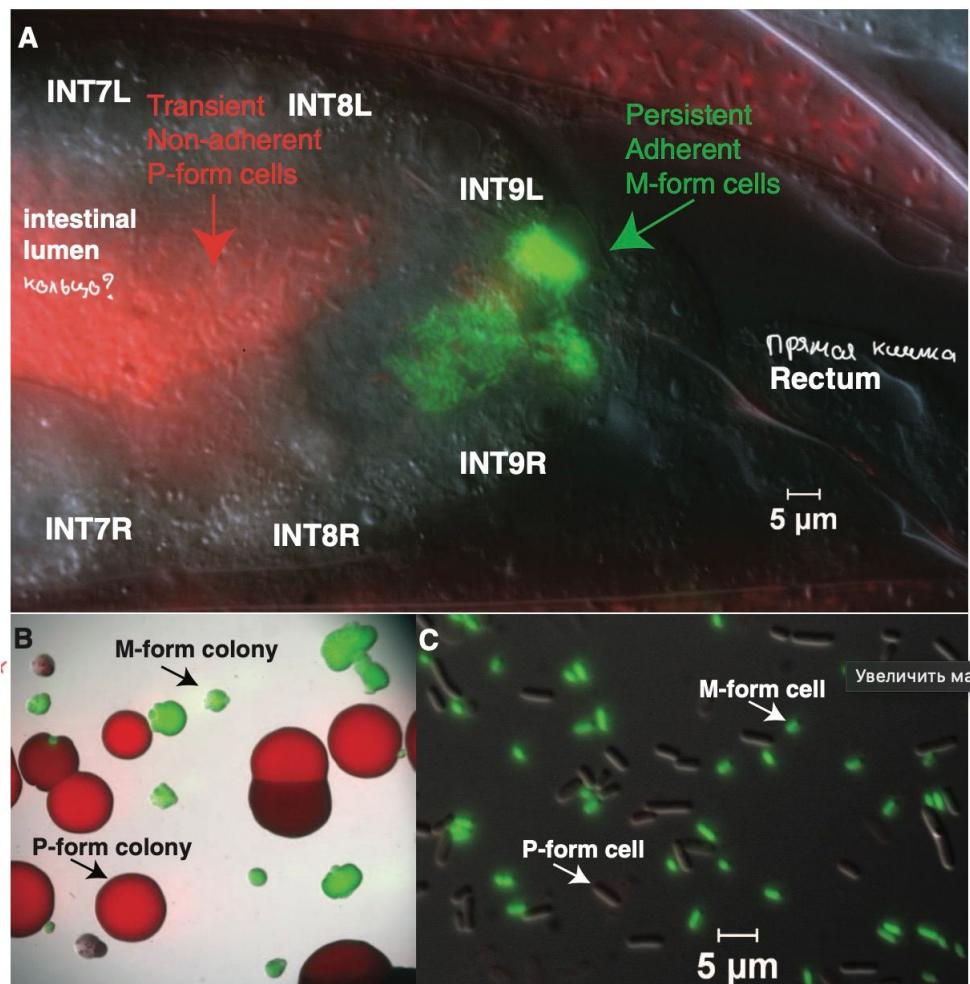


Рис. 36. Первая картинка

Значит на первой пикче (**а**) Дело происходит в кишечнике нематоды (глисты). Все эти инты — номера колец в кишечнике, типа геотег Зелёные — М-форма этих бактерий, она меньше и устойчива (в плане статична, так как они отвечают непосредственно за прилипание (по-умному адгезия)). Красные — П-форма — отвечают за заразность по отношению к насекомым, в которых селятся их нематоды (в кишечнике которых они находятся), территориально они находятся в люмене (внутренне пространство в кишечнике этой ебаной нематоды).

Пикча б) Нарисованы КОЛОННИИ, а не сами бактерии. Пишут, что красные (П-форму) образуют большие колонии, а зелёные (М-форма) маленькие (вау, охуеть, да?).

Пикча ц) Нарисованы сами бактерии, их характерный размер. Пишут примерно то же самое. Зелёные — бактерии М-формы, красные — П-формы (которая больше по размерам, чем М-форма).

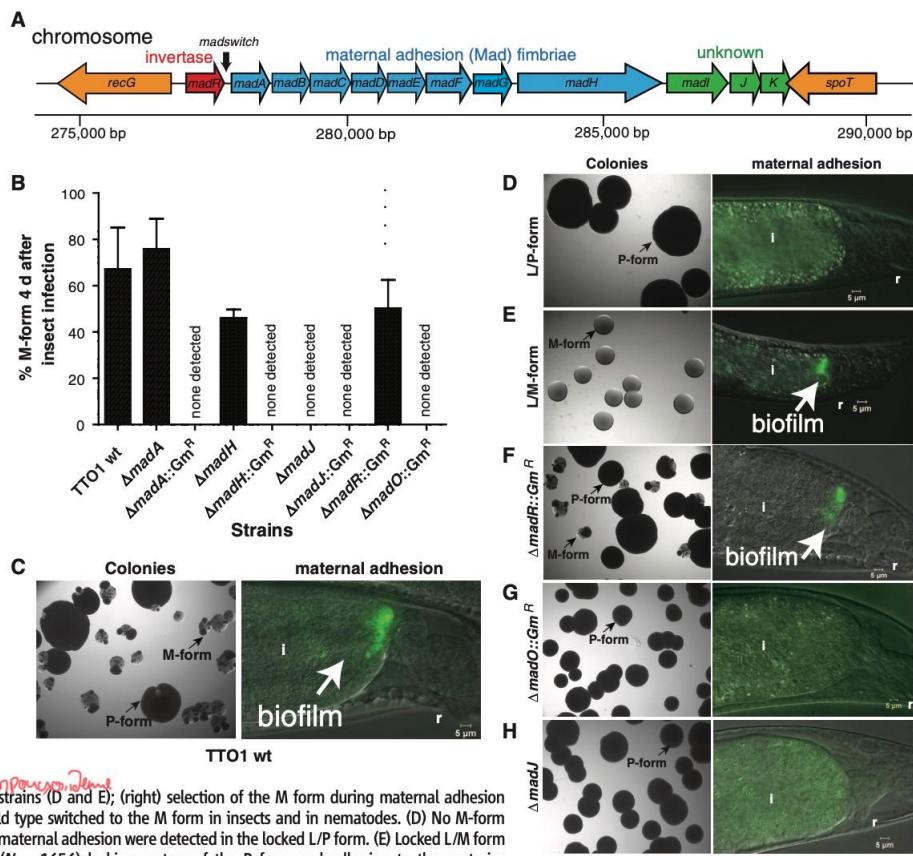


Рис. 37. Вторая картинка

Картинка а) Нарисована хромосома (ФЕЗЕЧЕСКАЯ КАРТА) Все эти *mad..* — гены. Мад-свитч — как раз тот самый участок-промотор (участок хромосомы, инициирующий трансляцию). БП — пары нуклеотидов, в них всё измеряется МадР (инвертаза, то есть отвечает за инверсию) — никаку не меняет, избыточен для того, чтобы включать инверсию. Дальше про гены нигде не написано, про которую нигде не написано. Стрелка — направление транскрипции (считывания)

б — гистограмма говна. По вертикальной оси процент бактерий в М-форме от всей колонии через 4 дня после инфицирования насекомого (П-формой). Усы — стандартное отклонения Дельта — делеция (удаление нахуй примерно), ::Gm добавление на это место какой-то хуёты. По иксам — ТТ01 — дикая форма, в которую ничего не добавляли (П-форма). Думаю, что подписывать процентики это всратоо. Ноне детектион — не нашли М-форму вообще

ц-х — Обозначения — аналогичные. Слева нарисованы колонии, справа кишечник нематоды. И — кишечник, р — ректум (жепа). Биофильм — множество микроорганизмов, расположенных на какой-либо поверхности, клетки которых прикреплены друг к другу. L/...-form — заблокирован определённый ген, который отвечает за этот свитч как раз. То есть бактерия по сути застряла в одной форме.

Гляди на картинке, наличие биоплёнки или ярко-зелёного цвета говорит тебе о том, что появились М-формы. Достаточно в принципе посмотреть на колонии.

В случае пикчи аш надо сказать, что в 54 процентах исследованных нематод не было прикреплённый (адгезированных) бактерий

Strains	M form (%)	Maternal adhesion (%)	Percent transmission to IJs (%)
TT01 (wild type)	67.1 ± 18	98.4 ± 1.3	94.4 ± 2.9
L/P form	ND*	ND	ND
L/M form	100*	97.3 ± 1.6	92.1 ± 6.4
$\Delta madR::Gm^R$	50.2 ± 12.2	98.6 ± 1.9	90.6 ± 3.2
$\Delta madA::Gm^R$	ND	ND	ND
$\Delta madA$	75.8 ± 13.1	ND	ND
$\Delta madH::Gm^R$	ND	ND	ND
$\Delta madH$	46.0 ± 3.6	ND	ND
$\Delta madJ::Gm^R$	ND	41.4 ± 8.0	19.1 ± 3.5
$\Delta madJ$	ND	46.1 ± 8.0	21.5 ± 6.4
$\Delta madO::Gm^R$	ND	ND	ND

*Determined from colonies from an overnight liquid LBP culture; n = 883 for L/P form, n = 1656 for L/M form.

Синтез инсектицидов (24, 25). Because M-форма emerge from prolonged aging of P-формы колоний, we reasoned that M-форма develops a higher incidence of persister cells (a high persister, *hip* phenotype). Indeed, the M-форма exhibited a *hip* phenotype, with >0.15% of cells tolerant to 1 µg/ml ciprofloxacin after 3 hours of exposure, which was 49.3 times the 0.003% tolerance of P-формы cells ($P = 0.01$) (Fig. 2H). The M-форма also exhibited more (8.7-fold, $P = 0.005$) tolerance to streptomycin aminoglycoside antibiotic (fig. S11). This degree of resistance provides further evidence that the M-форма is biased toward dormancy, which could be advantageous inside the nematode.

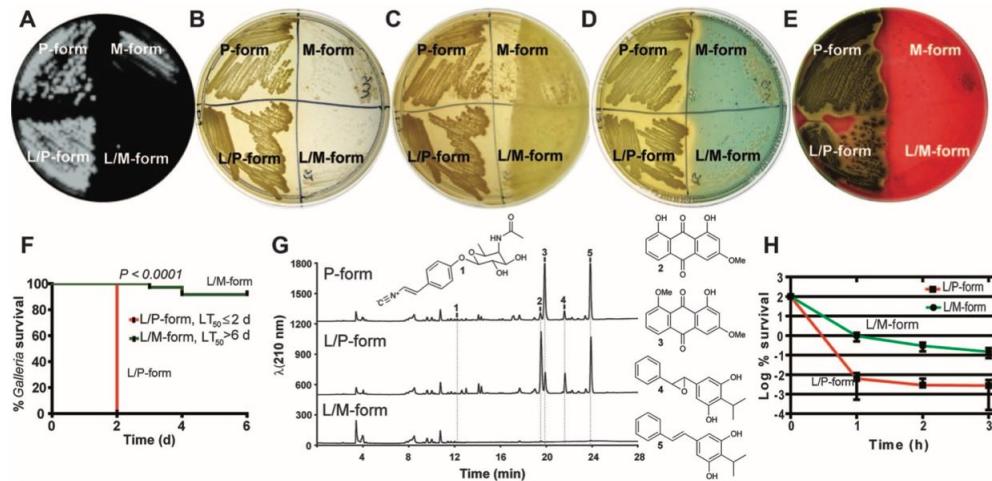


Рис. 38. Третья картинка

Табличка — первая колонка — типы введённых клеток, вторая — М-форма клеток в насекомых через 4 дня после того, как вводили П-форму, третья — процент адгезировавших(??) бактерий в кишечнике материнской нематоды через 38-40 часов (в 40-60 нематодах). Четвёртая — передача в заразное потомство (возрастом в 7 дней). +- — Стандартное отклонение

А,Б,Д,Е — чашка петри разделена на 4 части. Лево верх — простая П-форма, право верх — простая М-форма, лево низ — «фиксированная» (вмороженная) П-форма, право низ — «фиксированная» (вмороженная) М-форма

А — Свечение, которое производят соответствующие бактерии (отмечают, что в М-форме светятся мутанты, которые частично приобретают свойства П-формы) **Б** — Сравнивают цвет, П-форма непрозрачная и жёлтая, М-форма прозрачная и непигментированная (всм бесцветная) **Д** — Антимикробная активность за 48 часов роста на LBP (lysogeny broth plus sodium pyruvate) по отношению к бактерии *Micrococcus luteus* **Д** — Насколько активно происходило хелатирование (расщепление) железа. Для П-формы активно, для М-формы нет. Зона очищается по мере того, как железо расщепляется. **Е** — Насколько активно разрушают красные кровяные тельца на примере крови овцы. П-форма активно, М-форма вообще не разрушает

Ф — Вирулентность (способность производить вредные вещества) М-формой и П-формой для насекомых *Galleria mellonella* (личинок). (LT_{50} — время, когда умирало 50 процентов исследуемых особей)

Ж — Метаболитный анализ показал, что бактерии могут вырабатывать rhabduscin (химическая формула 1, под ней есть на число на графике, я так понял, что это момент его производства).

Далее аналогично 2,3 — антрахинонные пигментные молекулы (которые и дают жёлтый цвет). 4,5 — гидроксистильбеновые молекулы, которых практически нет в вмороженной М-форме.

AIII — График логарифма процента выживших от времени после введения 1 мкг/мл ciprofloxacin (антибиотик) за три часа наблюдений (Вмороженная М-форма форма в 50 раз более устойчивая к антибиотикам)

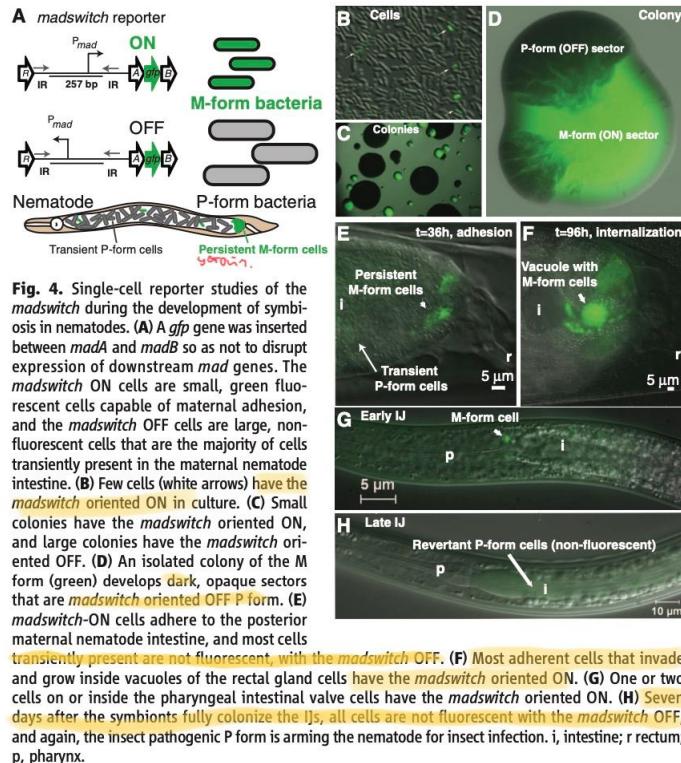


Рис. 39. Четвертая картинка

A — о том, как красили М-форму. Так как форма связана с направлением проомотора, то они добавляли красящий ген после проомотора (через 1 ген, чтобы не влиять на остальные гены). У клеток с направлением промотора ON клетки маленькие и светятся зелёным, способные к адгезии. С направлением промотора OFF — клетки большие, не светятся, которые не прикрепляются ни к чему в кишечнике материнской нематоды. Внизу картинки А изображено местоположение клеток в нематоде (серые — «плавающая» по кишечнику П-форма, зелёные — прикреплённая М-форма)

Б — у некоторых бактерий в культуре проомотор (*madswitch*) ориентирован ONю Эти бактерии зелёные, на них указывает стрелка

Ц — маленькие колонии имеют *madswitch* с ориентацией ON (зелёные, М-форма). Большие колонии имеют *madswitch* с ориентацией OFF (чёрные, П-форма)

D — В изолированной колонии бактерий ON появляются тёмные непрозрачные участки бактерий OFF

E — Показывают, что ON бактерии прикрепляются к кишечнику нематоды, а большинство ‘плавающих’ — не светятся, то есть OFF-бактерии.

F — Большинство прикреплённых клеток, которые прикрепляются к rectal gland и растут внутри клеток вакуолей этой rectal gland это ON-бактерии

G - В раннем заразном потомстве несколько клеток бактерий в кишечнике имеют madswitch направленный ON.

H — Через неделю после того, как симбиоты полностью колонизируют заразное потомство клетки перестают светиться, а значит, что развились мутанты с направлением OFF. То есть по сути в конце внутри нематоды остаётся только патогенная форма, которая нужна нематодам для заражения насекомых

На картинках i — кишечник p — глотка, r — прямая кишка

8.

8.1.

8.2.

8.3.

9.

9.1.

9.2.

9.3.

10.

10.1.

10.2.

10.3.

11.

11.1.

11.2.

11.3.

12.

12.1.

12.2.

12.3.

13.

13.1.

13.2.

13.3.

14.

14.1.

14.2.

14.3.

15.

15.1.

15.2.

15.3.

16.

16.1.

16.2.

16.3.

17.

17.1.

17.2.

17.3.

18.

18.1.

18.2.

18.3.

19.

19.1.

19.2.

19.3.

20.

20.1.

20.2.

20.3.

21.

21.1.

21.2.

21.3.