

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. AnA	18
4.1. Нормальное название	18
4.2. Абстракт	18
4.3. Картинки	19
5. Analysis of the Okazaki Fragment Distributions along Single Long DNAs	25
5.1. Нормальное название	25
5.2. Абстракт	25
5.3. Картинки	25
6. Programmable T7-based synthetic transcription factors	30
6.1. Нормальное название	30
6.2. Абстракт	30
6.2.1. Рисунок 1	30
6.2.2. Рисунок 2	31
6.2.3. Рисунок 3	32
7. The master quorum-sensing regulators LuxR/HapR directly interact with the alpha subunit of RNA polymerase to drive transcription activation in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae	33
7.1. Нормальное название	33
7.2. Абстракт	33
7.3. Картинки	33
7.3.1. Рисунок 1	33
7.3.2. Рисунок 2	35
7.3.3. Рисунок 5	35
7.3.4. Рисунок 6	36
7.3.5. Рисунок 7	38
8. Engineering of a novel tri-functional enzyme with MnSOD, catalase and cell-permeable activities	39
8.1. Нормальное название	39
8.2. Абстракт	39

8.3. Картинки	40
9. 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	48
9.1. Нормальное название	48
9.2. Абстракт	48
9.2.1. Пояснения к вышеуказанному	48
9.3. Картинки	49
10. Error-prone PCR of a fungal xylanase for improvement of its alkaline and thermal stability	51
10.1. Нормальное название	51
10.1.1. Пояснения к вышесказанному	51
10.2. Абстракт	51
10.3. Картинки	52
11. A Single Promoter Inversion Switches <i>Photorhabdus</i> Between Pathogenic and Mutualistic States	55
11.1. Нормальное название	55
11.2. Абстракт	55
11.3. Картинки	56
12. Mitochondrial DNA and human evolution A review (Ева)	61
12.1. Нормальное название	61
12.2. Абстракт	61
12.2.1. Общая инфа	61
12.3. Картинки	62
12.3.1. Для общего развития	64
13. Protection of nuclear DNA by lifespan-extending compounds in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
13.1. Нормальное название	65
13.2. Абстракт	65
13.3. Картинки	67
14. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter	71
14.1. Нормальное название	71
14.2. Абстракт	71
14.2.1. Примечание	71
14.3. Картинки	71
15.	76
15.1.	76
15.2.	76
15.3.	76

16.	77
16.1.	77
16.2.	77
16.3.	77
17.	78
17.1.	78
17.2.	78
17.3.	78
18.	79
18.1.	79
18.2.	79
18.3.	79
19.	80
19.1.	80
19.2.	80
19.3.	80
20.	81
20.1.	81
20.2.	81
20.3.	81
21.	82
21.1.	82
21.2.	82
21.3.	82

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

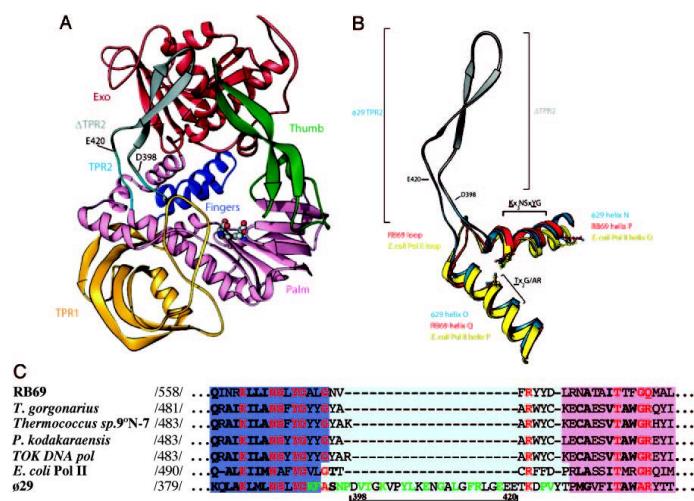


Рис. 1. 1A: структура днк полимеразы, показана локализация вставки TPR2; 1B: выравнивание структур мутантного варианта и дикого типа; 1C: выравнивание последовательностей нескольких бактерий и мутантной версии с делецией, выделены консервативные мотивы.

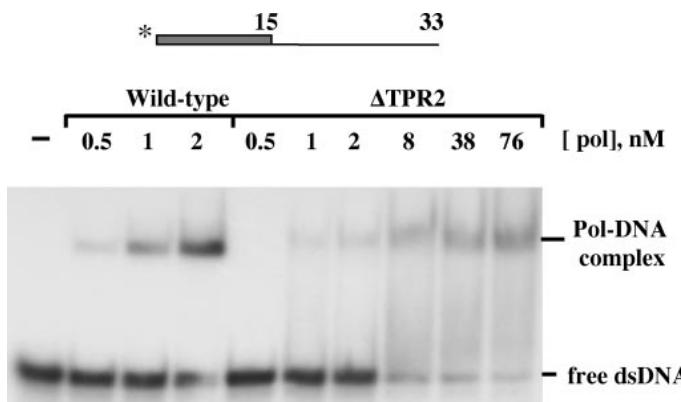


Рис. 2. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

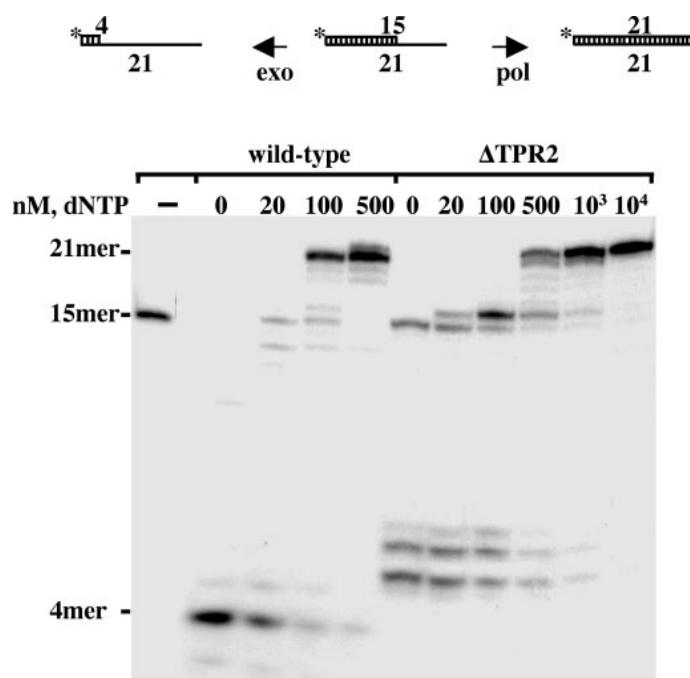


Рис. 3. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

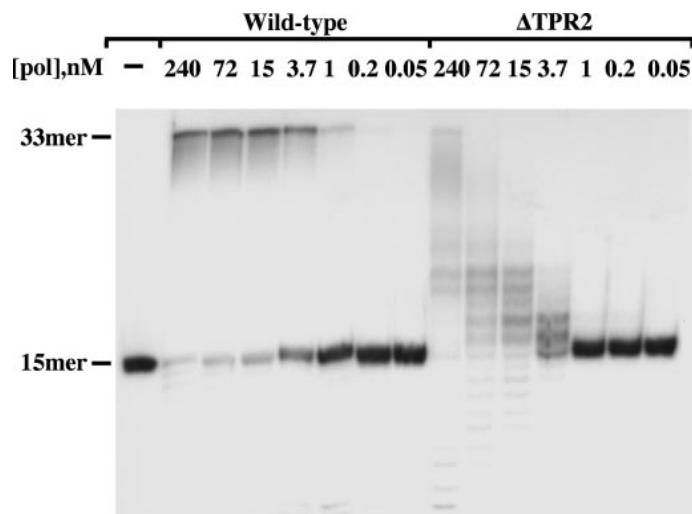


Рис. 4. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

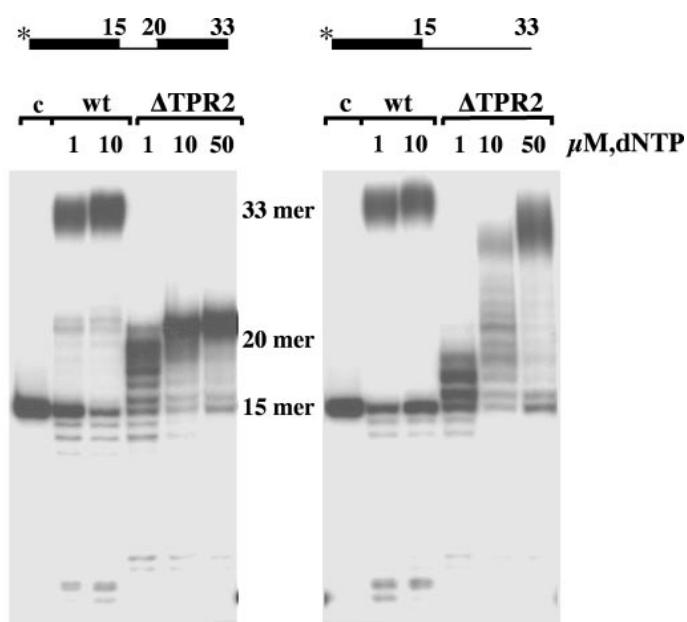


Рис. 5. Электрофорез, показывающий высокую процессивность/возможность замещения цепи. Здесь надо обратить внимание на оси, в зависимости от концентрации pol/dNTP показано преимущество дикого типа перед мутантным вариантом с делецией.

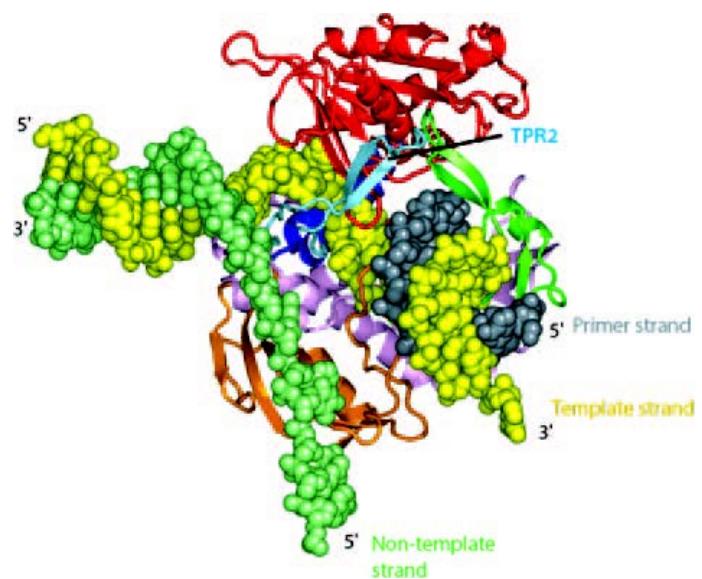


Рис. 6. Моделирование высокой процессивности и замещения цепи.

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

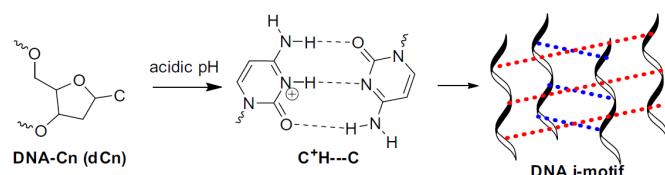


Рис. 7. Образование водородных связей между цитозинами ДНК в кислотной среде и формирование структуры под названием и-мотив.

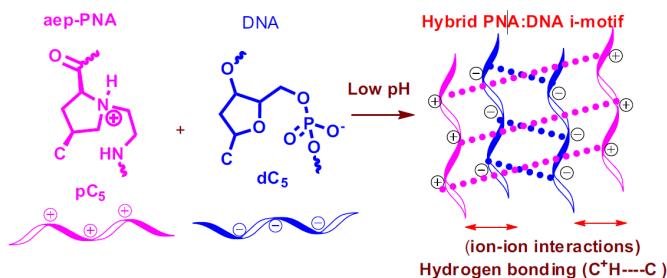


Рис. 8. Предполагаемая схема образования гибридного и-мотива.

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.

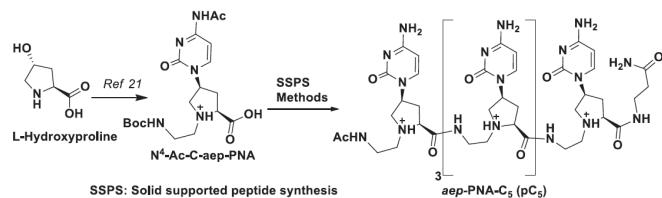


Рис. 9. Синтез цитозинового мономера аэп-ПНК и пентамера из цитозинов аэп-ПНК.

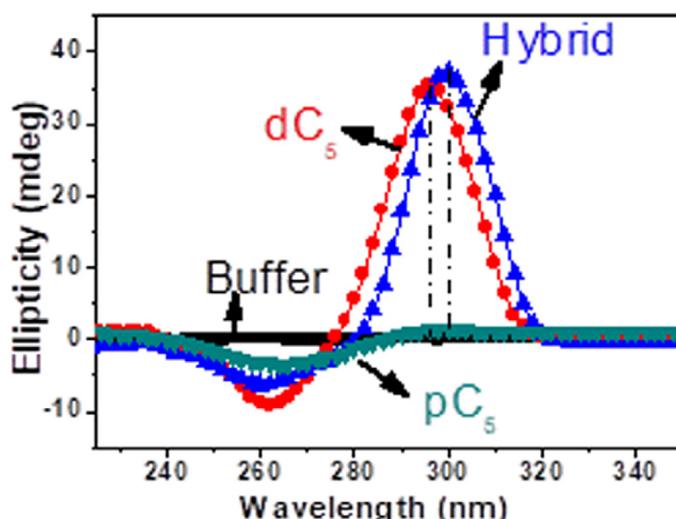


Рис. 10. КД-спектр (круговой дихроизм) цитозин-пентамеров аэп-ПНК (45 мМ), ДНК (45 мМ), смеси аэп-ПНК и ДНК 1:1 (по 22.5 мМ каждый) при 10 градусах Цельсия, pH 4.5.

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.

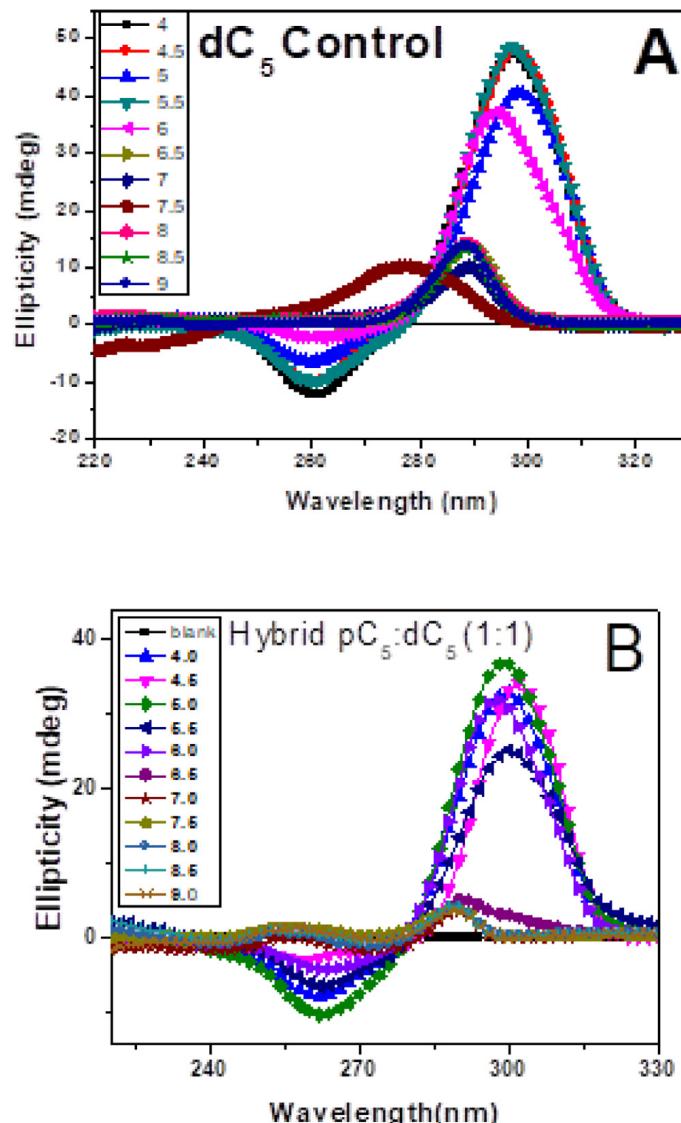


Рис. 11. КД-спектры при различных рН цитозин-пентамеров ДНК (45мМ) (на рис. А), смеси ДНК/аэп-ПНК (22.5 мМ каждый) (на рис. Б)

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).

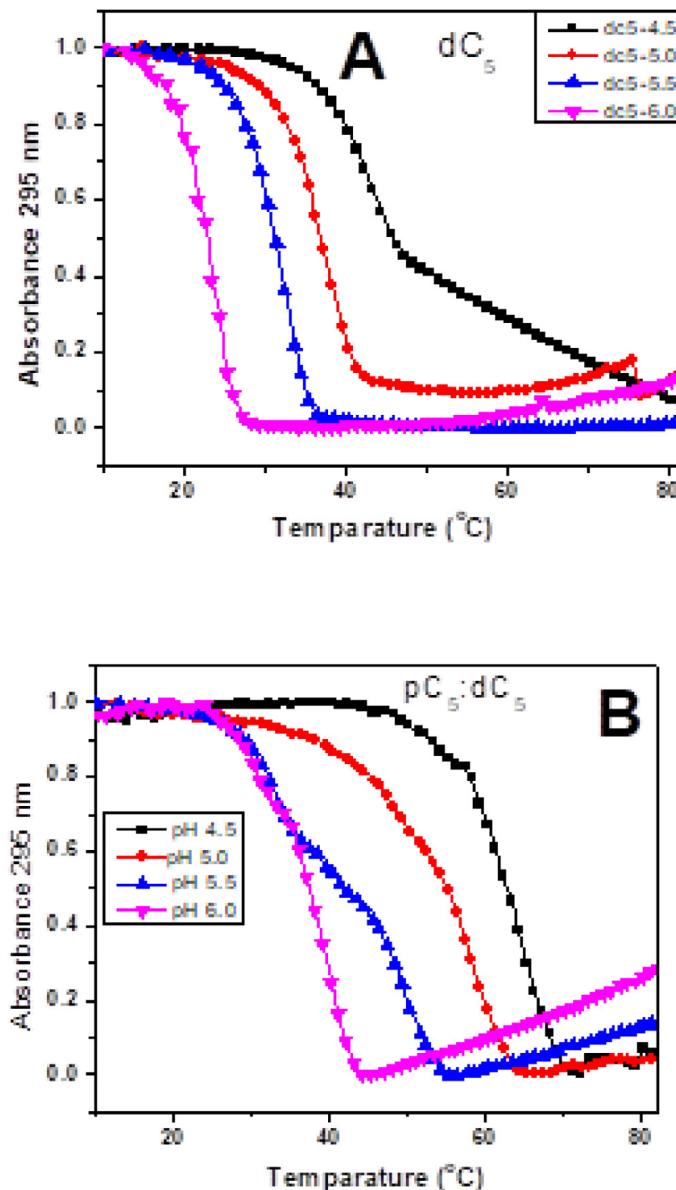


Рис. 12. Температурные профили плавления при различных рН при облучении УФ на длине волны 295 нм: цитозин-пентамеры ДНК (45.0 мМ), (В) цитозин пентамеры ДНК:аэп-ПНК (1:1) (22.5 мМ каждый).

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.

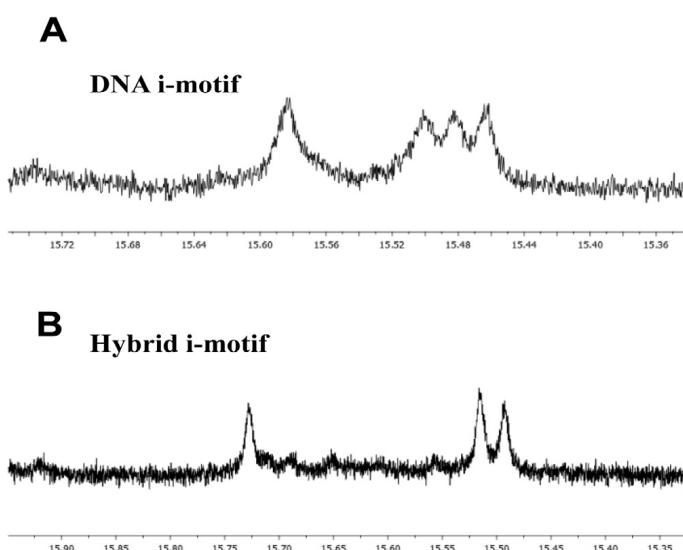


Рис. 14. Протонный магнитный резонанс водорода в связи H-N в протонированном цитозине при pH 4.5 при 25С (700 МГц) А) ДНК и-мотив (300 мМ), Б) гибрид ДНК/аэп-ПНК 1:1 (200 мМ каждый)

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.

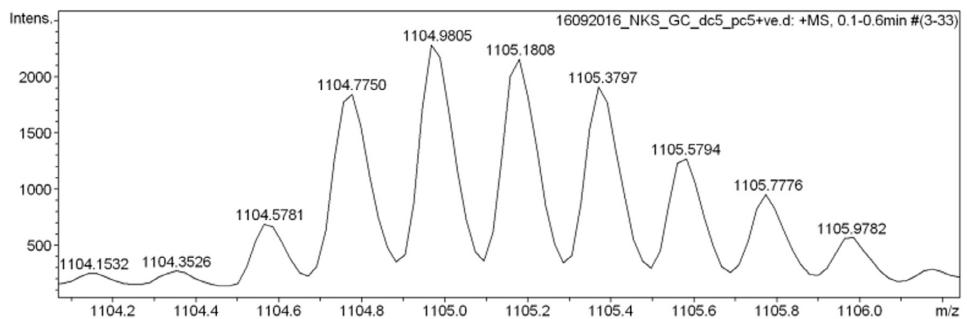


Рис. 16. Масс-спектр цитозин-пентамерного и-мотива ДНК/аэп-ПНК, полученный методом электроспрейевой ионизации.

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

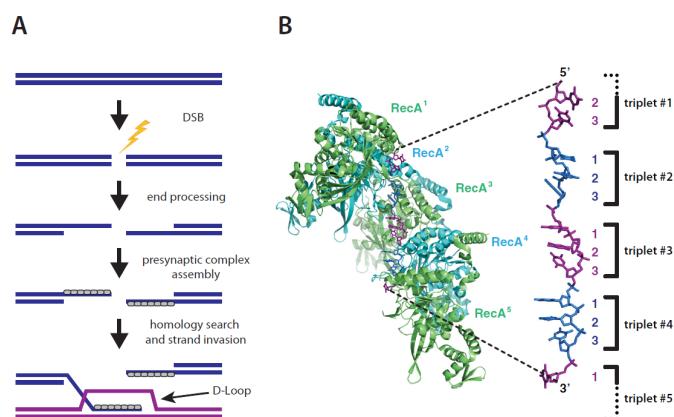


Рис. 17. А. Схематическое изображение первых стадий гомологической рекомбинации. Б. Кристаллическая структура RecA-ssDNA, которая показывает, как они связываются с триплетами (похожими на В форму, но не такими именно), образуя пресинаптический комплекс.

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

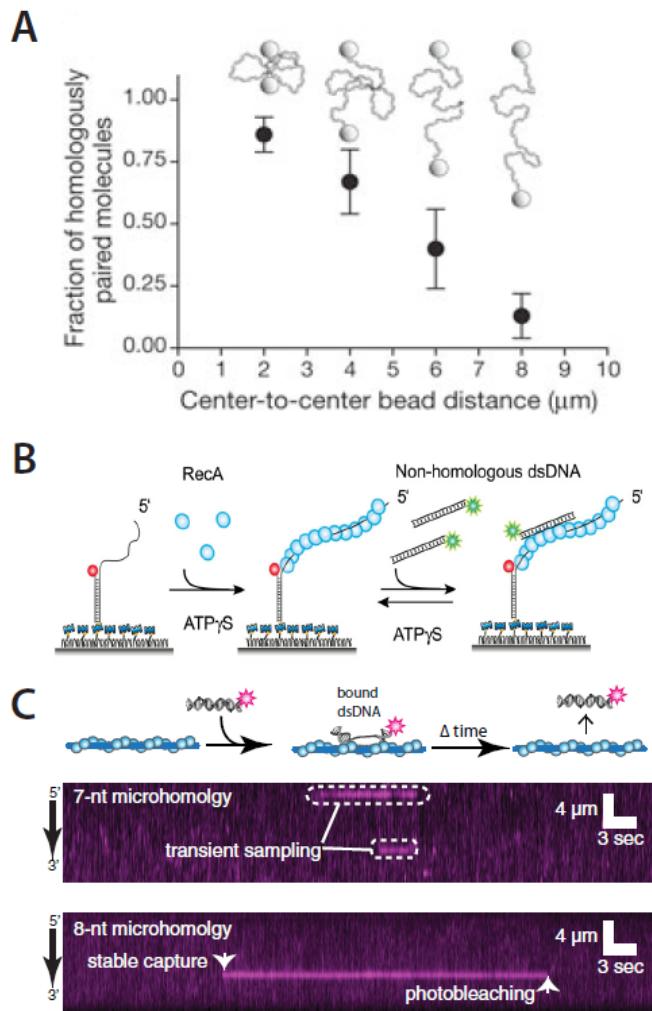


Рис. 18. А: График зависимости доли найденных гомологических спаренных молекул от расстояния между концами(подтверждающее, что гомологический поиск идет лучше для более спутанных молекул). Б: Картинка эксперимента по FRET (резонансная фотоскопия) исследованию гомологического поиска. В: Эксперимент показывающий, 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.

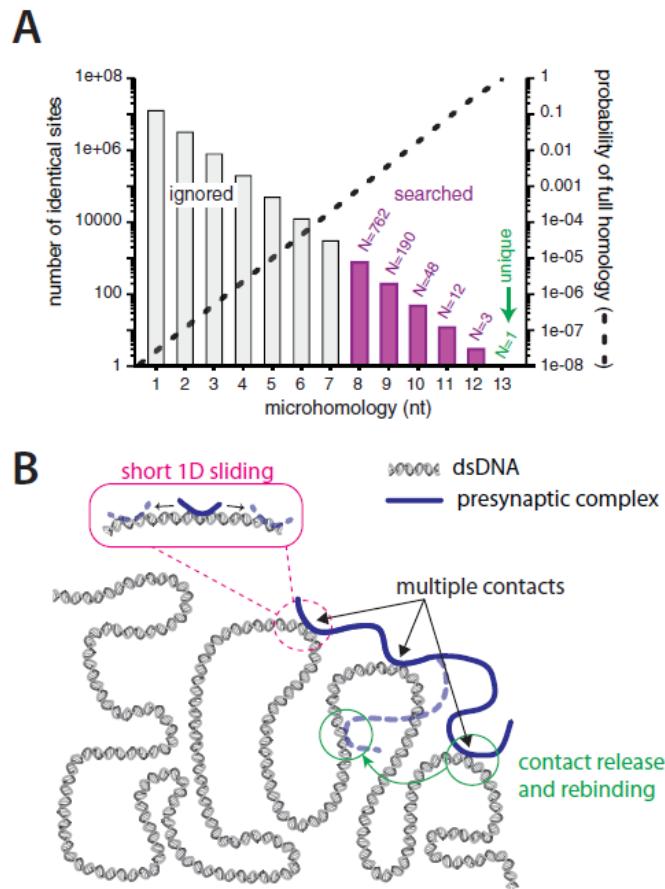


Рис. 19. А: Схематическая зависимость вероятности гомологического поиска от числа нуклеотидов внутри микрогомологии. Схематичное изображение основных принципов гомологического поиска: 1) одномерный сайдинг (скоростное (диффузионное?) скольжение в поисках нужных микрогомологий (розовый цвет), многоконтактность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

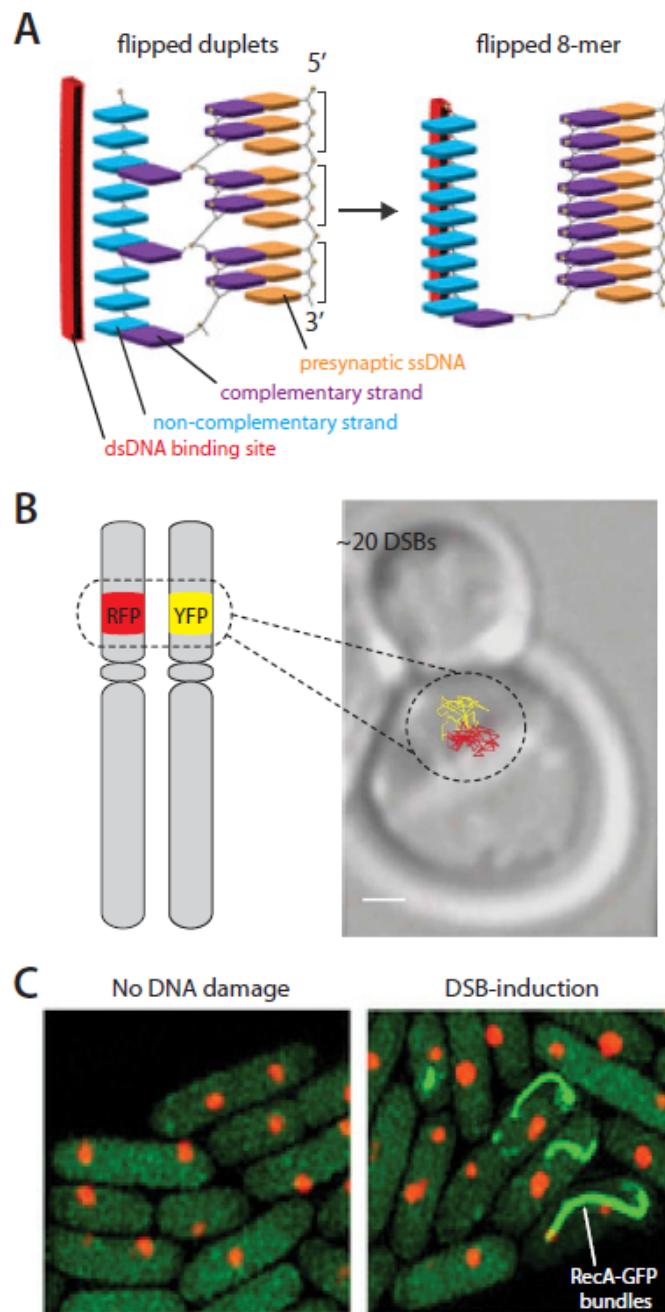


Рис. 20. А: Схематическое изображение взаимодействий дуплетов с образованием более устойчивых, связанных конфигураций. Б: Демонстрация диффузационного характера движения хромосом. В: С помощью флюоресценции показывается, что в поврежденном ДНК образуются RecA, которые ответственны за гомологическую рекомбинацию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

4. AnA

4.1. Нормальное название

Synthesis and Biophysical Properties of Arabinonucleic Acids (ANA): Circular Dichroic Spectra, Melting Temperatures, and Ribonuclease H Susceptibility of ANA, RNA Hybrid Duplexes[†]
Синтез и биофизические свойства арабинуклеиновых кислот: спектр кругового дихроизма, температура плавления, и чувствительность к рибонуклеазе H арабинуклеиновых кислот (ANA), рибонуклеиновых кислот (RNA) гибридных дуплексов

Glossary

- Circular Dichroic - (Wiki) is dichroism involving circularly polarized light, i.e., the differential absorption of left- and right-handed light. (короче говоря по разному поглощает свет разной поляризации)
- epimer - (Wiki) The two epimers have opposite configuration at only one stereogenic center out of at least two.
- antisense agent - (first site in google) Small pieces of DNA or RNA that can bind to specific molecules of RNA. This blocks the ability of the RNA to make a protein or work in other ways. Antisense agents may be used to block the production of proteins needed for cell growth. They are being studied in the treatment of several types of cancer. Also called antisense oligonucleotide.
- oligonucleotide - (Wiki) короткий фрагмент ДНК или РНК, получаемый либо путём химического синтеза, либо расщеплением более длинных полинуклеотидов. Используются в качестве зондов или праймеров.
- AON - oligonucleotide analogues
- RNase H (abbreviated Ribonuclease H or RNH) is a family of non-sequence-specific endonuclease enzymes that catalyze the cleavage of RNA in an RNA/DNA substrate via a hydrolytic mechanism.
- Escherichia coli - кишечная палочка

4.2. Абстракт

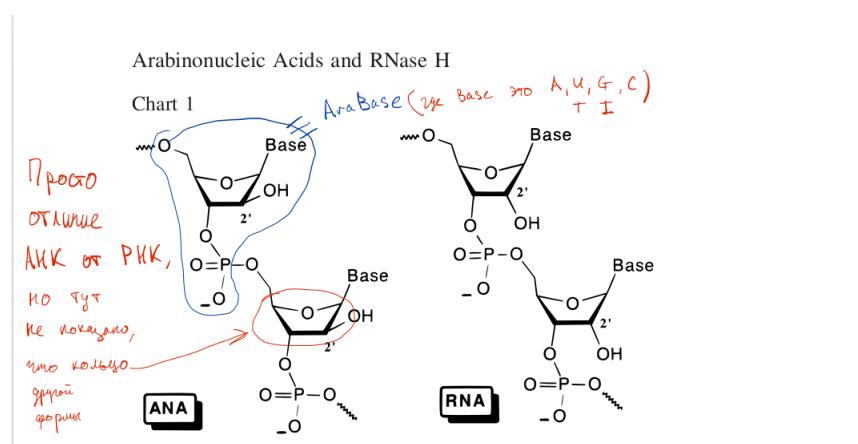
Арабинонуклеиновая кислота(АНК), являющаяся 2'-эпимером РНК(потому что около 2' углерода другое расположение водорода, показано на первой картинке), проявляет хорошие свойства антисмыслового агента, и вот наши догадки почему:

(Вначале определение антисмысловой терапии - это отключение синтеза белков, а для них нужны соответствующие РНК, и уничтожение этих РНК замедлит/отключит синтез белков)

Рибонуклеаза(далее - РНаза) уничтожает РНК, если РНК закреплена на комплементарной ДНК. Дуплекс комплементарных АНК и РНК очень похож по структуре на комплекс комплементарных ДНК и РНК, что, вероятно, и провоцирует активность РНазы. Помимо другого расположения атомов около 2'-углерода, скорее всего наблюдается еще и некоторая деформация сахарного кольца, которое больше похоже на таковое у ДНК, чем у РНК. Поэтому спектр дуплексов АНК/РНК очень похож на соответствующий спектр дуплексов АНК/ДНК. Также, ОН группа около 2'-углерода в дуплексе с РНК направлена в большую бороздку дуплекса(картинка

в конце статьи) и не мешает активности РНазы. Эти вещи позволяют сделать вывод, что они - ключевые в активации РНазы.

4.3. Картинки



Scheme 1^a

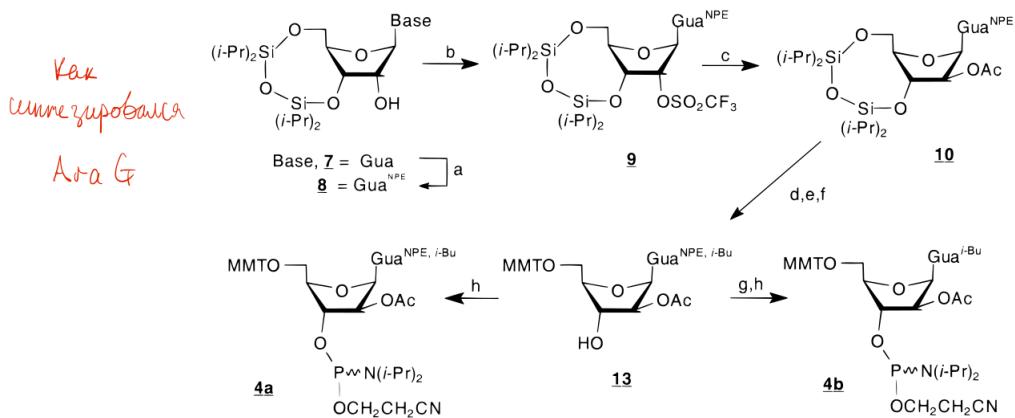


Table 1: Melting Temperatures (T_m) of Duplexes^a

code	designation (AON)	sequence	T_m (°C)	
			RNA target	DNA target
I	DNA	5'-AGC TCC CAG GCT CAG ATC-3'	72.3	68.0
II	DNA/araA	5'-AGC TCC CAG GCT <i>Ca</i> AG ATC-3'	71.7	66.2
III	ANA (U,G)	5'-AGC UCC CAG GCU CAG AUC-3'	44.0	≈26 ^b
IV	ANA (U,I)	5'-AIC UCC CAI ICU CAI AUC-3'	46	≈27
V	ANA (T,I)	5'-AIC TCC CAI ICT CAI ATC-3'	48	≈27
VI	S-DNA	5'-AGC TCC CAG GCT CAG ATC-3'	62.4	58.7
VII	RNA	5'-AGC UCC CAG GCU CAG AUC-3'	84.6	66.2

^a The melting temperatures (T_m) were obtained as the maxima of the first derivative melting curves (A_{260} vs temperature). All duplexes were 2.3 μ M in concentration. Buffer: 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄ (pH = 7.2). ^bBroad transition and small hyperchromicity observed.

Table 2: T_m Values of Duplexes Formed between Target RNA and Complementary DNA, Thioate-DNA, ANA, and RNA Oligomers^a

code	designation (AON)	DNA target		RNA target	
		T_m (°C)	% H	T_m (°C)	% H
VIII	DNA	50.3	16.6	51.3	17.3
IX	thioate-DNA	37.3	16.4	38.1	13.3
X	ANA	<16	≈4	32.1	10.1
XI	RNA	27.7	15.1	54.2	16.6

^a Aqueous solutions 2.3 μ M in each oligonucleotide, 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄ buffer (pH 7.2). Sequence of AON oligonucleotides: 5'-TTA TAT TTT TTC TTT CCC-3' (for ANA and RNA, T is replaced by U).

Рис. 21. Табличка с цепочками нуклеиновых кислот, были синтезированы короткие цепочки, указаны блоки с основаниями. аА в цепочке второй ДНК значит, то один из блоков в цепочке заменен на арабинонуклеиновый аналог. Указаны температуры плавления для дуплексов соответствующей нуклеиновой кислоты с комплементарной РНК и ДНК(предпоследний и последний столбцы). Плавлением считается момент, когда дуплекс распадается обратно на 2 цепочки.

7056 Biochemistry, Vol. 39, No. 24, 2000

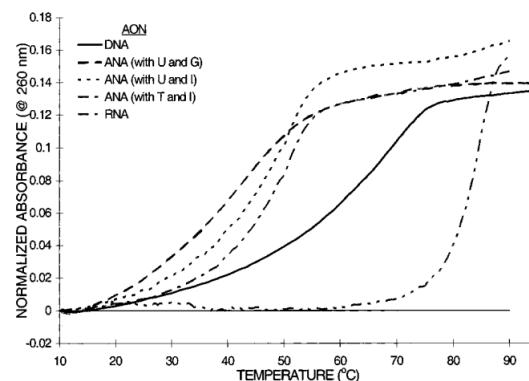


FIGURE 1: Thermal melting curves of oligonucleotides (AON) hybridized to complementary single-stranded RNA. See Table 1 for base sequences. Buffer: 140 mM K⁺, 1 mM Mg²⁺, and 5 mM Na₂HPO₄, pH 7.2.

Рис. 22. График плавления нуклеиновой кислоты(указаны слева) в дуплексе с РНК. Поглощение указанной длины волны соответствует тому, что в растворе распались дуплексы и отдельные цепочки начали поглощать.

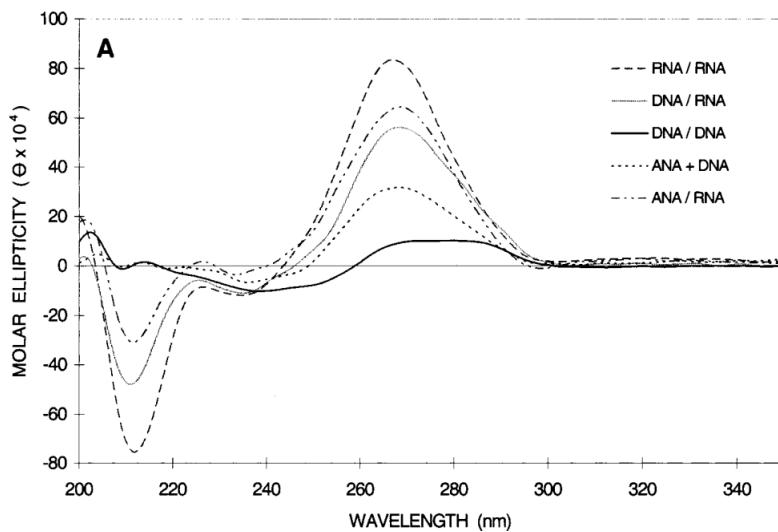


Рис. 23. Спектры кругового дихроизма соответствующих дуплексов(АНК и ДНК не соединяются в дуплекс) Видно, что АНК/РНК очень похоже на ДНК/РНК

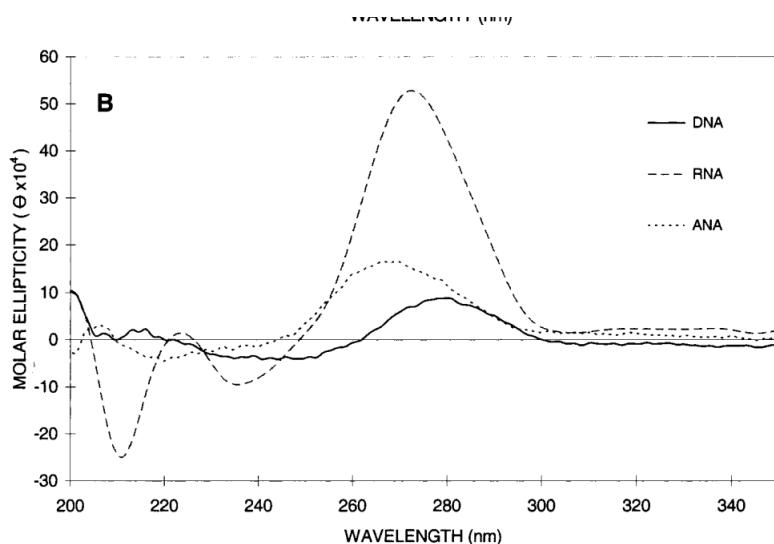


Рис. 24. Аналогично, но КД спектр уже просто для цепочек. Видно большую схожесть АНК с ДНК

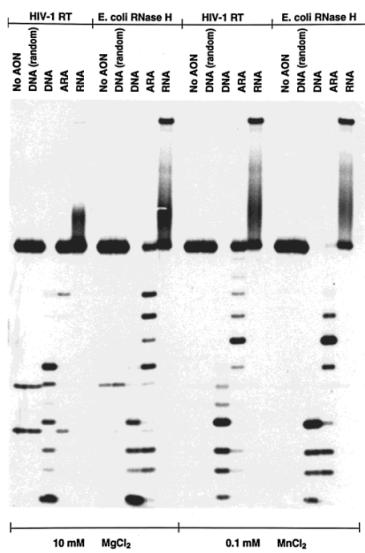
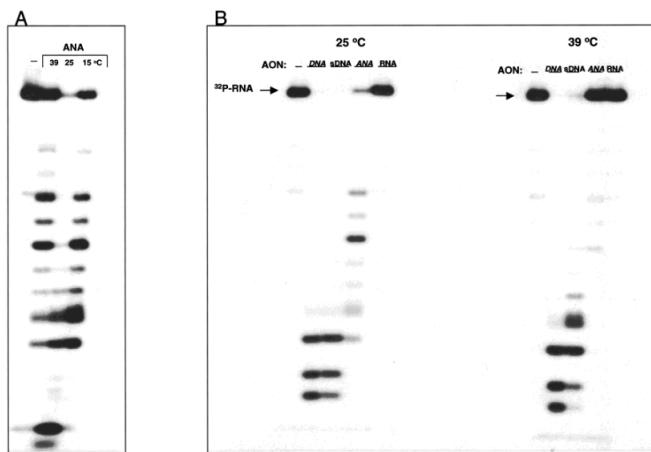


Рис. 25. Гидролиз в геле, куда с РНК смешивается указанная нуклеиновая кислота, и если РНаза проявляет активность, то появляются маленькие кусочки разрезанной РНК и они спускаются ниже, чем длинные исходные цепочки



Как и предыдущая картинка, но тут исследуется зависимость от температуры и другая цепочка АНК в картинке В. Видно, что при большой температуре АНК уже плохо работает(связано с тем, что дуплексы уже близки к температурам плавления)

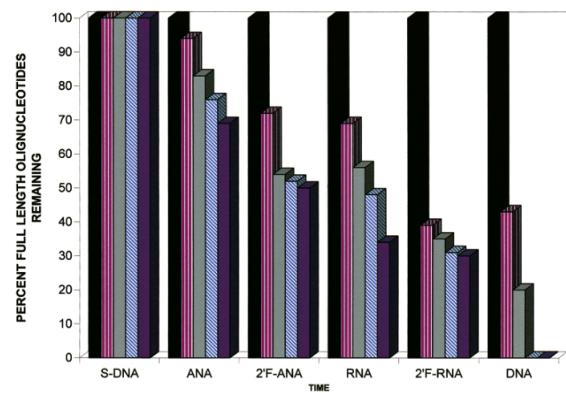
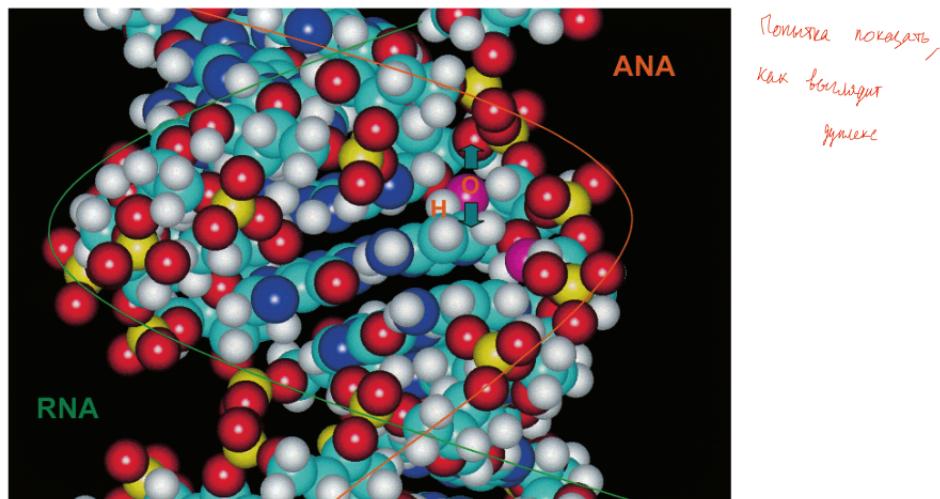


Рис. 26. snake venom phosphodiesterase (SVPDE) — это штука, которая разрушает нуклеиновую кислоту, и исследуется устойчивость нуклеиновых кислот с течением времени в присутствии этого фосфодиэстеразы.



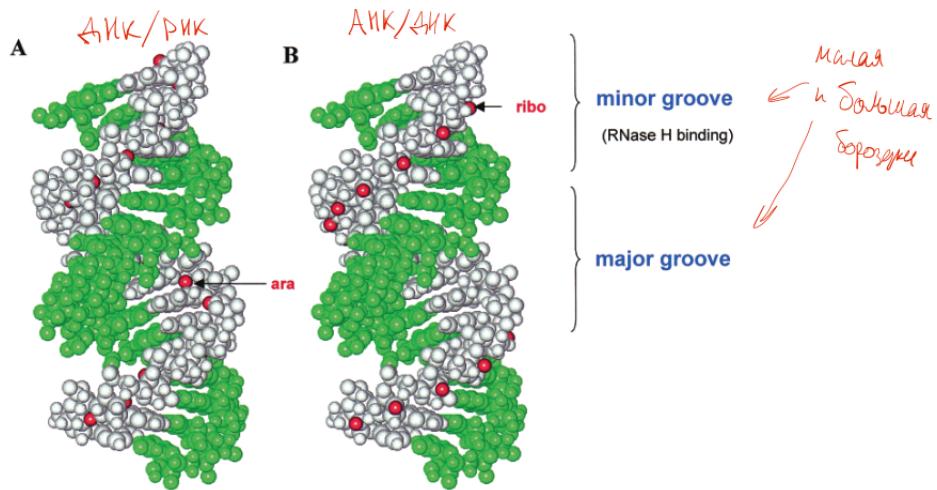


Рис. 27. На рисунке изображены дуплексы ДНК/РНК, но на А показана арабино конфигурация 2'Н атома, а на рисунке В - либо конфигурация 2"Н атома. Так как рибонуклеаза распознаёт дуплекс по его малой бороздке, а также видно, что арабино конфигурация мало влияет на конфигурацию этой малой бороздки, то АНК/РНК хорошо походит на истинный дуплекс ДНК/РНК. В либо конфигурации же, наоборот - из малой бороздки «видно» мешающую гидроксильную группу, торчащую наружу.

5. Analysis of the Okazaki Fragment Distributions along Single Long DNAs

5.1. Нормальное название

Исследование распределения фрагментов Окацаки вдоль одиночных длинных ДНК, реплицируемых белками бактериофага T4.

5.2. Абстракт

Репликация типа катящегося кольца в кольцах ДНК бактериофага M13 была ранее воссоздана инвивто, используя очищенные факторы, кодируемые бактериофагом T4. Её продуктами являются двунитевые кольца с линейными хвостами >100 kb. При использовании ДНК-полимеразы бактериофага T4, дефицитной по экзонуклеазной активности от 3' до 5', электронная микроскопия выявила короткие «лоскуты» одноцепочечной ДНК вдоль реплицированных хвостов. Последние определяли начало каждого фрагмента Окацаки, что позволило проанализировать длину последовательных фрагментов Окацаки на отдельных реплицирующихся молекулах. Были обнаружены ДНК, содержащие серии фрагментов Окацаки одинаковой длины, однако большинство из них демонстрировали большое разнообразие длин в сериях из шести или более фрагментов, что отражает широкое распределение популяции.

5.3. Картинки

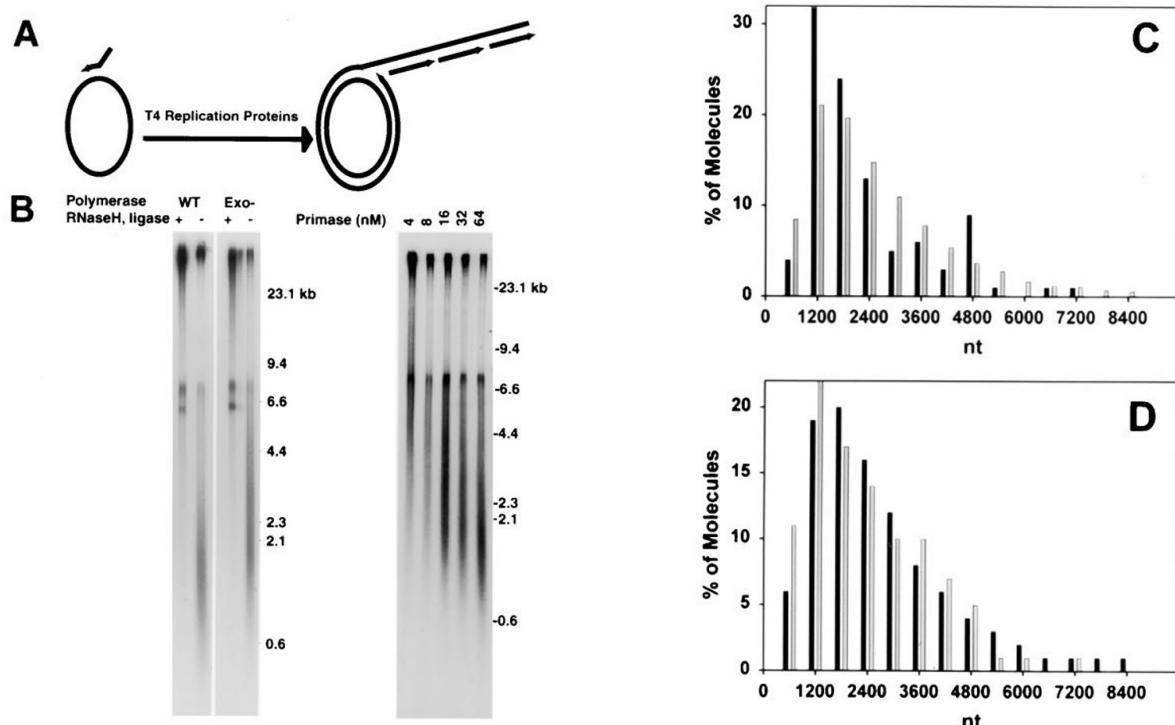


Рис. 28. Рисунок 1

Рисунок 1 А: Фото показывает, как происходит репликация по типу катящегося кольца. Фрагменты Оказаки показаны на правой картинке с помощью стрелочек. Полимераза показана на левой картинке маленьким хвостиком над кольцом. В: Результаты электрофореза. Если есть рнказа и лигаза(там плюс есть) видим четкие полоски около 6000 нуклеотидов(6 kb). Это соответствует полному кольцу двунитевой днк. Совсем сверху(выше 23 kb) – вариант, когда длинный-длинный хвост двунитевой получился. Это наблюдается независимо от того есть экзо-нуклеазная активность у полимеразы или ее нет. Если нет рнказы и лигазы, то видим, что нет полного кольца, очень мало большого продукта сверху на рисунке, и широкое пятно около 2 kb. Это фрагменты Оказаки, потому что нет рнказы и лигазы, все фрагменты Оказаки находятся отдельно друг от друга, несшты друг с другом и в таком случае будут двигаться по отдельности широким фронтом. Дальше на правой картинке меняют концентрацию праймазы. Чем больше праймазы дадим, тем чаще будет образовываться праймер на реплицированной нити, тем короче будут фрагменты Оказаки. От концентрации праймазы зависит длина фрагмента Оказаки.

С и D: В (С) реакция катализировалась мутантной ДНК-полимеразой D219A в отсутствие РНКазы Н и ДНК-лигазы, а в (D) реакция катализировалась ДНК-полимеразой дикого типа с РНКазой Н и ДНК-лигазой. В отсутствие РНКазы Н и лигазы (С) сравниваются все фрагменты Оказаки, в то время как в (D) сравниваются только самые последние синтезированные фрагменты.

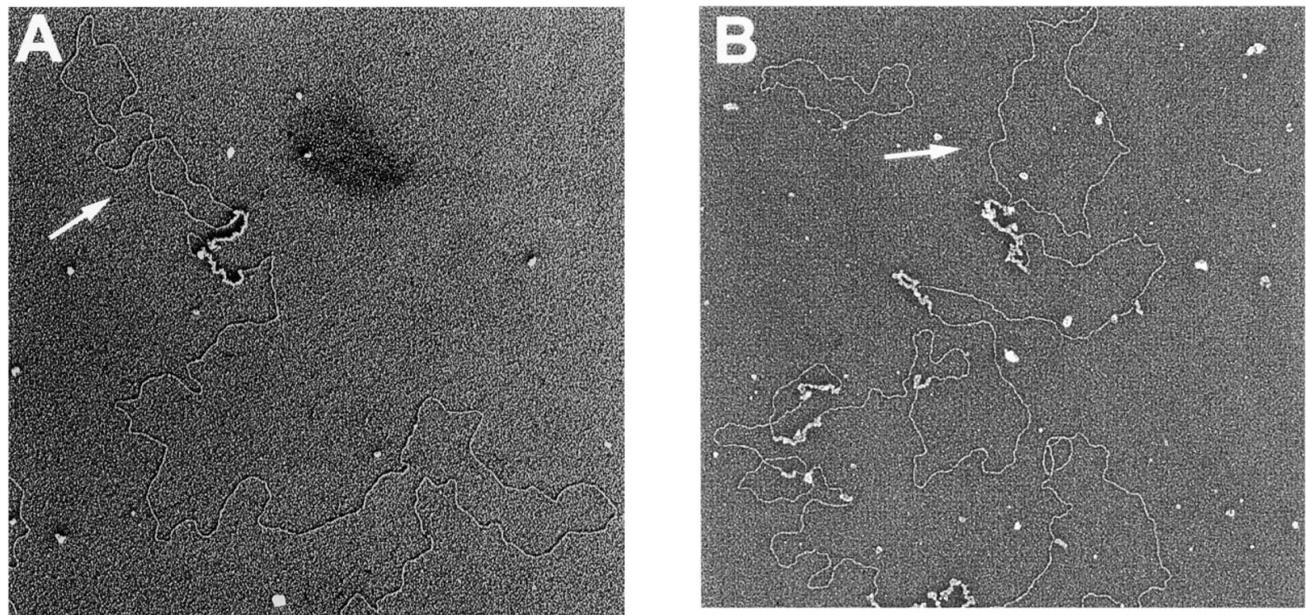


Рис. 29. Рисунок 2

Рисунок 2 Визуализация продуктов репликации, катализируемых ДНК - полимеразой Т4 дикого типа. На рисунке А показана репликация проводилась с использованием рнказой и лигазой, а на рисунке В – без них. Стрелочки показывают на кольца днк. Утолщения на картинке А – это белки ssB(белки, которые связываются с однонитевой днк). Они добавлены, чтобы визуализировать однонитевые участки. На рисунке В, когда нет рнказы и лигазы, появляются однонитевые участки на границе между двумя фрагментами Оказаки, потому что полимераза не может спить два фрагмента и случайным образом оказывается, появляется пробел между

этими фрагментами, которые благодаря белкам можем наблюдать (толстые белые участки).

Рисунок 3 Визуализация продуктов репликации, катализируемых ДНК-полимеразой D219A T4(мутантный тип). Суть такой полимеразы в том, что она отсоединяет хвост ранее синтезированного фрагмента Окадзаки от матрицы.

Реакции репликации типа катящегося колеса проводили, как описано на фиг. 1 и 2, с использованием ДНК-полимеразы D219A T4 без РНКазы Н и ДНК-лигазы. После инкубации в течение 5 мин образцы депротеинизировали и готовили для ЭМ (электронной микроскопии), как описано на фиг. 2. Стрелки указывают кружки-матрицы M13 (“колёса”). Из-за свойств инвазии цепи мутантной полимеразы D219A предполагалось, что на стыке каждого завершенного фрагмента Окадзаки (вставка) будут образовываться лоскуты оцДНК. Примаза присутствовала в количестве 64 нМ (А и В) или 8 нМ (С). На фото А насчитывается 23 фрагмента Окадзаки , 4 на В и 6 на С. Лоскуты, окрашенные SSB, имеют тенденцию быть длиннее с при пониженном количестве примазы (С). Изображения сделаны с обратным контрастом: столбик соответствует длине дцДНК, эквивалентной 1,1 т.п.н. (А), 1,0 т.п.н. (В) или 0,8 т.п.н. (С).

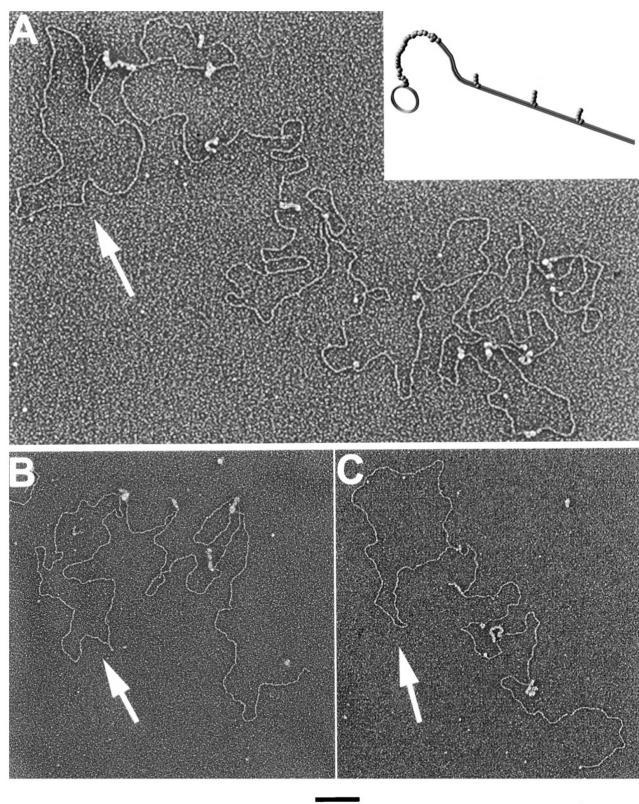


Рис. 30. Рисунок 3

Рисунок 4 Определение длины фрагментов Окадзаки с помощью ЭМ (электронной микроскопии снимков).

(А) Фрагмент Окадзаки в процессе синтеза состоит из двух сегментов, дуплексной области (ds1) и одноцепочечной области (ss2). Первый соответствует количеству произошедшего синтеза отстающей цепи, а второй соответствует оставшейся синтезируемой матрице. (В) Завершенный фрагмент Окадзаки, продуцируемый мутантной полимеразой D219A в отсутствие РНКазы Н и лигазы, состоит из трех сегментов, смещенной области (flap1), дуплексной области

(ds1) и лоскута, образованного вторжением в следующий фрагмент (flap2). Flap 1 соответствует количеству ДНК вымещенному мутантов полимеразой D219A преобразовании следующего отрезка Окадзаки. Сегмент ds1 соответствует дуплексной части измеряемого фрагмента Окадзаки. Flap2 соответствует длине ДНК соседнего фрагмента Окадзаки, вытесненной мутантной полимеразой.

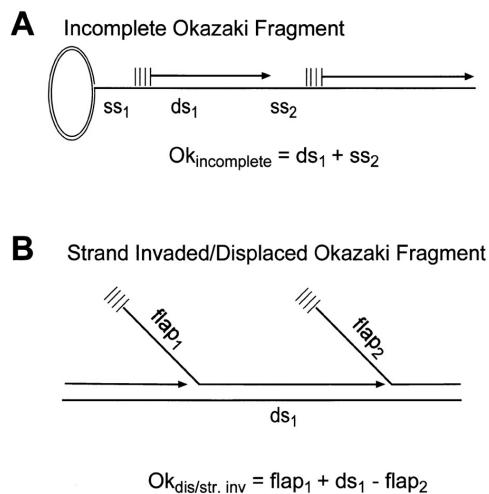


Рис. 31. Рисунок 4

Рисунок 5 Распределения последовательных фрагментов Окадзаки, являющихся продуктами длинной репликации типа катящегося колеса.

Из микрофотографий, таких как те, что на рисунке 30, и критериев измерения, описанных на рисунке 31, была определена длина последовательных фрагментов Окадзаки, расположенных вдоль хвостов круговой матрицы, генерируемых ДНК-полимеразой D219A в отсутствие РНКазы Н и лигазы. Длина каждого фрагмента показана по оси у, а суммарное расстояние от конца ДНК, удаленного от круглой матрицы, показано по оси x. Ориентация показана на рисунке. Примеры распределений фрагментов, синтезированных в присутствии 64 нМ (A – F) или 8 нМ (G – L) примазы.

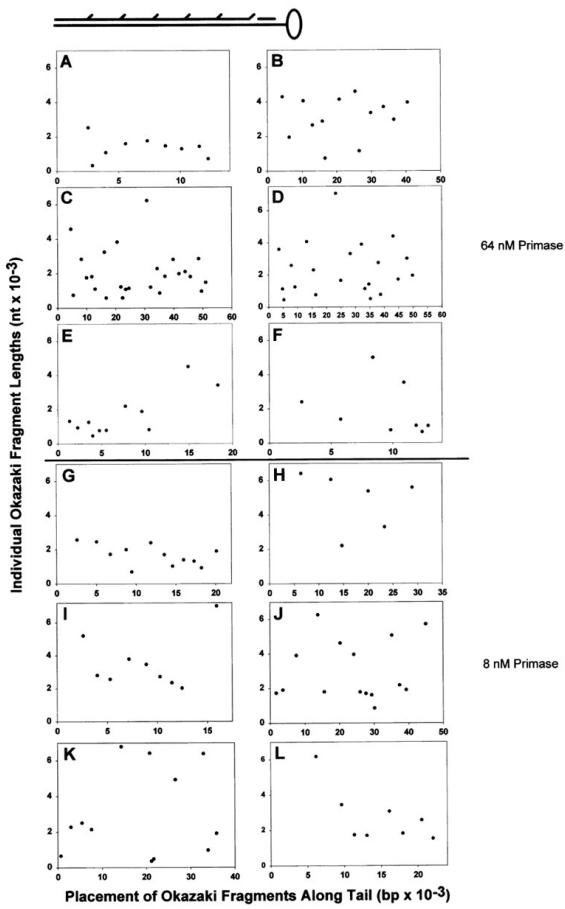


Рис. 32. Рисунок 5

Рисунок 6 Сравнение распределений фрагментов Оказаки для одной реплицирующейся молекулы с общей популяцией.

Длины фрагментов Окадзаки вдоль отдельных реплицирующихся молекул, взятые из таблиц 1 и 2 (А и В, соответственно), были нанесены на сглаженные логарифмически нормальные распределения (тонкие линии; значения оси Y слева) и сравниваются с общей популяцией фрагментов Окадзаки. длины построены аналогично (жирная линия; значения оси Y справа). Реакции происходят с примазой 64 нМ (А) и 8 нМ (В).

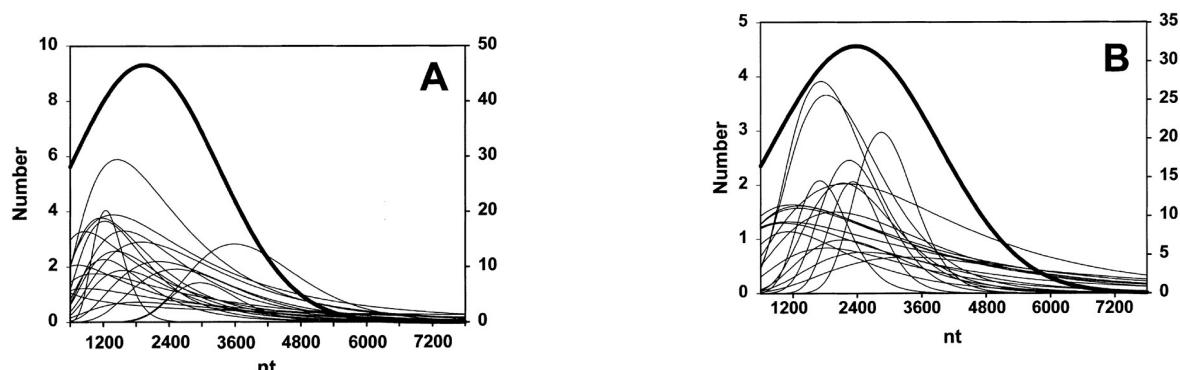


Рис. 33. Рисунок 6

6. Programmable T7-based synthetic transcription factors

6.1. Нормальное название

Программируемая система факторов транскрипции на базе бактериофага T7

6.2. Абстракт

Несмотря на недавний прогресс в создании факторов транскрипции для эукариотов, остаётся нужда в высокоактивных вариантах таких систем для бактерий. Факторам транскрипции желательно обладать двумя ключевыми свойствами: ортогональностью (влиянием только на свою цель) и программируемостью (возможностью направления на широкий диапазон целей по желанию пользователя). РНК полимераза бактериофага T7 обладает некоторыми привлекательными свойствами: высокой скоростью транскрипции, компактностью и возможностью применения в большом количестве организмов, а вирусное происхождение даёт независимость от собственного механизма транскрипции организма. Была создана система, в которой РНК полимераза T7 доставляется к цели с помощью ДНК-связывающих белков, что дало модульную и программируемую систему для сильной активации транскрипции в *Escherichia coli*. Утверждается, что это первая подобная система.

6.2.1. Рисунок 1

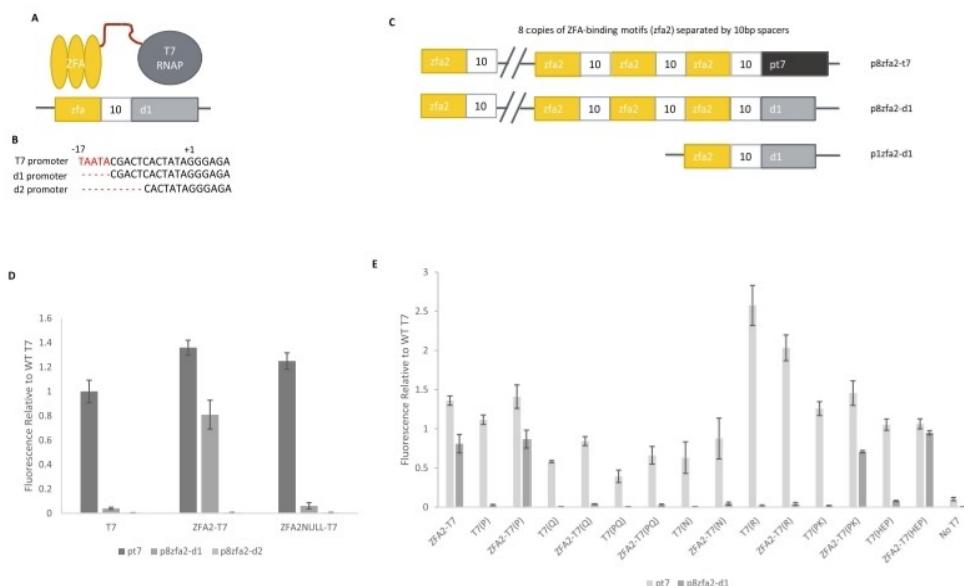


Figure 1. The direct-fusion version of the iiT7 system. (A) A schematic of the direct-fusion iiT7 system. A zinc finger array (ZFA) is attached by a peptide linker to the T7 RNA polymerase. The DNA sequence binding target (zfa) of the ZFA serves to recruit the protein fusion to the vicinity of a truncated T7 promoter sequence, d1. (B) The promoter sequences of the wild-type T7 promoter (pt7), and two truncated versions of the promoter (d1 and d2). (C) Schematics of several promoters used for testing: p8zfa2-t7 incorporates 8 copies of the zfa2 binding sequence, each spaced 10 bp apart, followed by the wild-type pt7 promoter sequence; p8zfa2-d1 replaces the pt7 sequence with the truncated d1 sequence; and p1zfa2-d1 uses only a single copy of the zfa2 binding sequence before d1. (D) Expression from promoters pt7, p8zfa2-d1, and p8zfa2-d2, in the presence of the wild-type T7 RNAP (T7), the fusion ZFA2-T7 (WT T7 RNAP fused to ZFA2), and the fusion ZFA2NULL-T7 (WT T7 RNAP fused to a non-DNA-binding mutant of ZFA2). Values are normalized to WT T7 activity on its native pt7 promoter. [Error bars represent one standard deviation for an n of 3]. (E) Expression of a set of T7 RNAP mutants (labels described in the text) from promoters pt7 and p8zfa2-d1, normalized to WT T7 on pt7. Each mutant's normalized activity is shown on both promoters, when expressed on its own (e.g. T7(PQ)) and when fused to a zinc finger array (e.g. ZFA2-T7(PQ)). The T7-HEP mutant shows nearly wild-type activity on the p8zfa2-d1 promoter when recruited by in the ZFA2-T7(HEP) construct. [Error bars represent one standard deviation for an n of 3].

Рисунок 1.А Схема системы: РНК полимераза T7 (RNAP T7) связана с блоком цинковых пальцев (ZFA), который присоединяется к своей цели (zfa), тем самым доставляя полимеразу

к усечённому промотеру d1.

Рисунок 1.В Три разных промотера: исходный промотер для RNAP T7 и два усечённых варианта.

Рисунок 1.С Варианты всей целевой последовательности: разное количество копий цели для цинковых пальцев и разные промотеры.

Рисунок 1.Д Результаты для систем T7 (только полимераза), ZFA2-T7 (T7 с блоком цинковых пальцев типа 2) и ZFA2NULL-T7 (T7 с блоком нерабочих цинковых пальцев) для 3 типов целей: pt7 (промотер T7), p8zfa2-d1 (8 копий цели для пальцев и усечённый промотер d1) и p8zfa2-d2 (8 копий цели для пальцев и усечённый промотер d2). Исходный промотер даёт слишком высокую вероятность транскрипции для полимеразы самой по себе, а с d2 транскрипция почти не идёт, поэтому был выбран d1.

Рисунок 1.Е Разные мутации РНК полимеразы T7: была выбрана (HEP), т.к. скорость для исходного промотера с цинковыми пальцами и без одинаковая, а для цели очень сильно отличается.

6.2.2. Рисунок 2

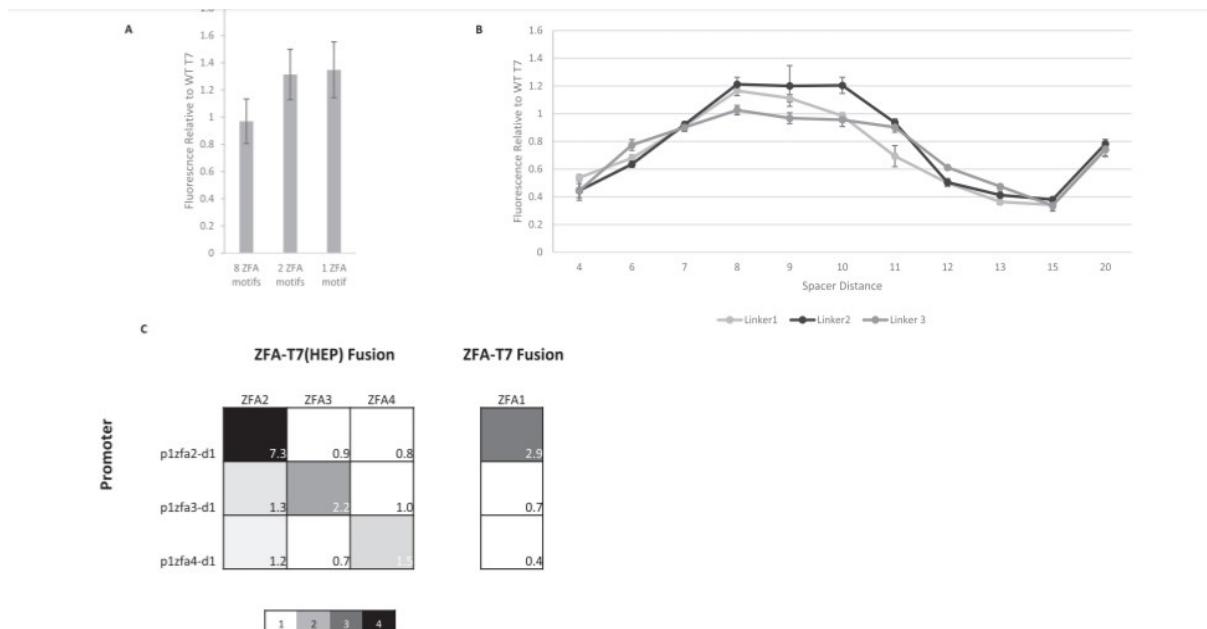


Figure 2. Tuning and orthogonality in the direct-fusion iT7 system. (A) Activities of the ZFA2-T7(HEP) fusion on three promoter variants incorporating 8, 2, or 1 copy of the zfa2 DNA-binding target sequences before the truncated d1 promoter sequence (p8zfa2-d1, p2zfa2-d1, and p1zfa2-d1, resp.) Values are normalized to WT T7 RNAP on its own pt7 promoter. Reducing the number of zfa2 sites does not reduce the activity of the promoters. [Error bars represent one standard deviation for an n of 3]. (B) Activities of the ZFA2-T7(HEP) fusion on versions of the p1zfa2-d1 promoter in which the length of the spacer sequence has been varied from 4 to 20 bp. The length of the linker fusing ZFA2 to T7(HEP) is also varied, creating ZFA2-T7(HEP) variants using Linker 1 (GS(GGGS)), Linker 2 (GS(GGGS)₂), and Linker 3 (GS(GGGS)₃). Activities are normalized relative to the fluorescence output of WT T7 RNAP on its native pt7 promoter. Spacer length has a strong effect on activity, while linker length has a much less substantial influence. [Error bars represent one standard deviation for an n of 3]. (C) An orthogonality plot, showing on-target and off-target activity levels for fusions ZFA{2,3,4}-T7(HEP), acting on promoters p1zfa{2,3,4}-d1. Values are given as ‘fold activities’: the ratio of observed fluorescence to the fluorescence measured with WT T7 RNAP acting on the same promoter. The fourth, separated column shows the reduced off-target activity obtained by the fusion ZFA1-T7 (using the wild-type, unmutated T7 RNAP). Scale color range is used to emphasize orthogonality.

Рисунок 2.А Зависимость величины эффекта для ZFA2-T7(НЕР) от количества копий цели для цинковых пальцев zfa2: 8 копий дают плохой результат, 2 или 1 лучше.

Рисунок 2.В Зависимость от длины связи между полимеразой и цинковыми пальцами (3 линии разного цвета) и размера промежутков в целевой последовательности.

Рисунок 2.С Таблица результатов для проверки ортогональности: ортогональность достаточно слабая, но в некоторой мере присутствует.

6.2.3. Рисунок 3

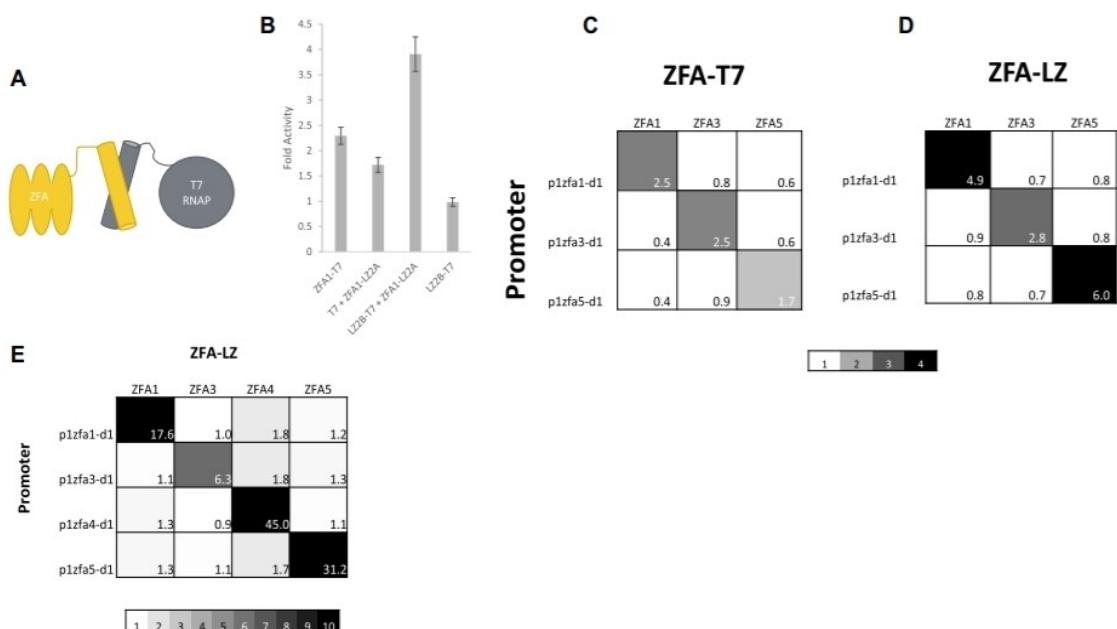


Figure 3. The leucine zipper bridged version of the iiT7 system. (A) A schematic of the bridged iiT7 system. A zinc finger array (ZFA) is attached by a peptide linker to a leucine zipper (LZ), and a complementary LZ is attached to the wild-type T7 RNAP (WT T7). (B) Activities of various construct combinations on promoter p1zfa2-d1, normalized to WT T7 RNAP on the same promoter (fold activity): the direct fusion ZFA1-T7; the bridged pair ZFA1-LZ2A + LZ2B-T7; the unbridged pair ZFA1-LZ2A + WT T7; and the unrecruited LZ2B-T7. [Error bars represent one standard deviation for an n of 3]. (C) An orthogonality plot showing fold activities on p1zfa{1,3,5}-d1 for the fused iiT7 system (constructs ZFA{1,3,5}-T7), provided for direct comparison with the bridged system. (D) An orthogonality plot showing fold activities on promoters p1zfa{1,3,5}-d1 for the bridged iiT7 system (constructs ZFA{1,3,5}-LZ2A + LZ2B-T7). Data in panels (C) and (D) are with the target promoters on plasmid backbone pADCR4. (E) Improved orthogonality and fold activity in the bridged system when placing the target promoters on plasmid backbone pADCR5, which lowers the basal expression level. The 4×4 grid shows fold activities on promoters p1zfa{1,3,4,5}-d1, in the presence of the bridged pairs of constructs ZFA{1,3,4,5}-LZ2A + LZ2B-T7. Scale color range is used to emphasize orthogonality.

Рисунок 3.А Схема системы с лейциновым мостиком: цинковые пальцы ZFA5 дали слишком сильную связь, которая не разрывалась полимеразой, и транскрипция после доставки к цели не начиналась. В данном варианте мостик должен разорваться и транскрипция должна начаться.

Рисунок 3.В Относительная частота транскрипции для систем с цинковыми пальцами; с цинковыми пальцами, к которым присоединена половина мостика; с мостиком; без цинковых пальцев с половиной мостика на полимеразе.

Рисунки 3.С, 3.Д и 3.Е Сравнение ортогональности - без мостика (C), с мостиком (D) и с мостиком с заменой плазмида-основы с pADCR4 на pADCR5 (E) (про что в статье ничего, кроме подписи к рисунку, нет). Итог, Е, показывает хорошую ортогональность и силу эффекта.

7. The master quorum-sensing regulators LuxR/HapR directly interact with the alpha subunit of RNA polymerase to drive transcription activation in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*

7.1. Нормальное название

Главные регуляторы кворума LuxR/HapR напрямую оказывают влияние на альфа-субъединицу РНК полимеразы для управления активации транскрипции в бактериях *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*.

Quorum-sensing – изменение поведения колонии бактерий при достижении критического значения концентрации.

7.2. Абстракт

В бактериях рода *Vibrio* кворум контролирует экспрессию генов разных факторов группового поведения, в том числе: биолюминисценцию, формирование биопленки, вирулентность и компетентность(способность бактериальной клетки поглотить находящуюся в окружающей среде молекулу ДНК).

Основные регуляторы кворума – это LuxR(для *Vibrio harveyi*)/HapR(для *Vibrio cholerae*) активируют экспрессию(транскрипция, трансляция, сплайсинг РНК и т.д) сотен разных генов в ответ на изменение плотности популяции. Механизм активации транскрипции факторами транскрипции TetR типа неизвестны, однако сайты связывания LuxR с ДНК, которые лежат вблизи -35 области промотера, необходимы для активации некоторых промоторов. Так, мы показали, что в *Vibrio harveyi* LuxR напрямую взаимодействует с РНК полимеразой, активируя транскрипцию биолюминисцентных генов luxCDABE.

LuxR взаимодействует с РНК полимеразой *in vitro* и *in vivo*, а конкретнее, с N- и C-концевыми доменами α -субъединицы РНК полимеразы. Замены аминокислот в домене взаимодействия РНКП и LuxR уменьшают взаимодействие между LuxR и α -субъединицей, и результатом становится возникновение дефектов активации транскрипции генов кворума *in vivo*.

Домен взаимодействия РНКП и LuxR для *Vibrio cholerae* хранится в HapR и требуется для активации гена *hapA*. Открытия, сделанные авторами статьи согласуются с моделью, в которой LuxR/HapR связываются с РНК полимеразой чтобы управлять инициацией транскрипции подмножества генов кворум-сенсинга в бактериях *Vibrio*.

7.3. Картинки

Используемый метод: *in vivo* использовался метод иммунопреципитации. Заключается он в следующем: хотим понять, с чем связывается конкретный ген LuxR. Создаем цепочки FLAG - ANTIFLAG, которые связуются между собой в будущем. В лабораторных условиях прикрепляем к нужному гену FLAG, пускаем его в клетку. Он связывается с какими-то частями РНКП. С помощью ANTIFLAG «вылавливаем» LuxR, вместе с ним оторвется часть РНКП, с которой он успел связаться. Результаты анализируем с помощью электрофореза.

7.3.1. Рисунок 1

Исследование взаимодействия LuxR и РНК-полимеразы

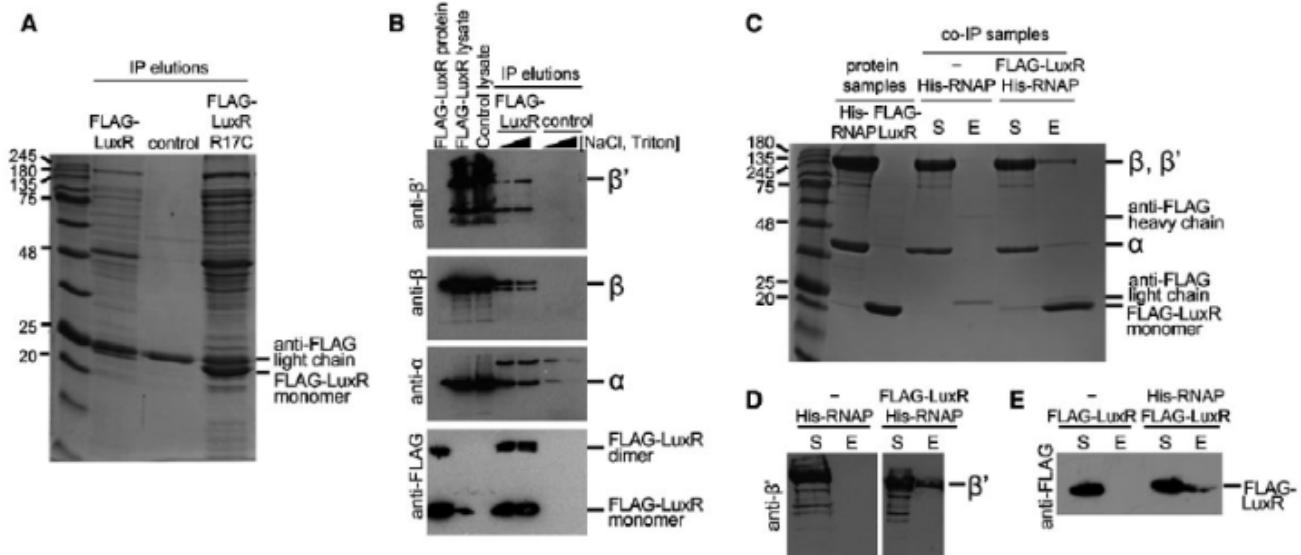


Рис. 34. Рисунок 1

Рисунок 1А Результаты иммунопреципитации(ИП) для оригинального гена, контрольного(без гена вообще) образца и мутанта R17C, который не умеет связываться с ДНК. В центральном столбике выделен только индикатор ANTIFLAG(очевидно, гена не было, ни с чем больше FLAG не связался). В левом столбике есть еще другие полосы, говорящие о связи LuxR с РНКП. В правом столбике темных полос много, так как в этой мутации транскрипция не могла остановиться и FLAG связался со всем подряд.

Рисунок 1В Определение конкретных субъединиц РНКП. Здесь 2 правых столбика дублируют части рисунка 1А. Левые столбцы отражают результаты вестерн-блоттинга – метода анализа специфичных белков. РНКП расщепляют на маленькие кусочки. Получается лизат(взвесь пептидов), который переносят на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану, затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку. В нерасщепленном белке(первый столбик) ожидаемо есть связь только FLAG-ANTIFLAG. Сравнение выделенных α и β белков из лизата и результатов 1А позволяет определить, что с ними ген и связался изначально.

Рисунок 1С Эксперимент *in vitro*. Результаты электрофореза белков в полиакриламидном геле (перед нанесением на гель образцы кипятили в присутствии додецилсульфата натрия). His-гистидин, хелатирует ион металла и связывается с носителем. Поскольку другие белки не связываются с носителем или связываются очень слабо, их можно удалить, промывая носитель подходящим буфером. Таким образом разделяют фазы. Столбики S – supernatants (надосадочная жидкость), E – элюция(то что не связалось). Таким образом *in vitro* тоже подтверждает связь LuxR с α и β

Рисунки Д и Е Аналогичный рисунку 1С эксперимент, но с помощью вестерн-плоттинга. Согласуется с 1С. Результаты вестерн-блоттинга FLAG-LuxR и His-RNAP инкубированных с nickel-NTA resin(?). Образцы были взяты с надосадочной жидкости и элюции, вестерн-блоттинг был проведен с антителами FLAG.

7.3.2. Рисунок 2

Сайты связывания LuxR с PluxC в ДНК.

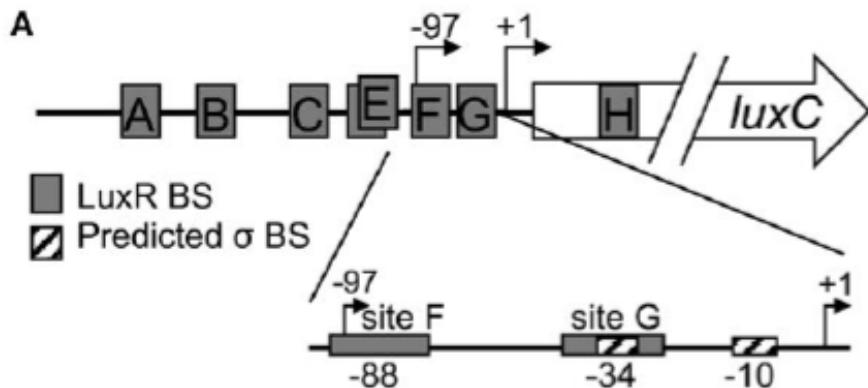


Рис. 35. Рисунок 2А

На рисунке 35 изображена диаграмма облости промотера гена luxCDABE. Серые квадраты отображают сайты связывания(BS), штрихованные квадраты – предполагаемые BS. Место старта транскрипции в случае высокой плотности популяции клеток отражено черной стрелкой на +1, а низкой – стрелкой на -97. Для кворум сенсинга основным сайтом считается +1.

Эксперименты по сдвигу подвижности были проведены с dsDNA субстратами для разных сайтов LuxR (рис. 36). Было проведено сравнение LuxR, LuxR N142D и LuxR L139R в зависимости от концентрации. Процент связи с ДНК отражается на вертикальной оси. Сайты связывания A-G все необходимы для активации транскрипции. Ближе всех к предполагаемому месту начала транскрипции при высокой плотности клеток находится сайт G, а низкой – сайт F.

Так как F и G сайты являлись кандидатами для места посадки LuxR, авторы статьи сравнили силу связи в них и в относительно далеком сайте B.

(я в этом не уверена) Возможно, из-за того что для разных мутаций белка значительно различались результаты электрофореза на последних двух графиках, был сделан вывод о том, что LuxR крепится близко сайтам F и G.

7.3.3. Рисунок 5

На рисунке 37А изображена структура белка *Vibrio vulnificus* SmcR. Красным отмечены разные аминокислоты, которые предположительно связываются с ДНК.

На рисунке В изображен график интенсивности биолюминисценции в зависимости от того, какую из аминокислот, отмеченных на рисунке А заменили на мутирующую. Видно, что некоторые замены не оказали влияния в сравнении с оригинальным (немутантным) образцом (WT), в то время как другие не дали инициироваться процессу люминесценции.

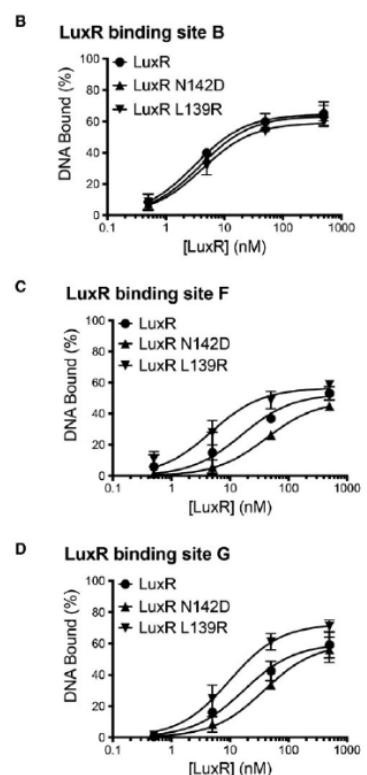


Рис. 36. Рисунок 2B, C, D

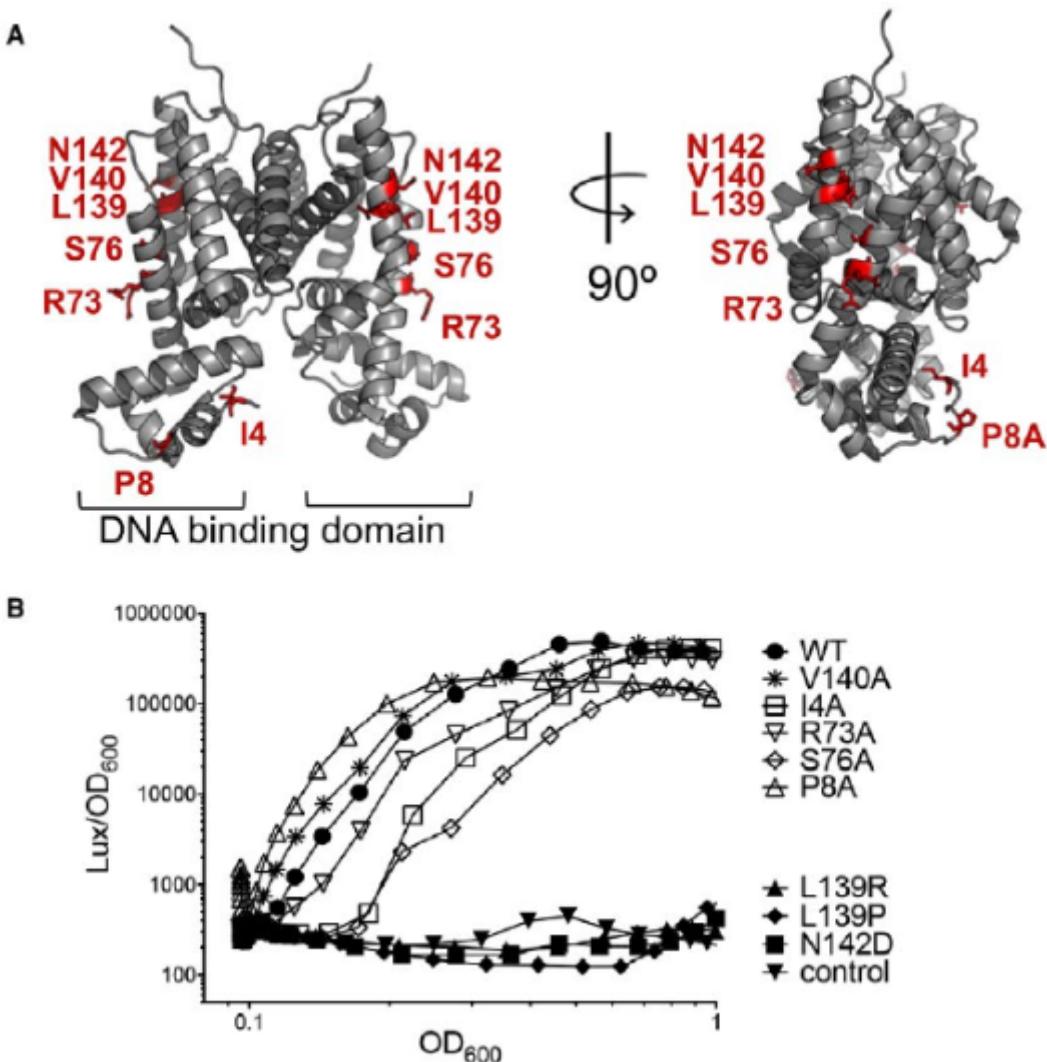


Рис. 37. Caption

Примечание: OD_{600} это оптическая плотность, мера ослабления света прозрачными объектами или отражения света непрозрачными объектами. Вычисляется как десятичный логарифм отношения потока излучения падающего на объект, к потоку излучения прошедшего через него, то есть это есть логарифм от величины, обратной к коэффициенту пропускания.

7.3.4. Рисунок 6

На рисунке 38А отображено выравнивание доменов взаимодействия с РНАП для разных белков (бактерия *Vibrio cholerae*). Чёрные треугольники указывают на положение аминокислот.

На рисунке 38В сравнивается биолюминисценция контрольного (немутантного) образца Δ hapR(a), пустой последовательности(b)

Производство биолюминесценции продемонстрировало значительное снижение у штаммов, экспрессирующих hapR S77A и N143D и была полностью прекращена в штамме, экспрессирующем ДНК-связывающий мутант hapR R18C.

Значит, поскольку эти замены в HapR приводят к фенотипам, сходным с аналогичными заменами в домене взаимодействия РНК-полимеразы LuxR, HapR взаимодействует с РНК-полимеразой через тот же домен взаимодействия, что и LuxR.

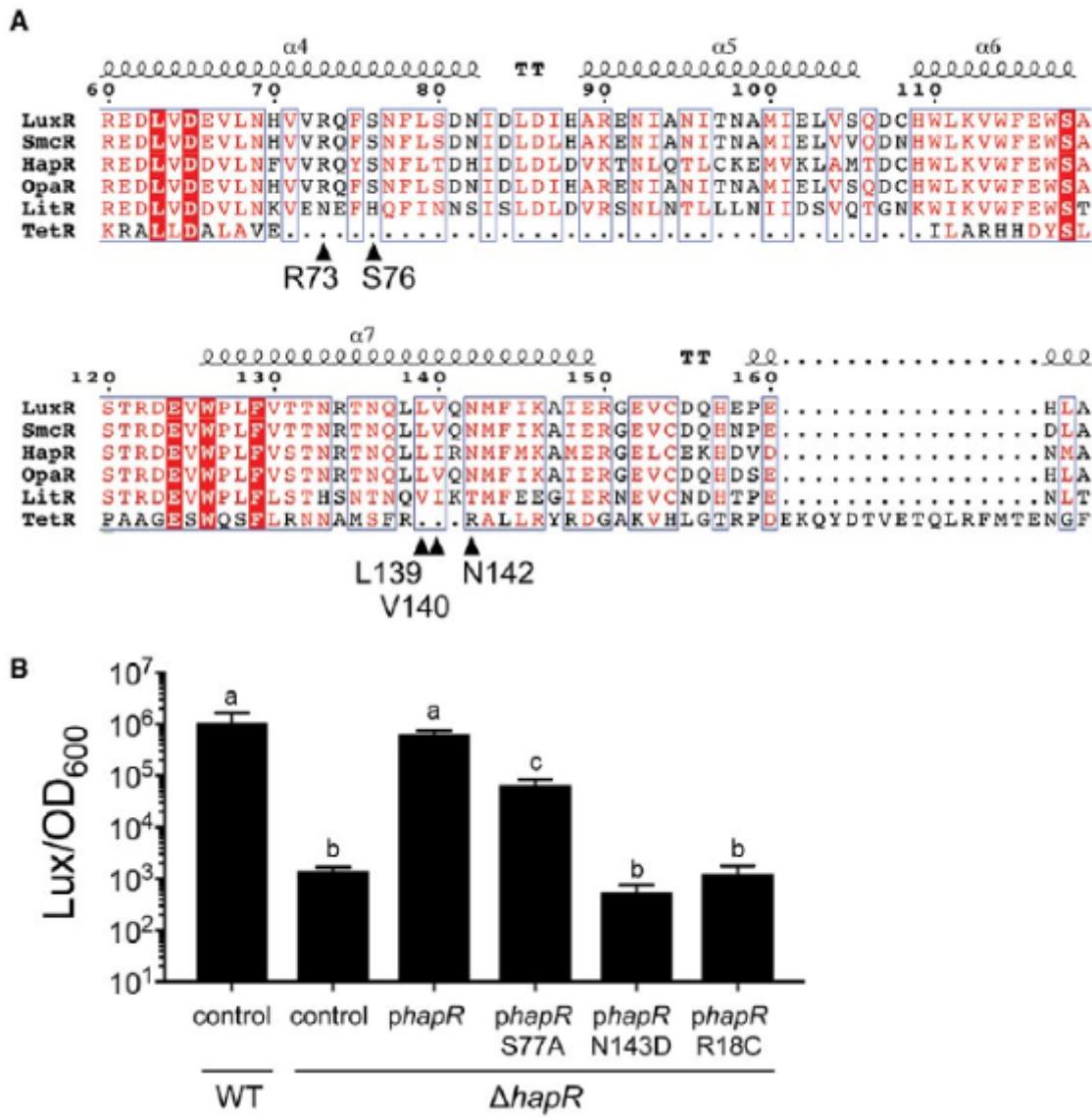


Рис. 38. Рисунок 6

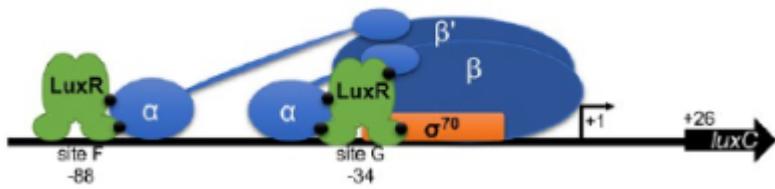


Рис. 39. Рисунок 7

7.3.5. Рисунок 7

Модель взаимодействия LuxR с РНКП на промотере *luxCDABE*. LuxR связывается с сайтами F и G, которые находятся на -88 и -34 относительно старта транскрипции (указан черной стрелкой). LuxR связывается с РНКП через взаимодействие с α -субъединицей, C-концевым доменом (сайты F и G) and N- (сайт G). Предполагаемые сайты взаимодействия обозначены черными кругами. Сайт связи LuxR и G расположен на -35 сайте для σ^{70} .

Сигма-фактор - это белок, необходимый для инициации транскрипции у бактерий. Это бактериальный фактор инициации транскрипции, который обеспечивает специфическое связывание РНК-полимеразы (RNAP) с промоторами генов.

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

8.1. Нормальное название

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

8.2. 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.

8.3. Картинки

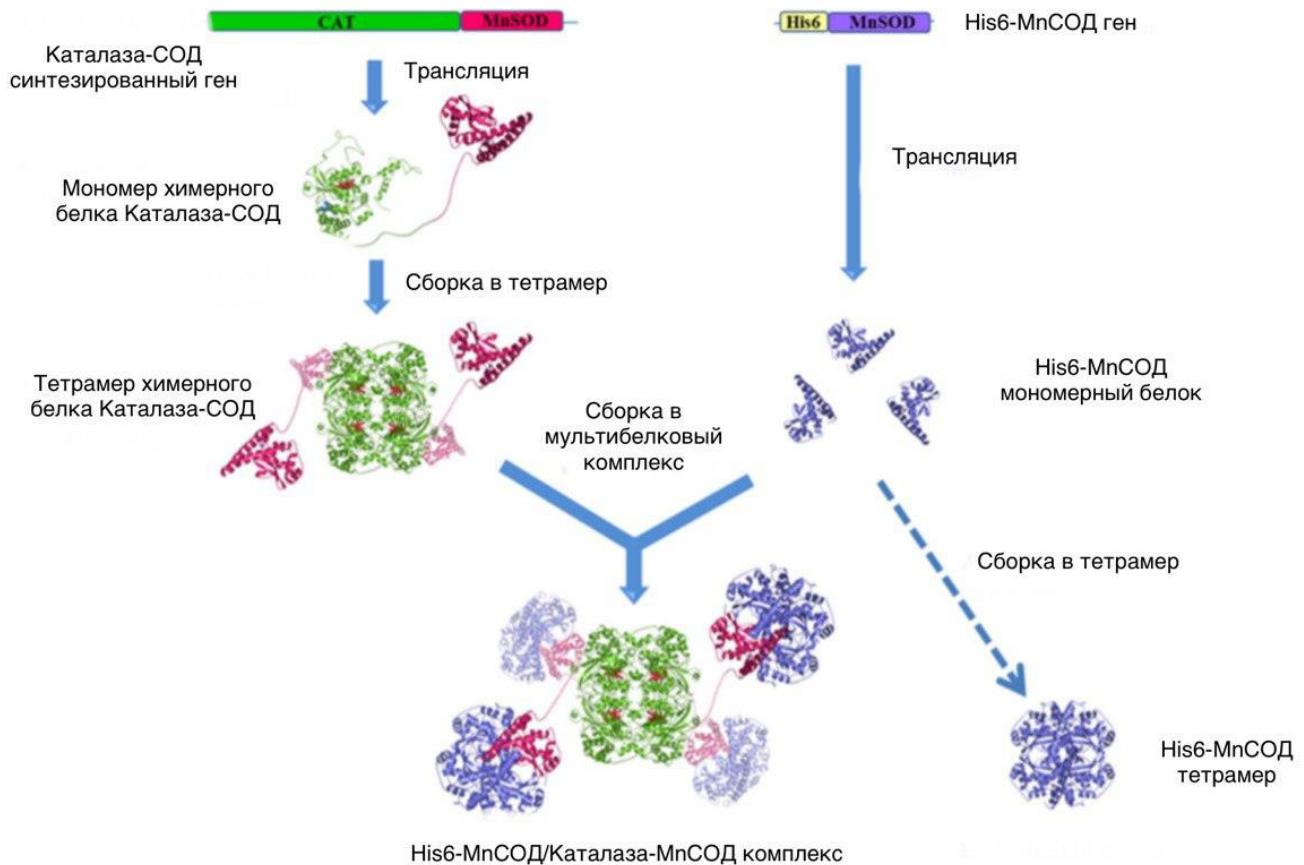


Рис. 40. Схематическое изображение стратегии конструирования бифункционального белка с супероксиддисмутазной и каталазной активностями. Совместная экспрессия химерного гена CAT-MnSOD с геном 6His-MnSOD позволяет получить мономер белка CAT-MnSOD и 6His-MnSOD. Затем два мономера собираются в большой мультимерный 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.

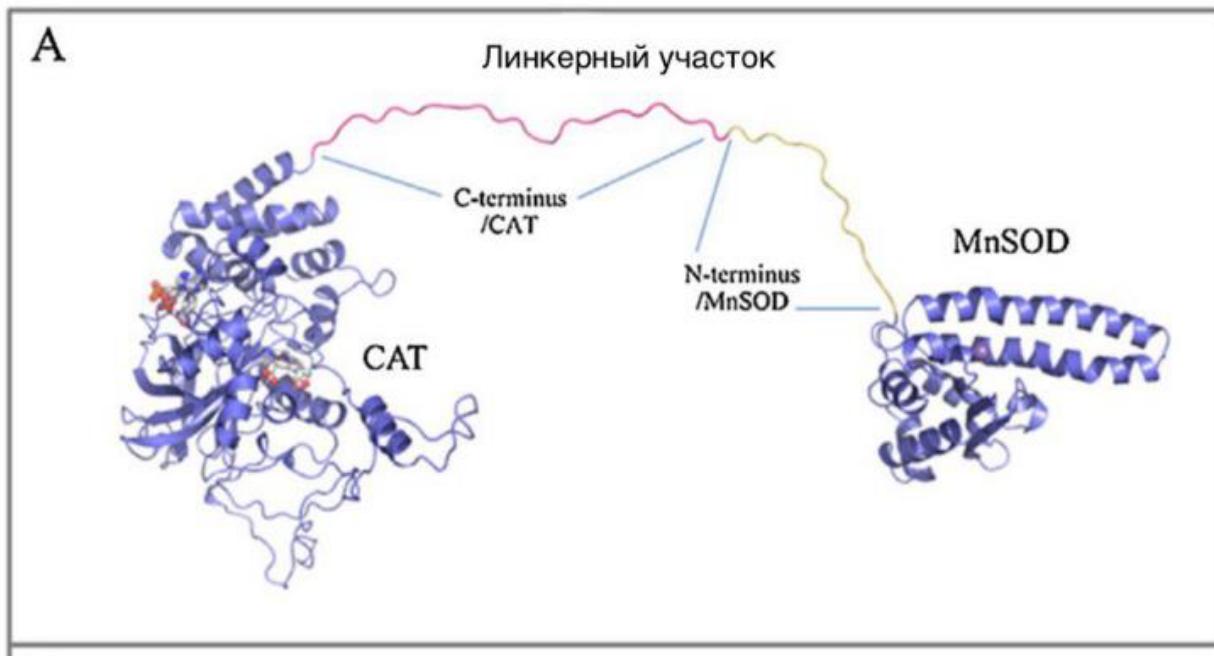


Рис. 41. Структурная модель химерного белка CAT-MnSOD (A). Модель одиночной цепи CAT-MnSOD. Линкер включает последние двадцать шесть C-концевых остатков 502-527 CAT и первые пятнадцать N-концевых остатков MnSOD

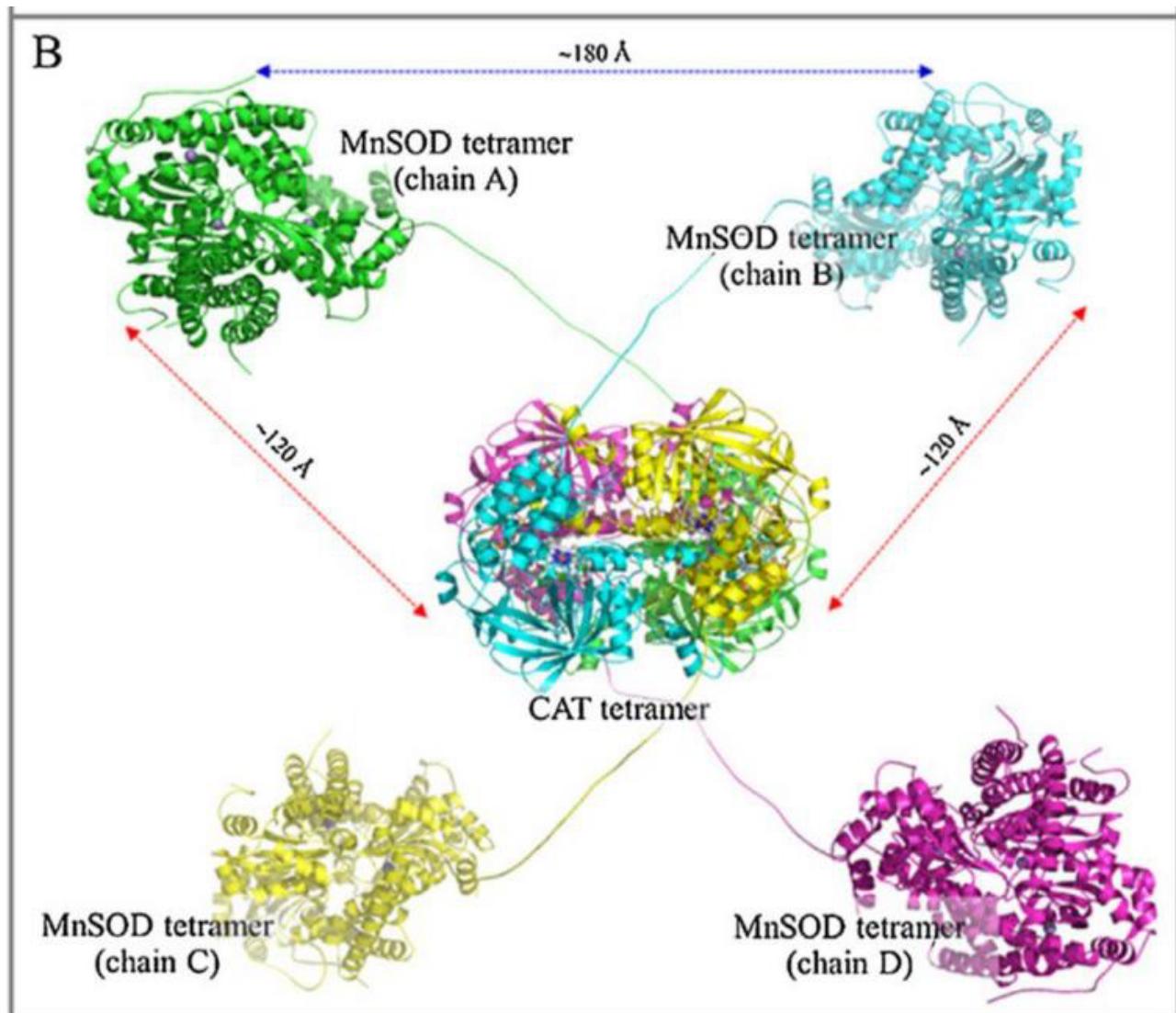


Рис. 42. (B). Модель тетрамерного CAT-MnSOD, построенная в соответствии с кристаллической структурой тетрамерной CAT человека (код pdb 1DGF). Определены расстояния до центра масс между MnSOD и CAT, а также между каждым соседним MnSOD. Гетероатомы, включая ионы гема, НАД и иона Mn^{3+} , показаны в шаровой модели.

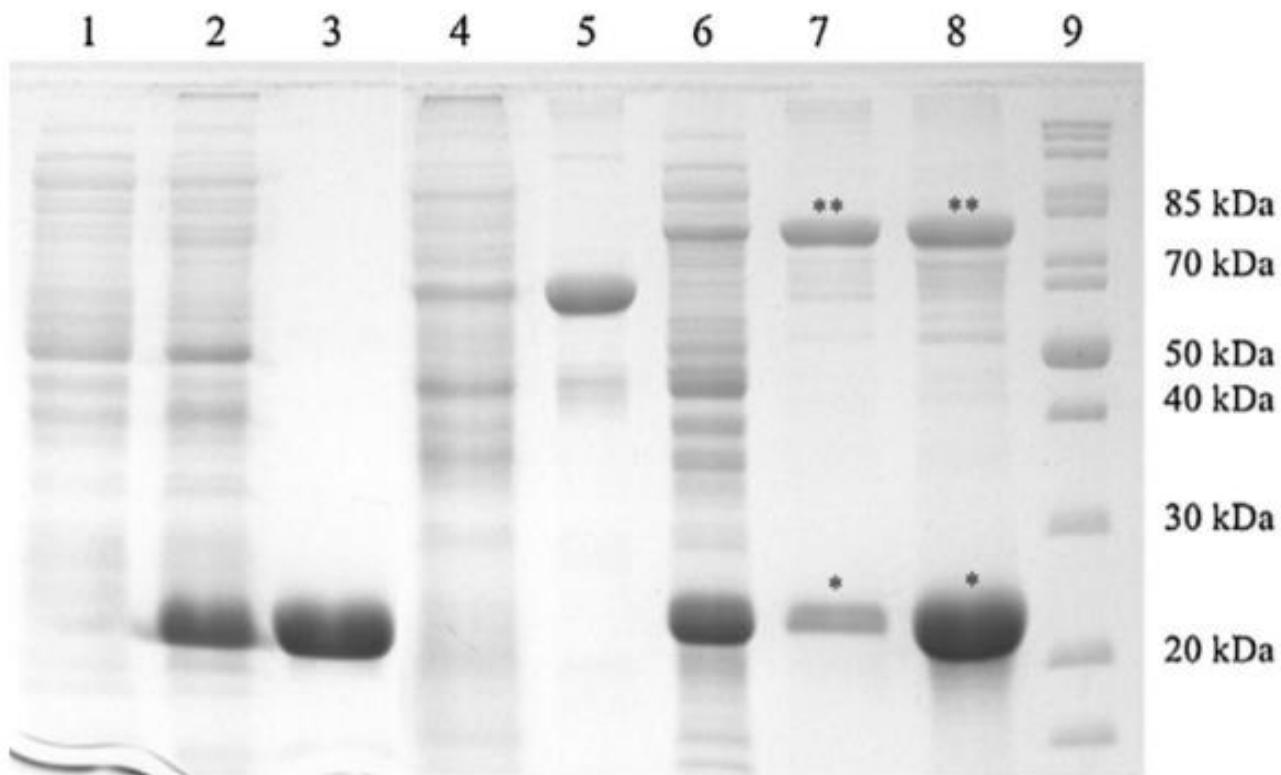


Рис. 43. Экспрессия и очистка нативных и химерных белков. Очищенные белки определяли с помощью электрофореза в ПААГ. Дорожка 1: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий контрольную плазмиду pETDuet-1, дорожка 2: неочищенный экстракт белков *E. coli*, несущий pET46-MnSOD, дорожка 3: очищенный 6His-MnSOD, 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).

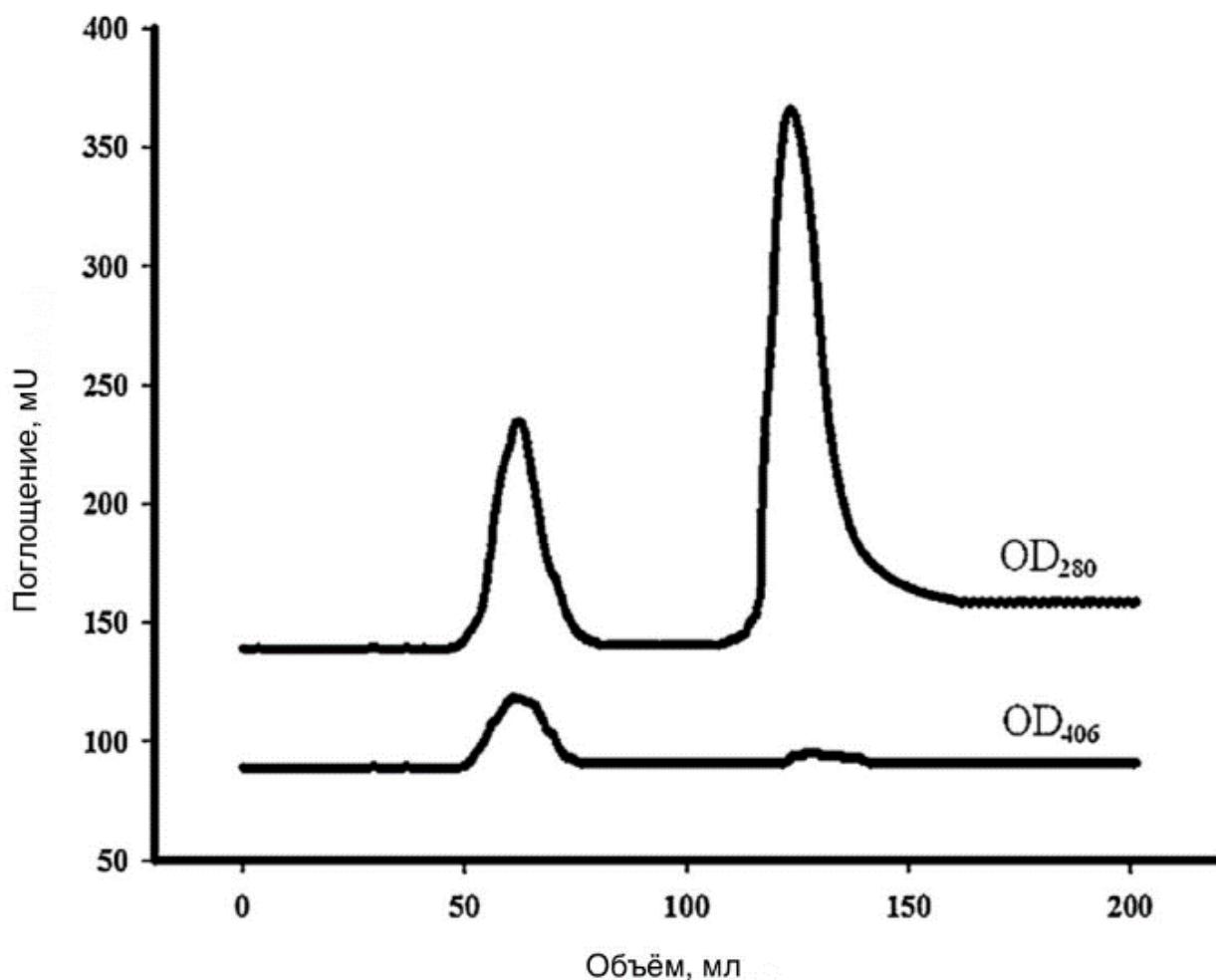


Рис. 44. Хроматограмма гель-фильтрационной хроматографии, выполненной на колонке для гель-фильтрации Sephadex G-25. Разделенные пики белков 6His-MnSOD и комплекса M/CM определяли по поглощению при 280 нм, а присутствие гема простетической группы отслеживали с помощью поглощения при 406 нм.

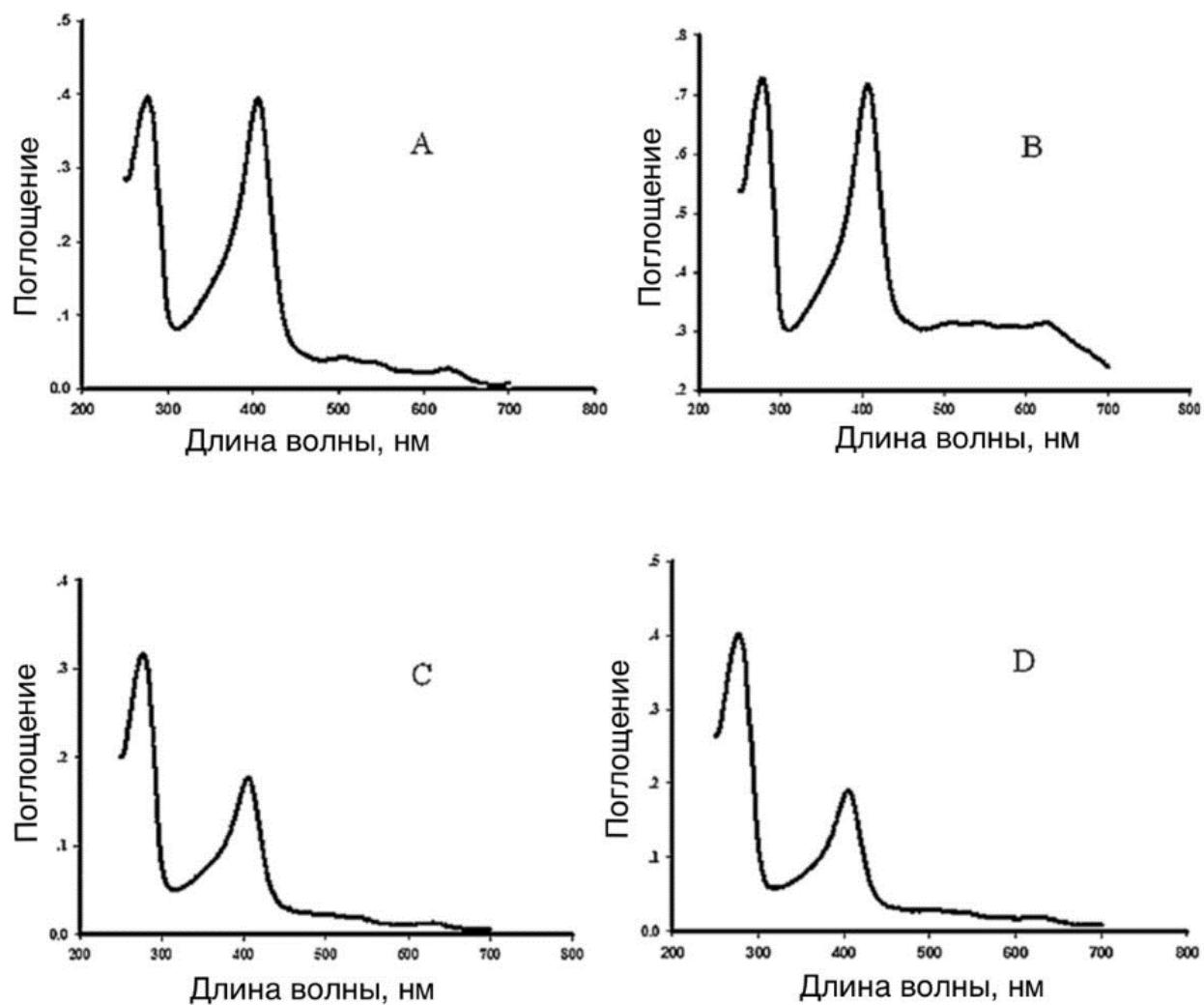


Рис. 45. Спектры поглощения очищенных белков (250–700 нм). Пик поглощения гема представлен при 406 нм. 6His-CAT (A); 6His-CAT-TAT (B); M/CM (C) и M-TAT/CM (D).

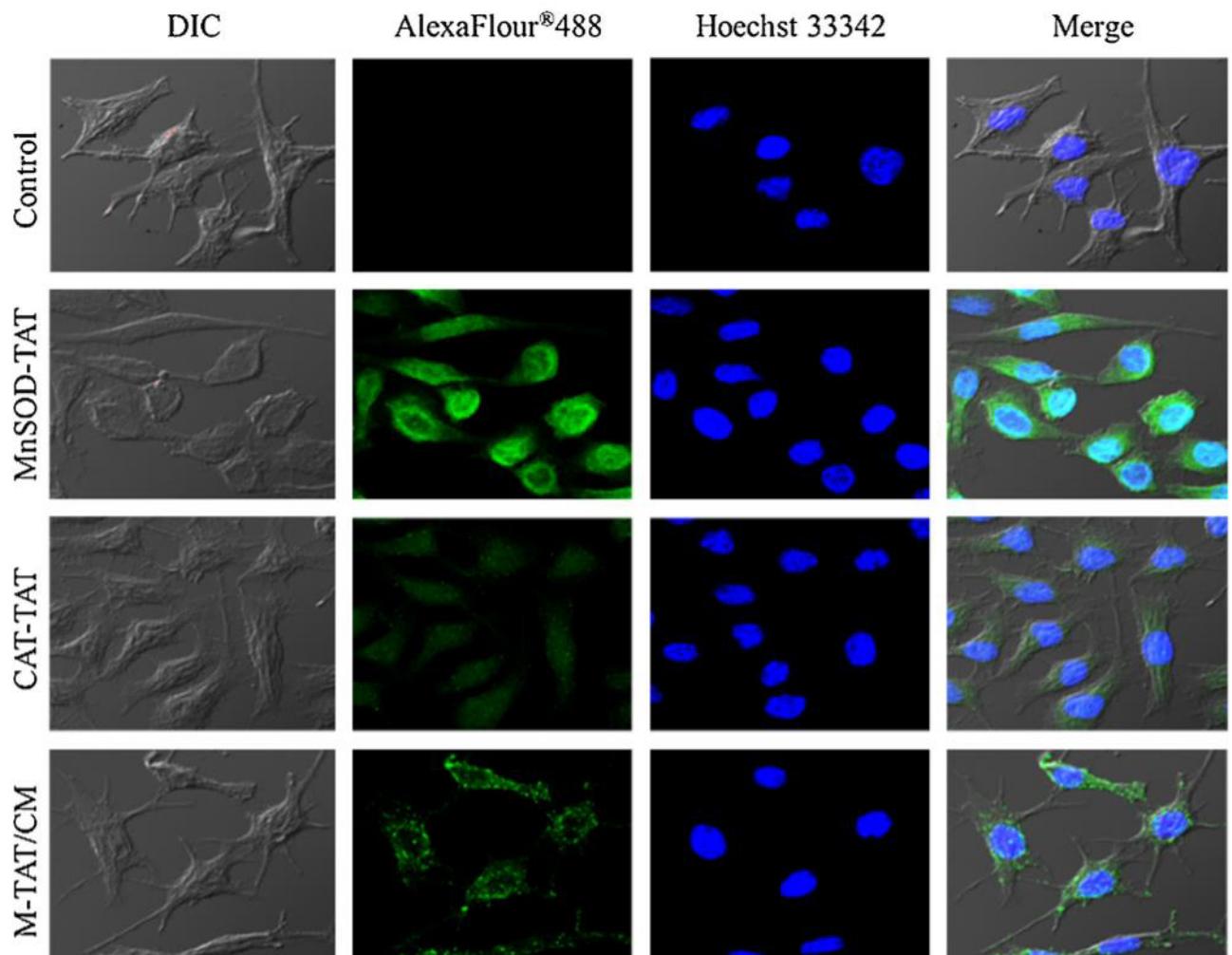


Рис. 46. Проникновение в клетки L929 6His-CAT-TAT, 6His-MnSOD-TAT и M-TAT/CM, меченых Alexa Flour 488®. Исследование и визуализация с помощью конфокальной микроскопии. Изображения были получены после обработки клеток L929 0,1 М раствором целевых белков в течение 1 часа. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342.

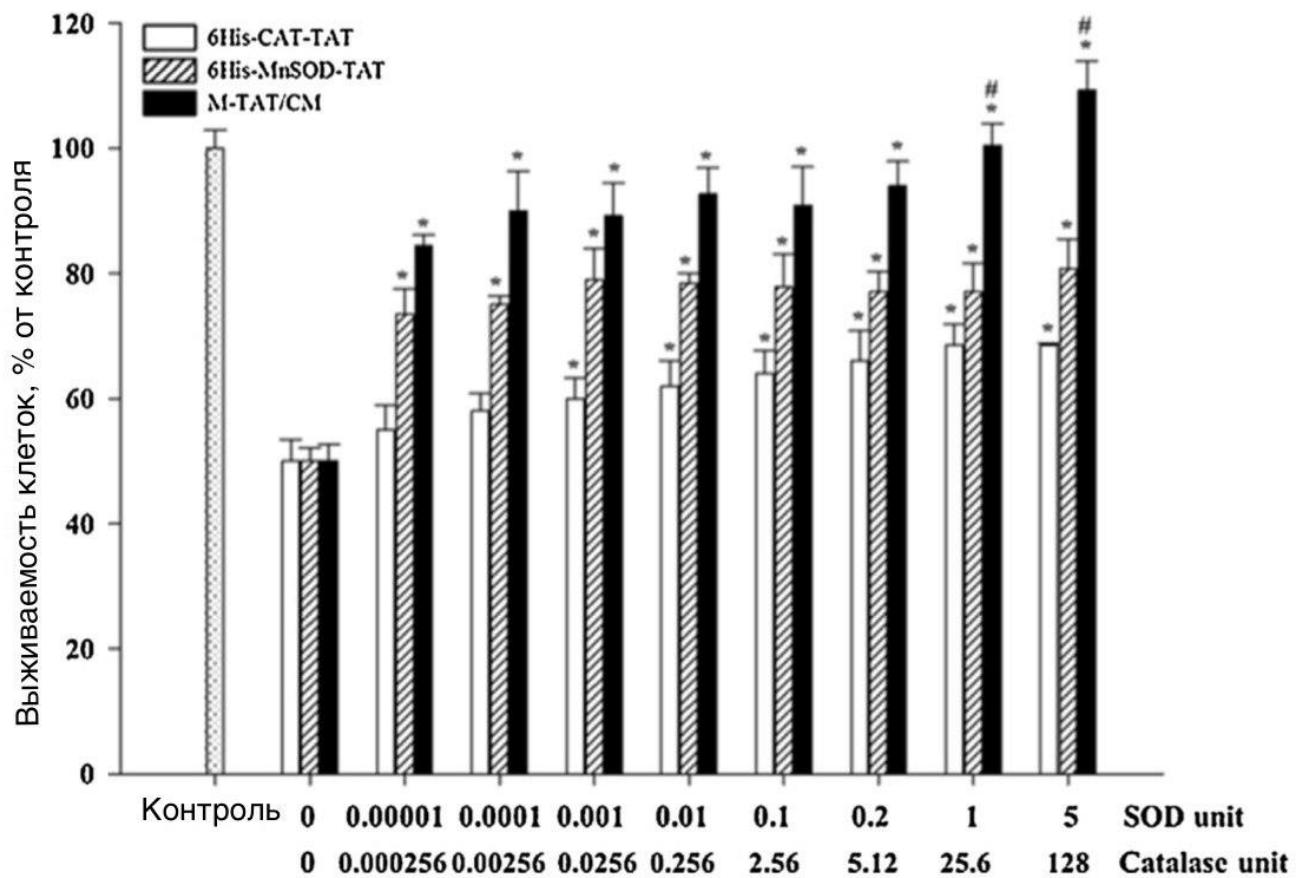


Рис. 47. Защитный эффект гибридных белков на оксидативный стресс, вызванный паракватом, в клетках L929. Клетки предварительно обрабатывали различными единицами белков в течение 1 часа. После удаления избытка белка клетки промывали и инкубировали с 30 мМ паракватом в течение 5 часов. Жизнеспособность клеток исследовали с помощью анализа MTS. Данные выражены как среднее значение + - стандартное отклонение в трех независимых экспериментах. Статистический анализ оценивали с помощью парного t-критерия, $p\text{-value} < 0.05$.

9. 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

9.1. Нормальное название

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

9.2. 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.

9.2.1. 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.

9.3. 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. 48. Первая картинка

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

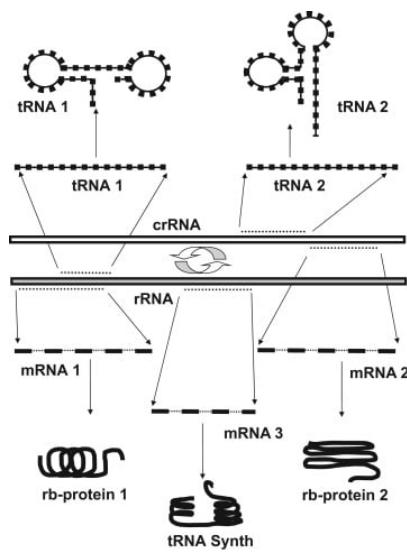


Рис. 49. Вторая картинка

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.

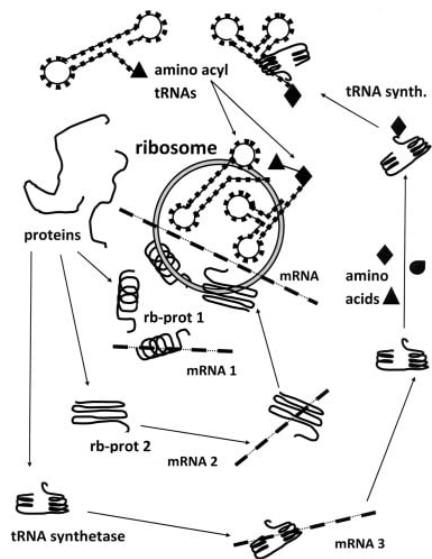


Рис. 50. Третья картинка

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.

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

10.1. Нормальное название

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

10.1.1. Пояснения к высказанныму

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

10.2. 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.

10.3. Картинки

Здесь просто различные условия ПЦР –
ничего содержательного.

Condition	Concentration (mM)			Programme	No. of cycles	References
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	dNTPs			
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)
DI*	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)
DII	–	–	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 DI was used as template for DII.

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

Рис. 51. Первая картинка

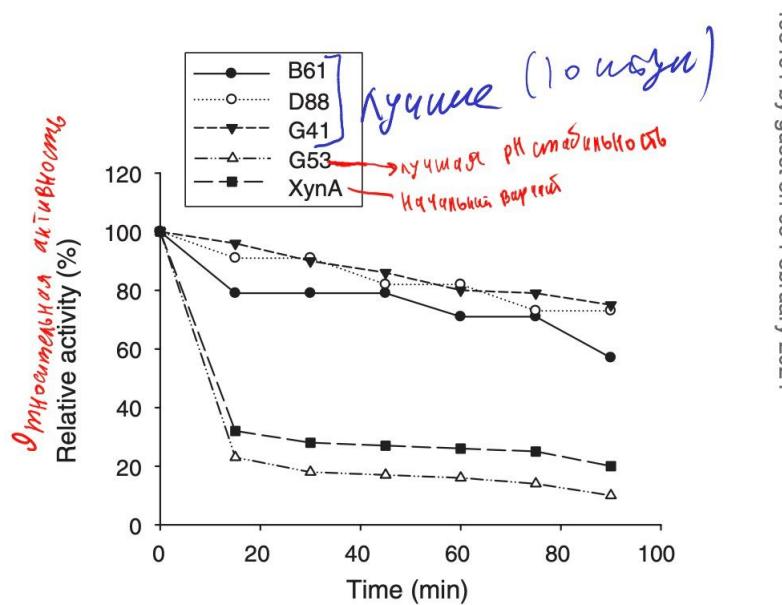


Fig. 1. Effect of temperature on the stability of wild-type XynA and its mutant progeny at 80 °C and pH 6.5. The remaining activities were expressed as percentages of the original activities, with each point representative of duplicate determinations.

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. 52. 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.

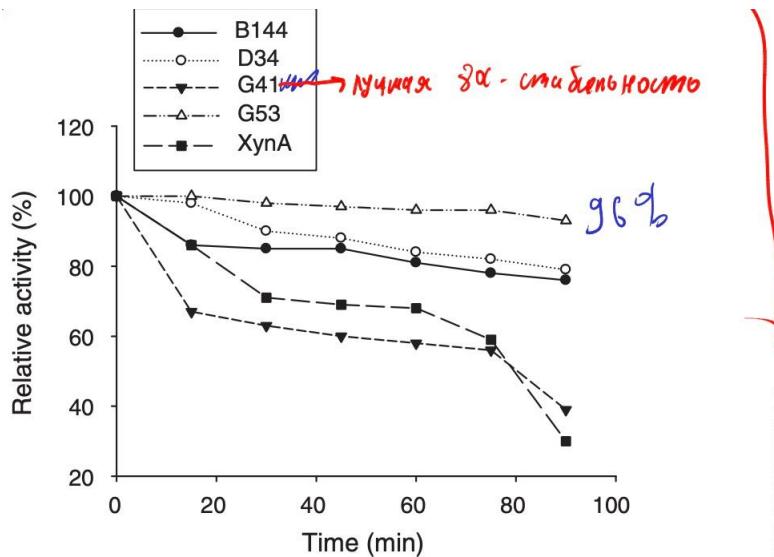


Fig. 2. Effect of alkalinity on the stability of wild-type XynA and its mutant progeny at pH 10 and 60 °C. The remaining activities were expressed as percentages of the original activities, with each point representative of duplicate determinations.

*тут тоже самое, но не в 80°C, а в pH 10.
лучшее что ли самое - это не теряет, но лучше в 80°C*
~~и лучше что ли самое - это не теряет, но лучше в 80°C~~

Рис. 53. 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.

<p>pH →</p> <p>G53</p> <p>G41</p> <p>t</p>	<pre> xynA MVGFTPVALAALAAATGALAFPAGNATELEKRQTTPNSEGWHGDYYYYSWWSDGGAQATYTN 60 G53 MVGFTPVALAALAAATGALAFPAGNATELEKRQTTPNSEGWHGDYYYYSWWSDGGTQATYTN 60 G41 MVGFTPVALAALAAATGALAFPAGNATELEERQTPNSEGHRHDGYYYSSWWSDGGAQAAAYTN 60 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** </pre> <pre> xynA LEGGTYEISWGDDGNLVGGKGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYI 120 G53 LEGGTYEISWGDDGNLVGGKGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYI 120 G41 LEGGTYEISWGDDGNLVGGRGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYI 120 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** </pre> <pre> xynA VENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIVYRLGKTTVRNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGT 180 G53 VENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIVYRLGKTTVRNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGT 180 G41 VENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIVYRLGKTTVRNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGT 180 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** </pre> <pre> xynA VQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG 225 G53 VQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG 225 G41 VQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG 225 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***** </pre>
--	--

Рис. 54. Четвертая картинка

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

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

11.1. Нормальное название

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

11.2. 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 биолюминесцентны, 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.

11.3. Картинки

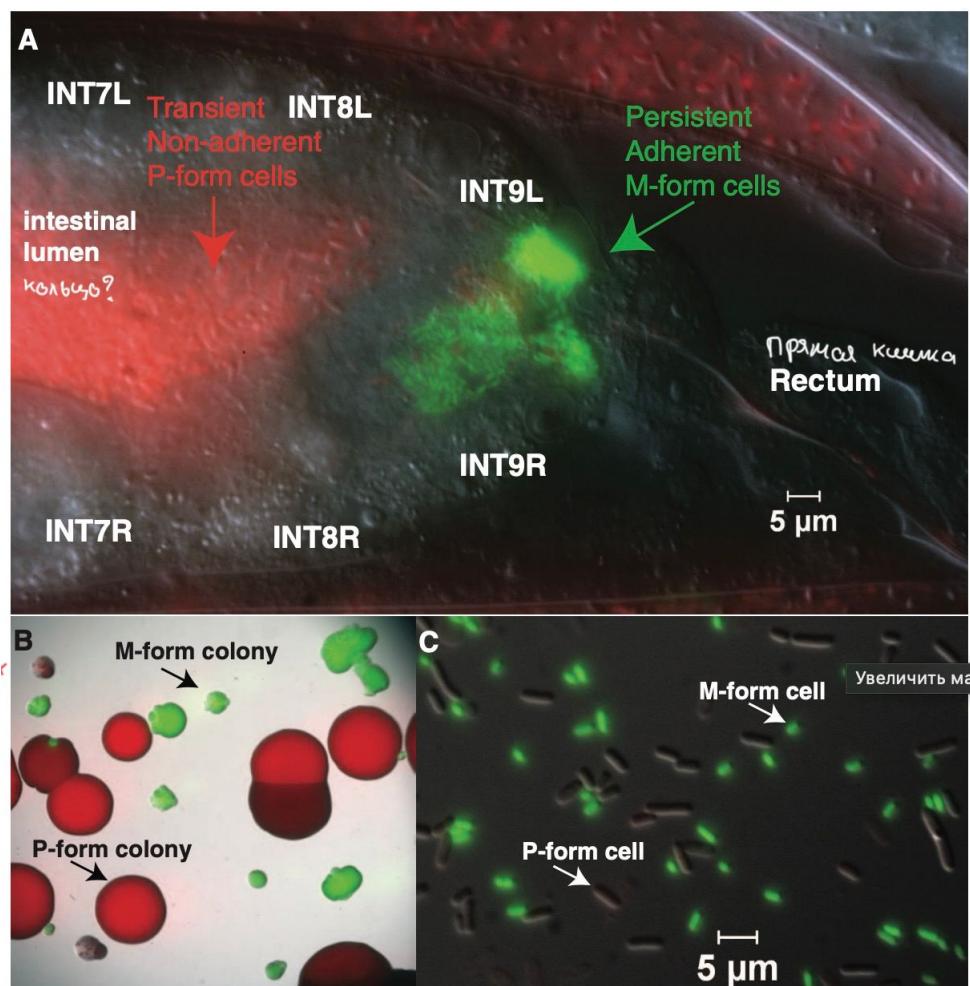


Рис. 55. Первая картинка

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).

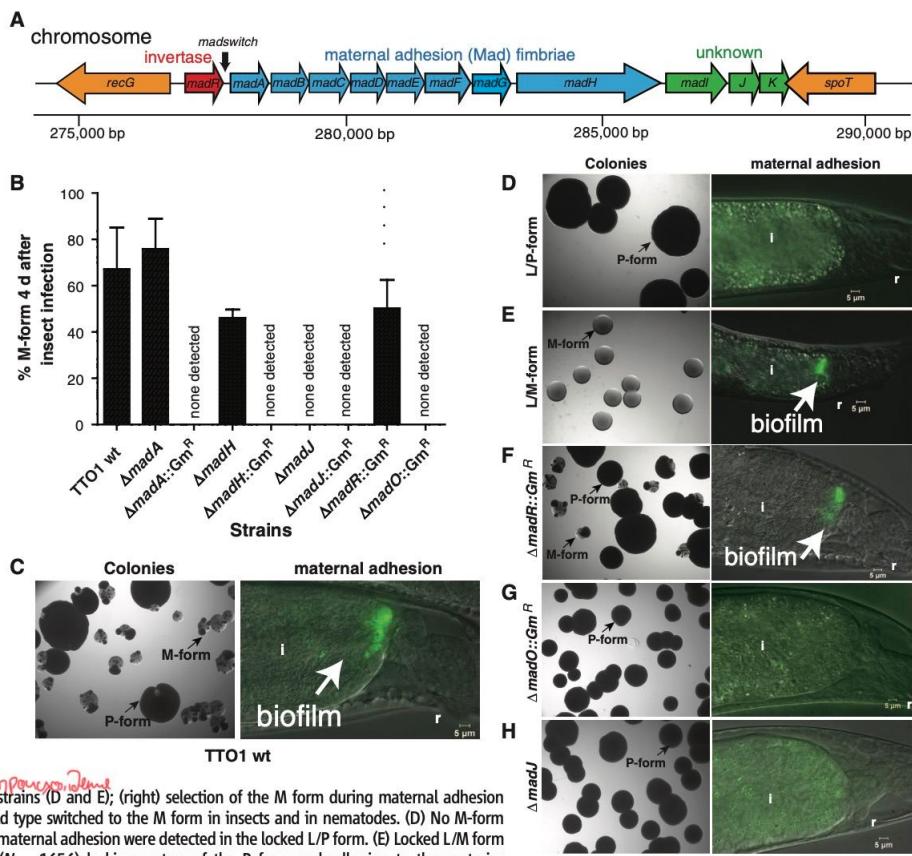


Рис. 56. Вторая картинка

Картинка а) Нарисована хромосома (ФЕЗЕЧЕСКАЯ КАРТА) Все эти *mad..* — гены. Мадсвитч — 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-форма. 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
$\Delta madO::Gm^R$	ND	41.4 ± 8.0	19.1 ± 3.5
$\Delta madO$	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 инсектина (24, 25). Because M forms emerge from prolonged aging of P-form colonies, we reasoned that the M form develops a higher incidence of persister cells (a high persister, *hip* phenotype). Indeed, the M form 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-form cells ($P = 0.01$) (Fig. 2H). The M form 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 form is biased toward dormancy, which could be advantageous inside the nematode.

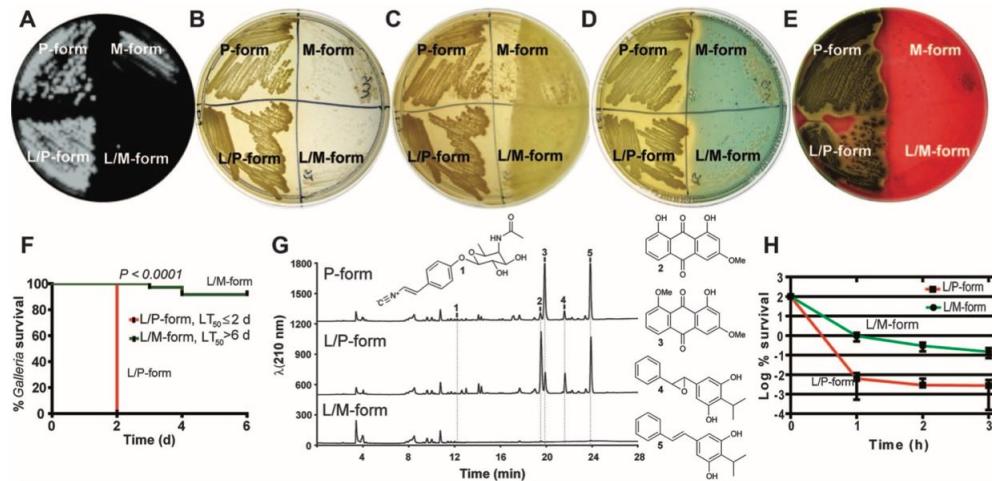


Рис. 57. Третья картинка

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)

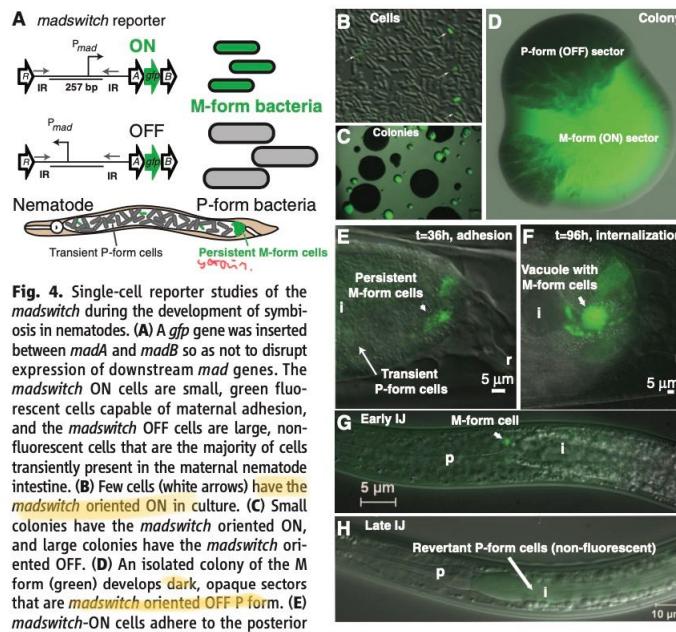


Fig. 4. Single-cell reporter studies of the *madswitch* during the development of symbiosis in nematodes. (A) A *gfp* gene was inserted between *madA* and *madB* so as not to disrupt expression of downstream *mad* genes. The *madswitch* ON cells are small, green fluorescent cells capable of maternal adhesion, and the *madswitch* OFF cells are large, non-fluorescent cells that are the majority of cells transiently present in the maternal nematode intestine. (B) Few cells (white arrows) have the *madswitch* oriented ON in culture. (C) Small colonies have the *madswitch* oriented ON, and large colonies have the *madswitch* oriented OFF. (D) An isolated colony of the M form (green) develops dark, opaque sectors that are *madswitch* oriented OFF P form. (E) *madswitch*-ON cells adhere to the posterior maternal nematode intestine, and most cells transiently present are not fluorescent with the *madswitch* OFF. (F) Most adherent cells that invade and grow inside vacuoles of the rectal gland cells have the *madswitch* oriented ON. (G) One or two cells on or inside the pharyngeal intestinal valve cells have the *madswitch* oriented ON. (H) Seven days after the symbionts fully colonize the IJs, all cells are not fluorescent with the *madswitch* OFF, and again, the insect pathogenic P form is arming the nematode for insect infection. i, intestine; r, rectum; p, pharynx.

Рис. 58. 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

12. Mitochondrial DNA and human evolution A review (Ева)

12.1. Нормальное название

Митохондриальная ДНК и эволюция человека.

12.2. Абстракт

- 1) Часть клеточной ДНК содержится в митохондрии
- 2) Изучение этой ДНК позволяет определить происхождение нашего вида, родство, возможное скрещивание с другими гоминидами (семейство приматов, включающих людей и больших человекообразных обезьян), миграции и колонизацию новых регионов мира с материнской точки зрения

12.2.1. Общая инфа

- 1) Копий такой молекулы в клетке от 100 до 1000 (вероятность обнаружения в образцах выше и больше материала)
- 2) В молекуле явно отсутствует рекомбинация, что означает, что все различия между последовательностями mtДНК являются результатом только фиксированных изменений. Было доказано, что частота мутаций в митохондриальных геномах в несколько раз выше, чем в ядерных последовательностях. Таким образом, это вызывает высокий уровень вариабельности последовательностей между людьми, накопленный за относительно короткий период времени по отношению к общей предковой молекуле mtДНК.
- 3) Постоянная скорость эволюционных изменений может служить молекулярными часами, позволяя исследовать возраст определенных линий и время их разрыва.

Ключевые понятия:

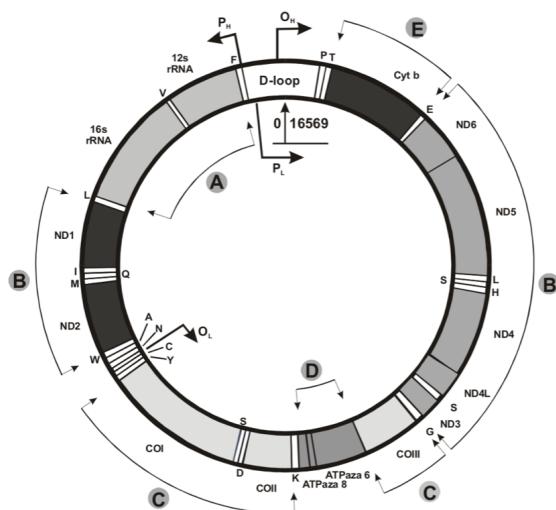
Гаплогруппа — группа схожих гаплотипов, имеющих общего предка, у которого произошла мутация, унаследованная всеми потомками.

Гаплотип — совокупность аллелей на локусах одной хромосомы, обычно наследуемых вместе.

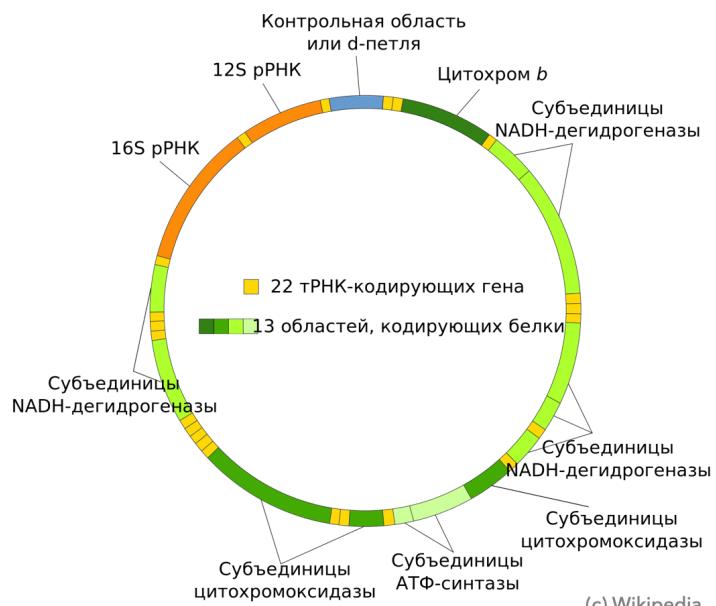
Аллели — различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках гомологичных хромосом, определяют направление развития конкретного признака

12.3. Картинки

Митохондриальная ДНК



(c) Mitochondrial DNA and human evolution: A review



(c) Wikipedia

Рис. 59. На рисунке изображен схематичное строение митохондриальной ДНК, которая включает в себя примерно 16,5 тысяч нуклеотидов и кодирует 13 полипептидов (зеленые области B, C, E, D); 2 рРНК (оранжевые области A); 22 тРНК (желтые и белые на левом рисунке кроме d-петли) обеспечивающих трансляцию белков внутри митохондрии. D-loop это область не кодирующая часть содержащая два гипервариабельных участка (HVR1 HVR2)

«Модель из Африки»



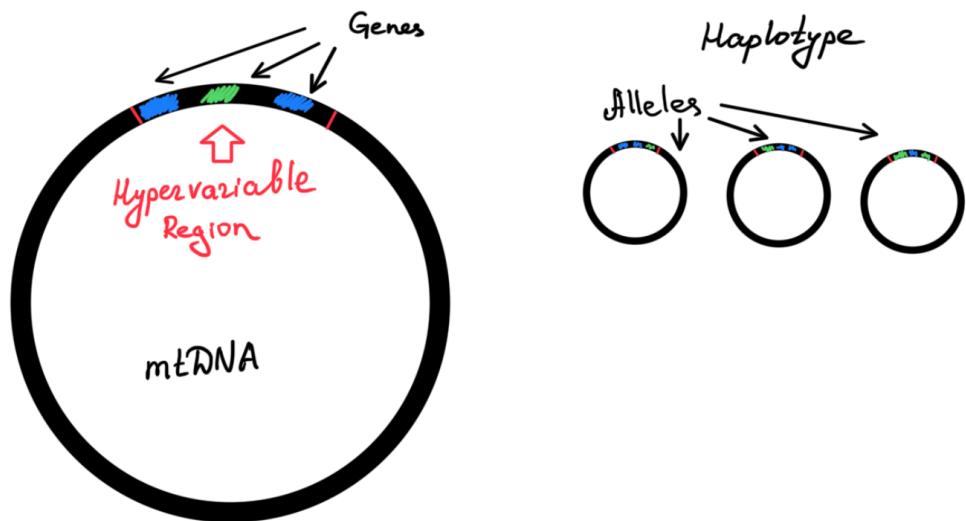
Географическое распространение вариантов мтДНК

(c) Mitochondrial DNA and human evolution: A review

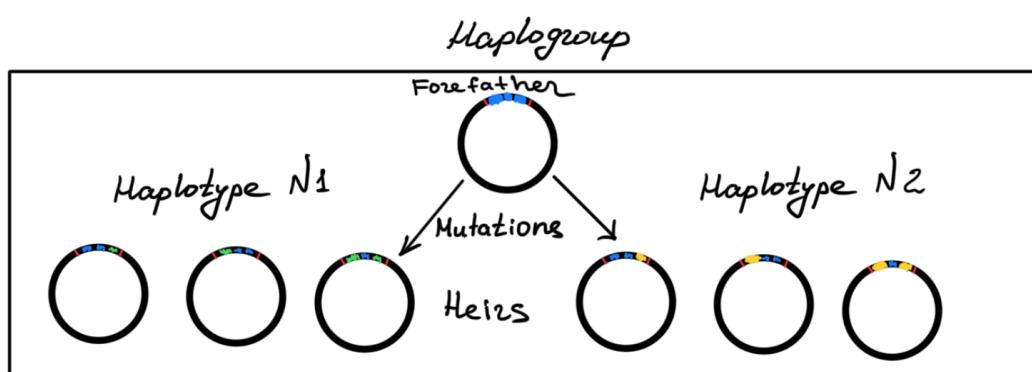
Рис. 60. Одна из двух моделей расселения людей: «Модель из Африки». На рисунке изображено географическое распространение людей в ходе эволюции. Белая область на карте это место появления первой мтДНК (100-200 тысяч лет назад (ка)). Стрелки показывают распространение гаплогруппы (заглавные группы). Отслеживание миграций *Homo sapiens* с помощью мтДНК основано на наблюдении за тем, что появление определенных гаплотипов часто связано с определенными регионами мира, и на предположении, что это результат накопления различных мутаций.

12.3.1. Для общего развития

Митохондриальный гаплотип



Митохондриальная гаплогруппа



13. Protection of nuclear DNA by lifespan-extending compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

13.1. Нормальное название

Защита ядерной ДНК с помощью веществ увеличивающих продолжительность жизни дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

13.2. Абстракт

АБСТРАКТ ГРАФИЧЕСКИЙ БЛЯТЬ

Graphical Abstract

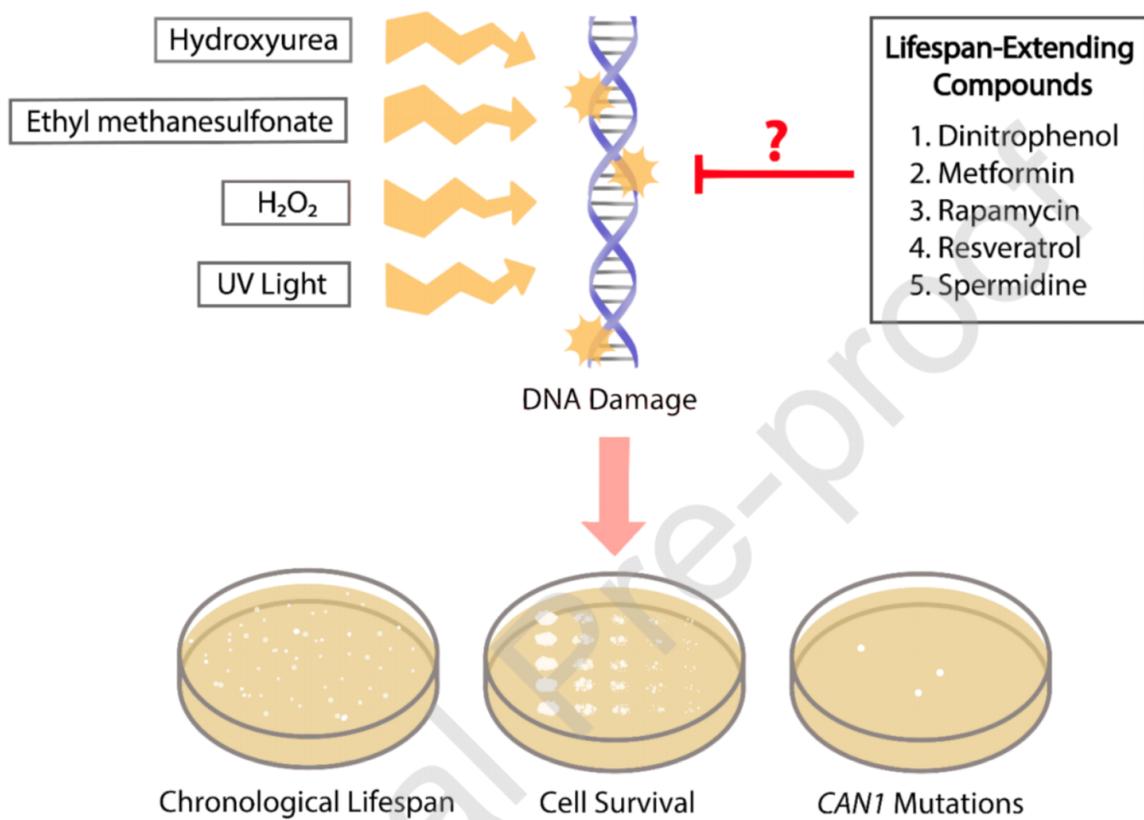


Рис. 61. Графический абстракт: воздействие гидроксимочевины, этил метанасульфоната, перекиси водорода и УФ излучения приводят к повреждению ДНК. Продлевающие жизнь вещества. Три интересующих исследователей аспекта: продолжительность жизни, выживание клеток и мутации в фокусе CAN1

1. Предположение-повреждение ДНК является причиной старения 2. Существуют вещества, которые увеличивают продолжительность жизни модельных организмов (дрожжи, черви, мухи и мыши) 3. Возможный механизм действия этих веществ-защита ДНК 4. Исследовались 5 веществ: динитрофенол, метформин, рапамицин, ресвератрол и спермидин на возможность

защиты ДНК (использовали дозы, которые показали эффективность в увеличении продолжительности жизни) ЧТО ДЕЛАЛИ И ЧТО ПОЛУЧИЛИ? 5. Рапамицин и спермидин снижают спонтанные мутации в локусе (месте) CAN1 6. Динитрофенол, метформин и ресвератрол защищают от индуцированных этилметансульфанатом (EMS) мутаций CAN1 7. Все 5 защищают от EMS 8. Метформин и спермидин защищают от УФ-излучения 9. Все 5 не эффективны против H₂O₂ (перекись), спермедин только повысил эффект 10. Спермидин показал положительное действие против задержки роста гидроксимочивиной 11. ИТОГ: соединения увеличивающие продолжительность жизни могут частично защищать ядерную ДНК

13.3. Картинки

Fig 1. The effect of lifespan-extending chemicals on (A) *CAN1* mutation rates, (B)

CAN1 EMS-induced-mutation frequencies, and (C) doubling times. CON,

untreated control; DNP, dinitrophenol; MET, metformin; RAP, rapamycin; RES,

resveratrol; SPD, spermidine. Values are shown as means + SD ($n = 10$ for (A),

except for MET where $n = 8$; $n = 10$ for (B); $N = 7$ for (C). P -values were calculated

by the Dunn' s multiple comparison test compared to the control. * $P < 0.05$, ** P

< 0.01, *** $P < 0.001$.

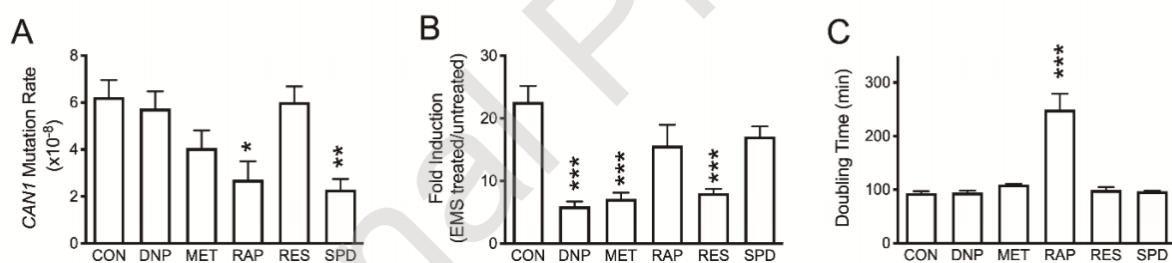


Рис. 62. **A)** Изменение темпа спонтанных (без внешних факторов) мутации в локусе CAN1 (CAN-канаванин) при воздействии: CON-контроль, ничего; DNP-динитрофенол; MET-метформин; RAP-рапамицин; RES-ресвератрол; SPD-спермидин; Показано, что RAP и SPD уменьшили в 1 и 2 раза соответственно. **B)** Изменение темпа индуцированных (под воздействием метансульфоната) мутации в локусе CAN1 (CAN-канаванин) при воздействии: CON-контроль, ничего; DNP-динитрофенол; MET-метформин; RAP-рапамицин; RES-ресвератрол; SPD-спермидин; Показано, что DNP, RES и MET в 3 раза уменьшили. **C)** Изменение времени деления при воздействии: CON-контроль, ничего; DNP-динитрофенол; MET-метформин; RAP-рапамицин; RES-ресвератрол; SPD-спермидин; RAP замедляет в 3 раза

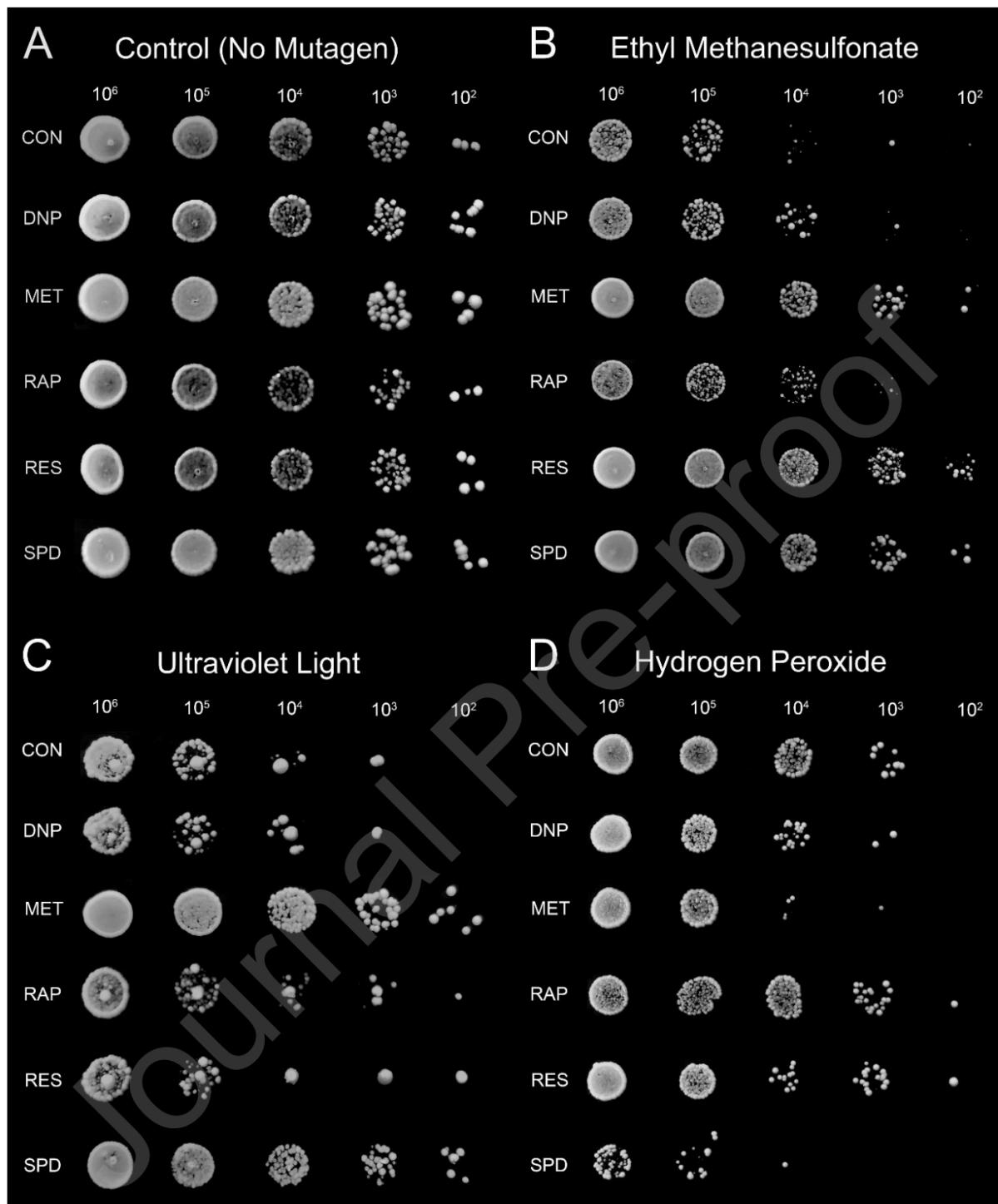


Рис. 63. На рисунке изображены 4 панели для изучения влияния на колонии клеток **A-контроль; B-этилметансульфонат; C-УФ; D-перекись водорода**. Выращенные клетки воздействовали и делали последовательные разведения: DNP, dinitriphenol; MET, metformin; RAP, гарамycin; RES, resveratrol; SPD, spermidine. **B)** Выживание клеток без всего менее 1% при введение веществ титры живых клеток увеличили **C)** Метформин и спермидин защищают от УФ-излучения **D)** Все 5 не эффективны против H₂O₂ (перекись), спермедин только повысил эффект

Fig 3. Hydroxyurea significantly decreases survival relative to the untreated control

(A). The effect on survival of the lifespan-extending chemicals in the presence of hydroxyurea relative to hydroxyurea alone is shown in (B). Maximum lifespans are shown in (C). The effect of each chemical on cell growth rates in the presence of hydroxyurea is shown in (D), where rapamycin completely arrested cell growth. HU, hydroxyurea-treated control; the following are also treated with hydroxyurea: DNP, dinitrophenol; MET, metformin; RAP, rapamycin; RES, resveratrol; SPD, spermidine. *P*-values were calculated by either (A) the Mann-Whitney test (*n* = 9), or (B, C, and D) the Dunn' s multiple comparison test compared to hydroxyurea treated control (*n* = 6). **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

Рис. 64. Провели эксперимент-вырастили в жидкой среде клетки и смотрят сколько дней протянут без добавления питательных веществ: A) Процент выживаемости в зависимости от времени при пустой среде и при добавлении гидроксимочевины B) То же самое, но с добавлением продлевавших жизнь веществ. Видно, что эффект от спермидина лучше в примерно 10 раз в отличии от других. C) Средняя продолжительность жизни по популяции, спермедин эффективен D) Скорость роста в присутствии гидроксимочевиной. HU-контроль обработанный гидроксимочевиной, видно, что RAP полностью остановил рост клеток.

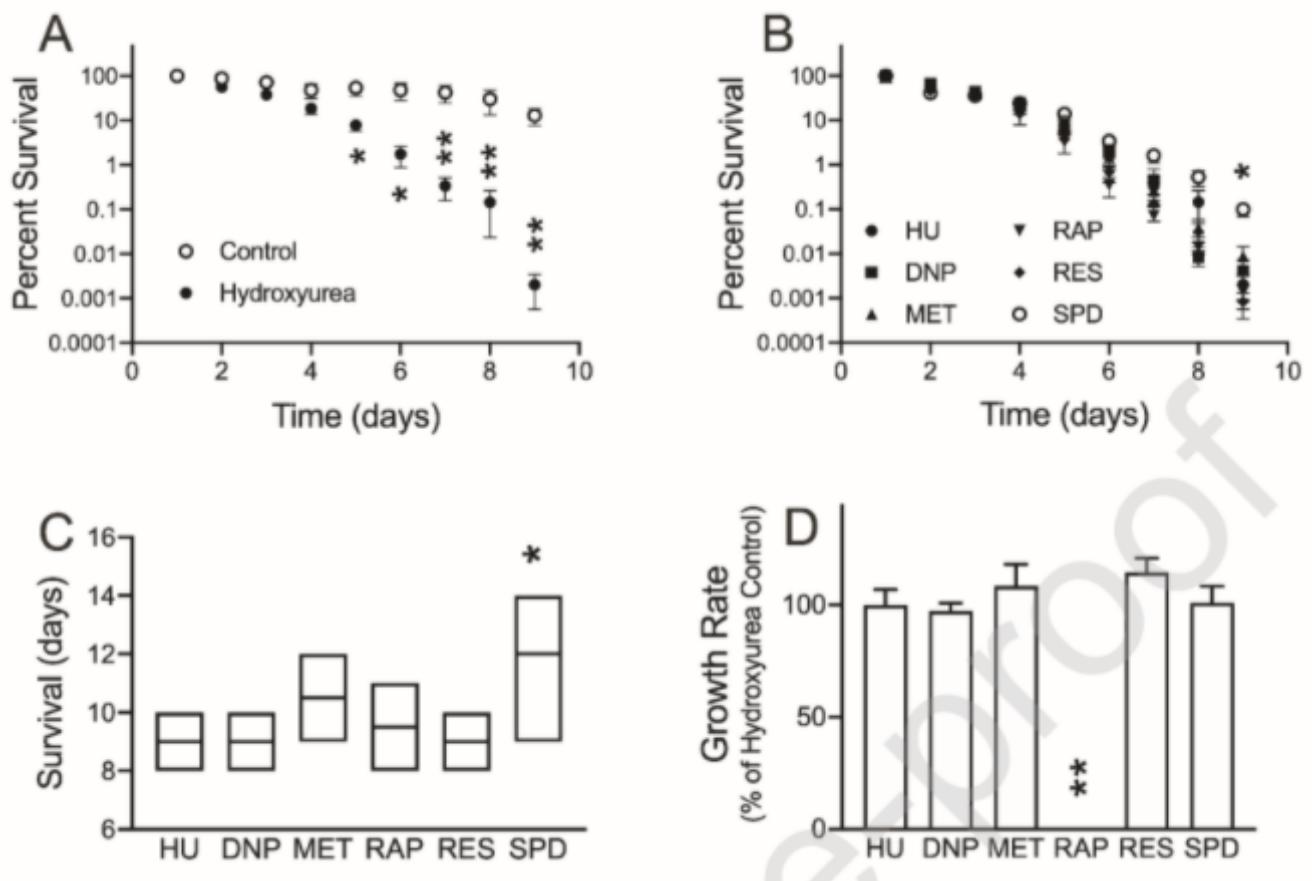


Рис. 65. (A) Выживаемость дрожжей в присутствии гидроксиарбамида и без него. Далее все опыты в его присутствии. (B) Выживаемость при добавлении растворов исследуемых соединений. В обоих опытах А и В, видимо, декстроза добавлялась в течение опытов одинаковыми дозами таким образом, чтобы в контрольной группе выживаемость держалась на 100%. По сравнению с контрольной группой, в растворе гидроксиарбамида выживаемость падает до 10^{-5} . Из наших веществ только SPD повышает выживаемость в её присутствии - примерно на 2 порядка. (C) Среднее максимальное время жизни: в растворе SPD время жизни увеличивается на 2-3 дня в сравнении с растворами остальных веществ. (D) Относительная скорость роста (деления клеток) в присутствии гидроксиарбамида: (сравни с (C) первого графика) RAP полностью выключает рост.

14. Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter

14.1. Нормальное название

Вызванное присутствием арабинозы связывание белков AraC и AraI активирует промотор оперона araBAD

14.2. Абстракт

Было обнаружено, что состояние *araI* в ДНК кишечной палочки, занятой белком AraC, изменяется с двух на четырехоборотную при добавлении арабинозы-индуктора. Участок AraI можно разделить на две смежные области: AraI1 и AraI2. *araI1* связывает как связанный с лигандом, так и свободный от лиганда белок AraC, тогда как *araI2* связывает белок AraC только в присутствии арабинозы. Мутация *araI* и известная мутация *araC* привели к потере связей в *araI2*, в то время как связывание с *araI1* не было затронуто. Оба мутанта не смогли активировать промотор оперона araBAD. Мы предполагаем, что занятость связей *araI2* белком AraC ведет к распознаванию РНК-полимеразой промотора araBAD и что *araI* действует как механизм переключения, позволяющий формам белка AraC выступать и репрессором, и активатором, регулируя промотор araBAD.

14.2.1. Примечание

Короче, о чём статья по факту: кишечная палочка кушает глюкозу, но если глюкозы нет, но есть арабиноза (это тоже сахар такой), то включается Арабинозный оперон araBAD, способствующий метаболизму арабинозы. Если в среде есть глюкоза, действие оперона подавляется. На картинке показан сам оперон araBAD: в отсутствии арабинозы димер AraC контактирует с O₂ и с I₁, формируя петлю ДНК в 210bp.

В присутствии же арабинозы (низ картинки) араC загибается, сохраняя контакт с *araI1* и привязывается к соседнему *araI2*. Это формирует петлю ДНК и начинается транскрипция.

14.3. Картинки

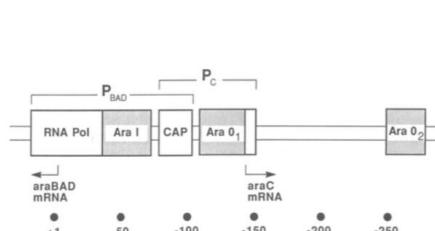


FIG. 1. The controlling region of the *araBAD* operon. The overlapping and divergent promoters of *araBAD* (P_{BAD}) and *araC* (P_C) are shown with the positions of the contact sites of RNA polymerase (RNA pol), AraC protein (*AraI*, *AraO₁*, and *AraO₂*), and the CAP binding protein (CAP). The P_C RNA polymerase binding site (open box) overlaps *AraO₁* (stippled box). The start points and directions of transcription are indicated by arrows. The numbers mark positions of nucleotides relative to the start point of *araBAD* transcription.

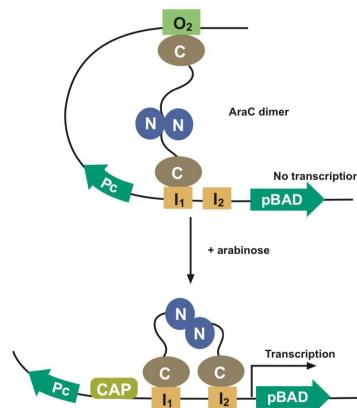


Рис. 66. Первая картинка и дополнение к ней

Здесь сама схема устройства araBAD: По сути, здесь то же самое, что на предыдущей картинке, только ущербно: пересекающиеся и разделенные области araBAD и araC. Начальные точки (стратуем отсюда) и направления транскрипции показаны стрелками. Числа для обозначение положений нуклеотидов относительно начальной точки транскрипции araBAD.

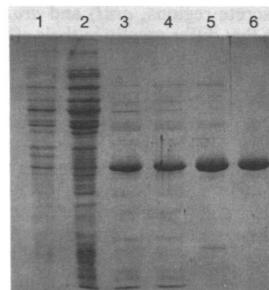


FIG. 2. NaDODSO₄/polyacrylamide gel electrophoresis showing the isolation of AraC from cells harboring the *tac* promoter-*araC* fusion plasmid. Samples were taken from successive steps during the isolation, precipitated with CCl₃COOH and analyzed on a NaDODSO₄/12.5% polyacrylamide gel. The isolation procedure was as described (8). Lanes: 1, whole cells (1/160,000 of the total preparation); 2, crude cell extract (1/80,000 of the total); 3, after phosphocellulose chromatography (1/7,000 of total); 4, after acid precipitation (1/7,000 of total); 5, after fractionation on a Sephadex G-100 column (1/2,250 of total); 6, after hydroxyapatite column chromatography (1/1,720 of total). The last three steps were necessary to remove numerous contaminants that made up about 20% of the total in lane 3.

Рис. 67. Вторая картинка

Электрофорез в геле, показывающий разные стадии отделения araC от клеток. Помещаем смесь разных кусков ДНК в гель, с концов прикладывает постоянный ток, и оно начинает ехать. Чем легче фрагмент, тем больше проедет.

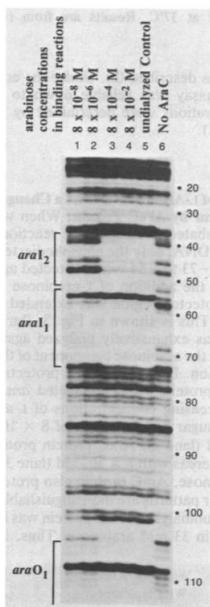


FIG. 3. DNase protection experiment showing the arabinose-dependent protection of *araI2* by AraC. The binding mixtures ($50 \mu\text{l}$) were described (2) and contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 100 mM dithiothreitol, and 90 mM KOAc. The end-labeled DNA fragment was present at 10 nM; AraC protein and L-arabinose were at the concentrations indicated. The mixtures were incubated for 16 min at 25°C and then were treated with DNase I at 0.2–0.3 g/ml for 30 sec. The digestions were stopped by the addition of 12.5 μl of "DNase stop" (3 M NH₄OAc/0.25 M EDTA/0.15 mg of sonicated salmon sperm DNA per ml). The fragments were precipitated twice with ethanol, dissolved in 80% (vol/vol) deionized formamide/10 mM NaOH/1 mM EDTA/0.1% xylene cyanol/0.1% bromophenol blue, heated 1 min at 90°C, and subjected to electrophoresis in 8% polyacrylamide/7 M urea gels. A 250-bp DNA fragment containing *araI2* was 5'-end-labeled at position –208, incubated with AraC protein concentrations of L-arabinose from 80 nM to 800 nM as indicated (lanes 1–4), and challenged with DNase I. Lanes: 1–4, 400 mM dialyzed AraC; 5, 200 nM undialyzed AraC with 33 mM added arabinose and AraC that had not been made sugar-free by extensive dialysis; 6, no AraC. The nucleotide positions indicated by the numbers on the right are negative relative to the transcription initiation site at +1. The bracket marked *araI2* indicates the region showing arabinose-dependent protection.

Рис. 68. Третья картинка

Смотрим на зависящее от наличия арабинозы ограждение *araI2* с использованием *araC*. Метод, который они используют, называется DNase protection assay, он исследует взаимодействия ДНК и белков: есть молекула ДНК, есть всякие ДНКазы, которые её расщепляют в определенном месте, например, где идут буквы ATACAC, или еще какие другие. Таких ферментов много, и каждый имеет вот такую уникальную последовательность, в которой он расщепляет ДНК. Используя разные наборы таких днказ, можно, комбинируя их, установить, где сидит белок. Скобочка с *araI2* определяет изменяющуюся при наличии арабинозы область.

Table 1. Loss of promoter activation in mutant 30-033

Cells	Strain 20-000 (wild type)	Strain 30-033 (<i>araI</i> mutant)
Induced	182	0.04
	173	0.03
Uninduced	0.16	<0.02
	0.14	—

Induced and uninduced cells were grown eight generations in minimal glycerol medium with and without 0.4% L-arabinose, respectively. The cells were harvested at $\approx A_{600} = 1$ and cell-free extracts were prepared and assayed for L-arabinose isomerase activity (8) and their protein concentrations (21). One unit of L-arabinose isomerase activity allows the formation of 1 μmol of L-ribulose per hr at 37°C. Results are from two independent determinations.

Рис. 69. Таблица 1

Индуцированные и нет, обычные и мутировавшие клетки изучали на предмет активации промотора.

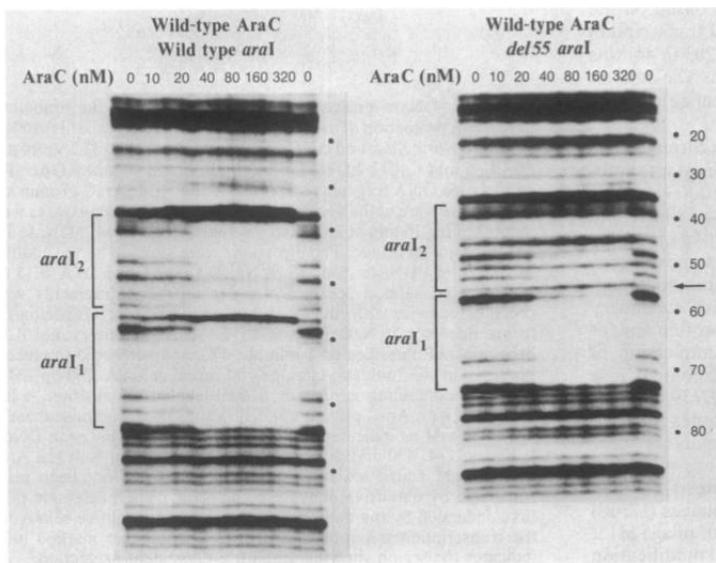


FIG. 4. DNase protection experiment showing the incomplete *araI*₂ protection in the deletion 55 *araI* (mutant 30-033) promoter. The binding mixtures were all 10 nM in DNA and 33 nM in arabinose, with wild-type AraC at the concentrations indicated. The nucleotide positions indicated by the numbers on the right are negative relative to the transcription initiation site at +1. The arrow indicates the position of the deleted base. Note that AraC did not protect the residues at -38, -39, and -40, nor did it cause enhanced cleavages at -35 and -36 of the mutant promoter. The band that appears at -52 in all lanes of wild-type *araI* represents a nick in the DNA fragment, which is observed even in the absence of DNase I treatment. For unknown reasons, the nick was observed only when the fragment was derived from certain plasmids and not from others, such as the one used to produce the fragment in Fig. 2.

Рис. 70. Четвертая картинка

Снова трюки с днказой при делеции 55 *araI* (мутировавшего) промотора. Стрелочкой на -52 на всех немутировавших разрыв в фрагменте ДНК.

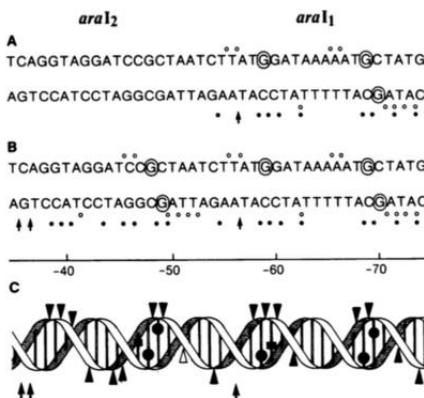


FIG. 5. DNA sequence and topology of the *araI₁* and *araI₂* regions. (A) The *araI₁* region. The positions of phosphate bonds that were protected against DNase I cleavage by ligand-free AraC are indicated by closed circles. The position of enhanced DNase I cleavage is shown by the arrow. (Data from Fig. 3.) An “activation-minus” *araC* mutant described by Brunelle *et al.* showed ethylation interference (open circles) and methylation interference (circled guanines) in the same region (22). (B) The *araI₂* region is downstream of *araI₁* and is protected by wild-type AraC only in the presence of arabinose. Phosphates that were protected against DNase I cleavage by AraC in the presence of arabinose are indicated by closed circles. Positions of enhanced cleavage are shown by arrows. (Data from Fig. 2). Circled guanines were protected against methylation by AraC arabinose complex (2) and showed methylation interference (23). Phosphates showing ethylation interference are indicated by open circles (23). Note the resemblance of the right halves of *araI₁* and *araI₂*. (C) *araI₁* and *araI₂* each correspond to two turns of a DNA duplex. ▲, Positions of protected phosphate bonds; △, position of a DNase I cleavage site not affected by the AraC-arabinose complex; ↑, enhanced cleavage sites; ●, protected guanines; and ■, guanines showing enhanced methylation. The sequences of 11 AraC-binding sites in *E. coli* (2, 7, 24) and *Salmonella typhimurium* (25) are shown below along with a consensus sequence. Sequences: 1, *E. coli* *araI₁*; 2, *E. coli* *araI₂*; 3, *E. coli* *araI₁* (*araE* promoter); 4, *E. coli* *araI₂* (*araE* promoter); 5, *S. typhimurium* *araI₁*; 6, *S. typhimurium* *araI₂*; 7, *E. coli* *araO₁* (-109 to -125); 8, *E. coli* *araO₁* (-130 to -146); 9, *S. typhimurium* *araO₁* (-109 to -125); 10, *S. typhimurium* *araO₁* (-130 to -146); 11, *E. coli* *araO₂* (-267 to -283). Underlined bases agree with the consensus sequence.

1. (-56) TATGGATAAAATGCTA (-72)
 2. (-35) TCAGGTAGGATCCGCTA (-51)
 3. (-57) ATGGATTAAATTGCTG (-73)
 4. (-36) TCAGGTGGAAACAGCA (-52)
 5. (-56) TATGGACAAAATGCTA (-72)
 6. (-35) TCAGGCAGGATCCGCTA (-51)
 7. (-109) TGTGGACTTTCTGCCG (-125)
 8. (-130) TATAGACACTTTGTTA (-146)
 9. (-109) TGTGGACATTCCAGCCA (-125)
 10. (-130) TATAGACACTTCTGTGA (-146)
 11. (-267) TATGGACAATTGGTTTC (-283)
- Consensus: T-GGAC — GCTA

specific guanine residue is contacted within the fourth major groove, and only a single phosphate bordering the fourth major groove showed ethylation interference with AraC protein binding (23). However, our DNase I protection experiments indicated that a fourth turn of the DNA is shielded by AraC protein and that *araI₂* is the same size as *araI₁*.

Рис. 71. Пятая картинка

Последовательность и топология ДНК в областях *araI1* и *araI2*. Положения фосфатных связей, которые были защищены от расщепления ДНКазой безлигандным AraC, показаны темными кружками. В - Фосфаты, которые были защищены от расщепления ДНКазой I с помощью AraC в присутствии арабинозы, обозначены закрашенными кружками. Позиции усиленного расщепления показаны стрелками. Обведенные в кружки гуанины были защищены от метилирования комплексом арабинозы AraC и вмешались в метилирование. Фосфаты, показывающие нарушение этилирования, обозначены светлыми кружками. Обратите внимание на сходство правых половинок *araI1* и *araI2*, каждый соответствует двум виткам дуплекса ДНК.

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.