

2^ο Σεμινάριο: Εικονική κλωνοποίηση γονιδίου και δημιουργία βιβλιοθηκών μεταλλαγμάτων

Γραπτή Εργασία και Παρουσίαση

Εισαγωγή:

1. Κάντε μία σύντομη εισαγωγή για τις υδρολάσες και τον καταλυτικό τους μηχανισμό. Δώστε βάση στο ρόλο των καταλυτικών αμινοξέων (πόσα είναι και που βρίσκονται;). Μήκος περίπου μισή με μία σελίδα, αν θέλετε μπορείτε να προσθέσετε επιπλέον εικόνες για την κατανόηση. Πιθανές πηγές: NCBI, Scopus, proteopedia κτλ.
2. Δώστε ότι πληροφορίες μπορείτε να βρείτε για την αλληλουχία που σας δόθηκε, το accession number στην NCBI ή/και στην UniProt, την αμινοξική αλληλουχία και κάθε πληροφορία που μπορεί να συλλέξατε από UniProt, 3DM, KEGG, protparameters και δημοσιεύσεις (οργανισμός προέλευσης, διαμερισματοποίηση, κατηγοριοποίηση, σύστημα έκφρασης, αριθμός αμινοξέων, αντιδράσεις που καταλύει, θέσεις καταλυτικών αμινοξέων και άλλων σημαντικών θέσεων κ.ά.). Προσοχή στις αλληλουχίες που θα παραδώσετε, η αμινοξική αλληλουχία να ταιριάζει με την αλληλουχία του γονιδίου!

Μοντέλο ομολογίας και αξιολόγηση:

3. Χρησιμοποιείτε το [SWISS-MODEL](#), το [i-TASSER](#) και το [AlphaFold](#) για να δημιουργήσετε τρία μοντέλα ομολογίας. Σχολιάστε την αναφορά και το μήκος του μοντέλου (μοντελοποιήθηκαν όλα τα αμινοξέα;). Στην αναφορά σας δίνει πληροφορίες για καταλυτικά αμινοξέα; Αν ναι, είναι σωστά, σύμφωνα με αυτά που αναφέρατε στην εισαγωγή;
4. Ποια 3D δομή χρησιμοποίησε η κάθε πλατφόρμα για το μοντέλο; Είναι η ίδια με την υποοικογένεια της 3DM; Αν όχι, κάντε μία ανάλυση με BLAST και - αν μπορείτε - εξηγήστε γιατί επιλέχθηκε αυτή η δομή αντί για τη δομή από τη 3DM. Ποια ήταν η ταυτότητα και η ομολογία με τη δική σας αλληλουχία;
5. Κάντε την ανάλυση της δομής μέσω του [MolProbity](#). Χρειάστηκε να κάνετε αναστροφή κάποιων αμινοξέων και αν ναι, ποια; Ποιο από τα μοντέλα είναι καλύτερο και γιατί; Έχετε Ramachandran plot outliers και αν ναι, ποια; Είναι κοντά στα καταλυτικά αμινοξέα; Θα επηρέαζαν την πρόσδεση του υποστρώματος; (Μπορείτε να δώσετε τον πίνακα που δημιουργεί η πλατφόρμα αλλά να τον σχολιάσετε).

Ανάλυση [3DM](#):

6. Ποια είναι η αρίθμηση των καταλυτικών αμινοξέων κατά 3DM και ποια η αρίθμηση στην αμινοξική αλληλουχία; Είναι ίδια με τα αμινοξέα που προβλέφθηκαν από τις πλατφόρμες ως καταλυτικά;
7. Πόσο συντηρημένα είναι αυτά τα αμινοξέα σε όλη την οικογένεια και στην υπο-οικογένεια που ανήκει το ένζυμο σας;
8. Πόσα και ποια είναι τα αμινοξέα (με αρίθμηση αλληλουχίας και 3DM) τα οποία δημιουργούν correlation network με cut-off 0.80, και ποια είναι τα ζεύγη των συσχετισμών; Ποια ζεύγη έχει η

πρωτεΐνη σας και ποιο είναι το πιο συχνό ζεύγος κάθε συσχετισμού; Χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη σας το πιο συχνό ζεύγος ή όχι;

Εικονική κλωνοποίηση:

9. Επιλέξτε τα περιοριστικά ένζυμα που επιλέγετε να χρησιμοποιήσετε, ανάλογα με το στόχο της κλωνοποίησης στο pET28b (αν θέλετε να έχετε C- ή N-τερματικό His-Tag).
10. Κάντε βελτιστοποίηση του γονιδίου για έκφραση σε ξενιστή *E. coli*, αποκλείοντας τις αλληλουχίες αναγνώρισης των δύο περιοριστικών ενζύμων που θα χρησιμοποιήσετε. <http://www.jcat.de>. Είχε το γονίδιο σας κάποια θέση αναγνώρισης που άλλαξε το κωδικόνιο σε κάτι μη βέλτιστο;
11. Σχεδιάστε τους εκκινητές για το πολλαπλασιασμό του γονιδίου και την εισαγωγή των περιοχών αναγνώρισης για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Προσέξτε να έχουν και οι δύο παρόμοια θερμοκρασία τήξης (πάνω από 50°C), στο 3' να έχουν ισχυρά νουκλεοτίδια (1 ή 2 C/G). Ο εκκινητής θα πρέπει να περιέχει 10-15 βάσεις από το γονίδιο, την θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου και 4-5 βάσεις προς το 5' άκρο, ώστε η θέση περιοριστικής πέψης να μην είναι στην άκρη. Ελέγξτε τα στοιχεία των εκκινητών και δείτε αν υπάρχει αυτό-συμπληρωματικότητα. Μην ξεχάσετε να ελέγχετε αν έχετε κωδικόνιο λήξης ή όχι, αναλόγως με το αν θέλετε C-terminal tag ή όχι. Για τον ανάστροφο εκκινητή πρέπει να χρησιμοποιήσετε την συμπληρωματική αλληλουχία από αυτή που θα σχεδιάσετε! Ο έλεγχος μπορεί να γίνει με το συγκεκριμένο εργαλείο: <https://www.biosyn.com/Gizmo/Tools/Oligo/Oligonucleotide%20Properties%20Calculator.htm>
12. Τέλος, αφού παραγγείλατε τους εκκινητές και προχωρήσατε στην στην PCR, θα πρέπει να πάρετε το προϊόν του γονιδίου με τις περιοριστικές θέσεις. Στο γονίδιο από την PCR, αλλά και στο πλασμίδιο θα πρέπει να γίνει περιοριστική πέψη για να δημιουργήσετε κολλοειδή άκρα. Αναφέρετε σε ποιο ρυθμιστικό θα κάνετε την πέψη (και αν χρειάζεται κάποιο πρόσθετο παράγοντα, π.χ. SAM, BSA) και πως θα απενεργοποιούσατε τα δύο ένζυμα (μπορείτε να χρησιμοποιήσετε το εργαλείο <http://nebcloner.neb.com/#!/redigest>). Μετά την πέψη, στο εργαστήριο θα ακολουθούσε μία αντίδραση λιγάσης με το θραύσμα του γονιδίου και του πλασμιδίου με τα συμπληρωματικά κολλοειδή άκρα και σε αυτό το στάδιο θα είχατε το πλασμίδιο σας με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φυσικού τύπου.

Βιβλιοθήκη:

13. Θέλετε να κάνετε μία στοχευμένη βιβλιοθήκη με τρεις συντηρημένες θέσεις που θα επιλέξετε από την 3DM (από το 1 έως το 88). Για κάθε θέση που επιλέξατε θεωρήστε τα αμινοξέα με συχνότητα μεγαλύτερη από 5% ως «επιτρεπτά». Θα πρέπει για κάθε θέση να επιλέξετε το βέλτιστο degenerate κωδικόνιο (μέσω του εργαλείου [CASTER](#)) για να δημιουργήσετε τη βιβλιοθήκη σε κάθε θέση. Το κωδικόνιο θα πρέπει να κωδικοποιεί αν είναι δυνατόν όλα τα «επιτρεπτά», και όσο το δυνατόν λιγότερα «μη επιτρεπτά» αμινοξέα, ώστε να μειωθεί το μέγεθος της βιβλιοθήκης. Θα πρέπει να αναφέρετε τη στρατηγική του πως επελέγησαν τα κωδικόνια, και το μέγεθος της βιβλιοθήκης για την ταυτόχρονη μετάλλαξη των τριών θέσεων με 95% κάλυψη. Τέλος, θα πρέπει να γίνει σύγκριση της βιβλιοθήκης που επιλέξατε με αντίστοιχη

συνδυαστική βιβλιοθήκη NNK και NDT, όσον αφορά το μέγεθος της βιβλιοθήκης, αλλά και τα αμινοξέα που καλύπτονται.

Πέραν του πρωτοκόλλου (~15 σελίδες), θα πρέπει να προωθήσετε τα εξής αρχεία:

- Δύο αρχεία fasta, ένα με την αμινοξική αλληλουχία και ένα με την αλληλουχία DNA.
- Το αρχείο του μοντέλου που επιλέξατε να δουλέψετε, με την εξής παρουσίαση: cartoon, σε γκρι χρώμα, με μόνο τις πλευρικές ομάδες των εξής αμινοξέων εμφανισμένες ως sticks και τα εξής χρώματα (αφού αρχικά έχει επιλεγεί elemental colouring): καταλυτικά αμινοξέα πράσινα, τα αμινοξέα του correlation network με μπλε, τα Ramachandran outliers κόκκινα, τα αμινοξέα της βιβλιοθήκης ως κίτρινα. (σε περίπτωση αμινοξέων σε παραπάνω από μία ομάδες, επιλέξτε ένα χρώμα, αλλά σημειώστε το στην αναφορά ότι ανήκουν και σε άλλη/άλλες ομάδες).

Παρακαλώ στείλτε μου για το αρχείο μου τα παρακάτω στοιχεία.

Ομάδα	Αλληλουχία	Υπο-οικογένεια	Θέσεις μετάλλαξης	His-Tag
Φιωτάκη - Ρακοπούλου				N-
Πολέντα – Παππά				C-
Συγγελάκη– Κοσιδεκάκης				C-
Κουτσογιάννη - Σουροπάνη				N-

Καλή επιτυχία!

Είμαι στη διάθεση σας για οποιαδήποτε διευκρίνηση!

Πιθανή παρουσίαση **XX** Μάη.