

Alternativni genetički kod

Lukić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:208620>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Kristina Lukić

Alternativni genetički kod

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Kristina Lukić

Alternative genetic code

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad izrađen je u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Nenada Malenice.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Alternativni genetički kod

Kristina Lukić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Standardni genetički kod čini gotovo univerzalan set pravila kojim se nukleotidna sekvenca prevodi u 20 prirodnih aminokiselina koje grade proteine. Međutim, u prirodi postoji velik broj aminokiselina koje nisu proteinogene i koje bi, ukoliko se pronade način njihove ugradnje, proteinima mogle dati brojna nova svojstva i funkcije. Napredak u znanosti i razvoj sintetske biologije i ksenobiologije omogućio je „rekodiranje“ i razvoj polusintetskih i sintetskih organizama s izmijenjenim, tzv. alternativnim genetičkim kodom. Znanstvenici su pri tome koristili različite metode i modele poput supresorskih tRNA, sintetskih parova baza, kvadripleta umjesto tripleta nukleotida, mutiranih ribosoma itd. Danas se većina ovakvih istraživanja bavi time kako proširenje genetičkog koda i proteini s novim svojstvima utječu na procese poput transkripcije, translacije i post-transkripcijske modifikacije proteina te potencijalnoj primjeni takvih organizama u genetičkom inženjerstvu, biotehnologiji i medicini. U ovom završnom radu prikazan je kratak pregled metoda koje su znanstvenici koristili kod proširenja genetičkog koda, opisani organizmi koji su dosad rekodirani i njihova potencijalna primjena u znanosti i biotehnologiji.

Ključne riječi: proširenje genetičkog koda, sintetski organizam, aminokiseline, sintetska biologija. protein, rekodiranje

(31 stranica, 12 slika, 0 tablica, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Alternative genetic code

Kristina Lukić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The standard genetic code forms a nearly universal set of rules that translate the nucleotide sequence into the 20 naturally occurring amino acids that build proteins. However, in nature, there is a large number of amino acids that are not proteinogenic, and, if a way of incorporating them is found, it could give proteins numerous new characteristics and functions. Advances in science and the development of synthetic biology and xenobiology enabled the "recoding" and development of semi-synthetic and synthetic organisms with altered or alternative genetic code. For that scientists have used various methods and models such as suppressor tRNAs, synthetic base pairs, quadruplets instead of nucleotide triplets, mutated ribosomes, etc. Today, most research is based on how the expansion of the genetic code and proteins with new properties affect processes such as transcription, translation, and post-transcriptional modifications of proteins and the potential application of such organisms in genetic engineering, biotechnology, and medicine. This bachelor thesis presents a brief overview of the methods used by scientists to expand the genetic code, description of the organisms that have been recoded so far, and their potential application in science and biotechnology.

Keywords: genetic code expansion, synthetic organism, amino acids, synthetic biology, protein, recoding

(31 pages, 12 figures, 0 tables, 75 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Proširenje genetičkog koda – pristupi	5
2.1. Supresija stop kodona.....	5
2.2. Upotreba kvadripleta umjesto tripleta	8
2.3. Preraspodjela <i>sense</i> kodona.....	10
2.4. Dodavanje novih parova baza	11
3. Polusintetski i sintetski organizmi	14
3.1. Prokariotski organizmi	14
3.2. Jednostanični eukariotski organizmi	14
3.3. Višestanični eukariotski organizmi	16
4. Utjecaj na ekspresiju proteina	17
4.1. Transkripcija.....	17
4.2. Translacija	18
4.3. Posttranslacijske modifikacije	18
5. Primjena i budućnost istraživanja	20
5.1. Molekularne metode.....	20
5.2. Medicina i nove terapije	21
5.3. Biotehnologija i budućnost.....	23
6. Literatura	25
7. Životopis.....	31

Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

mRNA – glasnička RNA (eng. *messenger RNA*)

tRNA – transportna RNA (eng. *transfer RNA*)

rRNA – ribosomska RNA (eng. *ribosomal RNA*)

A – adenin

T – timidin

G – gvanin

C – citozin

GTP – gvanozin trifosfat

IPTG - izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid

aaRS – aminoacil-tRNA-sintetaza

ncAA – nekanonske aminokiseline (eng. *noncanonical amino acids*)

SerRS – seril-tRNA sintetaza

Sec-tRNA^{Sec} – selenocisteinil-tRNA

TyrRS/tRNA^{Tyr} – ortogonalni par tirozil-tRNA sintetaze i tirozin-tRNA

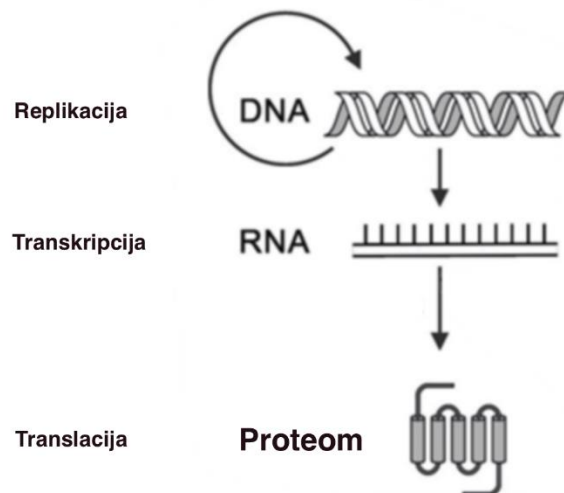
PylRS/tRNA^{CUA} – ortogonalni par pirolizil-tRNA sintetaze i supresorske tRNA

EcTyrRS/tRNA^{CUA} – ortogonalni par tirozil-tRNA sintetaze i supresorske tRNA iz *E. coli*

PylRS/tRNA^{Pyl} – ortogonalni par pirolizil-tRNA sintetaze i pirolizin-tRNA

1. Uvod

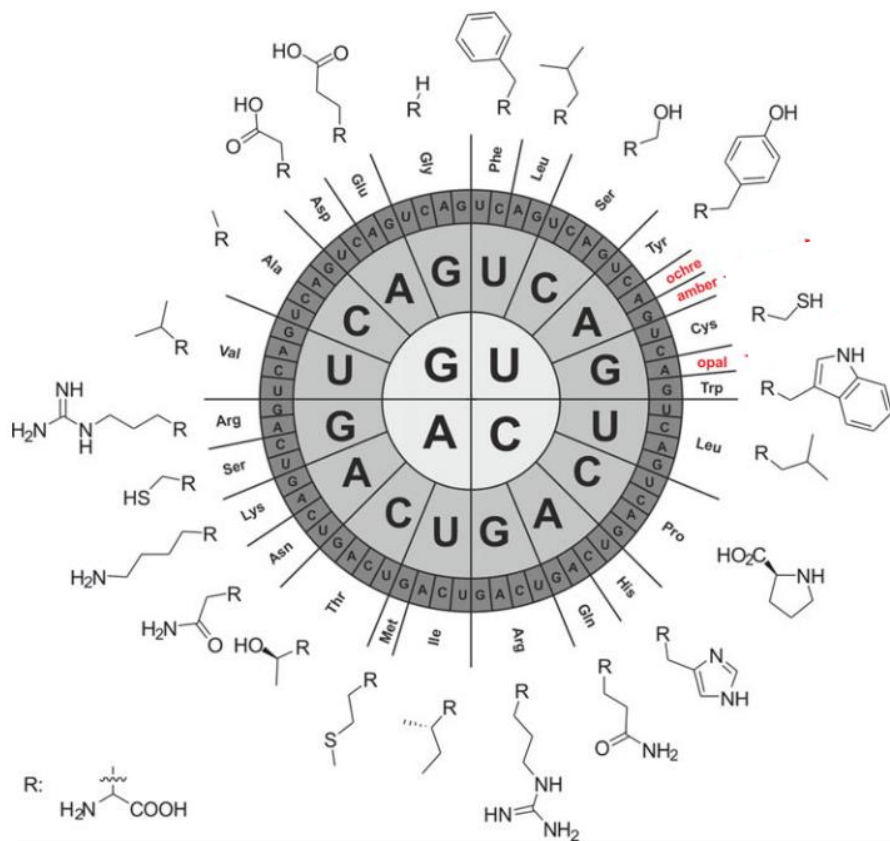
Standardni genetički kod definira kako se slijed nukleotida zapisan unutar molekule DNA prevodi u slijed aminokiselina koje izgrađuju proteine. Konačno dešifriranje genetičkog koda u 1960-ima (Nirenberg, 2004.) postalo je jedno od temeljnih otkrića molekularne biologije nakon što je otkrivena struktura DNA i potvrdilo je dotadašnju „dogmu“ molekularne biologije koju je postavio Francis Crick (Crick, 1970.). Prema centralnoj dogmi koja je shematski prikazana na Slici 1., molekulu DNA čine razni sljedovi četiri prirodno dostupna nukleotida – adenina, gvanina, timina i citozina. Određeni dijelovi tih nizova predstavljaju veće jedinice – gene. Većina se gena prepisuje tijekom procesa transkripcije te nastaje glasnička molekula mRNA koja sadrži slijed dušičnih baza istovjetan kodirajućem ili *sense* lancu DNA, uz zamjenu timina uracilom, a komplementaran kalupu ili *antisense* lancu s kojeg se prepisuje. Tijekom procesa translacije informacija zapisana u molekuli mRNA se u obliku tripleta ili kodona, slijeda od tri dušične baze, uz pomoć ribosoma i molekula tRNA prevodi u aminokiselinski slijed. Ovdje podjedinice ribosoma omogućavaju prepoznavanje kodona na mRNA i antikodona na tRNA, dok su molekule tRNA pri tome „natovarene“ specifičnom aminokiselinom pomoću enzima aminoacil-tRNA-sintetaze i tu aminokiselinu prenose na rastući polipeptidni lanac.



Slika 1. Shematski prikaz centralne dogme molekularne biologije koju je predstavio Francis Crick. Molekula DNA čini nasljednu informaciju živih organizama i može se replicirati, čime se umnaža, ili

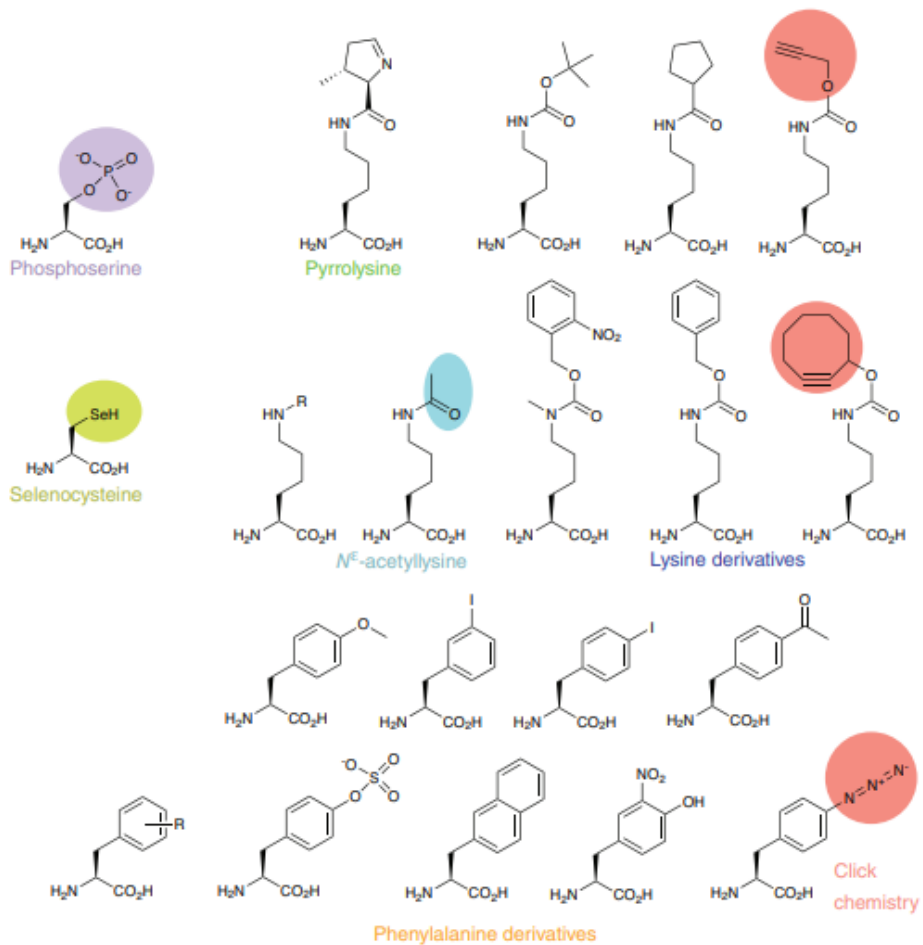
transkribirati, čime se njezini pojedini dijelovi prepisuju u komplementaran slijed mRNA i dalje prevode u proteine procesom translacije. (Preuzeto i prilagođeno: Acevedo-Rocha i Budisa, 2016.)

Genetički kod strukturiran je tako da postoje 64 kombinacije tripleta RNA ili kodona, od kojih su tri tzv. „stop“ kodoni (ochre, amber i opal) koji terminiraju sintezu proteina i preostali 61 kodon koji odgovaraju jednoj od 20 proteinogenih aminokiselina. Pojedine aminokiseline kodirane su s više kodona što rezultira degeneriranošću genetičkog koda, odnosno osigurava otpornost koda na tranzicijske mutacije (Crick, 1968.). Sve 64 prirodno dostupne kombinacije kodona s pripadajućim aminokiselinama prikazane su na Slici 2. Međutim, osim 20 standardnih (proteinogenih) aminokiselina, u prirodi postoji velik broj drugih aminokiselina koje se ne mogu ugraditi u proteine živih organizama standardnim putem.



Slika 2. Radijalni prikaz strukture genetičkog koda. Prikazani su kodoni i pripadajuće aminokiseline koje kodiraju, uključujući i stop kodone (ochre, amber i opal). Prva pozicija u kodonu (središnji krug) predstavlja 5'-kraj kodona na mRNA, a treća pozicija (vanjski krug) 3'-kraj kodona. (Preuzeto i prilagođeno: Oehm, 2016.).

Pitanje zašto je u proteine moguća ugradnja samo 20 aminokiselina kada ih u prirodi postoji mnogo veći broj, oduvijek je fasciniralo znanstvenike. Prirodno dostupne aminokiseline predstavljaju građevne blokove koji sadrže ograničen broj funkcionalnih skupina, a za obavljanje svojih prirodnih funkcija, proteinima su potrebne dodatne kemijske skupine koje su im osigurane posttranslacijskim modifikacijama poput fosforilacije i metilacije ili kofaktorima poput raznih anorganskih ili organskih molekula (Wang, 2005.). Ubrzo nakon što je genetički kod u potpunosti dešifriran, započela su istraživanja kojima se nastojalo proširiti genetički kod i omogućiti ugradnju i ostalih, tzv. nekanonskih aminokiselina u postojeći translacijski sustav stanice. Ključno otkriće koje je potaknulo razvoj ove grane biologije jest pronalazak primjera „prirodnog“ proširenja genetičkog koda (Wang, 2003.). U nekih je bakterija i metanogenih arheja uočena ugradnja dviju dodatnih aminokiselina – selenocisteina i pirolizina, koje se prema tome smatraju 21. i 22. aminokiselinom (Yuan i sur., 2010.). Kod takvih je organizama uočena strategija u kojoj se koriste prirodne molekule tRNA aminoacilirane selenocisteinom ili pirolizinom uz pomoć specifičnih aminoacil-tRNA-sintetaza i koje zatim prepoznaju stop-kodone i umjesto terminacije translacije ugrađuju neproteinogenu aminokiselinu u rastući polipeptidni slijed (Rother i Krzycki, 2010.). Neke od aminokiselina koje su dosad uspješno ugrađene u proteine *in vitro* prikazane su na Slici 3. Uglavnom je riječ o derivatima aminokiselina lizina i fenilalanina s manjim funkcionalnim skupinama.



Slika 3. Različite skupine nekanonskih aminokiselina pomoću kojih je dosad proširen genetički kod. Većina ncAA su derivati lizina i fenilalanina nastale sintetski dodavanjem različitih funkcionalnih skupina. (Preuzeto i prilagođeno: O'Donoghue i sur., 2013.)

Razvoj metoda za sustavno proširenje genetičkog koda živih organizama omogućio bi ugradnju nekanonskih aminokiselina koje bi proteinima pružile brojne nove funkcije i potaknule njihovu evoluciju. Takvi modificirani proteini mogli bi potencijalno imati ulogu u genetičkom inženjerstvu, biotehnologiji i medicini i brojnim drugim granama znanosti i omogućiti razvoj potpuno novih organizama s novim i proširenim funkcijama.

2. Proširenje genetičkog koda – pristupi

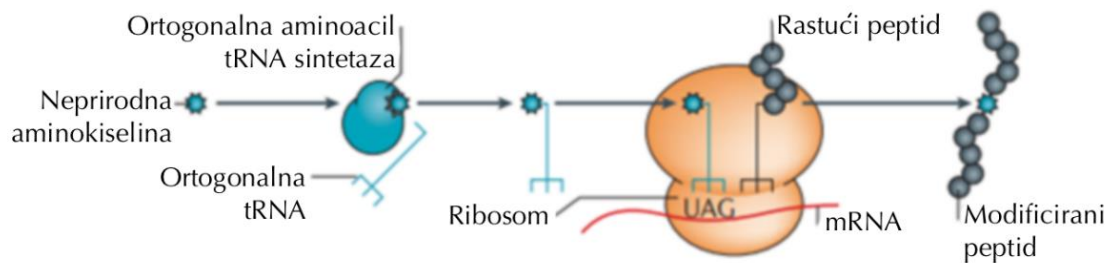
2.1. Supresija stop kodona

Kako je i spomenuto u uvodu, ključno otkriće koje je omogućilo razvoj metoda za proširenje genetičkog koda jest ugradnja selenocisteina i pirolizina supresijom stop kodona u bakterija i metanogenih arheja. Osim u prokariotima, prirodni načini proširenja genetičkog koda koji koriste istu strategiju pronađeni su i kod eukariotskih organizama, među prvima kod duhana i *Drosophila* (Beier i Grimm, 2001.).

Prirodno postoje tri stop kodona - UAG, UAA i UGA poznati i pod nazivima ochre, amber i opal, i njihova pojava u slijedu mRNA signalizira zaustavljanje translacije proteina. Jedan od najčešćih načina terminacije jest vezanje faktora otpuštanja proteina (eng. release factors, RF) za akceptorsko ili A-mjesto na ribosomu i oslobađanje novonastalog polipeptidnog lanca. Kod organizama koji imaju sposobnost suprimirati stop kodone i time i translaciju proteina, prisutne su tzv. supresorske molekule tRNA koje na mjestu svog antikodona sadrže triplet koji je komplementaran jednom od stop kodona. Osim specifičnih tRNA, takvi organizmi posjeduju i posebne enzime aminoacil-tRNA-sintetaze koje prepoznaju molekule tRNA i aminoaciliraju ih određenom aminokiselinom koja se zatim ugrađuje u protein na mjesto gdje se nalazi stop kodon. Dakle, dolazi do čitanja stop kodona kao *sense* kodona na prirodan način pomoću supresora koji su prisutni u stanici (Albers i sur., 2021.).

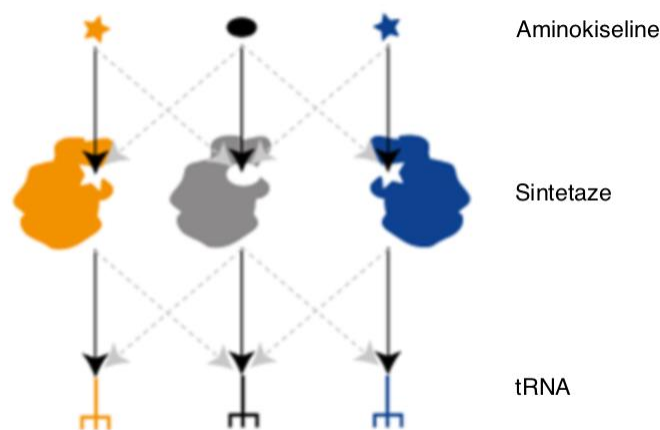
Upravo se na takav način odvija ugradnja selenocisteina u *E. coli*. Selenocistein se ugrađuje u protein umjesto terminacije translacije UGA stop kodonom ukoliko se nizvodno od njega, u sekvenci mRNA, nalazi selenocistein insercijska sekvenca (eng. selenocysteine insertion sequence, SECIS) koja stvara sekundarnu strukturu. Prije toga specifična aminoacil-tRNA-sintetaza, SerRS, aminoacilira tRNA^{Sec} serinom koji uz pomoć proteina Sela (Sec sintaze) i selenofosfata kao donora selena prelazi u selenocistein. Takva se Sec-tRNA^{Sec} dostavlja do ribosoma pomoću specijaliziranog faktora elongacije, SelB, GTP-vezujućeg proteina koji pripada obitelji translacijskih GTPaza, i nakon prepoznavanja UGA kodona ugrađuje selenocistein u rastući polipeptid (Copeland, 2003.).

Jednaku su strategiju koja je prikazana na Slici 4. znanstvenici upotrijebili za ugradnju bilo koje druge aminokiseline u proteine. No, pri tome su morali razriješiti dva problema – aminoacil-tRNA sintetaza i njezina pripadajuća tRNA iz jednog organizma morale su se klonirati i eksprimirati u drugom organizmu i ista ta aminoacil-tRNA-sintetaza morala je biti sposobna vezati se na faktor elongacije Tu (EF-Tu) koji omogućuje vezanje aminoacil-tRNA na ribosom i morala je biti sposobna reagirati s ribosomskim reakcijskim centarom (Chemla i sur., 2018.).



Slika 4. Shema generalne metode za ugradnju neproteinogenih aminokiselina u proteine supresijom stop kodona. AaRS aminoacilira tRNA koja prepoznaje stop kodon nekanonskom aminokiselinom. Na mjesto gdje se nalazi stop kodon dolazi do ugradnje nekanonske aminokiseline čime nastaje modificirani protein. (Preuzeto i prilagođeno: Davis i Chin, 2012.)

Pri tome je ključno da tRNA i aaRS koje se ugrađuju u drugi organizam tvore tzv. ortogonalni par, tj. ne bi smjele interferirati niti s jednim endogenim parom aaRS/tRNA. Ortogonalna aaRS ne može aminoacilirati niti jednu tRNA u stanicama domaćina osim pripadne ortogonalne tRNA čime se sprječava vezanje nestandardne aminokiseline na pogrešnu tRNA. S druge strane, ortogonalnu tRNA ne može aminoacilirati niti jedna aaRS domaćina osim pripadne ortogonalne aaRS čime se sprječava aminoaciliranje standardne aminokiseline na ortogonalnu tRNA. Primjer kako ortogonalnost tRNA i aaRS treba izgledati prikazan je na Slici 5.

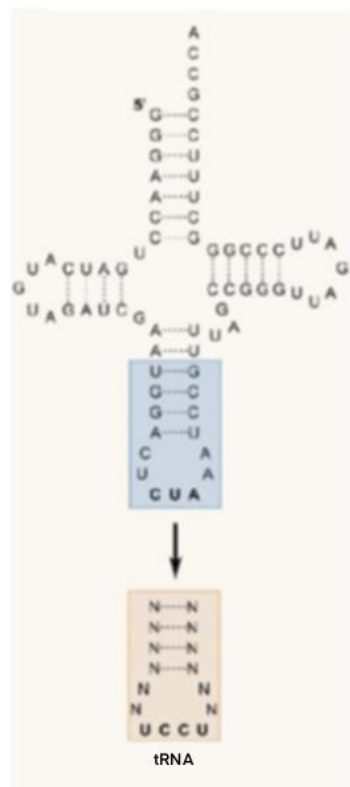


Slika 5. Ortogonalni par tRNA i aminoacil-tRNA-sintetaze. Ortogonalna tRNA ne može biti aminoacilirana nijednom aaRS osim pripadne ortogonalne aaRS. Ortogonalna aaRS ne može aminoacilirati niti jednu tRNA osim pripadne ortogonalne tRNA. (Preuzeto i prilagođeno: Wang i sur., 2012.)

Tek nakon što su ti uvjeti zadovoljeni i nakon što je gen proteina od interesa mutiran tako da sadrži stop kodon unutar kodirajuće sekvence, neproteinogena aminokiselina može se ugraditi na željeno mjesto. Sve što je potrebno su jedinstveni, ortogonalni par tRNA/aminoacil-tRNA sintetaze, izvor neproteinogene aminokiseline i jedinstveni kodon koji specificira tu aminokiselinu. Znanstvenici su tom strategijom uspješno rekodirali nekanonske aminokiseline u *E. coli* i kvascu koristeći UAG stop kodon i ortogonalne tRNA/sintetazne parove pronađene u *Methanococcus jannaschii* ili *Escherichiji coli* (Anderson i sur., 2004.). Tijekom translacije, native aaRS aminoaciliraju native tRNA koje u protein ugrađuju standardne aminokiseline. Kada na red dođe stop kodon, ortogonalna tRNA prethodno aminoacilirana nekanonskom aminokiselinom uz pomoć ortogonalne aaRS, kompetira za vezno mjesto s faktorima za terminaciju translacije i ukoliko dođe do njezinog vezanja, u rastući se polipeptidni lanac ugrađuje nova aminokiselina. Ekspresija takvih modificiranih proteina je obično slaba upravo zbog kompeticije ortogonalne tRNA s drugim faktorima zbog čega su znanstvenici odlučili istražiti i druge načine proširenja genetičkog koda (Chemla i sur., 2018.).

2.2. Upotreba kvadripleta umjesto tripleta

Frameshift mutacije ili mutacije pomaka okvira čitanja često uzorkovane delecijama i insercijama predstavljaju velik problem prilikom translacije proteina. Dodatak ili gubitak jednog ili dva nukleotida pomiče okvir čitanja i kao rezultat ne nastaje očekivani protein, nego slijed s izmijenjenim aminokiselinama ili preuranjeno terminirani kraći slijed nastao uvođenjem stop kodona. U prirodi je pronađena strategija kojom organizmi zaobilaze frameshift mutacije i upravo je ona poslužila kao inspiracija za novu metodu proširenja genetičkog koda. Molekule tRNA koje umjesto tripleta prepoznaju kvadriplet i na mjestu antikodona nose proširene antikodonske petlje od četiri nukleotida prvi su put pronađene u *Salmonelli typhimurium* gdje djeluju kao supresori +1 pomaka okvira čitanja, a kasnije su iste identificirane i u *E. coli* i *S. cerevisiae* (Wang, 2012.). Izgled tRNA koja djeluje kao supresor četverostrukog kodona prikazan je na Slici 6.

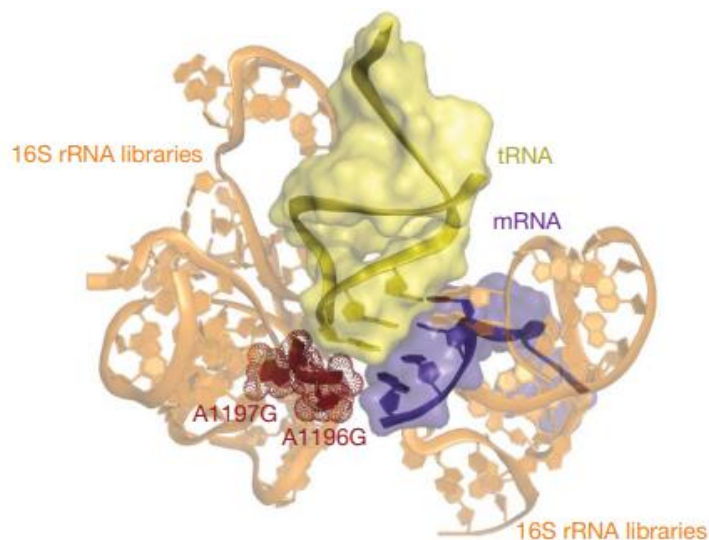


Slika 6. tRNA koja djeluje kao supresor frameshift mutacije i umjesto tripleta prepoznaje kvadriplet. (Preuzeto i prilagođeno: Tharp i sur., 2017.)

S obzirom da se proširenje genetičkog koda supresijom stop kodona pokazalo kao nedovoljno efikasno i potencijal ekspanzije sintetskog genetičkog koda općenito nema visoku učinkovitost jer se najčešće u organizam može ugraditi jedna do dvije vrste neproteinogenih aminokiselina u isto vrijeme, znanstvenici su razvili strategiju koja se temelji na prepoznavanju četiri umjesto tri kodona i koja bi mogla povećati broj dostupnih *sense* kodona s prirodno dostupnih 64 na čak 250 kodona (Chen i Schindlinger, 2010.).

Iako točan mehanizam prepoznavanja kvadripleta na mRNA i kvadripleta na tRNA nije u potpunosti razjašnjen, jedan od predloženih modela jest da tRNA ostvaruje interakcije tripletom na A mjestu u ribosomu, a dodatni kodon zatim uzrokuje proklizavanje mRNA za jednu bazu (Qian i sur. 1998.). Ostatak strategije vrlo je sličan supresiji stop kodona – organizam mora posjedovati jedinstvenu tRNA koja će prepoznavati kvadriplet na mRNA i jedinstvenu aminoacil-tRNA sintetazu koja će tu istu tRNA aminoacilirati određenom aminokiselinom, međutim ta tRNA u ovom slučaju neće prepoznavati stop kodon, već slijed od četiri nukleotida.

Problem kod ovakvog načina proširenja genetičkog koda jest što su prirodni ribosomi vrlo neučinkoviti za čitanje kvadripletnog kodona i vrlo često uzrokuju pogreške u dekodiranju. Kako bi razriješili taj problem, znanstvenici su dizajnirali tzv. ortogonalne ribosome (Chen i sur., 2010.). Ortogonalni ribosomi su mutirani ribosomi koji prepoznaju izmijenjeno mjesto vezanja ribosoma (RBS) i omogućuju translaciju samo mRNA koje sadrže promijenjeni RBS (Rackham i Chin, 2005.). Nekoliko takvih ribosoma dizajnirano je za potrebe istraživanja proširenja genetičkog koda. Jedan od njih je ribo-X, ribosom izmijenjen tako da smanjuje učestalost prijevremenog završetka translacije čime je supresija stop kodona i ugradnja neproteinogenih aminokiselina na izmijenjenim mRNA povećana, dok nativni ribosomi održavaju redovitu razinu supresije i ekspresije ostalih proteina (Wang i sur., 2007.). Drugi takav ribosom, ribo-Q, čija je trodimenzionalna struktura prikazana na Slici 7., izmijenjen je tako da prevodi kvadripletne kodone sličnom učinkovitošću kao i tripletne onih mRNA koje prepoznaje kao mutirane (Neumann i sur., 2010.). Iako su ortogonalni ribosomi povećali učinkovitost proširenja genetičkog koda supresijom stop kodona i korištenjem kvadripletnih kodona, još uvijek je ostao problem njihove ugradnje u organizme i sinteze mutiranih mRNA koje oni prepoznaju.



Slika 7. Trodimenzionalna struktura ribo-Q. Ortogonalni ribosom s mutacijom u A mjestu 16S rRNA koja mu omogućava da značajno poboljšava dekodiranje četverostrukih kodona. (Preuzeto i prilagođeno: Neumann i sur., 2010.).

2.3. Preraspodjela *sense* kodona

Većina aminokiselina u standardnom genetičkom kodu kodirana je s više kodona što znači da za svaku prirodnu aminokiselinu postoji barem jedna aminoacil-tRNA-sintetaza i barem jedna tRNA pomoću koje se ugrađuje u protein (Ibba i Söll, 2000.). Znanstvenici su, međutim, pokazali kako broj gena koji kodiraju molekule tRNA premašuje ne samo taj broj, već i ukupni broj standardnih kodona. U *E. coli* pronađeno je 86 gena, u čovjeka 497, a u *C. elegans* čak 584 gena koji kodiraju za tRNA (Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics, 2008.). Većina tih gena kodira izoakceptorske tRNA, molekule tRNA koje su specifične za istu aminokiselinu ali imaju različit antikodon ili se razlikuju u strukturi (Goodenbour i Pan, 2006.). Upravo su to svojstvo znanstvenici iskoristili za razvoj nove strategije proširenja genetičkog koda – umjesto da uvode nove kodone supresijom stop kodona ili korištenjem kvadripletnih kodona, iskorištavaju se endogene tRNA i aminoacil-tRNA-sintetaze na način da se reprogramiraju tako da prepoznaju, osim prirodnih aminokiselina, i neproteinogene aminokiseline (Acevedo-Rocha i Budisa, 2016.).

Prednost ove strategije je to što nema potrebe za uvođenjem novih parova tRNA i aminoacil-tRNA-sintetaza, već dolazi do preraspodjele *sense* kodona koji su već prisutni unutar stanice, odnosno organizma, tako da dio njih prepoznaje neproteinogene aminokiseline. U jednom od takvih eksperimenata, arginin koji može biti kodiran s čak šest kodona – CGU, CGC, CGA, CGG, AGA i AGG, izmijenjen je tako da jedan od njegovih rijetkih kodona, AGG, kodira za L-homoarginin (hArg) i L-N6-(1-iminoetil)lizin (Mukai i sur., 2015.). Pri tome je funkcija ciljnog kodona najprije ukinuta deaktiviranjem njegovih translacijskih faktora, a zatim mu je pridružena nova funkcija tako da sada na mjesto istog kodona specifično ugrađuje ncAA umjesto native aminokiseline (Lajoie i sur., 2016.).

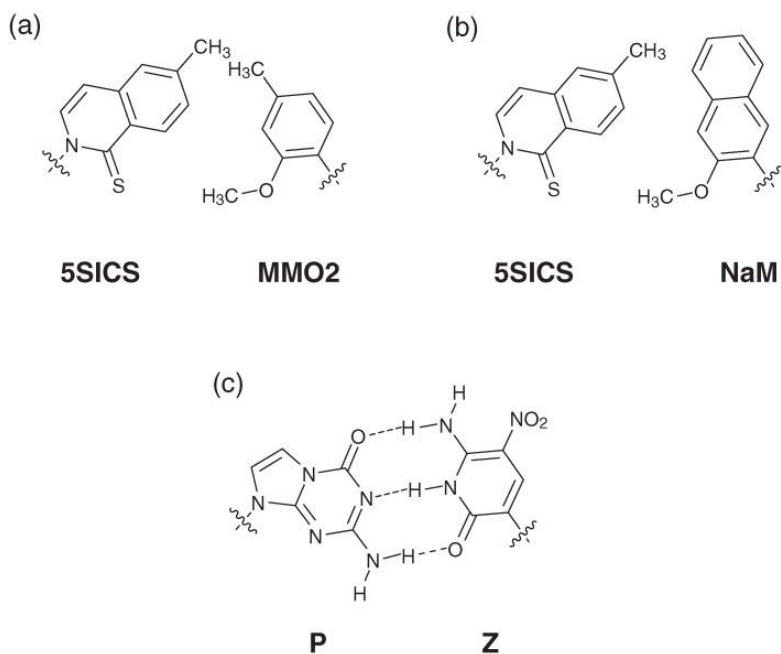
I ovaj je način proširenja genetičkog koda naišao na problem u vidu fenomena zvanog *codon usage bias*. Riječ je o tome da se specifični kodoni koriste češće odnosno rjeđe od drugih sinonimnih kodona tijekom prevođenja gena, što varira unutar i među vrstama (Behura i Severson, 2013.). To znači da iako postoji velik broj molekula tRNA koje su specifične za istu aminokiselinu i mogu se reprogramirati tako da dio njih prepoznaje nekanonske aminokiseline, broj njihovih kopija i efikasnost ugradnje će biti manja od očekivanog.

2.4. Dodavanje novih parova baza

Sve dosadašnje metode proširenja genetičkog koda temeljile su se na manipulaciji parovima tRNA/aaRS i dodavanju novih ili iskorištavanju starih kodona. Metoda koja je temelj mlade biološke discipline, sintetske biologije, koja je tek u začetku razvoja, jest osmišljavanje sintetskih parova nukleotida koji će se moći ugraditi u molekulu DNA. Dodavanje samo jednog dodatnog sintetskog para nukleotida onome prirodnom koji se sastoji od parova G-C i A-T, može proširiti mogućnosti ugradnje s 20 na čak 216 aminokiselina (Blažej i sur., 2020.).

Neki od najpoznatijih primjera sintetskih parova nukleotida koji se često označavaju kao X-Y ili Z-P i koji su uspješno ugrađeni i iskorišteni za proširenje genetičkog koda prikazani su na Slici 8. Ono što je ključno prilikom dizajna takvih sintetskih parova nukleotida jest da ne stvaraju povoljne interakcije s drugim parovima baza, da su stabilizirani unutar strukture DNA

interakcijama slaganja i da odgovaraju geometriji replikacijske i transkripcijske mašinerije. Međusobno povezivanje većine neprirodnih nukleotida temelji se na hidrofobnim interakcijama i vodikovim vezama koje se razlikuju od onih u Watson-Crickovom sparivanju (Georgiadis i sur., 2015.) ili se temelje samo na steričkoj komplementarnosti (Zhang i sur., 2015.).

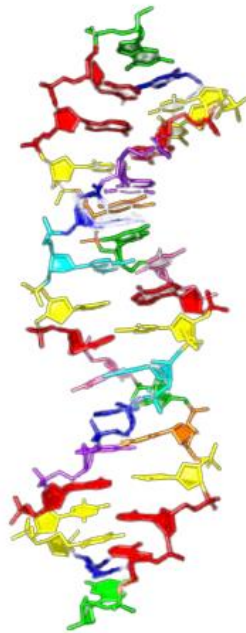


Slika 8. Primjeri sintetskih parova baza koji su dosad uspješno iskorišteni za proširenje genetičkog koda. (Preuzeto i prilagođeno: Hirao i Kimoto, 2012.)

Kako bi došlo do uspješnog proširenja genetičkog koda ugradnjom novog para baza *in vivo*, ključno je da analozi nukleotida učinkovito ulaze u stanice i da ih DNA i RNA polimeraze mogu prepoznati i ugraditi u nukleotidni slijed. U jednom od nedavnih eksperimenata prvi je put razvijen polusintetski organizam sposoban koristiti genetički kod od šest slova za repliciranje vlastitog genoma i sintezu proteina s neproteinogenim aminokiselinama (Fischer i sur., 2020.). Fischer i suradnici uspješni su demonstrirati uspješnu *in vivo* ugradnju dviju nekanonskih aminokiselina s 9 novih kodona čime su genetički kod *E. coli* uspješni proširiti s prirodnih 64 na 73 kodona.

Osim proširenja genetičkog koda na šest slova, zabilježeno je i proširenje na osam slova gdje su korištena dva para neprirodnih nukleotida. Takve su sekvence nazvane Hachimoji DNA, što na japanskom znači osam slova, i dokazano je kako se takve sekvence mogu prepisivati pomoću

varijante T7 RNA polimeraze *in vitro* (Hoshika i sur., 2020.). Struktura Hachimoji DNA prikazana je na Slici 9. i iako kompatibilnost neprirodnih nukleotida koji ju grade još uvijek nije dokazana *in vivo*, Hachimoji DNA mogla bi imati potencijalnu primjenu u dijagnostici bolesti i terapiji, u pohrani molekularnih informacija, barkodiranju, nanostrukturama i naravno, u dramatičnom proširenju genetičkog koda i izgradnji proteina s dodatnim aminokiselinama (Jordan, 2019.).



Slika 9. Kristalna struktura Hachimoji dvostruke uzvojnice izgrađene od četiri prirodne baze, G (zelena), A (crvena), C (plava), T (žuta) i četiri sintetske baze, B (cijan), S (ružičasta), P (ljubičasta) i Z (narančasta). (Preuzeto i prilagođeno: NASA. <https://www.nasa.gov/press-release/nasa-funded-research-creates-dna-like-molecule-to-aid-search-for-alien-life>)

Iako je proširenje genetičkog koda uspješno demonstrirano *in vivo*, postoji još mnogo nepoznanica u tome kako neprirodni nukleotidi djeluju na ugradnju novih aminokiselina. Mnoge prirodne polimeraze mogu prihvatiti komponente neprirodnih genetskih sustava, no uz povećanu stopu mutacija i grešaka i smanjenu učinkovitost (Yang, 2011.).

3. Polusintetski i sintetski organizmi

3.1. Prokariotski organizmi

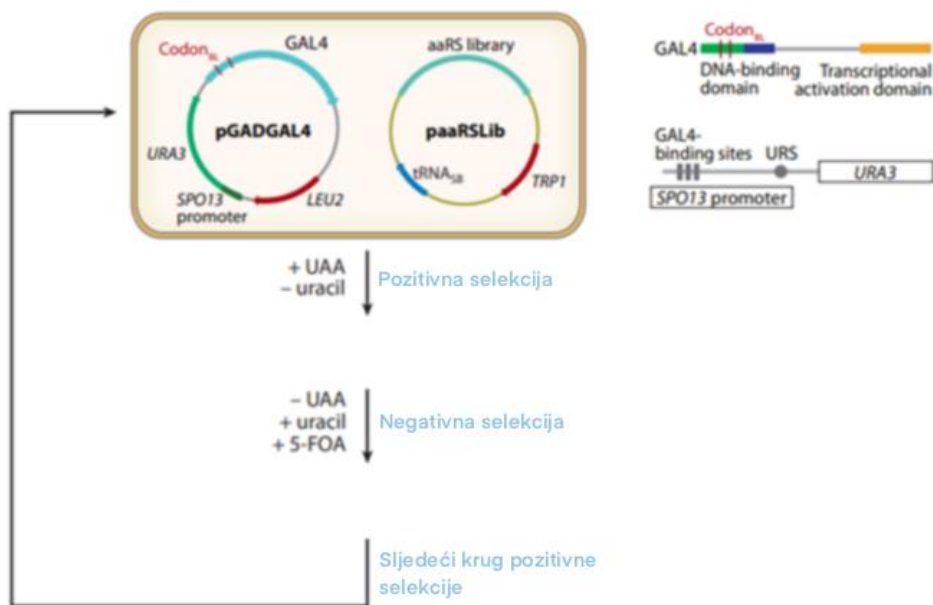
Svi prvotni eksperimenti proširenja genetičkog koda bili su rađeni upravo na onim bakterijama i arhejama u kojima su pronađeni prirodni načini proširenja koda. Međutim, otkrivanjem ortogonalnih parova i sve složenijim eksperimentima, kao idealan model nametnula se *Escherichia coli*. Svi eksperimenti koji su spomenuti u prijašnjem poglavlju, od supresije stop kodona, upotrebe kvadrupletnog kodona i reprogramiranja *sense* kodona, rađeni su na *E. coli* ugrađivanjem parova aaRS/tRNA iz drugih organizama poput *Methanococcus jannaschii* i *Methanosarcina mazei* (Chin, 2014.). *E. coli* je također prvi organizam u kojem je uspješno demonstrirana *in vivo* ugradnja neproteinogenih aminokiselina proširenjem koda sintetskim parovima baza (Fischer i sur., 2020.). Dosad najveći broj strukturno različitih neproteinogenih aminokiselina je ugrađen upravo u proteine unutar ovog vrlo popularnog modelnog organizma koristeći strategiju supresije UAG kodona ortogonalnim parom TyrRS/tRNA^{Tyr} iz *M. jannaschii* (Liu i Schultz, 2010.).

Nedavno su i neki ortogonalni parovi aaRS/tRNA uspješno, bez gubitka ortogonalnosti, uklonirani i u druge prokariotske organizme poput *Mycobacteria smegmatis*, *M. bovis* i *M. tuberculosis*, čime je u njih omogućena ugradnja nekanonskih aminokiselina u svrhu proučavanja njihove patogeneze i za proizvodnju cjepiva (Liu i Schultz, 2010.).

3.2. Jednostanični eukariotski organizmi

Kako se unutarstanični procesi važni za ekspresiju proteina poput transkripcije, translacije i posttranslacijskih modifikacija znatno razlikuju u prokariotskim i eukariotskim organizmima, bilo je potrebno pronaći odgovarajući, a opet jednostavan model na kojem će se istražiti proširenje genetičkog koda kod eukariota. Kao model je izabran kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jer su određena istraživanja pokazala kako su neki tada poznati ortogonalni sustavi iz bakterija također poznati i u kvascu. Kako bi se promijenila specifičnost aminokiselina parova aaRS/tRNA koji su

se ugrađivali u kvasce, primijenjena je selekcija u dva koraka čija je shema prikazana na Slici 10. Najprije su željeni geni koji sadrže ortogonalne parove aaRS/tRNA transformirani u uracil-auksotrofni soj *S. cerevisiae* koji sadrži vezivna mjesta za transkripcijski aktivator GAL4 ispred dvaju gena: gena URA3 potrebnog za sintezu uracila i ispred gena za tRNA sa antikodonom za supresiju nekog od endogenih kodona. Tijekom pozitivne selekcije, stanice kvasca se uzgajaju u prisutnosti nekanonskih aminokiselina i bez dodatka uracila te se dobivaju klonovi u kojima aaRS može aminoacilirati ugrađenu tRNA s neproteinogenom aminokiselinom i/ili prirodnom aminokiselinom što rezultira ekspresijom gena URA3 i sintezom uracila te posljedično, njihovim preživljavanjem. Nakon toga slijedi negativna selekcija gdje se preživjele stanice uzgajaju bez prisutnosti neproteinogene aminokiselina u prisustvu uracila i 5-fluororotske kiseline (5-FOA) koja ukoliko dođe do sinteze uracila, ubija stanicu. Na taj su način dobiveni klonovi koji isključivo aminoaciliraju ugrađenu tRNA željenom neproteinogenom aminokiselinom. Taj je postupak upotrebljen u *S. cerevisiae* za uspješnu ugradnju čak 22 neproteinogene aminokiseline, a slični su eksperimenti ponovljeni i u metilotrofnom kvascu, *Pichia pastoris* (Chin, 2014.).



Slika 10. Shema genetičkog rekodiranja kvasca (*S. cerevisiae*) s ciljem ugradnje ncAA. Nakon transformacije kvasca slijedi pozitivna i negativna selekcija kojom se dobivaju klonovi koji isključivo aminoaciliraju ugrađenu tRNA željenom neproteinogenom aminokiselinom (Preuzeto i prilagođeno: Chin, 2014.)

3.3. Višestanični eukariotski organizmi

Do prije nekoliko godina, proširenje genetičkog koda uglavnom je bilo ograničeno na jednostanične organizme i stanične kulture. Kao prvi višestanični eukariotski organizam za proširenje genetičkog koda izabran je *Caenorhabditis elegans* te su u njega uklonirani supresori UAG stop kodona. *C. elegans* je izabran jer je proziran tijekom svih stadija životnog ciklusa što omogućava lakšu detekciju nekanonskom aminokiselina fluorescencijom te su svi stadiji embriogeneze i post-embrionalnog razvoja unaprijed poznati i dokumentirani. Nekoliko je istraživačkih grupa radilo na proširenju genetičkog koda *C. elegans* ugradnjom ili PylRS/tRNA^{CUA} ili EcTyrRS/tRNA^{CUA} i došli su do istog zaključka – niz nekanonskih aminokiselina može se ugraditi u *C. elegans* uzgojem oblića u prisutnosti aminokiselina uz prethodnu ugradnju ortogonalnog para iz drugog organizma klasičnim genetičkim pristupima (Chin, 2014.).

Drugi višestanični organizam koji je upotrijebljen kao model za proširenje genetičkog koda jest *Drosophila melanogaster* u kojoj su pomoću supresije stop kodona uspješno ugrađene dvije nekanonske aminokiseline – butoksikarbonil lizin (BocK) i derivat lizina koji sadrži alkin (PropK). Pri tome je korišten ortogonalni sustav aaRS/tRNA iz *M. mazei*, PylRS/tRNA^{Pyl}, a ugradnja aminokiselina je praćena fluorescentnim reporter-genom koji bi se eksprimirao samo u slučaju da je stop kodon uspješno suprimiran (Brown, 2018.).

Od ostalih višestaničnih organizama, sličnim su principom nekanonske aminokiseline uspješno ugrađene i u zebricu (*Danio rerio*) i miša (*Mus musculus*). Još jedan vrlo važan model tijekom ranog istraživanja ekspanzije genetičkog koda činile su i kulture stanica sisavaca. Kao način unosa genske kazete korišteni su virusi. Kazeta je sadržavala dva polispecifična para aaRS/tRNA, izvedena iz parova tirozila *E. coli* i pirolizina arheje i mutant ciljnog gena s ugrađenim stop kodonom. Nekoliko je vrsta virusa dizajnirano za transfekcijski unos potrebnih gena poput retro- i lentivirusa, no kao najučinkovitiji vektor pokazao se bakulovirus. Pomoću bakulovirusa, u kulture stanica sisavaca koje su uključivale primarne stanice, matične stanice i neurone, došlo je do uspješne ugradnje velikog broja nekanonskih aminokiselina (Chatterjee i sur., 2013.).

4. Utjecaj na ekspresiju proteina

4.1. Transkripcija

Cilj rekodiranja je omogućiti ugradnju dodatnih aminokiselina u translacijski sustav stanice istom vjernošću i učinkovitošću kao i prirodnih aminokiselina. Međutim, promjene kodona mogu značajno promijeniti ekspresiju proteina i posljedično, fenotip cijele stanice ili organizma (Sauna i Kimchi-Sarfaty, 2011.). Sve nove komponente koje se dodaju u stanicu moraju zadovoljiti niz kriterija. Neproteinogena aminokiselina koja se ugrađuje mora biti stabilna i biti sposobna ući u stanicu iz medija te ne smije biti supstrat bilo koje endogene aminoacil-tRNA-sintetaze. Nova tRNA mora biti sposobna prepoznati jedinstveni kodon i ni jedan od kodona koji prepoznaju endogene tRNA te par aaRS/tRNA mora činiti ortogonalni par (Liu i Schultz, 2010.).

Transkripcija je prvi korak prema ekspresiji određenog proteina kada se dio genoma prepisuje u molekulu mRNA koja zatim služi kao uputa za prevođenje slijeda nukleotida u aminokiseline. Kako se većina strategija ekspanzije koda usmjerava na translacijski korak ekspresije proteina, proširenje koda nema prevelik utjecaj na transkripciju, ukoliko se ne radi o proširenju koda pomoću sintetskih parova baza, što je prethodno opisano. Pri tome je bitno da sintetski parovi baza zadovoljavaju geometrijske i interakcijske kriterije transkripcijske mašinerije, ponajviše RNA polimeraza, kako bi se molekula mRNA uspješno sintetizirala (Ostrov i sur., 2020.). U eksperimentima *in vitro* zbog toga su često korištene RNA polimeraze virusa, poput T7 RNA polimeraze, čije su podjedinice modificirane tako da dopuštaju manje odmake od standardnog načina replikacije i olakšaju ugradnju sintetskih nukleotida (Carey, 2015.). Kako ugradnja novih nukleotida utječe na procesiranje same mRNA, tek je u procesu istraživanja.

Tijek same transkripcije nije uvelike izmijenjen, međutim pokazano je kako promjene kodona unutar prvih 35 nukleotida gena utječu na kinetiku stvaranja sekundarnih struktura mRNA, njezinu degradaciju i time i sam proces translacije proteina (Hanson i Coller, 2018.). Osim utjecaja na samu mRNA, rekodiranje može utjecati i na druge komponente unutar sintetskih organizama koji su povezani s transkripcijom, poput utjecaja na bitne, nekodirajuće regulatorne elemente, mjesta vezanja ribosoma, promotore i prigušivače (Fredens i sur., 2019.). Zbog toga nije iznenađujuća

činjenica da se proširenjem koda povećava osjetljivost i smanjuje stopa rasta i preživljavanja sojeva koji se koriste u eksperimentima (Ostrov i sur., 2020.).

4.2. Translacija

Translacija je ključan korak ekspresije proteina i ne iznenađuje kako je upravo taj korak cilj u eksperimentima proširenja genetičkog koda. S obzirom da se prilikom ekspanzije koda u stanice i organizme unose strani sustavi aaRS/tRNA, velik broj istraživanja temelji se na tome kako takve izmjene utječu na broj endogenih ribosoma, prepisivanje i procesiranje molekula tRNA i sintezu aminoacil-tRNA-sintetaza (Liu i Schultz, 2010.).

Eksperimenti su pokazali kako proširenje koda uvelike utječe na brzinu translacije, tj. čini je mnogo sporijom za razliku od one normalne, a parametri koji na to utječu tek se trebaju otkriti i analizirati. Kod supresije stop kodona, brzinu translacije smanjuju kompeticija supresorskih tRNA s terminacijskim faktorima zbog čega se često koriste sojevi čiji su terminacijski faktori mutirani kako bi učinkovitost proširenja koda bila veća. Kod upotrebe kvadripletnog kodona, brzinu smanjuje struktura samog ribosoma zbog čega i jesu razvijeni ortogonalni ribosomi (Chin, 2017.). Osim ortogonalnih ribosoma, u eksperimentima su korišteni i mutirani endogeni ribosomi čije su velika i mala podjedinica izmijenjene tako da mogu prepoznati i omogućiti ugradnju β - i D-aminokiselina, osim prirodnih koje su sve L-aminokiseline (Liu i sur., 2018.).

4.3. Posttranslacijske modifikacije

U svim živim organizmima nakon same sinteze proteina, većina njih prolazi kroz dodatne modifikacije koje najčešće uključuju fosforilaciju, acetilaciju, metilaciju i ubikvitinaciju kako bi ispravno funkcionirali. Posttranslacijske modifikacije vrše brojni enzimi koji su, ili još uvijek nepoznati ili ne modificiraju proteine specifično ili ih modificiraju ovisno o drugim faktorima prisutnim u stanici, zbog čega su istraživanja takvih modifikacija otežana i većina njih još danas

nije otkrivena. Proširenje genetičkog koda i uvođenje aminokiselina s novim svojstvima izravno na željeno mjesto u protein tijekom njegove sinteze, kotranslacijski, pokazalo se kao dobar alat koji može pomoći u istraživanjima posttranslacijskih modifikacija (Chen i sur., 2018.).

Primjer u kojem su proširenje genetičkog koda i ugradnja dodatnih novih aminokiselina pomogli u otkrivanju mjesta i načina modifikacije histona jest acetilacija lizina i njegovih analoga. Lizinska acetilacija važna je modifikacija i predstavlja reverzibilan proces kataliziran lizin acetiltransferazama i deacetilazama (Neumann i sur., 2009.). Za proučavanje acetilacije lizina razvijeno je nekoliko genetskih sustava za ugradnju lizinskih analoga poput acetilizina (AcK) i analoga koji se ne mogu deacetilirati, poput 2-amino-8-oksononanske kiseline (KetoK), i analoga poput tio-acetilizina (TAcK) koje mogu prepoznati protutijela i omogućiti njihovu lakšu detekciju. Ti su analozi uspješno ugrađeni u histone H2A, H2B i H3 i H4 te je pokazano kako acetilacija histona igra ključnu ulogu u regulaciji transkripcije gena (Wilkins i sur., 2015.). S druge strane, nehistska acetilacija lizina također se pokazala važnom u višestrukim staničnim procesima kao što su metabolička regulacija i stanična signalizacija (Chen i sur., 2018.).

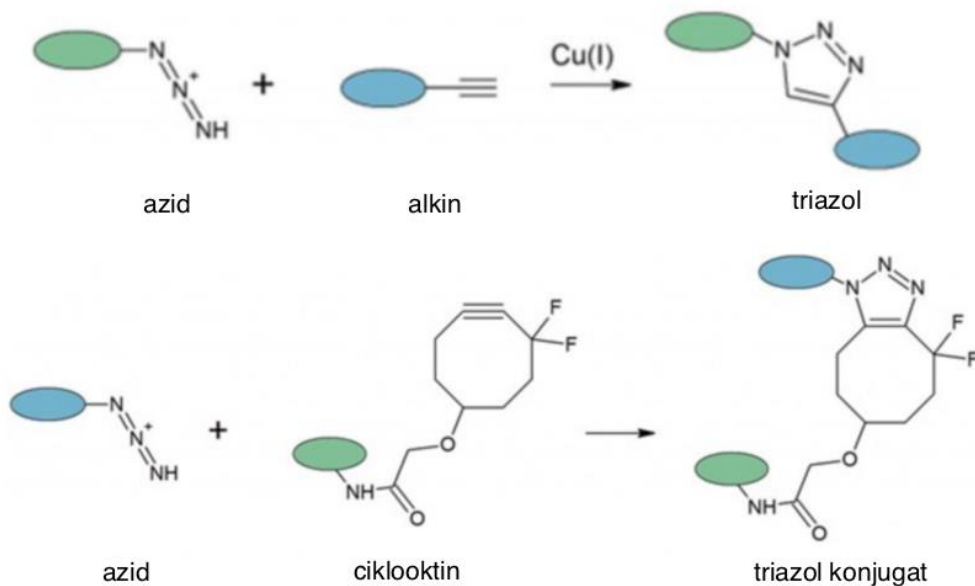
Osim koraka sinteze proteina i njegovih posttranslacijskih modifikacija, proširenjem genetičkog koda mijenja se ukupni sastav kodona što posljedično može imati velik utjecaj na brzinu rekombinacije i evoluciju genoma te na brojne druge faktore poput globalnih epigenetskih signala koji su važni regulatori dostupnosti kromatina i organizacije kromosoma (Ostrov i sur., 2020.).

5. Primjena i budućnost istraživanja

5.1. Molekularne metode

Potencijalne primjene modificiranih proteina kao posljedice proširenja genetičkog koda su mnoge i najviše ovise o fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima aminokiselina koje se u njih ugrađuju. Danas se radi na dizajnu brojnih novih sintetskih aminokiselina s najrazličitijim funkcionalnim skupinama koje mogu unaprijediti brojne molekularne metode koje se danas koriste i razviti potpuno nove načine detekcije ili kontrole raznih staničnih procesa (Ostrov i sur., 2020.). Proteini s određenim aminokiselinama mogu djelovati kao redoks probe za proučavanje prijenosa elektrona. Izotopno obilježene aminokiseline mogu poslužiti za nuklearnu magnetsku rezonancu (NMR) i infracrvenu spektroskopiju (IR). Aminokiseline koje sadrže teške atome mogu se koristiti za rendgensku kristalografiju, a fluorescentno obilježene aminokiseline u nizu drugih detekcijskih sustava (Chin, 2017.).

Jedna od metoda za praćenje međusobnih proteinskih interakcija i za mapiranje i lociranje određenog proteina u stanici koristi proteine modificirane neproteinogenim aminokiselinama. Riječ je o bioortogonalnom označavanju ili „*click*“ kemiji koji se temelje na brznoj reakciji između malih modularnih jedinica unutar stanice bez interferencije s nativnim biokemijskim procesima (Pham i sur., 2013.). Prilikom mapiranja i lociranja proteina u stanici, u određeni se protein ugradi nekanonska aminokiselina koja sadrži *photo-crosslinking* bočni lanac, tj. neku od skupina poput azida, benzofenona i diazirina koji se mogu povezati s drugom jedinicom, npr. alkinom. Modificiranom se proteinu s azidnom skupinom zatim doda neki alkinski spoj s fluoroforom ili imunoprecipitatom koji će u slučaju reakcije azida i alkina specifično obilježiti protein ili ga precipitirati na točno određenom položaju u stanici. Primjer reakcije između azida i alkina prikazan je na Slici 11. i kao produkt nastaje stabilni triazol koji olakšava detekciju (Liu i Schultz, 2010.).



Slika 11. Primjer reakcije „click“ kemije i bioortogonalnog označavanja. Aminokiselina s azidnom grupom ugrađuje se u protein i nakon dodatka alkina obilježenog fluoroforom ili imunoprecipitatom koji će u slučaju nastanka stabilnog triazola specifično obilježiti protein ili ga precipitirati. (Preuzeto i prilagođeno: Med Chem 101. http://medchem101.com/?page_id=142#)

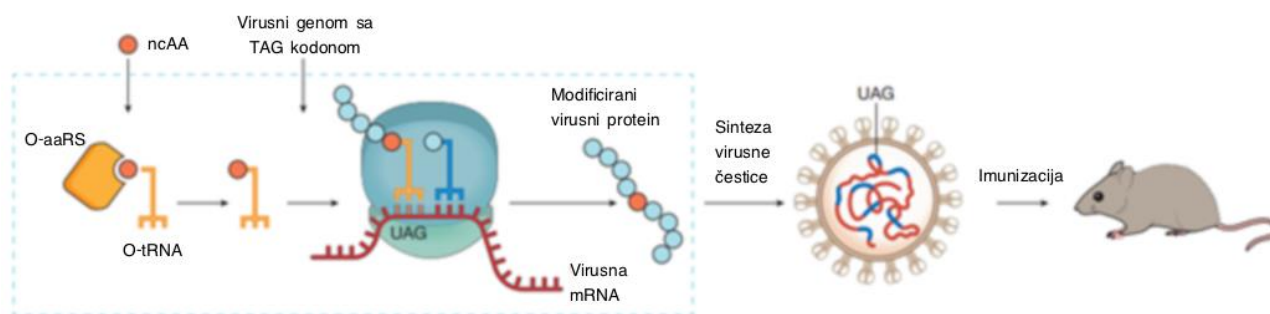
Slična se strategija koristi prilikom praćenja interakcija protein-protein ili protein-nukleinska kiselina. U protein se ugradi fluorescentno obilježena aminokiselina koja specifično reagira s dijelom drugog proteina ili nukleinske kiseline te se, ukoliko dođe do njihove reakcije, ista može detektirati fluorescencijom (Chin, 2014.).

5.2. Medicina i nove terapije

Osim mnogobrojnih primjena kod različitih metoda koje se koriste u molekularnoj biologiji i biokemiji, modificirani proteini imaju i velik potencijal primjene u medicini, u razvoju novih lijekova i terapija. Dio primjene proteina s nekanonskim aminokiselinama u terapijske svrhe krenuo je u smjeru izmjene citokina, faktora rasta, antitijela i domena antitijela na način da im se ugradi određena aminokiselina koja će omogućiti njihov veći titar i spriječiti vezanje određenog

faktora koji ih usmjerava na razgradnju i na taj način produljiti njihov poluživot i vrijeme djelovanja imunodne reakcije (Huang i Liu, 2018.). Druga primjena odnosi se na modificiranje proteina određenim aminokiselinama koje će omogućiti stvaranje terapijskih cjepiva protiv vlastitih imunskih stanica i proteina povezanih s tumorima ili upalama i omogućiti smanjenje imunološke tolerancije organizma i ponovno ga učiniti osjetljivim na neke antigene (Liu i Schultz, 2010.).

Treća i dosad najrazvijenija primjena jest ona u proizvodnji atenuiranih patogena za cjepiva, pogotovo onih patogena koje je teško ciljati tradicionalnim cjepivima poput virusa humane imunodeficijencije (HIV) i malarije. Određeni virusni genomi koji sadrže UAG stop kodone i neproteinogene aminokiseline ugrade se u stanice koje sadrže ortogonalni par aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA koje će služiti za supresiju stop kodona tijekom translacije virusnih gena (Slika 12.). Virusne čestice koje su nastale pakiranjem genoma nakon supresije stop kodona neće imati aktivne gene za virulenciju zbog ugrađene neproteinogene aminokiseline pa nakon imunizacije neće biti sposobne za replikaciju u domaćinu. Ovakvi atenuirani virusi pružaju snažan imunološki odgovor i dugotrajnu zaštitu od naknadnih infekcija istim patogenom. Takva je strategija primijenjena za izradu cjepiva za virus hepatitisa D, HIV-1 i influenza A virus (Chin, 2017.).



Slika 12. Primjena proširenja genetičkog koda u izradi atenuiranih virusa i cjepiva. U stanicu koja sadrži ortogonalnu aaRS i tRNA ugrađuje se virusni genom sa UAG stop kodonima i ncAA. Na mjesto stop kodona u genom virusa ugradi se ncAA stvarajući virus nesposoban za replikaciju u domaćinu. (Preuzeto i prilagođeno: Chin, 2017.)

5.3. Biotehnologija i budućnost

Iako je proširenje genetičkog koda u *in vivo* sustavima tek u začetku, potencijalna primjena takvih sintetskih i polusintetskih organizama u biotehnologiji je neupitna. Prvi sintetski bakterijski genom dovršen je 2008. godine sintezom genoma *Mycoplasma genitalium*, bakterije koja može uzrokovati infekcije mokraćnog i spolnog trakta kod ljudi (Craig, 2008.). Druga skupina znanstvenika 2017. godine djelomično je sintetizirala genom *Saccharomyces cerevisiae*, pekarskog kvasca za fermentaciju vina i piva (Pretorius i Boeke, 2018.). U budućnosti, takvi bi umjetni i izmijenjeni organizmi mogli proizvoditi sintetske biopolimere na prirodan način, sudjelovati u izradi brojnih cjepiva stvaranjem atenuiranih virusa, proizvoditi kemikalije i lijekove s boljim svojstvima i imati brojne druge aplikacije (El Karoui i sur., 2019.). Razne tehnologije sintetske biologije moći će se primjenjivati u svim sektorima – poljoprivredi, prehrani, zdravstvu, kemijskoj i industrijskoj proizvodnji i u gotovo svim područjima znanosti (Tebeje i sur., 2021.).

Međutim, već proširenjem genetičkog koda i njegovim uvođenjem u sustave *in vivo* povlači se niz važnih etičkih pitanja o mogućim štetama i koristima za društvo koja su slična etičkim raspravama vezanim uz uređivanje genoma. Neka od ključnih pitanja su: prelaze li ljudi moralne granice redizajniranjem organizama tehnikama sintetske biologije te koji su negativni utjecaji na okoliš uslijed uvođenja modificiranih organizama u ekosustav. Iako se organizmi koji se koriste u svrhu istraživanja uzgajaju u strogo kontroliranim i sterilnim uvjetima, uvijek postoji mogućnost slučajne kontaminacije ili pokušaja njihovog namjernog otpuštanja u okoliš. Međutim, pokazano je kako su organizmi dizajnirani za laboratorijsku upotrebu manje sposobni za preživljavanje u prirodnom okruženju u usporedbi s organizmima koji se pojavljuju u prirodi (Benner i Sismour, 2005.). Prvu prepreku njihovom širenju predstavljaju sam medij i hranjive tvari. Sintetski organizam koji je rekodiran za korištenje neproteinogene aminokiseline ili koji umjesto četiri nukleotida u svojoj DNA sadrži još jedan par sintetskih nukleotida zasigurno ne može preživjeti u prirodnom okolišu gdje takvi umjetni, a tom organizmu esencijalni spojevi, ne postoje i nisu dostupni. Naravno, teško je predvidjeti kako će se sintetski soj koji „pobjegne“ iz laboratorija razviti i mutirati pod selektivnim pritiscima vanjskog okoliša. No, upravo iz tog razloga znanstvenici su počeli razvijati razne metode kojima će, ukoliko dođe do proboja sintetskih organizama u okoliš, mogućnost njihovog širenja i evoluiranja svesti na minimum.

Često korištene metode za kontrolu modificiranih bakterija uključuju ugradnju biosigurnosnog modula u genom bakterije koji može izazvati njezinu smrt ili spriječiti njezino samoumnažanje nakon bijega (Li i sur., 2021.). Jedan od takvih sustava za biološko zadržavanje (eng. *biocontainment systems*) je ortogonalni ribosomski biovatrozid (eng. *orthogonal ribosome biofirewall*) koji se sastoji od aktivacijskog kruga i degradacijskog kruga. Aktivacijski krug označava šifrirane gene koji se aktiviraju pomoću ortogonalnog ribosoma, dok degradacijski krug predstavlja gene za specifične endonukleaze koje razgrađuju gene ortogonalnog ribosoma kao odgovor na specifične signale iz okoline, npr. izostanak IPTG-a. Dakle, određenim šifriranim genima, npr. genima za rekodiranje, može se pristupiti tek kada su ispunjeni određeni uvjeti, npr. dodatak IPTG-a, jednako kao i kod pristupa informacijama na računalu za koje je potrebna posebna lozinka (Jia i sur., 2017.).

Unatoč ugibanju sintetskih organizama u prirodi, uvijek postoji mogućnost prijenosa njihovih plazmida koji sadrže određene mutacije u druge mikroorganizme konjugacijom (Heuer i Smalla, 2007.). Jedan od načina sprječavanja takvog ishoda jest upotreba genskih barijera (eng. *gene-flow barriers*) gdje se u plazmid ubacuje gen ubojica, a u domaćina gen za represorski protein koji blokira njegovu ekspresiju. Ukoliko se takav plazmid nađe u domaćinu koji ne sadrži gen za represor, gen se neometano prepisuje i njegov genski produkt, najčešće toksin, ubija novog domaćina (Moe-Behrens i sur., 2013.).

Osim „*kill-switch*“ strategija, neki znanstvenici su počeli dizajnirati sojeve s minimalnim genomima koji bi osim esencijalnih gena trebali sadržavati gene za sintezu metabolita za koji su rekodirani, a svi ostali suvišni metabolički putovi bili bi uklonjeni (Moe-Behrens i sur., 2013.). Organizmi s minimalnim genomima gotovo bi u potpunosti smanjili mogućnost opstanka sintetskih organizama u prirodnom okruženju i spriječili njihovu moguću evoluciju.

Mnoga nova tehnološka dostignuća tijekom desetljeća naišla su na slične probleme, na nesigurnost i strah, kao i nove tehnologije koje pruža razvoj sintetske biologije (El Karoui i sur., 2019.). Primjena sintetske biologije, a time i organizama s proširenim genetičkim kodom, u biotehnološkoj industriji će se u narednim godinama samo povećati i ubrzati. Uz razvoj brojnih novih metode proširenja genetičkog koda, razvijaju se i brojne nove metode za održavanje biološke sigurnosti i sprječavanje potencijalnih neželjenih posljedica nekontroliranog širenja sintetskih organizama.

6. Literatura

1. Acevedo-Rocha CG, Budisa N. (2016). Xenomicrobiology: a roadmap for genetic code engineering. *Microb Biotechnol.* 9(5), 666-76. doi: 10.1111/1751-7915.12398.
2. Albers S., Beckert B., Matthies M.C. et al. (2021). Repurposing tRNAs for nonsense suppression. *Nat Commun.* 12, 3850. doi: 10.1038/s41467-021-24076-x.
3. Anderson J. C., Wu N., Santoro S. W., Lakshman V., King D. S., Schultz P. G. (2004). An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7566–7571. doi: 10.1073/pnas.0401517101.
4. Atkins J. F., Baranov P. V. (2010). The distinction between recoding and codon reassignment. *Genetics*, 185(4), 1535–1536. doi: 10.1534/genetics.110.119016.
5. Beier H., Grimm M. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Research*. 29(23), 4767–4782. doi: 10.1093/nar/29.23.4767.
6. Behura SK, Severson DW. (2013). Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 88(1), 49-61. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00242.x.
7. Benner, S. A., Sismour, A. M. (2005). Synthetic biology. *Nature reviews. Genetics*, 6(7), 533–543. doi: 10.1038/nrg1637.
8. Błażej P., Wnetrzak M., Mackiewicz D., Mackiewicz P. (2020). Basic principles of the genetic code extension. *Royal Society Open Science.* 7, 191384. doi: 10.1098/rsos.191384.
9. Brown W., Liu J., Deiters A. (2018). Genetic Code Expansion in Animals. *ACS chemical biology.* 13(9), 2375–2386. doi: 10.1021/acscchembio.8b00520.
10. Carey L. B. (2015). RNA polymerase errors cause splicing defects and can be regulated by differential expression of RNA polymerase subunits. *eLife.* 4. doi: 10.7554/eLife.09945.
11. centralna dogma. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža,* 2021. Pristupljeno 15. 8. 2022. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=11224>>.
12. Chatterjee A., Xiao H., Bollong M., Ai H. W., Schultz P. G. (2013). Efficient viral delivery system for unnatural amino acid mutagenesis in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v110(29), 11803–11808. doi: 10.1073/pnas.1309584110.
13. Chen H., Venkat S., McGuire P., Gan Q., Fan C. (2018). Recent Development of Genetic Code Expansion for Posttranslational Modification Studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1662. doi: 10.3390/molecules23071662.

14. Chen I. A., Schindlinger M. (2010). Quadruplet codons: one small step for a ribosome, one giant leap for proteins: an expanded genetic code could address fundamental questions about algorithmic information, biological function, and the origins of life. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(8), 650–654. doi: 10.1002/bies.201000051.
15. Chin J. W. (2014). Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals. *Annu Rev Biochem.* 83, 379–408. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035737.
16. Chin J. W. (2017). Expanding and reprogramming the genetic code. *Nature.* 550(7674), 53–60. doi: 10.1038/nature24031.
17. Chin, J. W. (2003). An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science*, 301(5635), 964–967. doi: 10.1126/science.1084772.
18. Click chemistry. *Med Chem* 101. http://medchem101.com/?page_id=142# (pristupljeno 22.8.2022.)
19. Copeland P. R. (2003). Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine. *Gene.* 312, 17–25. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00588-2.
20. Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561–563. doi: 10.1038/227561a0.
21. Crick F. (1968). The origin of the genetic code. *J Mol Biol.* 38(3), 367–79. doi: 10.1016/0022-2836(68)90392-6.
22. Davis L., Chin J. (2012). Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 168–182. doi: 10.1038/nrm3286.
23. El Karoui M., Hoyos-Flight M., Fletcher L. (2019). Future Trends in Synthetic Biology-A Report. *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* 7, 175. doi: 10.3389/fbioe.2019.00175.
24. Fischer E.C., Hashimoto K., Zhang Y. et al. (2020). New codons for efficient production of unnatural proteins in a semisynthetic organism. *Nat Chem Biol.* 16, 570–576. doi: 10.1038/s41589-020-0507-z.
25. Fredens J., Wang K., de la Torre D. et al. (2019). Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature.* 569, 514–518. doi: 10.1038/s41586-019-1192-5.
26. genski kôd. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 15. 8. 2022. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=21607>>.
27. Georgiadis, M. M., Singh I., Kellett W. F., Hoshika S., Benner S. A., Richards N. G. (2015). Structural basis for a six nucleotide genetic alphabet. *Journal of the American Chemical Society*, 137(21), 6947–6955. doi: 10.1021/jacs.5b03482.
28. Goodenbour J. M., Pan T. (2006). Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic acids research.* 34(21), 6137–6146. doi: 10.1093/nar/gkl725.

29. Hanson G., Collier J. (2018). Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19, 20–30. doi: 10.1038/nrm.2017.91.
30. Hirao I., Kimoto M. (2012). Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences.* 88(7), 345–367. doi: 10.2183/pjab.88.345.
31. Hoshika S., Leal N. A., Kim M. J., Kim M. S., Karalkar N. B., Kim H. J., Bates A. M., Watkins N. E. Jr, SantaLucia H. A., Meyer A. J., DasGupta S., Piccirilli J. A., Ellington A. D., SantaLucia J. Jr, Georgiadis M. M., Benner S. A. (2019). Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6429), 884–887. doi: 10.1126/science.aat0971.
32. Huang Y, Liu T. (2018). Therapeutic applications of genetic code expansion. *Synth Syst Biotechnol.* 3(3):150-158. Erratum (2020) in: *Synth Syst Biotechnol.* 5(4):330-331. doi: 10.1016/j.synbio.2018.09.003.
33. Ibba M, Soll D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* 69,617-50. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.617.
34. Jia B., Qi H., Li B.Z., Pan S., Liu D., Liu H., Cai Y., Yuan Y.J. (2017). Orthogonal Ribosome Biofirewall. *ACS Synth Biol.* 6(11), 2108-2117. doi: 10.1021/acssynbio.7b00148.
35. Jordan, B. (2019). Extension du domaine du codage : l'ADN hachimoji. *Médecine/sciences.* 35(5), 483–485. doi: 10.1051/medsci/2019080.
36. Katz L., Chen Y.Y., Gonzalez R., Peterson T.C., Zhao H., Baltz R.H. (2018). Synthetic biology advances and applications in the biotechnology industry: a perspective, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(7), 449–461. doi: 10.1007/s10295-018-2056-y.
37. Kotini S. B., Peske F., Rodnina M. V. (2015). Partitioning between recoding and termination at a stop codon-selenocysteine insertion sequence. *Nucleic acids research.* 43(13), 6426–6438. doi: 10.1093/nar/gkv558.
38. Lajoie M. J., Söll D., Church G. M. (2016). Overcoming Challenges in Engineering the Genetic Code. *Journal of molecular biology.* 428(5 Pt B), 1004–1021. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.003-
39. Lang K., Chin J. W. (2014). Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chemical Reviews*, 114(9), 4764–4806. doi: 10.1021/cr400355w.
40. Laski F. A., Ganguly S., Sharp P. A., RajBhandary U. L., Rubin G. M. (1989). Construction, stable transformation, and function of an amber suppressor tRNA gene in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), 6696–6698. doi: 10.1073/pnas.86.17.6696.
41. Li J., Zhao H., Zheng L., An W. (2021). Advances in Synthetic Biology and Biosafety Governance. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:598087. doi: 10.3389/fbioe.2021.598087.

42. Liu C.C., Jewett M.C., Chin J.W., Voigt C.A. (2018). Toward an orthogonal central dogma. *Nat Chem Biol.* 14(2), 103-106. doi: 10.1038/nchembio.2554.
43. Liu C.C., Schultz P.G. (2010). Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem.* 79, 413-44. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.105824.
44. Malyshe, D., Dhami K., Lavergne T. et al. (2014). A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature.* 509, 385–388. doi: 10.1038/nature13314.
45. Mandel, G. N., Marchant, G. E. (2014). The Living Regulatory Challenges of synthetic biology. *SSRN Electronic Journal.* doi: 10.2139/ssrn.2410179.
46. Moe-Behrens G. H., Davis R., Haynes K. A. (2013). Preparing synthetic biology for the world. *Frontiers in microbiology*, 4, 5. doi: 10.3389/fmicb.2013.00005.
47. Mukai T, Yamaguchi A, Ohtake K, Takahashi M, Hayashi A, Iraha F, Kira S, Yanagisawa T, Yokoyama S, Hoshi H, Kobayashi T, Sakamoto K. (2015). Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 43(16), 8111-22. doi: 10.1093/nar/gkv787.
48. Neumann H., Hancock S.M., Buning R., Routh A., Chapman L., Somers J., Owen-Hughes T., van Noort J., Rhodes D., Chin J.W. (2009). A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. *Mol Cell.* 36(1), 153-63. doi: 10.1016/j.molcel.2009.07.027.
49. Neumann H., Wang K., Davis L., Garcia-Alai M., Chin J.W. (2010). Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature.* 464(7287), 441-4. doi: 10.1038/nature08817.
50. Nirenberg, M. (2004). Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account. *Trends in Biochemical Sciences.* 29(1), 46–54. doi:10.1016/j.tibs.2003.11.009.
51. Northon, K. (2019). Funded research creates DNA-like molecule. NASA. <https://www.nasa.gov/press-release/nasa-funded-research-creates-dna-like-molecule-to-aid-search-for-alien-life> (pristupljeno 20.8.2022.)
52. O'Donoghue P., Ling J., Wang Y.S. et al. (2013). Upgrading protein synthesis for synthetic biology. *Nat Chem Biol.* 9, 594–598. doi: 10.1038/nchembio.1339.
53. Oehm, S. (2016). Adaptation of *E. coli* towards tryptophan analogue usage. PhD Thesis. Berlin, Germany: Department of Chemistry of TU Berlin.
54. Ostrov N., Nyerges A., Chiappino-Pepe A., Rudolph A., Baas-Thomas M., Church G. M. (2020). Synthetic genomes with altered genetic codes. *Current Opinion in Systems Biology.* 24, 32–40. doi: 10.1016/j.coisb.2020.09.007.

55. Pham N.D., Parker R.B., Kohler J.J. (2013). Photocrosslinking approaches to interactome mapping. *Curr Opin Chem Biol.* 17(1), 90-101. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.10.034.
56. Pretorius I.S., Boeke J.D. (2018). Yeast 2.0 – connecting the dots in the construction of the world's first functional synthetic eukaryotic genome. *FEMS Yeast Research.* 18(4). doi: 10.1093/femsyr/foy032.
57. Qian Q., Li J.N., Zhao H., Hagervall T.G., Farabaugh P.J., Björk G.R. (1998). A new model for phenotypic suppression of frameshift mutations by mutant tRNAs. *Mol Cell.* 1(4), 471-82. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80048-9.
58. Rackham O., Chin J.W. (2005). A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol.* 1(3), 159-66. doi: 10.1038/nchembio719.
59. Rother M., Krzycki J. A. (2010). Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea. *Archaea (Vancouver, B.C.),* 2010, 453642. doi: 10.1155/2010/453642.
60. Sauna Z., Kimchi-Sarfaty C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 12, 683–691. doi: 10.1038/nrg3051.
61. Scientists Create First Synthetic Bacterial Genome - Largest Chemically Defined Structure Synthesized In The Lab. (2008). *ScienceDaily.* www.sciencedaily.com/releases/2008/01/080124175924.html (pristupljeno 20.8.2022.)
62. Tack D.S., Cole A.C., Shroff R. et al. (2018). Evolving Bacterial Fitness with an Expanded Genetic Code. *Sci Rep.* 8, 3288. doi: 10.1038/s41598-018-21549-w.
63. Tamura K. (2016). The Genetic Code: Francis Crick's Legacy and Beyond. *Life (Basel, Switzerland).* 6(3), 36. doi: 10.3390/life6030036.
64. Tebeje A., Tadesse H., Mengesha Y. (2021) Synthetic bio/techno/logy and its application. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 35(1), 1156-1162. doi: 10.1080/13102818.2021.1960189.
65. Tharp J., Ehnbohm A., Liu W. (2017). tRNA(Pyl): Structure, function, and applications. *RNA Biology.* 15, 00-00. doi: 10.1080/15476286.2017.1356561.
66. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics (2008). Transfer RNA (tRNA). Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-1-4020-6754-9_17259.
67. Wang K., Neumann H., Peak-Chew S.Y., et al. (2007). Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol.* 25, 770–7.
68. Wang L. (2003). Expanding the genetic code. *Science.* 302(5645), 584-5. doi: 10.1126/science.302.5645.584.
69. Wang K., Schmied W.H., Chin J.W. (2012), Reprogramming the Genetic Code: From Triplet to Quadruplet Codes. *Angew. Chem. Int. Ed.,* 51, 2288-2297. doi: 10.1002/anie.201105016.

70. Wang L., Schultz P. G. (2005). Expanding the Genetic Code. *Angewandte Chemie International Edition*. 44(1), 34–66. doi: 10.1002/anie.200460627.
71. Wilkins B.J., Hahn L.E., Heitmüller S., Frauendorf H., Valerius O., Braus G.H., Neumann H. (2015). Genetically encoding lysine modifications on histone H4. *ACS Chem Biol*. 10(4):939-44. doi: 10.1021/cb501011v.
72. Yang Z., Chen F., Alvarado J.B., Benner S.A. (2011). Amplification, Mutation, and Sequencing of a Six-Letter Synthetic Genetic System. *Journal of the American Chemical Society*. 133(38), 15105-15112, doi 10.1021/ja204910n.
73. Yuan J., O'Donoghue P., Ambrogelly A., Gundllapalli S., Sherrer R. L., Palioura S., Simonović M., Söll D. (2010). Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *FEBS letters*, 584(2), 342–349. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.005.
74. Zhang Y., Baranov P.V., Atkins J.F., Gladyshev V.N. (2005). Pyrrolysine and selenocysteine use dissimilar decoding strategies. *J Biol Chem*. 280(21):20740-51. doi: 10.1074/jbc.M501458200.
75. Zhang L., Yang Z., Sefah K., Bradley K. M., Hoshika S., Kim M. J., Kim H. J., Zhu G., Jiménez E., Cansiz S., Teng I. T., Champanhac C., McLendon C., Liu C., Zhang W., Gerloff D. L., Huang Z., Tan W., Benner, S. A. (2015). Evolution of functional six-nucleotide DNA. *Journal of the American Chemical Society*. 137(21), 6734–6737. doi: 10.1021/jacs.5b02251.

7. Životopis

Rođena sam 9. prosinca 2000. godine u Zagrebu u Republici Hrvatskoj. Osnovnoškolsko obrazovanje završavam 2015. godine te iste godine upisujem XV. gimnaziju u Zagrebu, prirodoslovno-matematički smjer. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem na projektu „Daroviti učenici” u sklopu kojeg zajedno s drugim učenicima izrađujem istraživači rad pod nazivom „Utjecaj koloidnog srebra na različite tipove tumorskih i matičnih stanica” pod mentorstvom dr. sc. Marijane Popović Hadžije (Institut Ruđer Bošković) i Mihaele Marceljak Ilić (XV. gimnazija). Rad 2017. godine dobiva nagradu „High school student Future Scientist Award” za učeničke istraživačke radove na konferenciji ISABS. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja 2019. godine, upisujem Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biologija, čiju preddiplomsku razinu upravo završavam. Za vrijeme studiranja volontiram na manifestaciji Noć muzeja 2020. godine u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu, a 2022. godine volontiram u sklopu projekta „Studenti za buduće studente – Pripreme za maturu iz biologije“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu koji je ujedno prijavljen na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022. U slobodno se vrijeme bavim folklorom – aktivni sam član Kulturno-umjetničkog društva „Klas” od 2010. godine te već tri godine zaredom sudjelujem u programu koji održava Hrvatska matica iseljenika pod nazivom „Ljetna škola hrvatskog folklor”.