

Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine

Šimunić, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:217:170325>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ena Šimunić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

UGRADNJA NESTANDARDNIH AMINOKISELINA U PROTEINE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujne 2017.

Mentor rada: [izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj]

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	1
§ 1. UVOD.....	2
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	4
2.1. Genetski kod	4
2.2. Translacija	7
2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	8
2.3.1. Građa enzima.....	8
2.3.2. Specifičnost prema supstratima	9
2.3.3. Katalitički mehanizam.....	10
2.4. Selenocistein i pirolizin	11
2.4.1. Selenocistein.....	11
2.4.2. Biosinteza selenocisteina	12
2.4.3. Pirolizin.....	13
2.5. In vivo ugradnja nestandardnih aminokiselina	14
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XIX

§ Sažetak

Genetski kod je univerzalan i povezuje sve tri domene života. Definira suodnos kodona i aminokiselina te zakonitosti koje omogućuju prevođenje genetičke informacije zapisane u DNA u molekule proteina. Gotovo svi organizmi koriste standardnih 20 aminokiselina za izgradnju proteina, a neki mogu koristiti i dvije dodatne: selenocistein i pirolizin. Ugradnja tih dviju aminokiselina omogućena je prirodnim proširivanjem genetskog koda, te se odvija na malo drugačiji način od ugradnje standardnih 20 aminokiselina.

Proteini obavljaju različite funkcije u stanici, za što im je potrebna kompleksnost i raznolikost struktura. Proširivanjem repertoara aminokiselina korištenjem nestandardnih aminokiselina stanica može stvarati više raznolikih proteina, što može omogućiti selektivnu prednost u određenim nepovoljnim uvjetima. Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine također omogućuje precizno istraživanje njihove funkcije i interakcija, te stvaranje proteina novih svojstava. Takvi proteini promijenjenih svojstava mogu naći primjenu u medicini ili biotehnologiji. Nestandardne aminokiseline mogu se podijeliti u dvije skupine: aminokiseline izostrukturalne standardnim aminokiselinama koje prepoznaju translacijski sustavi stanice i ortogonalne aminokiseline koje nisu prepoznate od klasične translacijske mašinerije. Zbog tih strukturalnih razlika, te zbog potrebe za ciljanom, odnosno nasumičnom ugradnjom postoje dva načina za *in vivo* ugradnju nestandardnih aminokiselina u proteine. Izostrukturalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se metodom ugradnje putem selektivnog pritiska, korištenjem auktotrofnih sojeva, a ortogonalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se metodom supresije stop kodona. Metodom ugradnje putem selektivnog pritiska nestandardne aminokiseline ugrađuju se nasumično, na mjesta kodirana za ugradnju izostrukturalne proteinogene aminokiseline, a putem supresije stop kodona omogućena je ciljana ugradnja na određeno mjesto definirano ciljanim uvođenjem stop kodona u proteinu.

§ 1. UVOD

Aminokiseline se peptidnim vezama mogu povezavati u polipeptidne lance, odnosno u proteine. Proteini i manji peptidi obavljaju različite funkcije u organizmima, te su zbog toga ključni za život. Prenose signale i molekule u stanici, grade enzime koji kataliziraju različite reakcije, a sudjeluju i u procesu replikacije DNA, odnosno prijenosu genetske informacije. Za obavljanje različitih funkcija potrebna je kompleksnost i raznolikost struktura. Raznolikost strukture proteina može potjecati od brojnih i različitih posttranslacijskih modifikacija (npr. vezanjem lipida nastaju lipoproteini), od razlika u smatanju proteina, odnosno njihove tercijarne strukture, te od samog kovalentnog slijeda aminokiselina- primarne strukture. Kroz sve tri domene života, velika većina organizama koristi standardnih 20 aminokiselina za izgradnju proteina. Aminokiselinski slijed zapisan je u genomu svakog organizma, koji je univerzalan i povezuje sve tri domene života.

Danas se ugradnjom nestandardnih aminokiselina mogu stvoriti proteini novih svojstava koji mogu naći primjenu u biomedicini te biotehnologiji. Ugradnja nestandardnih aminokiselina također omogućuje bolju karakterizaciju strukture i funkcije proteina. Selenocistein i pirolizin su 21. i 22. aminokiselina, a njihova ugradnja omogućena je prirodnim proširivanjem genetskog koda. Uz njih postoje i brojni drugi analozi standardnih 20 aminokiselina koji se na različite načine mogu ugrađivati u proteine. Nestandardne aminokiseline izostrukturalne standardnim aminokiselinama koje prepoznaju translacijski sustavi stanice ugrađuju se nasumično na mjesta kodirana za proteinogenu izostrukturalnu aminokiselinu u proteinu, a ortogonalne aminokiseline koje nisu prepoznate od klasične translacijske mašinerije mogu se ciljano ugraditi na točno određeno mjesto u proteinu. Takve različite aminokiseline se u proteine ugrađuju različitim metodama. Izostrukturalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se metodom ugradnje putem selektivnog pritiska (eng. *selective pressure incorporation*), no budući da ih prepoznaju translacijski sustavi stanice često dolazi do lošijeg prepoznavanja, ili do hidrolitičkog popravka pogreške intermedijera ili finalnog produkta nastalog s tom nestandardnom aminokiselinom. Ortogonalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se metodom supresije stop kodona (eng. *stop-codon suppression*) uvedenog na ciljano mjesto u proteinu. Te se dvije metode koriste za dizajn proteina novih

svojstava. Koriste se ortogonalni parovi za ugradnju ortogonalnih aminokiselina ili aminokiseline koje translacijski sustavi dovoljno dobro prepoznaju za nasumičnu ugradnju.

Cilj ovog rada je upoznavanje s nekoliko metoda za ugradnju nestandardnih aminokiselina u proteine. Metode se razlikuju po aminokiselinama koje se njima mogu ugrađivati, a svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Genetski kod

Genetski kod je univerzalan, proteže se kroz sve tri domene života: arheje, prokariote i eukariote. Semikonzervativna replikacija DNA omogućuje prijenos nasljedne informacije iz generacije u generaciju. Proces biosinteze proteina započinje transkripcijom, prepisivanjem DNA u mRNA. Kodone mRNA zatim prepoznaju antikodoni tRNA u procesu translacije, pri čemu povezivanjem odgovarajućih aminokiselina nastaje polipeptidni lanac.

Važno svojstvo genetičkog koda je redundantnost. DNA je građena od deoksiribonukleotida koji se razlikuju u dušičnim bazama koje su adenin (A), timin (T), gvanin (G) i citozin (C). Kombinacijom te četiri baze nastaju $4^3 = 64$ moguća kodona koji u principu kodiraju 20 standardnih aminokiselina. Od toga 61 kodon kodira za različite aminokiseline, a 3 kodona su stop kodoni - UGA: *opal*, UAA: *ochre*, UAG: *amber*. Stop kodoni omogućuju terminaciju sinteze proteina na ribosomu, a stop kodoni UGA i UAG na specifične načine mogu sudjelovati u kodiranju selenocisteina i pirolizina.

Svaka aminokiselina kodirana je s jednim ili više (najviše šest) kodona. Broj tripleta koji kodiraju jednu aminokiselinu proporcionalan je zastupljenosti te aminokiseline u proteomu. U *E.coli*, triptofan je malo zastupljena aminokiselina (oko 1,5% proteoma) te ju kodira samo jedan kodon. Nasuprot tome, arginin čini oko 5,5% proteoma *E.coli* i kodira ga šest kodona.¹ Pridruživanje značenja nekog kodona određenoj aminokiselini nije slučajno.

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Slika 1. Kodoni i aminokiseline koje kodiraju

Kod je organiziran tako da se minimizira utjecaj mutacija. Međusobno slični kodoni kodiraju jednu aminokiselinu, pa tako uslijed promjene jedne baze kodona ne dolazi do promjene aminokiseline koja se ugrađuje. Tako na primjer kodoni CGU, CGC, CGA, CGG kodiraju arginin. Slični kodoni mogu kodirati slične aminokiseline- kodoni GAU i GAC kodiraju aspartat, a kodoni GAA i GAG kodiraju glutamat. Degeneracija genetskog koda omogućuje organizmima da biraju između rijetkih i učestalih kodona. Rijetki kodoni omogućuju organizmima selektivnu prednost u prilagodbi na nove uvjete. Primjećena je razlika u brzini prepisivanja rijetkih kodona u mediju siromašnom hranjivim tvarima. Takvi se kodoni prepisuju znatno sporije od kodona koji se često pojavljuju, što upućuje na činjenicu da je za prepisivanje rijetkih kodona važna unutarstanična koncentracija aminokiselina i tRNA. Molekule tRNA koje imaju antikodone komplementarne učestalijim kodonima prisutne su u većim koncentracijama u stanici, što omogućuje njihovo brže prepisivanje.

Porijeklo genetskog koda objašnjava nekoliko teorija: Crickova hipoteza o slučajnom zamrzavanju genetskog koda (eng. *Crick's frozen accident theory*), adaptivna, stereokemijska te ko-evolucijska teorija. Prije se smatralo da je genetski kod nepromjenjiv, te da je u nekom trenutku evolucije došlo do njegovog 'zamrzavanja', što objašnjava Crickova hipoteza o slučajnom zamrzavanju genetskog koda. Crick u svojoj teoriji smatra da je pridruživanje

aminokiseline određenom kodonu bilo nasumično, sve do trenutka kad bi daljnje proširivanje broja proteinogenih aminokiselina bilo opasno za stanicu zbog funkcionalne destabilizacije proteina. Prije zamrzavanja, genetski se kod proširivao i evoluirao. Postoje dvije glavne teorije koje objašnjavaju mogućnost promjene značenja nekih kodona: hvatanje kodona (eng. *Codon capture*) i teorija o postojanju dvojakog intermedijera (eng. *ambiguous intermediate theory*). Teorija hvatanja kodona smatra da promjene u genomu nastale zbog GC pritiska mogu uzrokovati promjene značenja kodona, najviše zbog promjene treće baze. Na taj način neki kodon može nestati, a odgovarajuća tRNA postati bespotrebna. Ako se kodon ponovno pojavi, može ga prepoznati („uhvatiti“) druga tRNA (potencijalno promijenjena da bi ga prepoznala) i njegovo značenje povezati s drugom aminokiselinom, na taj način mijenjajući njegovo originalno značenje. S druge strane, teorija o postojanju dvojakog intermedijera smatra da pojava mutantne tRNA može uzrokovati kompeticiju s pripadnom tRNA, te tako promijeniti značenje kodona povezujući ga s novom aminokiselinom koja je aminoacilirana na mutantnoj tRNA.

Razvojem proteomike i tehnika sekvenciranja genoma došlo je do raznih otkrića koja su potvrdila evoluciju i mijenjanje genetskog koda. 1970-ih pojavila se prva indikacija da genetski kod nije nepromijenjiv, kad je uočeno promijenjeno značenje stop kodona UGA u kodon za triptofan. Danas je poznato oko 20 varijacija standardnog genetskog koda. Pronađeni su različiti oblici genetskog koda u prokariotima, mitohondrijskom genomu i nuklearnom eukariotskom genomu.^{1,2}

Genetski kod definiran je specifičnom interakcijom kodona i antikodona na tRNA, te specifičnim povezivanjem tRNA s odgovarajućom aminokiselinom. Da bi se genetski kod promijenio, mora doći do promjene u genima koji kodiraju jednu ili više tRNA, na taj način mijenjajući antikodon. Takva promjena omogućuje ugradnju druge aminokiseline na mjesto ciljanog kodona, uz uvjet da aminoacil-tRNA-sintetaza i dalje prepoznaje promijenjenu tRNA. Nagle promjene u genetskom kodu imale bi katastrofalne posljedice za organizam. Zbog toga su promjene učestalije u sredinama gdje utječu na manji broj proteina, kao što je mitohondrij. Mitohondrijski genom je malen i kodira 10 do 20 proteina, no najviše varijacija genetskog koda pronađeno je upravo u mitohondrijskom genomu. Nasuprot tome, kod bakterija je poznata samo jedna varijacija u staničnom genomu. *Mycoplasma capricolum* koristi kodon UGA za triptofan. Neki eukarioti (protisti) mogu koristiti kodone UAA i UAG za glutamin.³

2.2. Translacija

Proces sinteze proteina naziva se translacija. To je složeni proces koji zahtijeva koordinaciju nekoliko stotina makromolekula, od kojih su najvažnije mRNA (messenger RNA), tRNA (transfer RNA) i ribosomi. Translacija se odvija u ribosomu, velikom supramolekulskom kompleksu građenom od dvije podjedinice. Bakterijski ribosom (70S) građen je od 30S male podjedinice i 50S velike podjedinice. Eukariotski citosolni ribosom je nešto veći (80S), a također se sastoji od male (40S) i velike (60S) podjedinice. Ribosomi su ribozimi, većinom (65%) građeni od rRNA, s manjim brojem proteina koji se nalaze uglavnom na površini. Katalitički mehanizam ribosoma nije potpuno razjašnjen, no danas je najprihvaćenija ideja da ribosom pozicionira supstrat na odgovarajući način, a da sam supstrat potpomaže katalizu. O važnosti ribosoma govori i činjenica da u *E.coli* čine oko 25% suhe tvari stanice, odnosno da jedna stanica *E.coli* sadrži oko 15 000 ribosoma.³ Na sintezu proteina troši se oko 90% kemijske energije koja se utroši u biosintetskim reakcijama.

Translacija je složeniji proces od transkripcije ili replikacije DNA jer zahtijeva prevođenje s jezika DNA – četiri nukleotida, na jezik proteina – 20 aminokiselina. Za takvo prevođenje (translaciju) potrebna je neka vrsta adaptora. F.Crick u svojoj hipotezi adaptora pretpostavlja da bi tu funkciju mogla obavljati neka mala nukleinska kiselina, kao što je RNA. Ta je hipoteza ubrzo potvrđena i danas je poznato da tu funkciju ima tRNA. tRNA na svojoj antikodonskoj petlji ima triplet nukleotida zvan antikodon koji prepoznaju odgovarajuće kodone na molekuli mRNA, a na svom 3' kraju ima mjesto na koje se može vezati odgovarajuća aminokiselina. 'Čitanjem' kodona na mRNA, tRNA pozicionira odgovarajuću aminokiselinu za ugradnju u rastući polipeptidni lanac, te tako sudjeluje u 'prevođenju' jezika nukleinskih kiselina u jezik proteina, odnosno povezuje kodon s njegovim značenjem. Za točnost translacije ključno je da tRNA bude aminoacilirana ispravnom aminokiselinom. Tu reakciju kataliziraju aminoacil-tRNA-sintetaze, a aminoacilirana tRNA se u principu više ne provjerava kad disocira s enzima. Ispravno prepoznavanje kodona i antikodona je također od iznimne važnosti. Mala podjedinica ribosoma sudjeluje u osiguravanju točnosti čitanja kodona mehanizmom molekuskog ravnala. Prve dvije baze kodona se na taj način provjeravaju i osigurava se njihovo sparivanje s odgovarajućim Watson-Crickovim parom baza antikodona. Čitanje treće baze kodona je fleksibilnije, što objašnjava teorija kolebljive

baze. Na taj način nekoliko različitih kodona određuje jednu aminokiselinu (na primjer, kodoni za alanin su GCU, GCC, GCG i GCA- razlikuju se samo u trećoj bazi kodona) i potreban je manji broj tRNA, jer jedna može prepoznati više kodona.

Translacija se može podijeliti u tri faze- inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Prije početka translacije mala i velika podjedinica ribosoma su odvojene. Kod bakterija, u fazi inicijacije dolazi do sklapanja inicijacijskog kompleksa. Na malu podjedinicu vežu se inicijacijski faktori IF-1 i IF-3, te mRNA. Shine-Dalgarno sekvenca omogućuje ispravno pozicioniranje mRNA, odnosno pozicioniranje start kodona (AUG) u P mjesto ribosoma. Vezanje inicijacijskog faktora IF-2 u kompleksu s GTP-om na 30S podjedinicu omogućuje vezanje inicijacijske tRNA- formilmetionil-tRNA koja prepoznaje start kodon i veže se u P mjesto. Zatim dolazi do hidrolize GTP-a, disocijacije inicijacijskih faktora i vezanja velike podjedinice. U fazi elongacije, elongacijski faktori, GTP-aze EF-G i EF-Tu omogućuju vezanje aminoaciliranih tRNA. Dolazi do nastajanja peptidne veze između rastućeg polipeptidnog lanca i odgovarajuće aminokiseline, te do translokacije- pomaka jednog kodona prema 3' kraju mRNA koji uzrokuje pomak peptidil-tRNA iz A u P mjesto ribosoma. Tako se deacilirana tRNA može pomaknuti u E mjesto ribosoma i izaći u citosol, što omogućuje vezanje sljedeće aminoacilirane tRNA. Pomak mRNA do stop kodona uzrokuje terminaciju- vezanje faktora otpuštanja (RF), hidrolizu veze između novonastalog polipeptidnog lanca i tRNA te rastavljanje i recikliranje kompleksa ribosoma, tRNA i mRNA. Sintetizirani polipeptidni lanac izlazi iz ribosoma kroz tunel u velikoj podjedinici u linearnom obliku. Smatanje proteina i druge posttranslacijske dorade ne odvijaju se na ribosomu.

2.3. Aminoacil-tRNA-sintetaze

2.3.1. Građa enzima

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) ključni su enzimi u translaciji i prijenosu genetičke informacije. Kataliziraju reakciju aminoaciliranja tRNA odgovarajućom aminokiselinom, ključan korak za ispravnost biosinteze proteina. 24 tipa aaRS mogu se podijeliti u dva strukturno različita razreda (I i II) sa sličnim katalitičkim mehanizmom. Razredi se razlikuju po građi aktivnog mjesta i katalitičke domene, no katalitička domena svih aaRS veže ATP, 3' kraj odgovarajuće tRNA te aminokiselinu.

Većina aaRS razreda I su monomeri, s N-terminalnom katalitičkom domenom, koja tvori strukturni motiv Rossmannove petlje, građen od paralelne β -ploče građene od 5 lanaca koji su

povezani α -zavojnica. Rossmannova petlja podjeljena je na dva dijela domenom koja kod nekih aaRS- izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS), valil-tRNA-sintetaze (ValRS) i leucil-tRNA-sintetaze (LeuRS), sadrži hidrolitičko aktivno mjesto za popravak pogreške, odnosno za hidrolizu pogrešno aminoaciliranih tRNA. Kod navedenih aaRS ta je umetnuta domena znatno veća nego kod drugih aaRS.

Kod većine aaRS razreda I tRNA se preko svog antikodona veže u C-terminalnu domenu, zauzimajući veliku površinu enzima, od mjesta vezanja antikodona, do aktivnog mjesta. Kod dimernih aaRS (TyrRS, TrpRS), tRNA se veže preko obje podjedinice. Na taj se način ostvaruju brojne interakcije enzima i supstrata koje omogućuju potreban visok stupanj specifičnosti.

Katalitička domena aaRS razreda II građena je od sedmerolančane β -ploče okružene α -zavojnica. Većina tih aaRS su homodimeri, no poznate su i monomerne te tetramerne α_4 i $(\alpha\beta)_2$ kvaterne strukture. Kod razreda II prisutna je veća strukturna raznolikost, što se očituje i u različitoj terciarnoj strukturi domena za popravak pogreške kod ThrRS, ProRS, AlaRS i PheRS. Unatoč raznolikosti, gotovo sve aaRS razreda II vežu tRNA na isti način.

aaRS razreda I i II vežu tRNA na različite načine što omogućuje specifičnost, odnosno razlikovanje tipova enzima. tRNA se na Rossmannovu petlju aaRS razreda I veže preko malog utora akceptorske peteljke, dok se kod razreda II veže preko velikog utora orijentiranog prema katalitičkoj domeni. Dimerne aaRS razreda I vežu tRNA preko velikog utora.⁴

2.3.2. Specifičnost prema supstratima

Budući da imaju ključnu ulogu u prijenosu informacije, aaRS moraju biti specifične pri vezanju i procesiranju supstrata. Važno je da vežu odgovarajuću aminokiselinu i tRNA. Specifičnost prema molekulama tRNA se lakše postiže, jer je tRNA velik supstrat koji s aaRS ostvaruje brojne interakcije i veliku dodirnu površinu. Odgovarajuća tRNA izabire se na temelju specifičnih interakcija ostvarenih između proteina i određenih nukleotidnih sljedova, te temeljem specifičnih interakcija koje nastaju zbog specifične konformacije šećer-fosfatne okosnice tRNA. Ponekad se za prepoznavanje koristi i terciarna struktura tRNA.

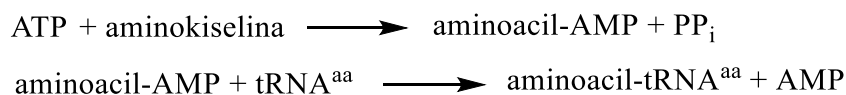
Razlikovanje aminokiselina je nešto teže jer su one znatno manji supstrati od tRNA, a među nekim od njih postoje samo male strukturne razlike. Posebno je teško razlikovati manje aminokiseline od supstratne, jer ne uzrokuju steričke smetnje na temelju kojih bi se isključile.

Zbog toga aaRS imaju domene za popravak pogreške koje im omogućuju visok stupanj točnosti u reakciji aminoaciliranja. Prva takva domena pronađena je u *E.coli*, kod izoleucil-tRNA-sintetaze (IleRS). Toj aaRS problem predstavlja valin, koji se od izoleucina razlikuje po samo jednoj metilenskoj skupini. Zbog toga, u prisutnosti valina, tvori valil-adenilat te ga hidrolizira u sintetskom aktivnom mjestu u katalitičkoj domeni. Također može hidrolizirati i Val-tRNA^{Ile}, u domeni za popravak pogreške.⁴ Danas je poznato deset aaRS čije domene za popravak pogreške imaju hidrolitičku aktivnost. Alanil-tRNA-sintetaza (AlaRS) i fenilalanil-tRNA-sintetaza (PheRS) su posebno zanimljive, jer ne mogu sterički isključiti aminokiseline veće od supstrate. Serin predstavlja problem AlaRS, a tirozin PheRS. Te se dvije pogrešno aminoacilirane tRNA zbog toga hidroliziraju u domeni za popravak pogreške odgovarajuće aaRS. Takve aaRS, koje imaju mogućnost popravka pogreške su veće i imaju kompleksniju te imaju fleksibilniju strukturu od drugih aaRS. Fleksibilnost strukture je nužna kako bi tRNA mogla putovati između aktivnog mjesta i domene za popravak pogreške.

Aminoacil-tRNA-sintetaze građene su tako da svoje supstrate vežu odvojeno. Unatoč tome vezanje jednog supstrata nije potpuno neovisno o vezanju drugog, što je dokazano proučavanjem glutaminil-tRNA-sintetaze (GlnRS) iz *E.coli*. Ustanovljeno je da promjena identitetnih elemenata tRNA mijenja K_m za glutamin. Također, vezanje pogrešne aminokiseline smanjuje afinitet za vezanje tRNA^{Gln}. Moguće je da su GlnRS i tRNA^{Gln} evoluirale tako da zajedno djeluju na povećanje specifičnosti prema glutaminu, te da identitetni elementi tRNA, uz to što omogućuju prepoznavanje molekule tRNA, pomažu u prepoznavanju odgovarajuće aminokiseline.⁴

2.3.3. Katalitički mehanizam

Reakcija koju kataliziraju aaRS odvija se u dva koraka. U prvom koraku pomoću ATP-a nastaje aminoacil-adenilatni intermedijer, kojeg u drugom koraku nukleofilno napada kisikov atom hidroksilne skupine s 3'-kraja tRNA.



Mehanizam te reakcije sličan je kod oba razreda aaRS, no postoje neke ključne razlike. AaRS razreda I kataliziraju aminoacilaciju direktno na 2'-OH skupinu tRNA, dok aaRS razreda II

(osim PheRS) kataliziraju aminoacilaciju na 3'-OH skupini. Mjesto aminoacilacije povezano je s orijentacijom tRNA, odnosno s načinom vezanja u aktivno mjesto enzima. Druga važna razlika je u koraku koji određuje brzinu reakcije. AaRS razreda I ograničene su brzinom disocijacije produkta, dok kod razreda II brzinu reakcije određuje vezanje aminoacilirane tRNA na enzim.

Osim ovih razlika, sve aaRS imaju zajednički katalitički mehanizam: u prvom koraku α -karbonilni kisikov atom aminokiseline napada α -fosfor kompleksa Mg-ATP te nastaje aminoacil-adenilatni intermedijer, uz otpuštanje pirofosfata. U drugom koraku 2' ili 3' hidroksilna skupina napada karbonilni ugljik adenilata te nastaje aminoacilirana tRNA i AMP.

Reakcija je termodinamički pogonjena hidrolizom pirofosfata anorganskom pirofosfatazom, budući da nastajanje veze aminoacil-tRNA zahtjeva cijepanje dviju visokoenergetskih, fosfoanhidridnih veza.⁴

2.4. Selenocistein i pirolizin

Neki organizmi uz 20 standardnih proteinogenih aminokiselina koriste i dvije dodatne, selenocistein i pirolizin. *Desulfotobacterium* kodira 22 aminokiseline, dok je kod *Acetohalobium arabaticum* primjećena promjena broja kodiranih aminokiselina ovisno o hranjivoj podlozi. Stanice koje su rasle na piruvatu kao jedinom izvoru energije kodirale su 20 aminokiselina, dok su u prisutnosti trimetilamina kodirale i pirolizin. To je jedini poznati organizam koji može mijenjati broj kodiranih aminokiselina u ovisnosti o okolišu te izvoru energije.⁵

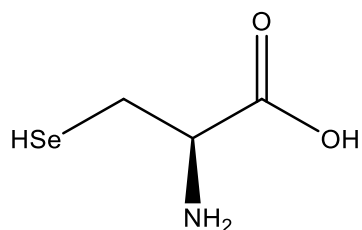
Selenocistein i pirolizin su nestandardne aminokiseline čija je ugradnja omogućena prirodnim proširivanjem genetskog koda. Budući da su obje aminokiseline kodirane stop kodonima, jedan su od dokaza evolucije genetskog koda. U različitim organizmima zadovoljavaju potrebu za raznolikošću proteina, uz ostale kotranslacijske i posttranslacijske modifikacije.

2.4.1. Selenocistein

Selenocistein je 21. proteinogena aminokiselina, analog cisteina koji umjesto sumpora sadrži selenij te gradi selenoproteine. 1980-ih godina otkriveno je da je kodon UGA odgovoran za ugradnju selenocisteina u protine mnogih vrsta, pa i ljudi.² Precizna sinteza selenoproteina

ključna je za razvoj i zdravlje organizama, jer je uočeno da se selenocistein često nalazi u aktivnom mjestu selenoproteina i odgovoran je za njegovu aktivnost.

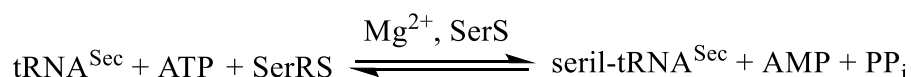
Budući da kodon UGA istovremeno određuje i ugradnju selenocisteina i terminaciju sinteze selenoproteina, biosintetska mašinerija za sintezu selenocisteina mora moći razlikovati stop-kodon od kodona za selenocistein. Mehanizam koji omogućuje razlikovanje uključuje slijed SECIS (eng. *Sec insertion sequence*) - strukturu ukosnice u 3'-netranslatiranoj regiji selenoproteinske mRNA kod eukariota, te protein SBP2 (eng. *SECIS binding protein 2*), koji vezanjem na SECIS stvara kompleks s posebnim elongacijskim faktorom SelB za Sec-tRNA^{Sec}. Elongacijski faktor SelB omogućuje ugradnju selenocisteina na ciljane UGA kodone namijenjene ugradnji selenocisteina. Ključnu ulogu u razlikovanju značenja UGA kodona ima udaljenost između kodona i slijeda SECIS. Kod bakterija, SECIS sekvenca se nalazi u neposrednoj blizini UGA kodona i dio je kodirajuće sekvence bakterijskih gena, što otežava inženjering novih selenoproteina.⁶



Slika 2. Selenocistein

2.4.2. Biosinteza selenocisteina

Selenocistein je jedina poznata proteinogena aminokiselina u eukariotima koja se sintetizira na svojoj tRNA. Biosinteza započinje aminoaciliranjem tRNA^{Sec} serinom u prisutnosti seril-tRNA-sintetaze, ATP-a i Mg²⁺.⁷



Sec sintaza (SelA kod bakterija, SepSecS kod arheja i eukariota) je enzim koji sintetizira selenocistein koristeći piridoksal-fosfat kao prostetičku skupinu. Kod bakterija, enzim interagira sa seril-tRNA^{Sec}, miče hidroksilnu skupinu serina, te nastaje intermedijer dehidroalanil-tRNA. Intermedijer zatim reagira s aktiviranim donatorom selenija, te nastaje selenocisteil-tRNA. Donor selenija kod bakterija i eukariota je selenofosfat. Eukarioti imaju sličan mehanizam sinteze u kojem sudjeluje dodatni intermedijer O-fosfoseril-tRNA. O-

fosfoseril-tRNA nastaje u reakciji kataliziranoj O-fosfoseril-tRNA-kinazom. SepSec-sintaza zatim djeluje na fosfoseril-tRNA i nastaje dehidroalanil-tRNA. Reakcijom sa selenofosfatom, nastaje selenocisteil-tRNA^{Sec}. U *E.coli* selenofosfat nastaje reakcijom selenida i ATP-a kataliziranoj selenofosfat sintetazom (SelD).

tRNA^{Sec} je najduža poznata tRNA s produženom akceptorskom peteljkom koja nastaje zbog neuobičajenog djelovanja RNaze P. Svojom strukturom tRNA^{Sec} se znatno razlikuje od kanonskih tRNA.⁸ Otkrivena je 1970. godine i klasificirana kao sporedni izoakceptor tRNA^{Ser} koji dekodira UGA kodon. Daljnja istraživanja pokazala su da tRNA^{Sec} postoji u dvije izoforme koje se razlikuju u jednoj metilnoj skupini, te da posjeduje brojna specifična svojstva. Transkribira se drugačije od svih poznatih tRNA jer njena transkripcija započinje na prvom nukleotidu kodirajuće sekvence. Od drugih tRNA razlikuje se i po tome što ima slijed nukleotida dugačak 90 nukleotida, te njena sekundarna struktura odstupa od oblika djeteline. Specifična je i po tome što sudjeluje u reakciji O-fosfoseril-tRNA-kinaze.⁷

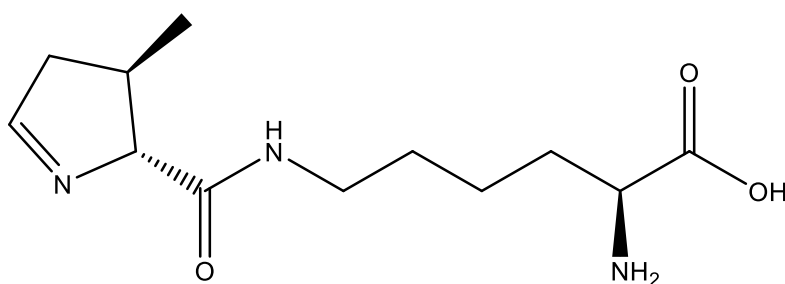
2.4.3. Prolizin

Prolizin je 22. proteinogena aminokiselina, esencijalna u metabolizmu trimetilamina nekih metanogenih arheja,² a pojavljuje se i kod nekih bakterija. Kodira je stop kodon UAG, a u proteine se ugrađuje pomoću prolizil-tRNA-sintetaze (PylRS). PylRS je homodimerni enzim koji katalizira nastajanje Pyl-tRNA^{Pyl} mehanizmom zajedničkim svim aminoacil-tRNA-sintetazama. Monomer enzima se može podijeliti na N- i C- terminalne domene, koje su ovisno o organizmu, kodirane jednim ili dva gena. Struktura N-terminalne domene nije poznata, no struktura C-terminalne domene određena je za bakterijski i arhejski enzim. C-terminalna domena sadrži katalitičku srž enzima, građenu od antiparalelnih β -ploča okruženih α -zavojnica, što je svojstveno aaRS razreda II. Iz bakterijskog kompleksa PylRS-tRNA^{Pyl} vidljivo je da se na jednu molekulu enzima vežu dvije molekule odgovarajuće tRNA, odnosno da se na svaki monomer veže jedna. Prepoznavanje molekule tRNA omogućeno je kroz interakciju enzima i elemenata identiteta tRNA te kroz prepoznavanje karakteristične tercijarne strukture tRNA^{Pyl}. PylRS ne interagira direktno s antikodonom tRNA^{Pyl}.

U organizmima koji koriste prolizin, tri proteina sudjeluju u njegovoj sintezi koja obuhvaća transformaciju lizina u prolizin. U prvom koraku PylB katalizira nastajanje (3R)-3-metil-D-ornitina iz lizina. On se zatim, pomoću PylC veže na N^e-amino skupinu druge molekule lizina, te nastaje L-lizin-N^e-(3R)-metil-D-ornitin. Taj se intermedijer u posljednjem

koraku oksidira do pirolizina u reakciji kataliziranoj enzimom PylD. Sintetizirani pirolizin se pomoću PylRS veže na tRNA^{Pyl}. Pirolizin se u veznom mjestu PylRS prepoznaje uglavnom pomoću hidrofobnih (nespecifičnih) interakcija, što objašnjava činjenicu da PylRS može koristiti različite aminokiselinske supstrate u reakciji aminoaciliranja. Enzim može koristiti različite supstrate koji posjeduju karbamat, te amidnu ili karbonilnu skupinu i mogu se pravilno orjentirati u veznom mjestu.

Obrtni broj PylRS je za oko tri reda veličine manji nego prosječni obrtni broj aaRS za standardne aminokiseline, što može biti povezano s činjenicom da se pirolizin translacija 3000 puta rjeđe od standardnih aminokiselina. Unatoč tome što nije jako dobar katalizator, PylRS je zbog svojih svojstava važna u eksperimentima proširivanja genetskog koda. Budući da može koristiti različite supstrate (one koji posjeduju karbamat, amidnu ili karbonilnu skupinu), njome je ugrađeno više od 100 različitih nestandardnih aminokiselina. Također je praktično što PylRS ne prepoznaje molekule tRNA temeljem njihovog antikodona, pa se bilo koji kodon može iskoristiti za ugradnju nestandardne aminokiseline. Kako enzim može koristiti supstrate u kojima je pirolinski prsten zamijenjen nekom drugom, sličnom skupinom, PylRS je posebno pogodna za ugradnju analoga lizina jer za to nije potrebna izmjena aktivnog mjesta. Uz analoge lizina može ugrađivati i različite analoge fenilalanina.⁹



Slika 3. Pirolizin

2.5. *In vivo* ugradnja nestandardnih aminokiselina

Zbog raznolikosti funkcija, proteini zahtijevaju visok stupanj kemijske kompleksnosti struktura, što se očituje u velikom broju posttranslacijskih modifikacija i potrebi za

kofaktorima. Proširivanje genetskog koda nestandardnim aminokiselinama omogućuje dodatnu raznolikost u građi i funkciji proteina.

Da bi se nova aminokiselina mogla dodati u genetski repertoar potreban je kodon koji specifično označava tu aminokiselinu. U početku se koristila redundantnost genetskog koda za *in vitro* ugradnju nestandardnih aminokiselina na specifično mjesto. Korištenjem UAG stop kodona i kemijskim aminoaciliranjem supresorske tRNA željenom aminokiselinom, ugrađene su brojne nestandardne aminokiseline. Ugradnja nestandardnih aminokiselina omogućila je ispitivanje utjecaja bočnih ogranaka na strukturu i funkciju proteina, te na njihov katalitički mehanizam. U početku su korišteni sustavi bez stanica, no napretkom tehnologije i inženjersvom translacijskih sustava omogućena je *in vivo* ugradnja nestandardnih aminokiselina. Za *in vivo* ugradnju potrebno je uvesti neke promjene u sustave za biosintezu proteina stanice, što je vidljivo već i kod ugradnje selenocisteina i pirolizina, iako su to dvije nestandardne aminokiseline čija je ugradnja omogućena prirodnim proširivanjem genetskog koda. Nestandardne aminokiseline mogu se podijeliti u dvije skupine: aminokiseline izostrukturne standardnim aminokiselinama koje prepoznaju translacijski sustavi stanice i ortogonalne aminokiseline koje se ne translatairaju na klasičan način. Zbog tih strukturnih razlika te kako bi se omogućila ciljana, odnosno nasumična ugradnja, postoje dva načina za *in vivo* ugradnju nestandardnih aminokiselina.

Izostrukturne nestandardne aminokiseline ugrađuju se metodom ugradnje putem selektivnog pritiska na nasumično mjesto u proteinu, korištenjem auktotrofnih sojeva za proteinogene aminokiseline izostrukturne onim nestandardnim aminokiselinama koje se žele ugraditi. Određena endogena tRNA može se aminoacilirati željenom aminokiselinom, sterički sličnom supstratu enzima. Koriste se standardni kodoni, no onemogućuje se ugradnja standardne aminokiseline korištenjem auktotrofnog soja bakterije. Najpoznatiji primjer takve ugradnje je selenometionin, koji se ugrađuje pomoću metionil-tRNA-sintetaze i odgovarajuće tRNA^{Met}, a može gotovo kvantitativno zamijeniti metionin u stanicama korištenih auktotrofnih sojeva koji ne sintetiziraju metionin.¹

Ortogonalne nestandardne aminokiseline ugrađuju se na točno određeno mjesto pomoću ortogonalnog para aaRS-tRNA, metodom supresije stop kodona. Za ugradnju nestandardne aminokiseline potreban je kodon koji ne kodira niti jednu od 20 standardnih aminokiselina, a tome mogu poslužiti stop kodoni ili kvadrupletni kodoni. Željeni kodon može se ugraditi na bilo koje mjesto u primarnoj strukturi, što omogućuje ugradnju

nestandardne aminokiseline na točno određeno mjesto u proteinu. Za razliku od metode ugradnje putem selektivnog pritiska, kod metode supresije stop kodona nužno je da aaRS i tRNA funkcioniraju neovisno o endogenom aminoacilacijskom sustavu stanice, te da su ortogonalne. Ortogonalnost se očituje u tome što aaRS ne aminoacilira druge, endogene tRNA, a ciljana tRNA nije supstrat drugih aaRS. Taj idealni slučaj se teško postiže jer ciljana (inženjerska) tRNA zadržava svoju tercijernu strukturu i ima mali broj nukleotidnih identitetnih elemenata pa može interagirati s drugim aaRS. Promjenom identitetnih elemenata tRNA lako postane supstrat neke druge endogene aaRS.⁹ Problem se može riješiti korištenjem translacijskih sustava iz drugih domena. Također je važno da novosintetizirana ili ugrađena nestandardna aminokiselina bude stabilna i otporna na stanične enzime, te da nije toksična. Najveći problem koji se pojavljuje pri korištenju nestandardnih aaRS je velik gubitak njihove enzimatske aktivnosti, čak i s aminokiselinama koje su vrlo slične pravom supstratu. Problem predstavlja i lošija kompatibilnost para nestandardne aminokiseline i njene tRNA s elongacijskim faktorom Tu i ribosomom. Zbog gubitka enzimatske aktivnosti nestandardnih aaRS, prilikom sinteze proteina s nestandardnim aminokiselinama, dolazi do kompeticije sa staničnim aminoaciliranim tRNA čiji je antikodon sličan ciljanom, što smanjuje uspješnost sinteze.

Razvijeni su mnogi ortogonalni parovi, no do nedavno najčešće korišten je ortogonalni par baziran na TyrRS iz *Methanocaldococcus jannaschii*. Danas se sve više koristi PylRS iz *Methanosarcinaceae* u paru sa svojom supresorskom tRNA. Taj ortogonalni par pokazuje veću toleranciju prema različitim supstratima te može koristiti različite antikodone (UAG, UAA, UGA, UAGA) bez uvođenja dodatnih promjena na tRNA^{Pyl}, što omogućuje ugradnju većeg broja nestandardnih aminokiselina. Metoda supresije stop kodona omogućuje ugradnju nestandardnih aminokiselina na točno određeno mjesto u proteinu. Na taj se način struktura proteina minimalno mijenja, što omogućuje njeno detaljno i precizno proučavanje. Korištenjem nestandardnih aminokiselina mogu se proučavati i protein-protein interakcije.

Ograničenje metode supresije stop kodona su faktori otpuštanja (RF) koji uzrokuju terminaciju translacije na ribosomu. Kompetiraju s tRNA i dovode do nastajanja smjese djelomično i potpuno sintetiziranih proteina. Nadalje, umetanje stop kodona u mRNA može uzrokovati promjene u energiji smatanja i utjecati na vezanje i interakciju mRNA s ribosomom. Također može doći do promjene okvira čitanja, što može onemogućiti ispravnu sintezu cijelog polipeptidnog lanca.^{1,10}

Ugradnja jedne nestandardne aminokiseline na jedno mjesto u proteinu omogućuje istraživanje specifičnog problema, kao što je interakcija liganda i receptora, no jedna nestandardna aminokiselina ugrađena na samo jednom mjestu u proteinu nema velik biotehnološki značaj. Zbog toga je potrebno paralelno ugrađivati više nestandardnih aminokiselina u protein. U prvom takvom provedenom eksperimentu korištene su kombinacije ortogonalnih parova TyrRS iz *Methanocaldococcus jannaschii* i PylRS iz *Methanosarcina mazei*. Time je omogućena simultana zamjena značenja *amber* (UAG) i *ochre* (UAA) kodona. Daljnju prenamjenu kodona metodom supresije stop kodona onemogućuju faktori otpuštanja i pomak okvira čitanja. Nasuprot tome, metoda inkorporacije selektivnim pritiskom omogućuje ugradnju tri ili više nestandardnih aminokiselina u protein bez smanjenog iskorištenja. Paralelnom ugradnjom homopropargilglicina, 4-azatriptofana i (4s)-fluoroprolina dobiven je funkcionalni protein. Također, dobivena je aktivna fluorirana lipaza s 24 promijenjene aminokiseline.¹⁰ Takvi funkcionalni proteini s više ugrađenih nestandardnih aminokiselina mogu se dobiti korištenjem kombinacije ovih dviju metoda.

Budući da najveći problem ugradnji nestandardnih aminokiselina predstavljaju faktori otpuštanja, najjednostavnije rješenje tog problema bilo bi korištenje soja bakterija u kojem je inaktivirana sinteza faktora otpuštanja. Uklanjanje RF1 iz *E.coli* uklonilo bi kompeticiju supresorske tRNA koja čita UAG kodon i tog faktora otpuštanja prilikom translacije. Gen *prfA* koji kodira RF1 esencijalan je u *E.coli* pa jednostavno uklanjanje RF1 nije moguće. Potpuno uklanjanje RF1 postignuto je uvođenjem mutantnog faktora otpuštanja RF2 koji nadoknađuje gubitak RF1, te korištenjem visoko-protičnih metoda kojima su UAG kodoni zamijenjeni UAA kodonima. U drugom pristupu TAG kodoni u esencijalnim genima zamijenjeni su TAA kodonima, te je uveden ortogonalni par za UAG. Na taj način omogućena je ekspresija glutation-S-transferaze s različitim nestandardnim aminokiselinama na sedam pozicija UAG kodona. Uklanjanje RF1 ne utječe znatno na ugradnju jedne nestandardne aminokiseline, no znatno olakšava paralelnu ugradnju više različitih nestandardnih aminokiselina u jedan polipeptidni lanac.^{10, 11}

Za *in vivo* paralelnu ugradnju više različitih nestandardnih aminokiselina potrebno je više kodona bez značenja. Taj problem bi se mogao riješiti uvođenjem kvadrupletnih kodona ili 'oslobađanjem' postojećih tripletnih kodona. Potpunim uklanjanjem RF1 kodon UAG oslobađa se svog značenja i može se koristiti za ugradnju neke nestandardne aminokiseline. Na isti način bi se i drugi rijetki kodoni mogli prenamjeniti. Zbog degeneriranosti genetskog

koda, 30 do 40 kodona je organizmu dovoljno za kodiranje genetske informacije. Svi ostali kodoni mogli bi se prenamjeniti.² Uvođenje kvadrupletnih kodona predstavlja problem jer se oni transliraju lošije od tripletnih kodona te mogu uzrokovati pomak okvira čitanja.

Bolji rezultati i veći prinos nosivih proteina dobiveni su korištenjem većeg broja supresorskih tRNA, optimizacijom nestandardnih aminoacil-tRNA za bolje vezanje elongacijskog faktora Tu (EF-Tu), te povećanom ekspresijom aaRS. Za daljnje poboljšanje metoda i veće prinose sintetiziranih proteina potrebni su novi ortogonalni parovi.⁶ Potrebno je i bolje istražiti posttranskripcijske modifikacije tRNA, jer one mogu utjecati na efikasnost i sposobnost dekodiranja aminoacil-tRNA.²

Jedna od metoda za ugradnju nestandardnih aminokiselina je i promjena značenja kodirajućeg kodona (eng. *sense codon reassignment*), koja uključuje uklanjanje endogenih translacijskih komponenti (tRNA, aaRS) i zamjene kodona kojeg želimo promijeniti sinonimnim kodonima kroz cijeli kromosom ili esencijalne gene. Za razliku od metode supresije stop kodona, kod koje uvijek postoji kompeticija s originalnim značenjem kodona, kod metode koja mijenja značenje kodirajućeg kodona dolazi do potpunog uklanjanja značenja i funkcije određenog kodona. Provedeno je istraživanje u kojem je rijedak kodon za arginin, AGG, promijenjen u kodon za L-homoarginin i L-N⁶-(1-iminoetil)lizin korištenjem ortogonalnog para PyIRS-tRNA^{PyI}. Takva zamjena je najvjerojatnije bila moguća jer su obje uvedene nestandardne aminokiseline slične argininu. Stanice mogu preživjeti uklanjanje rijetkog AGG kodona ako je on u svim esencijalnim genima zamijenjen sinonimnim kodonima.¹

Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine može omogućiti stvaranje novih proteina s različitim korisnim svojstvima. Takvi proteini mogli bi naći različite primjene. Mogli bi se koristiti za istraživanja prijenosa signala u stanici, te u medicini, za stvaranje fosfoproteina koji bi se mogli koristiti kao markeri za tumore. Proučavanje protein-protein interakcija korištenjem nestandardnih aminokiselina može biti značajno za istraživanje Alzheimerove bolesti, infekcija virusom HIV te velikog broja tumora.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. C. G. Acevedo-Rocha, N. Budisa, *Microb. Biotechnol.* **9** (2016) 666-667.
2. P. O'Donoghue, J.Ling, Y.Wang, D.Söll, *Nat. Chem. Biol.* **9** (2013) 594-598.
3. D.L.Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed., W.H Freeman and Company, New York, 2013., 1103-1115.
4. J.J.Perona, I.Gruić-Sovulj, *Top. Curr. Chem.* **344** (2013) 1-41.
5. L. Prat, I. U. Heinemann, H. R. Aerni, J. Rinehart, P. O'Donoghue, D. Söll. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (2012) 21070–21075.
6. C. Miller, M.J. Bröcker, L. Prat, K. Ip, N. Chirathivat, A. Feiock, M. Veszprémi, D. Söll, *FEBS Lett.* **17** (2015) 2194-2199.
7. A.A. Turanov, X.Xu, B.A.Carlson, M.Yoo, V.N. Gladyshev, D.L.Hatfield, *Adv. Nutr.* **2** (2011) 122-128.
8. J. Yuan, P. O'Donoghue, A. Ambrogelly, S. Gundllapalli, R.L. Sherrer, S.Palioura, M. Simonović, D. Söll, *FEBS Lett.* **2** (2010) 342-349.
9. A.Crnković, T.Suzuki, D.Söll, N.M.Reynolds, *Croat. Chem. Acta.* **89** (2016) 163-174.
10. M. G Hoesl, N.Budiša, *Curr. Opin. Biotechnol.* **23** (2012) 751-757.
11. Y. Zheng, M. J. Lajoie, J. S. Italia, M. A. Chin, G. M. Church, A. Chatterjee, *Mol. Biosyst.* **12** (2016) 1746-1749.