

Život 2.0

Pendelić, Robert

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:217:308123>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ŽIVOT 2.0

LIFE 2.0

SEMINARSKI RAD

Robert Pendelić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. MINIMALNA STANICA	3
2.1. Najjednostavniji postojeći genom?	3
2.2. Put do prve sintetske stanice	3
2.3. Dizajn i sinteza minimalnog bakterijskog genoma	6
3. OD MANJIH STANICA PREMA VEĆIM.....	8
4. GENOM I GENETIČKI KOD.....	9
4.1. Kompresija genetičkog koda	9
4.2. Uvođenje novih aminokiselina u genetički kod	12
4.3. Sintetski parovi baza i nukleinske kiseline	14
5. PRIMJENE	17
6. LITERATURA	18
7. SAŽETAK	21
8. SUMMARY	21

1. UVOD

Biologija je znanost koja se bavi proučavanjem života i živih organizama, a sintetska biologija je grana biologije koja se pretežito fokusira na inženjerstvo i konstrukciju sintetskog života. U obje se definicije koristi pojam život. Većina ljudi intuitivno razlikuje živo od neživog, ali što je to zapravo život? Postoji li neka definicija ili pravilo što čini život? Razni znanstvenici i filozofi još od davnina nastoje odgovoriti na ta pitanja na različite načine, ali neuspješno. Potpuno ispravna, sveopće prihvaćena i praktična definicija života još uvijek ne postoji. Za sad je najbliže tome NASA sa definicijom: „Život je samoodrživi sustav sklon načelima Darwinističke evolucije.“ (www.khanacademy.org) koja se ponekad koristi u znanstvene svrhe. Život je teško definirati jer, filozofski gledano, to nije jednostavna tvar poput vode, već proces, više poput vatre, a jednostavne definicije vatre također nema (McKay 2014). Osim toga, jedini život za koji se zasad zna je ovaj na Zemlji što dodatno otežava stvari.

Za stanicu se često kaže da je osnovna jedinica života, o čemu se dosta debatira je li istinita tvrdnja ili ne (O'Malley i Müller-Wille, 2010). Ako je stvarno tako, onda je život definiran onime što stanicu održava živom – njenim genom koji djeluje kao operativni sustav stanice i određuje sve njene karakteristike. Stoga će se potencijalno daljnjim istraživanjima o genomima moći bolje definirati i objasniti porijeklo života.

Uz iznimku genoma nekih virusa, genomi su uglavnom dugačke dvolančane molekule DNA. Oba lanca DNA sastoje se od velikog broja dušičnih baza uronjenih u šećerno-fosfatnu okosnicu – takva struktura DNA je visoko konzervirana. Dušične baze dvaju lanaca se međusobno sparuju tvoreći bazne parove (bp) gvanin-citozin (GC) i adenin-timin (AT). Dakle, čitav genom je baziran na samo četiri slova, ali pitanje je zašto – zašto baš samo tih četiri? Postoji li više baznih parova i, ako da, mogu li se koristiti za proširenje genetičkog koda? Teško je, možda i nemoguće, dati odgovor na prvo pitanje, ali, zahvaljujući dugogodišnjim istraživanjima, ne i na preostala dva.

U području sintetske biologije, sintetska stanica je ona koja je kompletno stvorena sintezom abiotskih komponentni. Nju se smatra živom ako ona raspolaže energijom, održava ionski gradijent, sadrži makromolekule, pohranjuje informacije i sklona je mutiranju (Dreamer 2015). Tako stvoreni život se smatra umjetnim, tj. sintetskim. Ideja sintetskog života postoji barem od 4. stoljeća pr. Kr. kada je iznesena u Aristotelovoj knjizi *Generation of Animals*, a otkrićima 20. i 21. stoljeća se sve više pretvara u realnost (McCarty 2018). Trenutni vrhunac je dizajn i kreacija

sintetskog genoma koji, ubačen u stanicu, održava stanicu živom. Iako su takve stanice referirane kao sintetske, mnogi ističu da nije tako jer je genom jednostavno ubačen u već postojeću živu stanicu (Pennisi 2010), zbog čega se koristi opći termin život 2.0.

Dok se genetičko inženjerstvo temelji samo na manipulaciji gena organizama, mogućnosti koje sintetska biologija pruža su daleko iznad toga, a metode koje koristi puno radikalnije. Zato se gotovo svaki životni oblik dobiven tehnikama sintetske biologije svrstava pod termin život 2.0. Poanta je da se radi o životu, ali ne onakvom s kakvim smo dosad upoznati. (www.economist.com)

Cilj rada je predstaviti čitatelju ideju drugačijeg oblika života, prolaskom kroz neka dosadašnja otkrića te raznih prošlih, trenutnih i budućih pitanja, ideja, planova i mogućnosti na području sintetske biologije.

2. MINIMALNA STANICA

Prvi potpuno sekvencirani genom nekog samoreplicirajućeg organizma je genom bakterije *Haemophilus influenzae* Rd 1995. godine (Fleischmann i sur. 1995). Ovo je otkriće dovelo do novih znatiželja za dodatnim razumijevanjem genetičke informacije i pitanjima poput: „Tvoriti li taj genom potpuni genetički sustav? Ako da, može li se on kemijskom sintezom reproducirati?“ i „Koji od tih gena su esencijalni za život?“ Povodom toga su John Craig Venter i njegov tim iste godine započeli potragu za minimalnom stanicom koja bi sadržavala samo esencijalne gene.

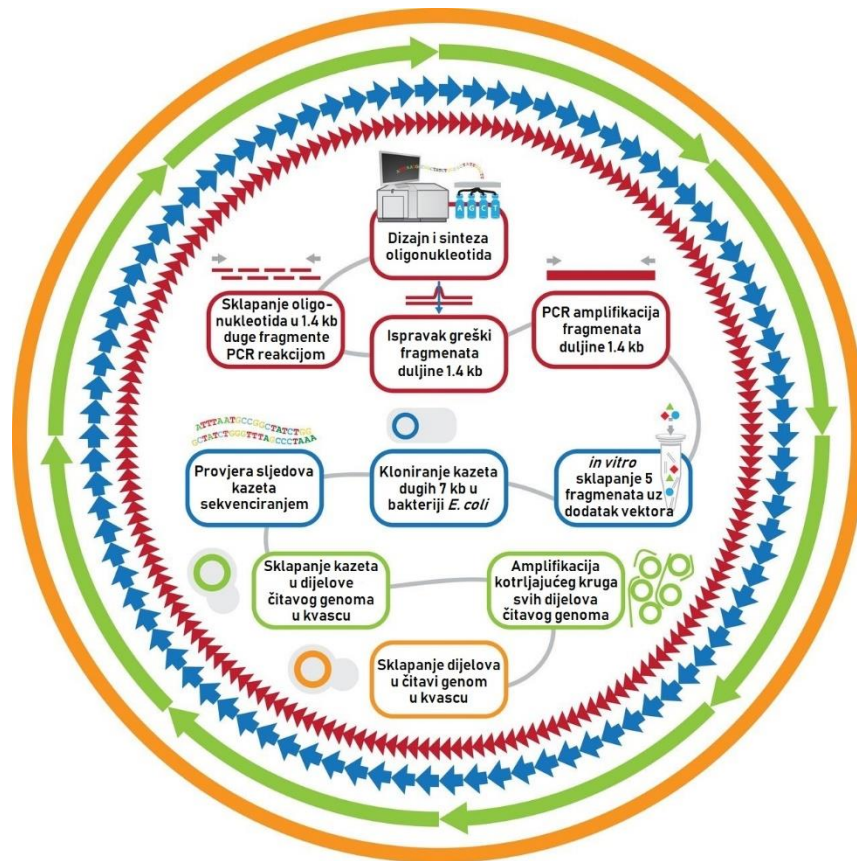
2.1. Najjednostavniji postojeći genom?

1995. godine je sekvenciran genom bakterije *Mycoplasma genitalium* koji ima 580 070 bp i sadrži 525 gena. Riječ je o genomu koji sadrži najmanji broj gena bilo kojeg autonomnog organizma (Fraser i sur. 1995). Međutim, poslije se inaktivacijom tih gena jedan po jedan otkrilo da njih otprilike 100 nisu esencijalni pri optimalnim laboratorijskim uvjetima (Hutchison i sur. 1999, Glass i sur. 2006). To upućuje da je moguća minimalna stanica jednostavnija od bilo koje prirodne autonomne stanice. Za daljnje pojednostavljivanje genoma se pojavljuje ideja sinteze reduciranih genoma *M. genitalium* i njihova transplantacija u stanice u svrhu testiranja njihove sposobnosti da održe stanicu živom (Gibson i sur. 2008).

2.2. Put do prve sintetske stanice

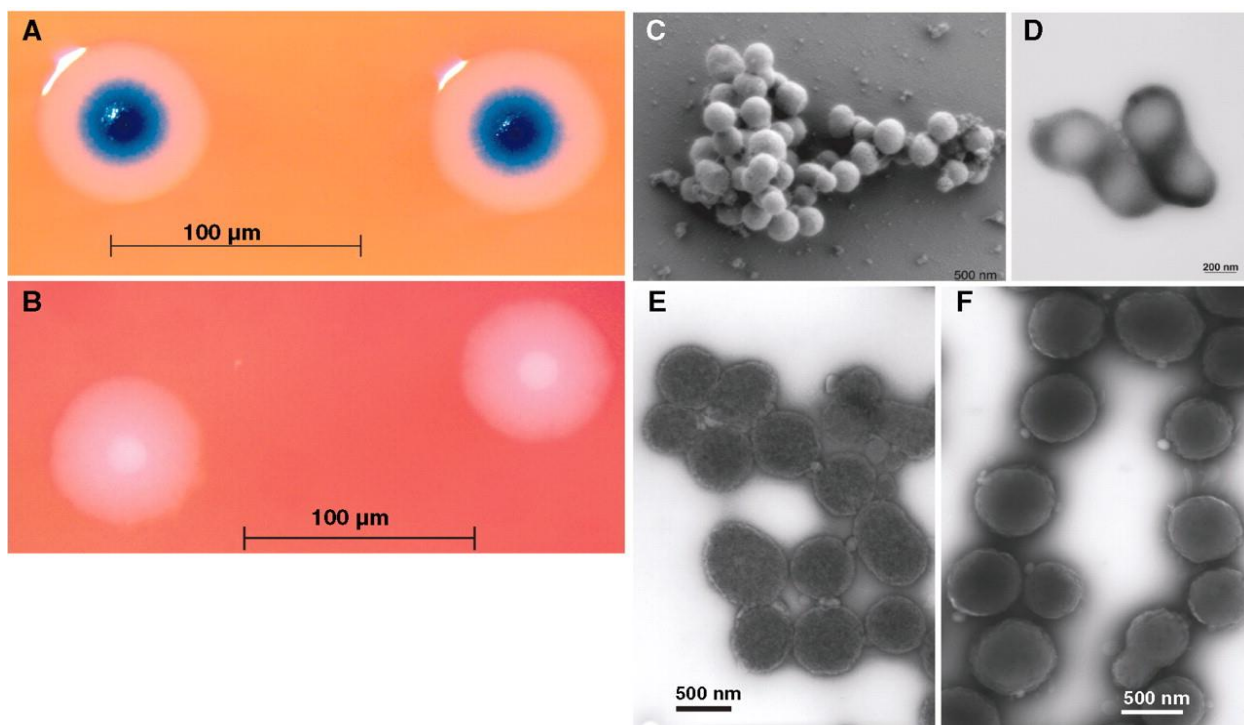
2003. godine je objavljena metoda kojom se mogu pouzdano sintetizirati lanci DNA dugi 5 - 6 kilobaza (kb) što je do tad predstavljalo problem u sintezi DNA lanaca duljih od nekoliko stotina baza (Smith i sur. 2003). Poboljšanja i modifikacije ove metode su omogućile znanstvenicima da 5 godina nakon kemijski sintetiziraju, sklope i kloniraju genom bakterije *M. genitalium* u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (Sl. 1). Kako bi se općenito genomi prepoznali kao sintetski, odlučeno je u njih ugraditi po nekoliko „vodenih žigova“, odnosno specifičnih sljedova nukleotida koji se mogu prepoznati sekvenciranjem (Gibson i sur. 2008). Tim eksperimentom je nadvladana jedna od dviju prepreka za stvaranje sintetske stanice.

Druga prepreka je bila problematika transplantacije tako kemijski sintetiziranog genoma u stanicu. Prvi korak u rješavanju ovoga problema bio je otkriti kako zamijeniti genom jedne bakterijske stanice genomom druge. To je ostvareno 2007. godine kada je objavljen rad o uspješnoj transformaciji genoma *Mycoplasma mycoides* u stanicu *Mycoplasma capricolum*. Transformacija je rezultirala stanicama koje su fenotipski identične stanicama donora genoma *M. mycoides* (Lartigue i sur. 2007). Međutim, DNA se u kvascu *S. cerevisiae* drugačije modificira nego u bakterijskim stanicama. Zbog toga bi sintetski bakterijski genom (sklopljen i umnožen u kvascu), ubačen u akceptorske stanice mikoplazme, bio podložan bakterijskim restrikcijским endonukleazama, enzimima koji cijepaju DNA na specifičnim mjestima. Kako bi se sintetski genom pripremljen u kvascu prilagodio za unos u bakterijsku stanicu, 2009. je godine opisan niz koraka, među kojima je jedan od važnijih DNA metilacija *in vitro* (Lartigue i sur. 2009).



Slika 1. Shematski prikaz sinteze čitavog sintetskog genoma. Dizajnirani su preklapajući oligonukleotidi, kemijski sintetizirani i sklopljeni u fragmente duljine 1.4 kb (crveno). Nakon ispravka krivo ugrađenih nukleotida i PCR amplifikacije, po pet fragmenata se sklope *in vitro*, tvoreći kazete duljine 7 kb (plavo). One se provjere sekvenciranjem i zatim sklapaju u kvascu, tvoreći dijelove (na slici osmine) cjelokupnog genoma (zeleno). Svi dijelovi podliježu amplifikaciji kotrljajućeg kruga (eng. *rolling circle amplification*, RCA), a zatim se sklapaju u kvascu, tvoreći kompletni genom (narančasto). (Preuzeto i prilagođeno iz Hutchison i sur. 2016)

Koristeći stečeno znanje iz navedenih eksperimenata, znanstvenici su se uputili u provedbu ideje stvaranja prve sintetske stanice. Plan je bio koristiti bakteriju *M. genitalium*, ali pošto je njihova brzina rasta spora, odlučeno je koristiti bakterije *M. mycoides* i *M. capricolum* koji imaju znatno brži rast. Tako je 2010. objavljen rad kojim je opisan dizajn, sinteza i sklapanje genoma *M. mycoides* (Sl. 1) veličine 1,08 mega-baznih parova (Mbp) i njegova transplantacija u stanice *M. capricolum*. Te stanice pokazuju očekivana fenotipska svojstva *M. mycoides* (Sl. 2), sposobne su replicirati se i upravljati im ubačeni sintetski genom (Gibson i sur. 2010). Time je na John Craig Venter institutu (JCVI) stvorena prva sintetska stanica zbog čega je dobila naziv *M. mycoides* JCVI-syn1.0.



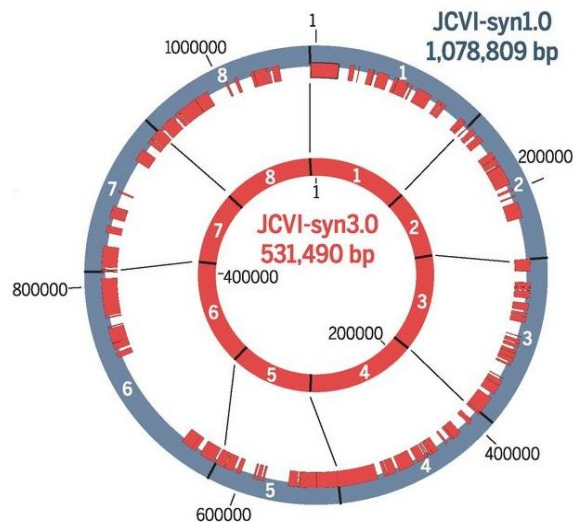
Slika 2. Slike *M. mycoides* JCVI-syn1.0 i divljeg tipa *M. mycoides*. Za usporedbu njihovih fenotipova, proučavana je morfologija njihovih kolonija nasadenih na SP4 agar koji sadrži X-gal. (A) 3 dana nakon nasađivanja, JCVI-syn1.0 kolonije su plave jer sadrže *lacZ* gen i ekspimiraju β -galaktozidazu, koja pretvara X-gal u spoj plave boje. (B) Stanice divljeg tipa ne sadrže *lacZ* i njihove kolonije ostaju bijele. Kolonije oba tipa stanica imaju morfologiju prženog jaja karakterističnog za većinu mikoplazmi. Skenirajućim (C) elektronskim mikroskopom (EM) i tehnikom negativnog bojanja transmisijskim (D) EM su dobivene slike JCVI-syn1.0 stanica. Za usporedbu morfologija, korištene su elektronske mikroskopske slike JCVI-syn1.0 stanica (E) i stanica divljeg tipa (F). Obje stanice pokazuju istu jajoliku morfologiju i opći izgled.

(Preuzeto i prilagođeno iz Gibson i sur. 2010)

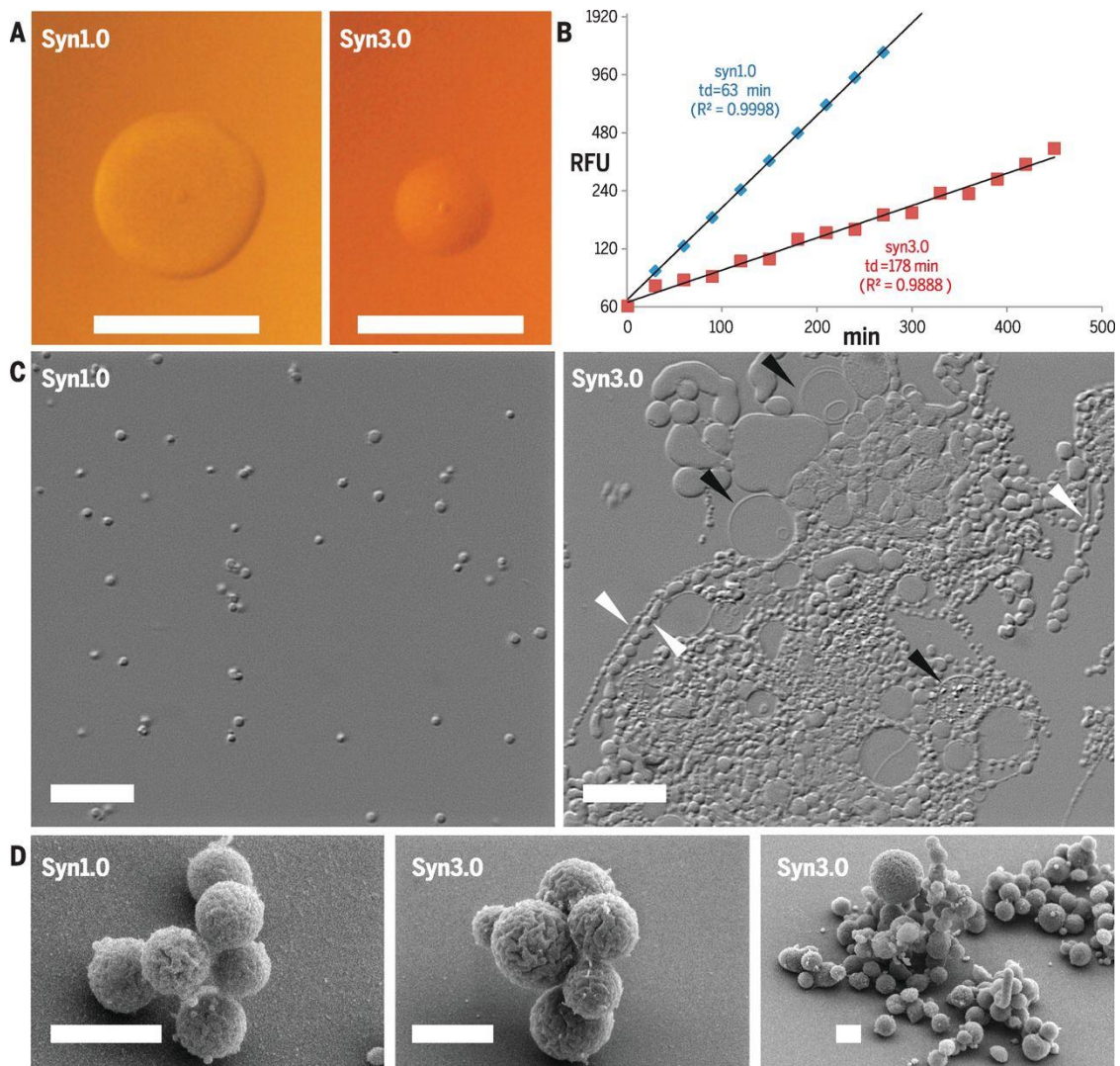
2.3. Dizajn i sinteza minimalnog bakterijskog genoma

Svi ovi projekti su vodili ka stvaranju minimalne stanice kako bi se razumjela molekularna i biološka funkcija svih njenih gena u svrhu bolje spoznaje o životu. Jedini preostali korak je bio reducirati genom, odnosno ukloniti sve suvišne gene, novostvorenog sintetskog soja JCVI-syn1.0. Za to je korištena strategija dizajniraj-izgradi-testiraj (DIT) u čijem se svakom ciklusu koristi transpozonska mutagenaza za utišavanje gena. Time se razaznalo koji se geni mogu potencijalno ukloniti nakon čega se nastojalo izgraditi takav ili sličan reducirani genom i zatim ga testirati transplantacijom u stanice. Znanstvenici su nakon tri takva ciklusa dobili prvu sintetsku minimiziranu stanicu sa genomom manjim od onoga iz bakterije *M. genitalium*. Nazvana je JCVI-syn2.0 i ima 515 gena. Međutim, vrhunac je dostignut četvrtim ciklusom kojim je dobiven JCVI-syn3.0 čiji je genom veličine 531 490 bp i sadrži samo 473 gena od čega za njih 149 još nije poznata uloga (Hutchison i sur. 2016, Sleator 2016). Ne zna se funkcija otprilike trećine gena potrebnih za život!

Od početnih 1,08 Mbp kojih ima genom syn1.0, dobiveni genom syn3.0 je gotovo upola manji (Sl. 3). Unatoč tome morfologija je njihovih kolonija dosta slična (Sl. 4). Pretpostavlja se da bi se daljnjim DIT ciklusima mogao dodatno smanjiti genom, ali on bi rezultirao stanicama sporijeg rasta i potrebom za boljom kontrolom okolnih uvjeta što je nepoželjno. Tako da syn3.0 najvjerojatnije nije najmanji živi mogući sintetski konstrukt (Hutchison i sur. 2016, Sleator 2016).



Slika 3. Usporedba genoma JCVI-syn1.0 i JCVI-syn3.0. Genomi JCVI-syn1.0 (vanjski plavi krug) i JCVI-syn3.0 (unutarnji crveni krug) su prikazani razdijeljeni u svojih osam segmenata. Crveno označena područja uz vanjski plavi krug su dijelovi genoma syn3.0 zadržani iz syn1.0. (Preuzeto i prilagođeno iz Hutchison i sur. 2016)



Slika 4. Usporedba značajki rasta i morfologije syn1.0 i syn3.0 stanica. (A) Usporedba veličina kolonija i morfologije 96 sati nakon nasađivanja stanica na podlogu. Syn3.0 kolonije su očekivano manje zbog teže optimizacije rasta (rezultat manjeg broja gena) rezultirajući u smanjenoj brzini rasta. (B) Usporedba brzina rasta tekućih statičnih kultura dobivenih mjerenjem fluorescencije (relativne fluorescentne jedinice, RFU) dvovalčane DNA. Vrijeme duplikacije (td) za syn1.0 je td=63 min, a za syn3.0 td=178 min. (C) Mikroskopske slike morfologije nativnih stanica u tekućim kulturama dobivene diferencijalnim interferencijskim kontrastom. Bijele strelice predstavljaju forme segmentiranih filamenata, a crne velikih vezikula. (D) Slike syn1.0 i syn3.0 dobivene skenirajućim EM koje ukazuju na sličnost njihovih izgleda.

(Preuzeto i prilagođeno iz Hutchison i sur. 2016)

3. OD MANJIH STANICA PREMA VEĆIM

Mikoplazme nisu jedini organizmi kojima je reduciran genom, a ideja konstruiranja sintetskih stanica također nije ograničavana samo na njih. Od 2002. do 2010. se radilo na reduciranju genoma bakterije *Escherichia coli* čime je stvoren soj MDS42. Projekt je započet identifikacijom neesencijalnih dijelova genoma i zatim njihovom delecijom (Kolisnychenko i sur. 2002). Time je uklonjeno prvo 8,1%, a kasnije sveukupno 15% početnog genoma bez ikakvih promjena biokemijskog i replikacijskog sustava stanica. Neočekivano, takve stanice su pokazale nova korisna svojstva poput visoke efikasnosti elektroporacije te precizno umnažanje rekombinantnih gena i plazmida koji su nestabilni u drugim sojevima. Producirani soj je vrlo koristan za istraživanja u području funkcionalne genomike, primjenu u biotehnologiji i proučavanje stabilnosti genoma i evolucije (Pósfai i sur. 2006, Umenhoffer i sur. 2010).

Mikoplazme su neki od, ako ne i najjednostavniji organizmi. Unatoč tome su i dalje ekstremno kompleksni, a konstrukcije sintetskih stanica temeljenih na njima su bile veliki izazov. Kako eukariotske stanice imaju još kompleksniji genom, lako je shvatiti zašto još nijedna nije sintetski konstruirana (Xu 2016). No, s obzirom da je u toku projekt Sc2.0 – dizajn i sinteza kompletnog eukariotskog genoma *S. cerevisiae*, pitanje je vremena kada će se to promijeniti. Razlog zašto je odabran upravo kvasac *S. cerevisiae* je taj što je dobro proučen organizam te ima relativno jednostavan genom za eukariotsku stanicu (www.syntheticyeast.org). Ima 16 linearnih kromosoma zbog čega je projekt internacionalno podijeljen u 16 timova – svaki je odgovoran za dizajn i sintezu jednog. Kromosomi se redizajniraju kako bi im se uklonio suvišni materijal poput nepotrebnih transpozona, ponavljajućih elemenata i subtelomernih regija. Svi tRNA geni su premješteni na *de novo* kromosom u svrhu boljeg uređenja genoma. Cilj je stvoriti što reduciraniji genom kvasca koji neće uvelike narušiti robusnost stanica. Do sad je dovršeno 6 kromosoma, a kada se dovrše svi, kombinirat će se u cjeloviti sintetski genom (www.nature.com).

Uloga ovakvih eksperimenata je pojednostaviti genom organizama što više moguće. Reduciranje i pojednostavljivanje genoma uvelike pomaže znanstvenicima praćenje procesa koji se u organizmu zbivaju i otkrivanje koji gen je odgovoran za što. Time se smanji, a poželjno i poništi, utjecaj suvišnih dijelova genoma jer oni nepoznatim ili nepredvidivim utjecajem na organizam mogu dovesti do krivih zaključaka tijekom nekog istraživanja.

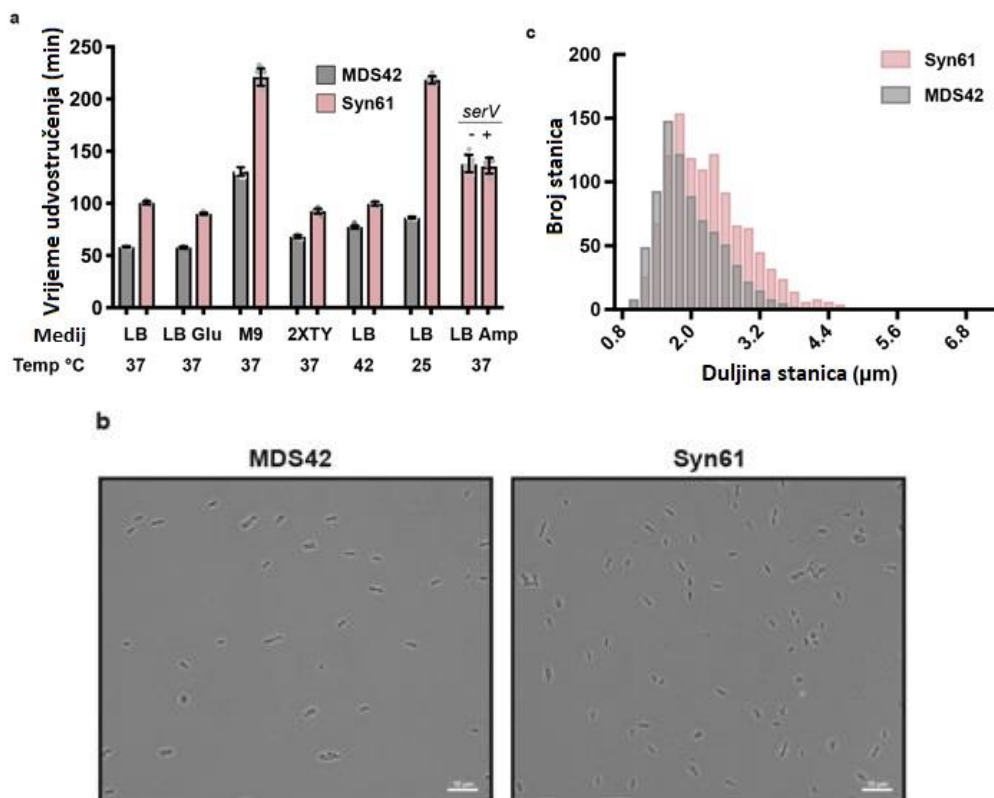
4. GENOM I GENETIČKI KOD

Stanični život je dirigiran njenim genom ili, jednostavnije rečeno, dugim specifičnim poretkom izmjenično ponavljajućih četiri slova: A (adenin), T (timin), G (gvanin) i C (citozin) od kojih svako predstavlja odgovarajuću dušičnu bazu (navedeno u zagradama) DNA molekule. Geni su područja tog genoma sa kojih se takav poredak, duljine i do nekoliko tisuća baza, prepisuje u RNA procesom transkripcije. Neke RNA predstavljaju konačni genski produkt, a glasničke RNA (mRNA) su one koje procesom translacije daju proteine. Translacijom se svakom specifičnom kodonu mRNA, odnosno nizu triju uzastopnih dušičnih baza, pridaje jedna aminokiselina (ak) – osnovna jedinica proteina. Skup pravila pridavanja točno određene aminokiseline svakom kodonu se naziva genetički kod. Različitih kombinacija kodona ima 64, od čega su njih 3 STOP kodoni koji ne kodiraju za aminokiselinu nego zaustavljaju daljnu sintezu proteina, a preostalih 61 se pridaje 20 različitih aminokiselina. Zbog toga je većina aminokiselina kodirana s više od jednog kodona (Zimmer 2019). Kodoni koji kodiraju istu aminokiselinu nazivaju se sinonimni kodoni.

4.1. Kompresija genetičkog koda

Znanstvenici pokazuju veliki interes za genetički kod jer ih zanima zašto za 18 aminokiselina kodira više od jednog kodona. U svrhu otkrivanja uloge sinonimnih kodona proveden je eksperiment kojim je dizajniran, sintetiziran i testiran genom bakterije *Escherichia coli* kojemu su izbrisana tri tipa kodona iz svih gena. Od njih tri, dva kodiraju za aminokiselinu serin i zamijenjeni su drugim kodonima koji također kodiraju za serin, a zadnji je jedan od STOP kodona, zamijenjen drugim STOP kodonom. Tim eksperimentom je dizajniran sintetski genom bakterije *E. coli* koji je četiri puta (4 Mbp) veći i puno kompleksniji od dotad pripremljenih sintetskih genoma. Sadrži samo 61 kodon od kojih 59 njih kodira za svih 20 aminokiselina, a preostala dva su STOP kodoni. Njegovom ugradnjom u stanicu *E. coli* MDS42 je dobivena nova vijabilna sintetska stanica nazvana *E. coli* Syn61 koja pokazuje sporiji rast i izduženi morfološki oblik (Sl. 5) u usporedbi sa ishodišnim sojem (Fredens i sur. 2019). Metoda korištena za ugradnju je znatno drugačija i puno delikatnija od one za dizajn i transplantaciju minimalnog genoma jer se radi o genomu prevelikom

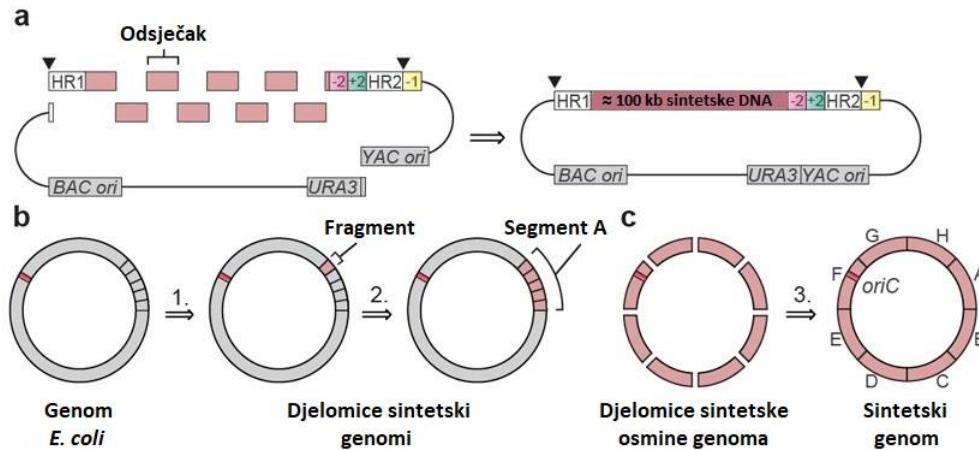
za jednostavno ubacivanje u stanicu. Temelji se na dizajniranju manjih segmenata sintetskog genoma kojima se dio po dio mijenja prirodni genom (Sl. 6, Sl. 7) (Zimmer 2019).



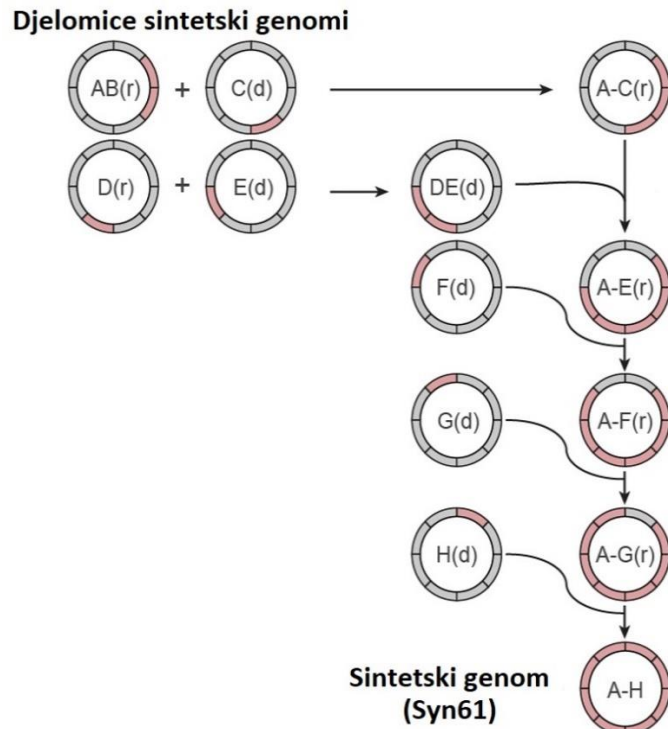
Slika 5. Usporedba vremena udvostručenja i duljina MDS42 i Syn61 stanica. (a) Vrijeme udvostručenja Syn61 soja je dulje od onoga MDS42 soja na svakom korištenom mediju i pri svakoj temperaturi što znači da je njena brzina rasta sporija u svakom slučaju. (b) Reprerzentativne mikroskopske slike MDS42 i Syn61 stanica dobivene fazno-kontrastnim mikroskopom. (c) Histogram duljina MDS42 i Syn61 stanica dobivenih mjerenjem sa njihovih mikroskopskih slika.

(Preuzeto i prilagođeno iz Fredens i sur. 2019)

Genetički kod je univerzalan za gotovo sve stanice uz nekoliko iznimki. Potpunim uklanjanjem tri tipa kodona, genetički kod stanice Syn61 je uspješno komprimiran. Geni odgovorni za translaciju tih kodona nepotrebni su za život stanica Syn61. Iz tog razloga, oni se mogu ukloniti iz genoma ili zamijeniti genima koji omogućuju translaciju istog kodona, ali mu pridaju drugu aminokiselinu. Time bi njen genetički kod bio promijenjen zbog čega bi ona imala drugačiji život od ostalih stanica. Jedna od prednosti toga bi mogla biti jača rezistencija na viruse koji, pošto se razmnožavaju isključivo pomoću stanica domaćina, također dijele isti univerzalan genetički kod. Stanica poput Syn61 ne bi stvarala ispravne proteine kodirane virusnim genomom koji sadrže kodone koji su uklonjeni iz genoma Syn61, onemogućujući stvaranje novih virusnih čestica (Pease 2019). Znanstvenici se nadaju napretku ovog eksperimenta u smjeru uspješnog uklanjanja dodatnih kodona i daljnje kompresije genetičkog koda (Zimmer 2019).



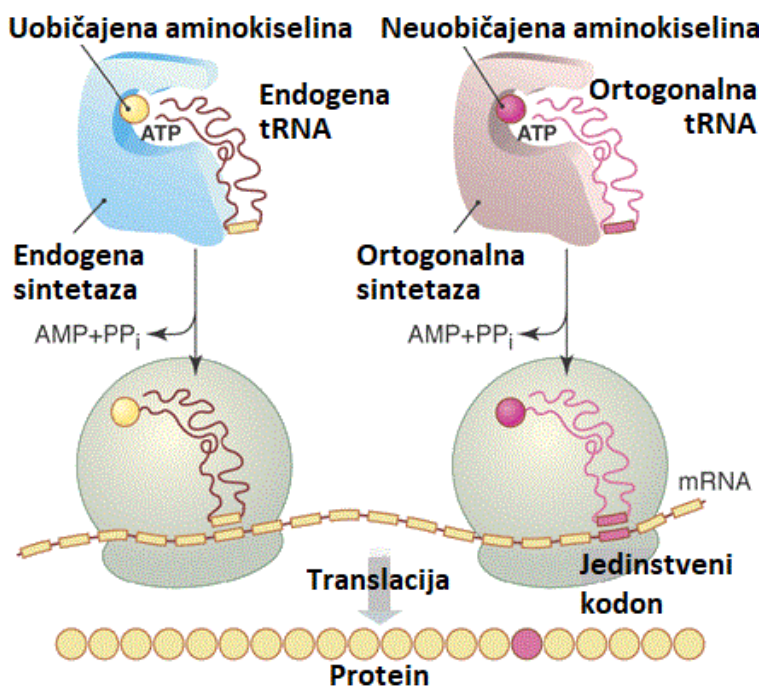
Slika 6. Shematski prikaz sinteze sintetskog genoma Syn61. (a) Dizajn, kemijska sinteza i sklapanje umjetnog bakterijskog kromosoma (BAC) u *S. cerevisiae*. Svaki BAC sadrži jedan od 37 fragmenata sintetskog genoma dugih otprilike 100 bp (ružičasto), Cas9 restriksijska mjesta (crne strelice) koja omogućuju izrezivanje fragmenata *in vivo*, mjesta homologije (HR1 i HR2) za ciljanu rekombinaciju, prikladne dvostruko-selektivne kazete (-2 i +2) koje omogućuju ugradnju samo željenog fragmenta svakim korakom, mjesta replikacije za BAC (*BAC ori*) i umjetni kromosom kvasca (*YAC ori*) te *URA3* marker. (b) Transformacija BAC kromosoma u stanice *E. coli* omogućuje da se jedan po jedan fragment ugrađuju u njen genom (korak 1). Susjedno ugrađenih 4 ili 5 (ovisno o tome koji segment tvore) fragmenata tvore jedan segment (korak 2). (c) Svaki od osam segmenata (A-H) je duljine oko 0,5 Mb i dobiva se na isti opisan način. Njihovim sklapanjem (korak 3, Sl. 7) se dobiva čitavi sintetski genom. (Preuzeto i prilagođeno iz Fredens i sur. 2019)



Slika 7. Shematski prikaz sklapanja sintetskog genoma Syn61. Segmenti sintetskog genoma (ružičasto) iz stanica *E. coli*, čiji su genomi samo dijelom sintetski, se slijedom prikazanih konjugacija sklapanju u čitavi sintetski genom Syn61. Segmenti se iz stanica donora (d) konjugiraju u akceptorske stanice (r) zamjenjujući odgovarajuća područja genoma divljeg tipa (sivo). Sadržaj genoma je mijenjan u smjeru kazaljke dok nisu ugrađeni svi segmenti. (Preuzeto i prilagođeno iz Fredens i sur. 2019)

4.2. Uvođenje novih aminokiselina u genetički kod

Kompresijom genetičkog koda se, zanimljivo, pospješuje ideja njegovog proširivanja. Kako je za život stanica Syn61 potrebno samo 61 od prisutnih 64 kodona, nekorištenim se kodonima mogu pridijeliti nove, neuobičajene aminokiseline (Pease 2019). To su one aminokiseline koje nisu normalno prisutne u prirodi ni u stanici. Preduvjeti za proširivanje genetičkog koda su nekorišteni kodon, neuobičajena aminokiselina, prijenosna RNA (tRNA) koja prepoznaje nekorišteni kodon i aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) koja prepoznaje samo tu tRNA i odabranu neuobičajenu aminokiselinu. Enzimi aaRS vežu odgovarajuću aminokiselinu na odgovarajuću tRNA pri čemu nastaje aminoacilirana tRNA koja odlazi na ribosom. Aminoacilirana tRNA prepoznaje kodon na mRNA, a ribosom ugrađuje aminokiselinu vezanu za tRNA u polipeptidni lanac (Sl. 8).



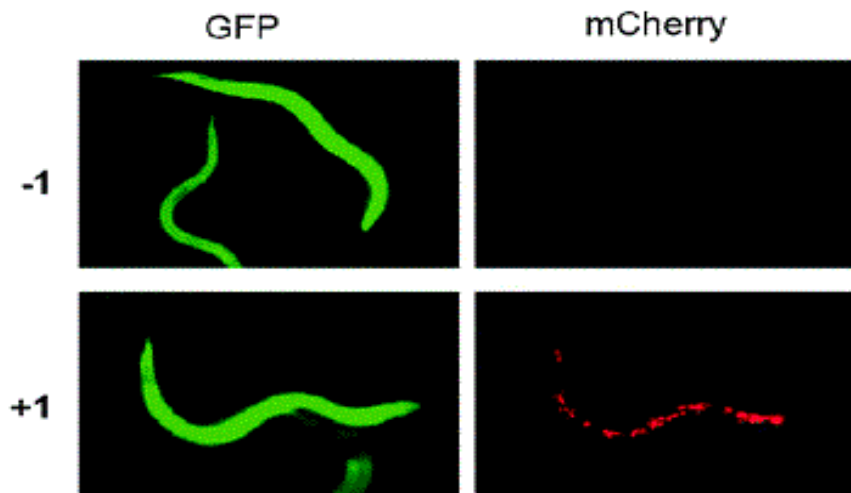
Slika 8. Generalno načelo ugradnje uobičajenih i neuobičajenih aminokiselina u proteine. Endogena (iz stanice domaćina) i ortogonalna (koja ne prepoznaje endogene tRNA i uobičajene aminokiseline) aminoacil-tRNA-sintetaza prepoznaju odgovarajuće tRNA i aminokiseline te ih kovalentno povezuju uz potrošnju jedne molekule ATP-a. Aminoacilirana tRNA dolazi do ribosoma (sivo) gdje prepoznaje odgovarajući kodon u mRNA. Na ribosomu se aminokiseline sa tRNA ugrađuju u polipeptidni lanac pri čemu nastaju proteini. Tijekom čitanja kodona ribosom klizi po mRNA, a nakon ugradnje aminokiseline tRNA se oslobađaju sa ribosoma. (Preuzeto i prilagođeni iz Wang L. 2003)

U svrhu boljeg razumijevanja biološki važnih molekula proteina, njihovih struktura i uloga u biološkim procesima te stvaranja proteina i organizama novih karakteristika, poželjno bi bilo znati manipulirati proteinima. Kemijski pristup tome je nizom raznih kemijskih reakcija dobivati željene

proteine, a biosintetski stvoriti staničnu mašineriju koja bi ih stvarala staničnim procesima, nakon čega bi se proučavala njihova svojstva. Tako je glavna ideja proširivanja genetičkog koda usko povezana sa željom za boljim razumijevanjem proteina (Wang Q. i sur. 2009).

Godine 2001. prvi puta je opisano uspješno proširenje genetičkog koda (Wang L. i sur. 2001). Eksperimentom je u stanice *E. coli* uveden specifičan ortogonalni par tRNA/aaRS porijeklom iz arheje *Methanococcus jannaschii*. Ortogonalni par znači da ortogonalna aaRS ne prepoznaje endogene tRNA i uobičajene aminokiseline koje se nalaze u *E. coli* (ili nekoj drugoj stanici domaćinu), a ortogonalnu tRNA ne prepoznaje niti jedna endogena aaRS. Takvi parovi omogućuju povezivanje neuobičajene aminokiseline i tRNA koja prepoznaje kodon koji je odabran za ugradnju te aminokiseline. Prvi ortogonalni par dizajniran je na temelju para tRNA/aaRS iz arheje *M. jannaschii* koji se sastoji od tirozil-tRNA-sintetaze i supresorske tRNA^{Tyr} koja prepoznaje STOP kodon umjesto tirozinskog kodona. Ovaj par sup-tRNA^{Tyr}/TyrRS omogućuje ugradnju tirozina na temelju STOP kodona u mRNA. Mutacijama je molekula sup-tRNA^{Tyr} optimizirana za funkcioniranje u *E. coli*, a enzim TyrRS promijenjen na način da, umjesto tirozina, prepoznaje i na molekulu sup-tRNA^{Tyr} veže *o*-metil-L-tirozin. Tako dobiven ortogonalni par omogućuje *E. coli* ugradnju *o*-metil-L-tirozina u proteine na temelju jednog od univerzalnih STOP kodona. Nedugo nakon toga je na isti način stvoren mutant iste TyrRS koji selektivno ugrađuje L-3-(2-naftil)-alanin, aminokiseline znatno drugačije strukture od one ishodišne. To upućuje na potencijalnu generalizaciju ove metode za ugradnju svih drugih aminokiselina (Wang L. 2003).

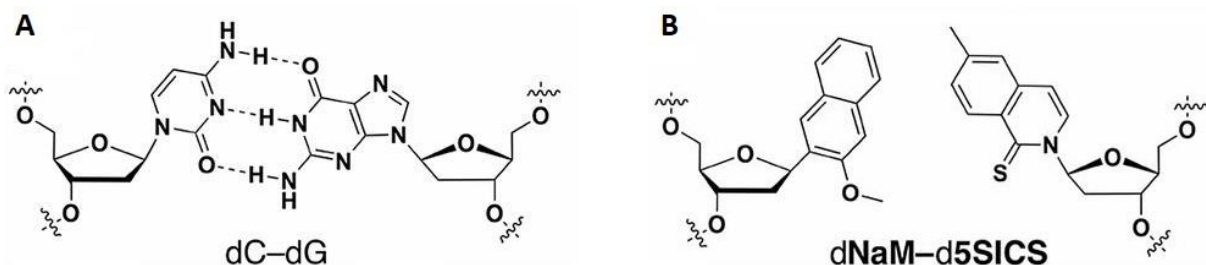
Do danas je, korištenjem različitih ortogonalnih parova tRNA/aaRS, uspješno ugrađeno preko 70 različitih neuobičajenih aminokiselina u proteine stanica *E. coli*, kvasca i sisavaca (Liu i Schultz 2010). Metoda ima svoja ograničenja, ali omogućuje ugradnju nekih aminokiselina koje su fluorescentne, foto-osjetljive ili bio-ortogonalno reaktivne. One se mogu lako pratiti *in vivo* što znanstvenicima otvara vrata prema raznim novim otkrićima. Također, primjena ove tehnologije na višestanični organizam bi znatno doprinijela istraživanjima o interakcijama među stanicama (Wang Q. i sur. 2009). To je prvi puta ostvareno u nematodi (Sl. 9) *Caenorhabditis elegans* (Greiss i Chin 2011), a nekoliko godina kasnije u mišu (Han i sur. 2017).



Slika 9. Fluorescentne slike *Caenorhabditis elegans*. U sve stanice *C. elegans* je ugrađen izvan-kromosomski transgeni niz *Ex1* koji sadrži gene za fluorescentne GFP i mCherry proteine, koji su povezani *amber* STOP kodonom, te ortogonalni par tRNA/aaRS, koji prepoznaje *amber* STOP kodon i neuobičajenu aminokiselinu N^ε-(tert-butiloksikarbonil)-L-lizin (1). Kada u mediju nije prisutna ak 1 (-1), u stanicama se stvara samo GFP, ali ne i mCherry jer translacija prestaje na *amber* kodonu. Kada je u mediju prisutna ak 1 (+1), u stanicama se stvaraju GFP i GFP-mCherry jer se translacija ponekad nastavlja preko *amber* kodona. U oba slučaja GFP disocira iz jezgre u ostatak stanice, ali GFP-mCherry se zadržava u jezgri jer mu je na kraj slijeda dodan slijed za lokalizaciju u jezgri. (Preuzeto i prilagođeno iz Greiss i Chin 2011)

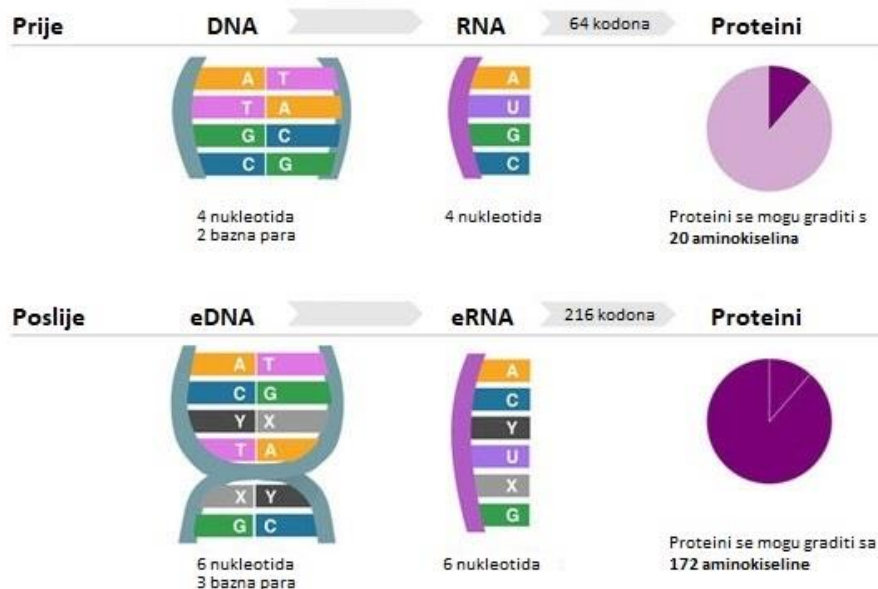
4.3. Sintetski parovi baza i nukleinske kiseline

Ideja stvaranja neprirodnih parova baza (bp) postoji još od 1990. godine kada je modificiranjem baza G i C u izo-G i izo-C stvoren novi bp (Howgego 2014). Na početku se smatralo da su za pravilnu funkciju bp, odnosno procese replikacije i transkripcije potrebne vodikove veze među bazama po kojem je načelu otkriveno još alternativnih bp. Kasnije je sintetskim bazama d5SICS i dNaM (Sl. 10), među kojima nema vodikovih veza, demonstrirano drugačije. Te baze, ugrađene u DNA su pravilno i efikasno *in vitro* replicirane i transkribirane u RNA (Li i sur. 2014). Idući korak je naravno bio ugraditi dodatne baze u genom živog organizma i proučiti funkcioniraju li takve baze *in vivo*. Godine 2014. prvi puta je uspješno proširen alfabet genoma *E. coli* sa 4 na 6 slova (Malyshev i sur. 2014). Iako se eksperimentom nadvladalo mnogo izazova, stvoreni semi-sintetski organizam je pokazivao nisku brzinu rasta te je u raznim standardnim uvjetima rasta gubio novougrađene baze. Boljim optimizacijama tog organizma su uklonjeni ti problemi i stvoren je njegov stabilni oblik (Zhang i sur. 2017). Rezultat toga je stanica koja može sadržavati 216 različitih kodona, od kojih su njih 152 nekoristeni i mogu se iskoristiti u svrhu proširivanja genetičkog koda (Sl. 11).



Slika 10. Prikaz dC-dG i dNaM-d5SICS baznih parova. (A) Kemijska struktura para baza dC-dG i (B) dNaM-d5SICS.

(Preuzeto i prilagođeno iz Zhang i sur. 2017)



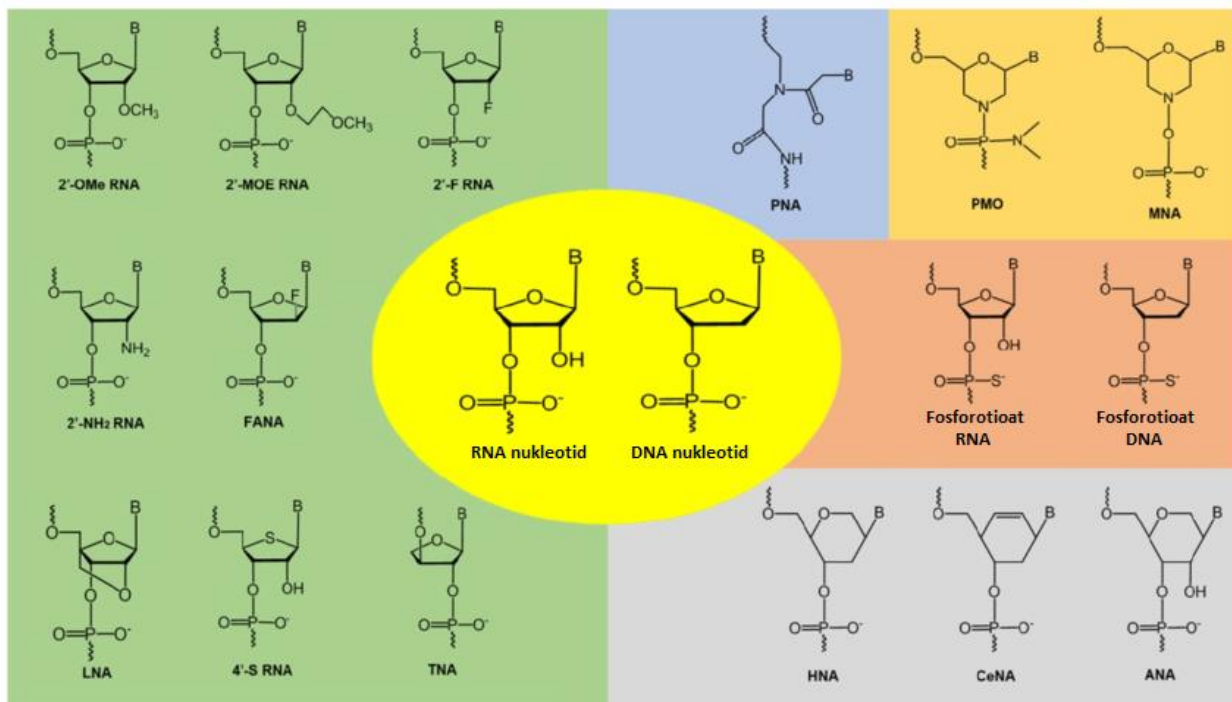
Slika 11. Usporedba brojeva kodona i mogućih aminokiselina za ugradnju između DNA i proširene DNA (eDNA). DNA se sastoji od 4 nukleotida koji tvore 2 jedinstvena bp i kodira za 20 različitih aminokiselina. eDNA se sastoji od 6 nukleotida koji tvore 3 jedinstvena bp i može kodirati za 172 različite aminokiseline.

(Preuzeto i prilagođeno iz www.wired.com/2014/05/synthetic-dna-cells/)

Pohrana i procesiranje cjelokupne genetičke informacije ovisi isključivo o DNA i RNA polimerima. Međutim, do danas je konstruirano barem 6 različitih polimera nalik na DNA, grupno nazvanih sintetske, odnosno kseno-nukleinske kiseline (XNA). XNA također mogu pohranjivati genetičku informaciju, odnosno slijed dušičnih baza, ali umjesto šećera deoksiriboze i riboze iz šećerno-fosfatnih okosnica DNA i RNA, sadrže razne alternative (Sl. 12). Takva karakteristika im daje određene prednosti nad DNA i RNA molekulama zbog mogućnosti drugačijih interakcija s okolišem i/ili veće inertnosti. Unatoč tome, otkriće je dobilo veći značaj tek desetak godina nakon, kada se inženjeringom polimeraza omogućila transkripcija određene XNA u DNA i obrnuto. Razlog tome je što XNA molekule nisu dovoljno dobri supstrati za enzime kao što su to DNA ili RNA, čineći ih nevidljivima za organizme u kojima se nalaze. Poput DNA i RNA, za XNA je pokazano da su sklone procesima nasljeđivanja i evolucije (Pinhiero i sur. 2012). To je bitno jer

svaki polimer može sadržavati informaciju, ali ono što je dosad činilo DNA i RNA jedinstvenima su ta dva procesa. Bez tih karakteristika, XNA ne bi nikada bile potencijalni kandidati za zamjenu DNA ni RNA (Gonzalez 2012).

Kao nastavak na istraživanje o XNA molekulama 2014. godine su iz njih konstruirani umjetni XNAzimi (Taylor 2014). Oni omogućuju jednostavne katalitičke reakcije poput cijepanja i spajanja lanaca RNA. Jedan od njih može spajati XNA lance, što se smatra jednim od prvih koraka prema kreiranju sintetskog živućeg sustava. Unatoč kataliziranju samo jednostavnih reakcija, njihova korisnost bi mogla biti potencijalno velika zbog novih svojstava koja uvode te molekule (www.mrc.ukri.org). Daljnja istraživanja o XNA molekulama bi potencijalno mogla odgonetnuti puno pitanja vezana za postanak, razvitak i definiciju života (Gonzalez 2012).



Slika 12. Primjeri sintetskih kemijski modificiranih nukleinskih kiselina (NK). 2'-OMe: 2'-O-metil; 2'-MOE: 2'-O-metoksietil; 2'-F: 2'-fluoro; 2'-NH₂: 2'-amino; FANA: fluoroarabino NK; LNA: zaključana NK; TNA: treozna NK; PNA: peptidna NK; PMO: fosfordiamidatni morfolino oligomer; MNA: morfolino NK; HNA: heksitolna NK; CeNA: cikloheksenilna NK; ANA: anhidroheksitolna NK. (Preuzeto i prilagođeno iz Chakravarthy i sur. 2017)

5. PRIMJENE

Većina istraživanja u sintetskoj biologiji uznemirila je javnost i neke znanstvenike. Propituju se potencijalni biološko-sigurnosni, okolišni i socijalno-ekonomski rizici te razne etičke i filozofske nedoumice, koje se dotiču prirode života. Međutim, vrijedi istaknuti trenutne i potencijalno buduće primjene tog znanja i njihova moguća korist za zdravlje, okoliš i energiju.

Zdravlje: Konstruirani su sintetski transkripcijski sklopovi koji sadrže hibridne transkripcijske regulatore što omogućuje da se na njima traže potencijalni lijekovi protiv tuberkuloze ili infekcije HIV-om. Osmišljeni su prostetički uređaji koji se sastoje od mikroenkapsulirajućih stanica sisavaca koje sadrže sintetski genom dizajniran za rješavanje prisutnog problema. Takvi uređaji su korišteni pri uspješnoj terapiji miša. U bakterijama se sintezom različitih virusnih antigena mogu kreirati bolji antigeni koji čine bolja cjepiva i time rezultiraju u boljoj imunosti na te viruse, a biosintezom farmaceutski bitnih spojeva oni se mogu masovno proizvoditi. XNA se može koristiti kao zamjena za mikro i malu interferirajuću RNA (König i sur. 2013).

Okoliš: Bakterije bi se mogle koristiti kao bio-senzori koji pomoću modificiranog metabolizma prepoznaju zagađivače poput teških metala, eksploziva i pesticida. Određene vrste svojim metabolizmom mogu prirodno odstraniti kontaminirajuće tvari, a geni odgovorni za takav metabolizam se mogu prenijeti i optimizirati za funkciju u drugim stanicama. Osim farmaceutski bitnih spojeva, razne druge bitne kemikalije poput biorazgradive plastike, se također mogu metaboličkim inženjerstvom optimizirati i masovno proizvoditi (König i sur. 2013).

Energija/biogoriva: Dizajnom sintetskih putova i izmjenom metabolizma se u bakterijama iz šećera mogu dobiti razni alkoholi, biodizel i alkani. Osim šećera, na sličan način se mogu dobiti bakterije koje također daju biodizel, ali iz lignoceluloznih polisaharida, odnosno celuloze i hemiceluloze. Izmjenom metaboličkih puteva moguće je direktnom sintezom iz vode, ugljikovog dioksida (CO₂) te korištenjem svjetlosti dobiti navedene produkte. Osim ugljičnih goriva koji su dosad spominjani, vodik (H₂) se također može koristiti kao gorivo, a nastoji se otkriti kako metabolički masovno proizvesti vodik koristeći svjetlost i vodu (König i sur. 2013).

Kako bi se smanjio rizik negativnog utjecaja genetički promijenjenih mikroorganizama na okoliš i druge organizme, nastoji se pronaći način da oni funkcioniraju isključivo na temelju XNA. Time bi životi prirodnih i sintetskih organizama bili potpuno razdvojeni. U tom slučaju XNA bi djelovala poput zaštitnog „vatrozida“ (König i sur. 2013).

6. LITERATURA

- Building better yeast. *Nature communications* **9**. www.nature.com Pristupljeno 16.8.2020.
- Chakravarthy M., Chen S., Dodd P. R., Veedu R. N., 2017. Nucleic Acid-Based Theranostics for Tackling Alzheimer's Disease. *Theranostics* **7**, 3933-3947.
- Dreamer D., 2015. A giant step towards artificial life? *Trends in Biotechnology* **23**, 336-338.
- Fleischmann R. D. i sur., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
- Fraser C. M. i sur., 1995. The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-404.
- Fredens J. i sur., 2019. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature* **569**, 514-518.
- Gibson D. G. i sur., 2010. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science* **329**, 52-56.
- Gibson D. G. i sur., 2008. Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Science* **319**, 1215-1220.
- Glass J. I. i sur., 2006. Essential genes of a minimal bacterium, *PNAS*, **103**, 425-430
- Gonzalez R., 2012. XNA is synthetic DNA that's stronger than the real thing. *Io9*. www.io9.gizmodo.com Pristupljeno 16.8.2020.
- Greiss S. i Chin J. W., 2011. Expanding the Genetic Code of an Animal. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14196-14199.
- Han S., 2017. Expanding the genetic code of *Mus musculus*. *Nature communications* **8**, 14568.
- Howgego J., 2014. On stranger nucleotides. *Chemistry World*. www.chemistryworld.com Pristupljeno 16.8.2020.
- Hutchison C. A. III i sur., 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* **351**.
- Hutchison C. A. III i sur., 1999. Global Transposon Mutagenesis and a Minimal Mycoplasma Genome. *Science* **286**, 2165-2169.
- Kolisnychenko V. i sur., 2002. Engineering a Reduced *Escherichia coli* Genome. *Genome Res.* **12**, 640-647.
- Lartigue C. i sur., 2009. Creating Bacterial Strains from Genomes That Have Been Cloned and Engineered in Yeast. *Science* **325**, 1693-1696.

- Lartigue C. i sur., 2007. Genome Transplantation in Bacteria: Changing One Species to Another. *Science* **317**, 632-638.
- Li L. i sur., 2014. Natural-Like Replication of an Unnatural Base Pair for the Expansion of the Genetic Alphabet and Biotechnology Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **3**, 826–829.
- Life 2.0. *The Economist*. www.economist.com Pristupljeno 7.8.2020.
- Liu C. C., Schultz P. G., 2010. Adding new chemistries to the genetic code. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 413-444.
- Lyons S., 2018. Why are scientists building a synthetic yeast genome? *ABC Science*. www.abc.net.au Pristupljeno 16.8.2020.
- Malyshev D. A. i sur., 2014. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature* **509**, 385–388.
- McCarty N., 2018. Synthetic Life: Made from Scratch. *SynBioBeta*. www.synbiobeta.com Pristupljeno 7.8.2020.
- McKay C., 2014. What's life? It's a tricky, often confusing question. *Astrobiology*. www.astrobio.net Pristupljeno 16.8.2020.
- König H., Frank D., Heil R., Coenen C., 2013. Synthetic Genomics and Synthetic Biology Applications Between Hopes and Concerns. *Curr Genomics*. **14**, 11–24.
- O'Malley M. A. i Müller-Wille S., 2010. The cell as nexus: Connections between the history, philosophy and science of cell biology. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. **41**, 169–171.
- Pease R., 2019. Artificial life form given 'synthetic DNA'. *BBC Radio Science Unit*. www.bbc.com Pristupljeno 16.8.2020.
- Pennisi E., 2010. Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium. *Science* **328**, 958-959.
- Pinheiro V. B. i sur., 2012. Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science* **336**, 341-344.
- Pósfai G. i sur., 2006. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science* **312**, 1044-1046.
- Sleator R. D., 2016. JCVI-syn3.0 – A synthetic genome stripped bare! *Bioengineered* **7**, 53-56.
- Smith H.O., Hutchison C. A. III, Pfannkoch C., Venter J. C., 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *PNAS* **100**, 15440-15445.
- Taylor A. I. i sur., 2014. Catalysts from synthetic genetic polymers. *Nature* **518**, 427–430.

- Umenhoffer K. i sur., 2010. Reduced evolvability of *Escherichia coli* MDS42, an IS-less cellular chassis for molecular and synthetic biology applications. *Microbial Cell Fact.* **9**.
- Wang L., 2003. Expanding the Genetic Code. *Science* **302**, 584-585.
- Wang L., Brock A., Herberich B., Schultz P. G., 2001. Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*. *Science* **292**, 498-500.
- What is life? *Khan Academy*. www.khanacademy.org Pristupljeno 2.8.2020.
- World's first artificial enzymes created using synthetic biology. *MRC*. www.mrc.ukri.org Pristupljeno 16.8.2020.
- Wang Q., Parrish A. R., Wang L., 2009. Expanding the Genetic Code for Biological Studies. *Chem Biol* **16**, 323-336.
- Xu C., Hu S., Chen X., 2016. Artificial cells: from basic science to applications. *Materials today* **19**, 516-532.
- Zhang Y. i sur., 2017. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet. *PNAS* **114**, 1317-1322.
- Zimmer C., 2019. Scientists Created Bacteria With a Synthetic Genome. Is This Artificial Life? *The New York Times*. www.nytimes.com Pristupljeno 16.8.2020.
- www.syntheticyeast.org Pristupljeno 16.8.2020.
- www.wired.com Pristupljeno 17.8.2020.

7. SAŽETAK

Ljudi još od davnina nastoje definirati život i otkriti njegovo porijeklo, ali dosad bezuspješno. Međutim, razna otkrića u području sintetske biologije znanstvenicima su otvorila vrata mnogim mogućnostima, većina njih usko povezanih uz pojam života. Zato se daljnjim istraživanjima nastoje razotkriti misteriji života i dizajnirati umjetni život. U tom procesu stečeno je puno korisnog znanja koje se učinkovito primjenjuje na raznim područjima.

U ovom radu predstavljen je termin život 2.0 – to je život, ali ne onakav kakvog poznajemo. Pregledom raznih istraživanja tijekom posljednja dva desetljeća ukratko su prikazane samo neke od mnogih ideja, planova, mogućnosti i prednosti koje nudi život 2.0 i kako ga je moguće stvoriti.

8. SUMMARY

People have been trying to define life and discover its origin from long ago, but so far without success. However, a variety of discoveries in the field of synthetic biology has opened the door for scientists towards many possibilities, most of which are closely related to the notion of life. That's why further research seeks to unravel the mysteries of life and succeed in creating artificial life. A lot of useful knowledge that is well applied in various fields was acquired in the process.

This paper introduces the term life 2.0 – it's life, but not as we know it. Through review of various researches over the last two decades, it shows only some of many ideas, plans, possibilities and advantages that life 2.0 offers and how it can be created.