

# Sintetski geni

---

**Delaš, Kristina**

**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:217:695558>

*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  
Kemijски odsjek

Kristina Delaš

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **SINTETSKI GENI**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2020. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

20. rujna 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. OPĆENITO O DNA I GENIMA.....	2
2.1. DNA.....	2
2.2. Replikacija DNA .....	4
2.3. Geni .....	5
§ 3. SINTETSKI GENI.....	7
3.1. Sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču.....	7
3.2. Sinteza oligonukleotida na mikročipovima .....	9
3.3. Lančana reakcija polimeraze.....	10
3.4. Lančana reakcija ligaze.....	13
3.5. Pogreške u sintezi gena.....	13
3.6. Popravak pogrešno sparenih baza .....	14
3.7. Primjena sintetskih gena .....	16
3.7.1. Sinteza bakterijskih genoma .....	16
3.7.2. Optimizacija kodona .....	16
3.7.3. Mutageneza.....	17
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	18



## § Sažetak

DNA je deoksiribonukleinska kiselina koja se sastoji od šećera deoksiriboze, dušičnih baza i fosfata te formira dvostruku zavojnicu. Sintetski geni su dugačke sintetske molekule DNA koje se dobiju spajanjem kraćih oligonukleotida. Sinteza oligonukleotida je sinteza kratkih fragmenata nukleinskih kiselina.

Najvažnije metode za stvaranje sintetskih gena su fosforamiditna sinteza, lančana reakcija polimeraze (PCR) i lančana reakcija ligaze (LCR). Najčešće se koristi sinteza na čvrstom nosaču koja koristi fosforamidite koji se ugrađuju u rastući lanac. Sinteza na čvrstom nosaču je automatizirana pomoću računala. Može se izvoditi u koloni ili na mikročipu. Fosforamiditnom metodom se uglavnom sintetiziraju kraći oligonukleotidi koji se kasnije mogu produživati pomoću lančane reakcije polimeraze ili lančane reakcije ligaze. U lančanoj reakciji ligaze se koristi termostabilna ligaza za povezivanje kratkih oligonukleotida. Za razliku od lančane reakcije ligaze, lančana reakcija polimeraze ne koristi ligazu već polimerazu. Pomoću lančane reakcije polimeraze mogu se napraviti milijuni kopija određenog slijeda DNA. Sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču omogućava sintezu novih gena po mjeri. Prilikom sinteze oligonukleotida mogu se javiti pogreške kao što su delecije, umetanje i supstitucija baza što smanjuje kvalitetu produkta. Pogreške koje ostaju u oligonukleotidima se kopiraju u komplementarni lanac pomoću lančane reakcije polimeraze. Postoje razni mehanizmi koji uključuju specifične proteine koji sudjeluju u popravljanju krivo sparenih baza. Jedan od primjera primjene sintetskih gena je sinteza genoma bakterije *Mycoplasma mycoides*. Sintetski genom je prenesen u srodnu bakteriju *M. capricolum* kojoj je prethodno izbačen genom, pri čemu se novonastala stanica normalno replicirala i sintetizirala proteine kodirane sintetskim genomom. Budući da je genetski kod degeneriran, moguće je mijenjanjem kodona utjecati na povećanje proizvodnje proteina što se naziva optimizacija kodona. Sintetski geni se koriste i u mutagenezi što je metoda za proučavanje funkcija gena.



## § 1. UVOD

DNA je dugački linearni polimer, nukleinska kiselina koja nosi genetičku informaciju. Ta genetička informacija se može prenositi s jedne generacije na drugu. DNA se sastoji od puno nukleotida, a svaki se sastoji od dušične baze, šećera deoksiriboze i fosfata. Genetička informacija je pohranjena u slijedu baza. DNA formira dvostruku zavojnicu koja se sastoji od dva komplementarna lanca omotanih jedan oko drugog. Upravo je ta komplementarnost lanaca odgovorna za prijenos genetičke informacije. Ukoliko se jedan lanac ošteti, on se može popraviti pomoću komplementarnih baza drugog lanca te je genetička informacija očuvana. Tako stanice mogu očuvati svoju genetičku informaciju i prenijeti je na sljedeću generaciju.

Gen se najlakše definira kao nukleotidni slijed DNA koji kodira za protein ili RNA. Slijed od tri baze duž lanca DNA, određuje jednu aminokiselinu unutar proteina. Ono što povezuje DNA slijed sa slijedom proteina naziva se genetski kod. Slijed aminokiselina u proteinu određen je slijedom nukleotida u genu. Slijed nukleotida u DNA određuje komplementarni slijed nukleotida u RNA što određuje slijed aminokiselina u proteinu. Genom je ukupni genetski materijal organizma, a uključuje gene i nekodirajuće sljedove.

Sinteza sintetske DNA se naziva sinteza gena, što je zapravo sinteza dijelova DNA dužine od 250-2000 parova baza iz jednolančanih sintetskih oligonukleotida.

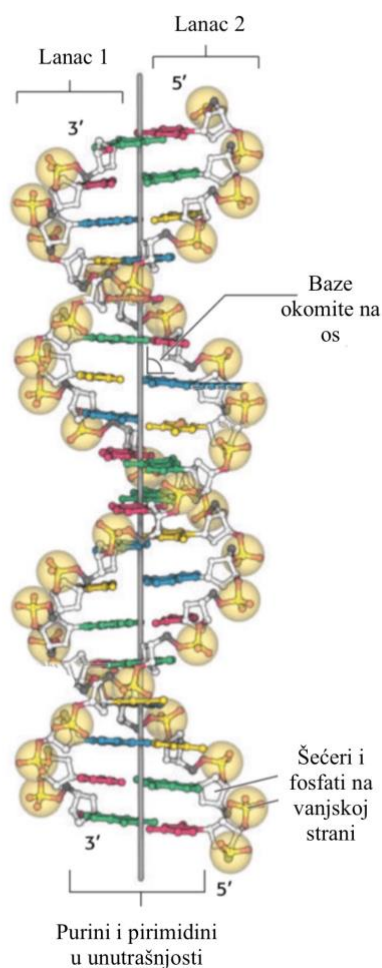
U ovom završnom radu se obrađuje *de novo* sinteza DNA koja se razlikuje od biosinteze prirodnog slijeda DNA. Obrađuju se metode sinteze oligonukleotida, spajanje tih oligonukleotida u duže dvolančane molekule DNA, pogreške u sintezi oligonukleotida te primjena sintetskih gena.

## § 2. OPĆENITO O DNA I GENIMA

### 2.1. DNA

DNA je nukleinska kiselina koja sadrži genetičku informaciju u stanici. Ta genetička informacija se može prenijeti s jedne generacije na drugu te kodira za proteine. DNA je dugački polimer koji se sastoji od velikog broja nukleotida, a svaki se sastoji od šećera deoksiriboze, fosfata i dušične baze. Postoje četiri vrste dušičnih baza u DNA: purini (adenin i gvanin) i pirimidini (timin i citozin). Šećeri su povezani fosfodieterskim vezama i čine okosnicu. Fosfodieterska veza je veza između 5'-OH jednog šećera i 3'-OH drugog šećera.

Watson i Crick su postavili trodimenzijski model dvostruke zavojnice DNA 1953. godine. DNA formira dvostruku zavojnicu koja se sastoji od dva komplementarna lanca omotanih oko zajedničke osi. Lanci su antiparalelni što znači da idu u suprotnim smjerovima. Lanci su povezani vodikovim vezama između adenina i timina te citozina i gvanina. Adenin se uvijek sparuje s timinom i formira dvije vodikove veze, a gvanin se uvijek sparuje s citozinom formirajući tri vodikove veze. Dvostruka zavojnica je stabilizirana i van der Waalsovima interakcijama između baza usporedno s osi zavojnice. Okosnica koja se sastoji od fosfata i šećera se nalazi na vanjskoj strani, a baze su u unutrašnjosti zavojnice. Baze su okomite na os zavojnice. Fosfodieterska okosnica sadrži negativan naboj koji odbija hidroksidne ione koji mogu izvršiti napad na okosnicu.

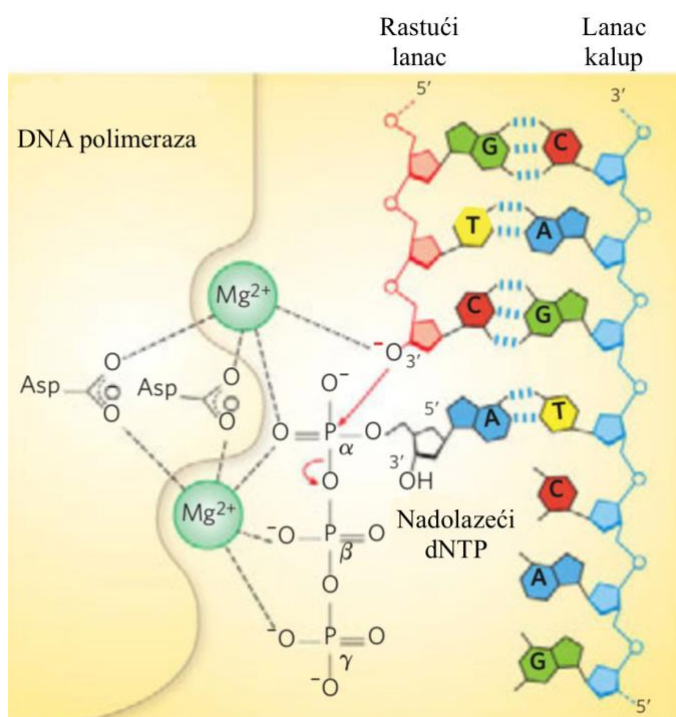


Slika 1. Watson-Crickov model dvostruke zavojnice DNA. Preuzeto i prilagođeno prema [1]

Za razliku od DNA, RNA je jednolančana zavojnica te sadrži riboze umjesto deoksiriboza. Također, RNA umjesto timina ima uracil. Ribiza posjeduje 2'-OH grupu dok deoksiriboza ima vodik na tom položaju. Odsutnost 2'-OH skupine u DNA dodatno povećava njezinu otpornost na lužnatu hidrolizu. Veća stabilnost DNA vjerojatno je odgovorna za njenu upotrebu kao nasljedni material umjesto RNA.<sup>1,2</sup>

## 2.2. Replikacija DNA

Replikacija DNA je semikonzervativna što znači da se DNA sastoji od roditeljskog lanca i novosintetiziranog lanca. Svaki lanac dvostruke zavojnice služi kao kalup za sintezu novog, komplementarnog lanca. Replikacija započinje na točno određenom mjestu koje se naziva izvorište replikacije. Eukariotske DNA imaju puno izvorišta replikacije dok prokariotske DNA imaju samo jedno. Kod bakterija protein DnaA prepoznaje izvorište replikacije, te se veže na njega i omogućuje vezanje DNA-helikaze. DNA-helikaza odmotava dvostruku zavojnicu DNA te dolazi do pucanja vodikovih veza između lanaca. Kako se DNA odmotava, dolazi do stvaranja superzavoja što povećava torzijski stres u DNA i otežava odmotavanje. Enzim giraza (koja pripada razredu topoizomeraza II) uklanja te superzavoje. Kako bi se spriječilo ponovno povezivanje odmotanih jednolančanih DNA u dvolančanu DNA, veže se protein SSB koji sprječava asociiranje jednolančanih DNA. Sljedeće, enzim primaza formira RNA-početnicu na koju se veže DNA-polimeraza. Početnica ima slobodnu 3'-OH grupu. DNA-polimeraze sintetiziraju DNA u 5'→3' smjeru tako da kataliziraju nukleofilni napad 3'-OH skupine zadnjeg nukleotida rastućeg lanca na  $\alpha$ -fosfat nadolazećeg dNTP-a. DNA-polimeraze sadrže metalne ione u aktivnom mjestu.<sup>3,4</sup>



Slika 2. Mehanizam adicije novog nukleotida pomoću DNA-polimeraze. Preuzeto i prilagođeno prema [4]

Točnost replikacije DNA osigurava se sparivanjem komplementarnih parova baza. Ukoliko je ipak došlo do greške, DNA-polimeraze imaju odvojenu domenu za popravak greške. Ako je dodan krivi nukleotid, 3'→5' egzonukleazna aktivnost ove domene uklanja krivo spareni nukleotid te polimeraza dodaje ispravan nukleotid. Ta aktivnost se naziva popravak pogreške (eng. *proofreading*). Polimerazna aktivnost i popravak greške odvijaju se u zasebnim domenama DNA-polimeraze.<sup>3</sup>

Mjesto sinteze DNA naziva se replikacijske rašlje. Novi lanac DNA se uvijek sintetizira u 5'→3' smjeru. Budući da su lanci antiparalelni tj. idu u suprotnim smjerovima, lanac kalup se čita od 3'→5' smjeru. Jedan lanac DNA se sintetizira neprekidno i zove se vodeći lanac, a drugi lanac se sintetizira u obliku Okazakijevih fragmenata te se naziva tromi lanac. Kako replikacija napreduje, DNA-ligaza spaja Okazakijeve fragmente katalizirajući stvaranje fosfodieterskih veza.<sup>4</sup>

### 2.3. Geni

Gen je dio DNA koji kodira primarni slijed nekog genetičkog produkta, koji može biti polipeptid ili RNA. Gen je dio kromosoma koji određuje ili utječe na fenotip, poput boje očiju. Cjelokupni nukleotidni slijed stanične DNA čini genom. Samo mali dio genoma zapravo kodira za proteine. Neki se geni mogu izraziti na različite načine kako bi generirali više proteina ovisno o tkivu u kojem je gen ekspimiran. Tijekom ekspresije gena, DNA se prvo kopira u RNA procesom transkripcije. mRNA dalje služi za sintezu proteina.

Transkripcija je proces kopiranja genetičke informacije s DNA u RNA. DNA služi kao kalup kojeg čita RNA-polimeraza. Nastaje jednolančana mRNA koja je komplementarna DNA, a razlikuje se po tome što sadrži ribozu umjesto deoksiriboze i uracil umjesto timina kao što je prije već navedeno. Kasnije, u translaciji mRNA se koristi kao kalup za sintezu polipeptida koji se sastoje od aminokiselina. Kako bi se preveo slijed nukleotida u slijed aminokiselina koristi se genetski kod. Tri uzastopna nukleotida, što se naziva kodon, kodiraju jednu aminokiselinu polipeptidnog lanca. Jedna aminokiselina može biti kodirana i pomoću više kodona. Slijed aminokiselina određen je slijedom baza u DNA. Antikodon na tRNA molekuli prepoznaje taj komplementarni slijed od tri baze. mRNA se translacija u proteine što se odvija na ribosomima. Translacija je kompliciraniji proces od transkripcije jer se u transkripciji nukleotidi samo kopiraju, a u translaciji se slijed nukleotida prevodi u slijed aminokiselina.

Prosječni polipeptidni lanac od 350 aminokiselina odgovara DNA duljine 1050 parova baza. Kromosom bakterije *Escherichia coli* je cirkularna DNA molekula koja sadrži 4,639 675 parova baza. Te baze kodiraju 4300 gena za proteine i 157 gena za strukturne i katalitičke RNA. Ljudski genom sadrži otprilike 3,1 milijardu parova baza koje kodiraju 25 000 gena na 24 različita kromosoma.<sup>5</sup>

Aktivnost gena je kontrolirana na razini transkripcije. Hoće li gen biti transkribiran određuje se međudjelovanjem specifičnih DNA slijedova i specifičnih proteina koji se vežu za te sekvence.<sup>1,6</sup>

## § 3. SINTETSKI GENI

### 3.1. Sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču

Sinteza na čvrstom nosaču razvijena je prvo za sintezu peptida, ali ima primjenu i u sintezi oligonukleotida. Kemijsku sintezu na čvrstom nosaču izumio je Bruce Merrifield te je zbog toga 1984. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju.<sup>8</sup> Sinteza na čvrstom nosaču se izvodi na čvrstom materijalu koji se nalazi u koloni koja omogućuje slobodan prolazak svih reagensa i otapala. Metodu je moguće automatizirati.

Sinteza fosforamiditnog oligonukleotida uključuje oligonukleotidni rastući lanac koji je vezan za čvrstu podlogu te se na njega adiraju aktivirani monomeri. Sinteza se odvija u četiri faze: uklanjanje zaštitne skupine, povezivanje, blokiranje i oksidacija. Dodaje se jedan nukleotid u jednom ciklusu.

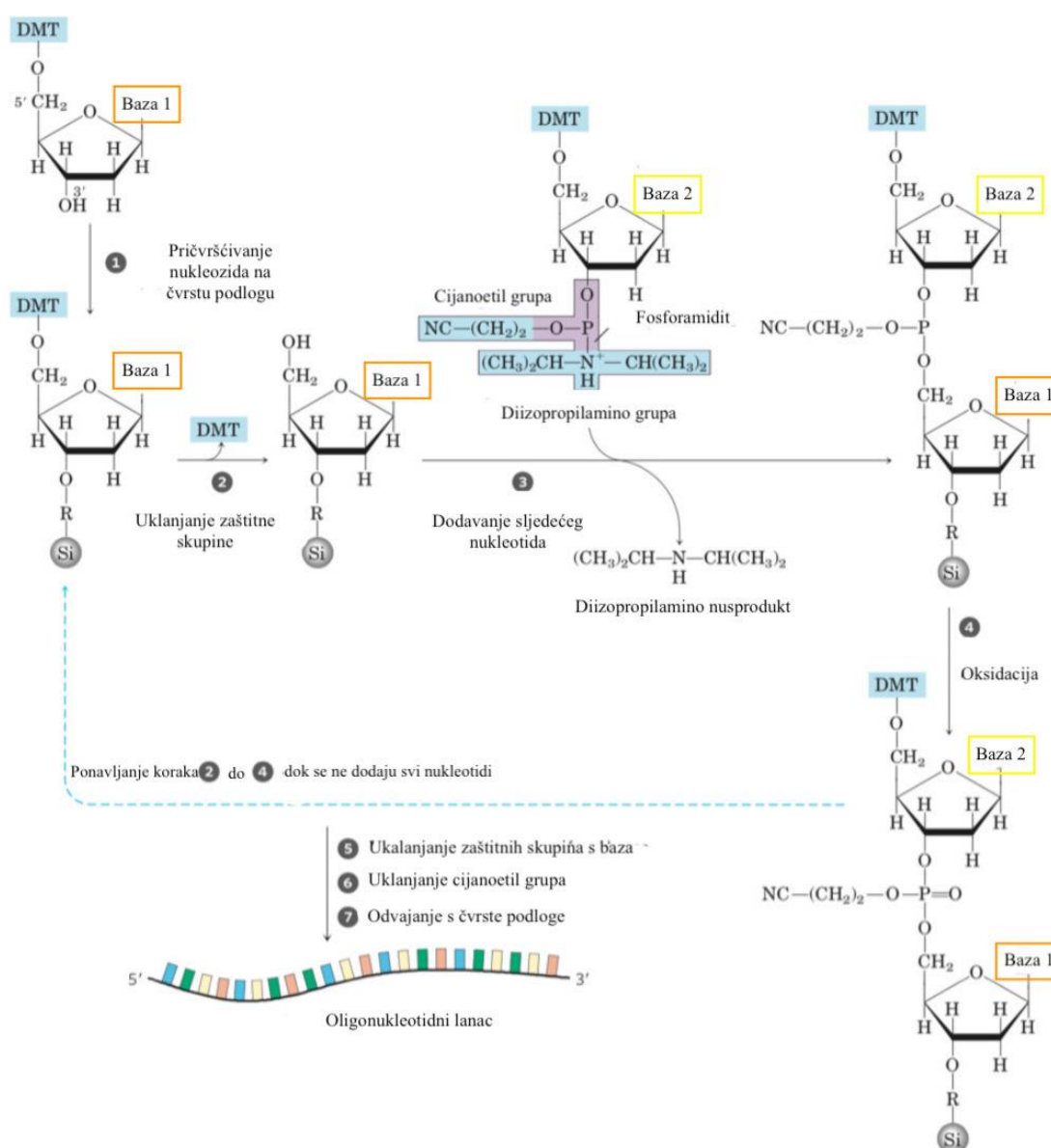
Prvi nukleozid je pričvršćen za podlogu preko svoje 3'-OH grupe, a 5'-OH grupa mu je zaštićena s dimetoksitritilom (DMT) kako bi se spriječila polimerizacija i ta se grupa mora maknuti prije početka sinteze. Pomoću slabe kiseline se uklanja zaštitna DMT skupina s 5'-kraja rastućeg lanca i zaostaje reaktivna OH skupina.

Aktivirani monomeri su zaštićeni deoksiribonukleozid 3'-fosforamiditi koji imaju zaštićenu 5'-OH grupu pomoću dimetoksitritila (DMT). Na 3'-kraju ima fosforamidit tj. trovalentni fosfit koji umjesto jednog kisika ima amino grupu ili supstituirani amin (diizopropilamin). Za jedan od fosforamiditnog kisika se veže b-cijanoetil (bCE) što ga čini nereaktivnim. Drugi kisik je vezan za deoksiribozu. Deoksiribonukleozid fosforamiditi su pomiješani s aktivatorom tetrazolom. Reaktivne grupe na svim bazama su isto zaštićene. 5'-OH rastućeg lanca vezanog na čvrstu podlogu radi nukleofilni napad na 3'-fosfor nadolazećeg nukleotida i formira fosfit triester uz oslobađanje supstituiranog diizopropilamina.

Neizreagirane 5'-OH grupe se blokiraju acilacijom kako bi se izbjegle delecije. Inače bi reagirale sa sljedećim fosforamiditima, a formirani oligonukleotidi bi imali bazu manje što dovodi do delecije. Acetilacijom 5'-OH grupa one se blokiraju i ne mogu reagirati. Koriste se N-dimetilimidazol i anhidrid octene kiseline koji pomiješani zajedno acetiliraju alkohole.

Fosfitni ester oksidira se jodom i nastaje fosfortriester. Zaštitna DMT skupina uklanja se ispiranjem kolone kiselinom kako bi 5'-OH skupina mogla reagirati sa sljedećim nukleotidom. Nastaje otopina narančaste boje od karbokationa DMT.

Ponavljaju se reakcije dodavanja nukleotida koji ima reaktivni fosforamidit na 3'-kraju dok se ne doda željeni broj nukleotida. Na kraju se ostale zaštitne grupe na bazama i fosfatima uklone dodavanjem otopine  $\text{NH}_3$ . Oligonukleotid se odvaja s čvrste podloge pomoću koncentrirane otopine amonijevog hidroksida te pročišćava HPLC kromatografijom ili elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Spajanje se provodi u bezvodnim uvjetima jer voda reagira s fosforamiditima.



Slika 3. Sinteza oligonukleotida fosforamiditnom metodom. Preuzeto i prilagođeno prema [9]



Sinteza fosforamiditnog oligonukleotida odvija se u 3'→5' smjeru suprotno 5'→3' smjeru biosinteze DNA u replikaciji DNA. Svaki se oligonukleotid zasebno sintetizira na svojoj koloni te se onda željeni oligonukleotidi pomiješaju i tvore gen. Tako se smanjuje složenost sinteze oligonukleotida jer se u smjesi koriste samo oligonukleotidi koji su potrebni za taj gen. Metoda je vrlo korisna jer se mogu napraviti oligonukleotidi sa slijedom koji se odredi po želji. Ekspresijom sintetskih gena mogu se proizvesti novi proteini s novim svojstvima.

Fosforamiditna sinteza se izvodi u koloni, a materijali koji se koriste su netopljive čestice, promjera 50-200 μm, na koje je oligonukleotid vezan tijekom sinteze. Najčešće se koristi staklo s kontroliranim porama ili polistiren. Dimenzije materijala se prilagođuju veličini oligonukleotida.

Ova metode je vrlo učinkovita, s efikasnosti većom od 99% , ako oligonukleotid sadrži manje od 100 nukleotida.<sup>7</sup> Međutim, tijekom uklanjanja zaštitnih skupina sa kiselina javljaju se reakcije depurinacije, posebno kod adenzina, koje utječu na kvalitetu sinteze oligonukleotida koji su dulji od 100 nukleotida. Na kvalitetu sinteze utječu i uklanjanje DMT zaštitne grupe, što ako je neuspješno dovodi do delecija baze. Sinteza RNA je složenija jer se treba zaštititi 2'-OH skupina riboze tako da to ne utječe na reaktivnost 3'-OH grupe.

Kako bi se smanjila potrošnja reagensa i mutacije koje nastaju prilikom uklanjanja zaštitnih skupina sa kiselina postoji i alternativna metoda sinteze fosforamiditnog oligonukleotida. Umjesto DMT skupine koja štiti 5'-OH svakog fosforamidita, koristi se karbonatna skupina. Koristi se peroksi anion koji tada služi kao nukleofil za uklanjanje 5'-karbonata zaštitne skupine i oksidaciju fosfit tristerske veze do fosfotriesterske veze. U lužnatim uvjetima uklanjanje 5'-karbonata pomoću peroksi aniona je ireverzibilno te zato eliminira depurinaciju i smanjuje mutacije u sintetiziranoj DNA.<sup>9-11</sup>

### 3.2. Sinteza oligonukleotida na mikročipovima

Sinteza oligonukleotida na mikročipovima koristi alternativnu fosforamiditnu sintezu. Oligonukleotidi se nalaze na površini mikročipa te se temelji na sintezi pod svjetlom i uklanjanju zaštite s fotolabilnih nukleozida fosforamidita. Koriste se fotolitografske maske kako bi se odabralo područje površine čipa koja će se izložiti svjetlosti. Oligonukleotidima koji

su izloženi svjetlosti uklanjaju se fotolabilne zaštitne skupine na 5'-OH, što aktivira tu OH skupinu za spajanje s aktiviranim nukleozidima. Svaki ciklus tako produžuje oligonukleotid za jednu bazu. Moguće je i paralelno sintetizirati veliki broj oligonukleotida na jednom mikročipu.<sup>7</sup>

Postoje i naprednije metode koje su zamijenile fotolitografske maske s mikrozrcalima pomoću kojih se može kontrolirati svjetlost.<sup>11</sup>

Prednost sinteze oligonukleotida na mikročipu je to što je puno jeftinija od sinteze oligonukleotida na čvrstom nosaču. Cijene se kreću od \$0.00001-\$0.001 po nukleotidu što je puno jeftinije od \$0.05-\$0.15 po nukleotidu za sintezu oligonukleotida na čvrstom nosaču.<sup>12</sup> Manja cijena je djelomično zbog manje količine potrebnih reagensa. Ipak, oligonukleotidi sintetizirani na mikročipu su manje kvalitetni i metoda je više podložna greškama nego sinteza oligonukleotida na čvrstom nosaču. Unatoč tome, ovom je metodom moguće sintetizirati više jedinstvenih oligonukleotida nego metodom na čvrstoj podlozi.

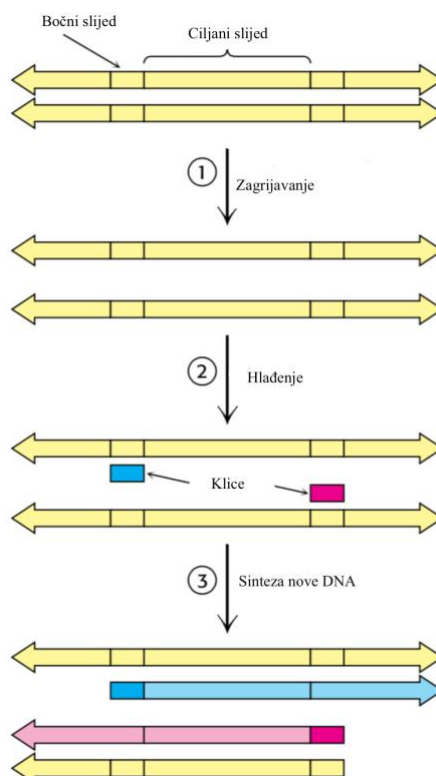
### 3.3. Lančana reakcija polimeraze

Najčešće korištena metoda povezivanja kraćih oligonukleotida u dulje fragmente je lančana reakcija polimeraze (PCR). Lančana reakcija polimeraze kopira puno fragmenata određenog slijeda DNA te je metoda za umnažanje specifičnih sljedova DNA. Može poslužiti za stvaranje milijuna kopija jednog odsječka DNA. Ovo višestruko umnažanje odsječka DNA u PCR-u je korisno jer omogućuje manipulaciju i proučavanje gena. Primjena lančane reakcije polimeraze je vrlo široka, može se koristiti u biokemiji, molekularnoj biologiji, medicini, forenzici...

Za lančanu reakciju polimeraze potrebna je dvolančana DNA koja sadrži fragment kojeg je potrebno kopirati, par početnica, DNA-polimeraza koja je otporna na temperaturu te sva četiri deoksiribonukleozida trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Početnice su kratki oligonukleotidi koji se sparuju s kalupom DNA na način da omeđuju ciljni slijed koji se želi umnožiti.

U prvom koraku otopina se zagrijava na 96 °C kako bi moglo doći denaturacije DNA odnosno pucanja vodikovih veza te odvajanja lanaca. DNA se mora denaturirati zato što nije prisutan enzim za razdvajanje lanaca, odnosno helikaza. Otopina se hladi na 56 °C kako bi se početnice mogle vezati na denaturirane DNA lance. Jedna se početnica veže na jedan lanac, a druga na drugi lanac. Početnice su komplementarne sljedovima u lancima DNA koji omeđuju

ciljnu DNA koja se treba umnožiti. Početnice su prisutne u suvišku što povećava vjerojatnost da će se baš one vezati za određeni slijed kako se DNA lanci ne bi opet spojili. Otopina se opet zagrije na 72 °C što je optimalna temperatura za DNA-polimerazu *Taq*, izoliranu iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u izvorima vruće vode. *Taq*-DNA-polimeraza produžuje lance u 5'→3' smjeru dodajući deoksiribonukleozid-trifosfate.<sup>7,11,13-15</sup>

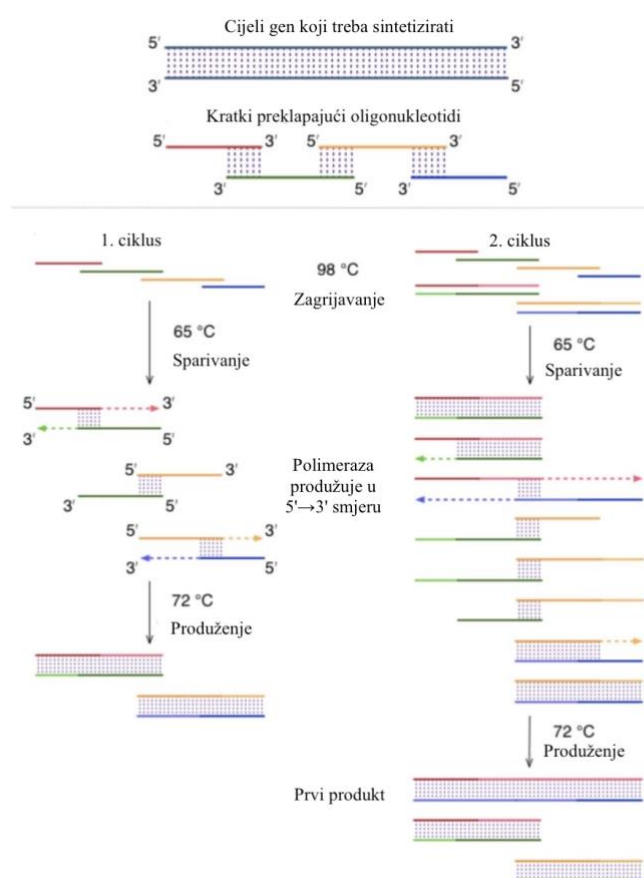


Slika 4. Prvi ciklus lančane reakcije polimeraze. Preuzeto i prilagođeno prema [15]

Ovo je jedan ciklus lančane reakcije polimeraze koji se obično ponavlja 30 puta. *Taq* polimeraza je i dalje prisutna u otopini. Na kraju trećeg ciklusa dobivaju se dva fragmenta koji predstavljaju ciljani početni slijed. Nakon  $n$  ciklusa, dobije se  $2^n$  kopija DNA. Umnažanje je milijun puta nakon 20 ciklusa i milijardu puta nakon 30 ciklusa, što se može izvršiti u sat vremena.<sup>14</sup>

Postoji verzija PCR metode koja omogućuje kreiranje sintetskih gena počevši od djelomično preklapajućih sintetskih oligonukleotida duljine oko 100 nukleotida. Pri tome termostabilna DNA-polimeraza dodaje dNTP-ove kako bi popunila „rupe“ na jednom lancu pomoću komplementarnih baza drugog lanca. Koriste se kratki sintetski oligonukleotidi koji se

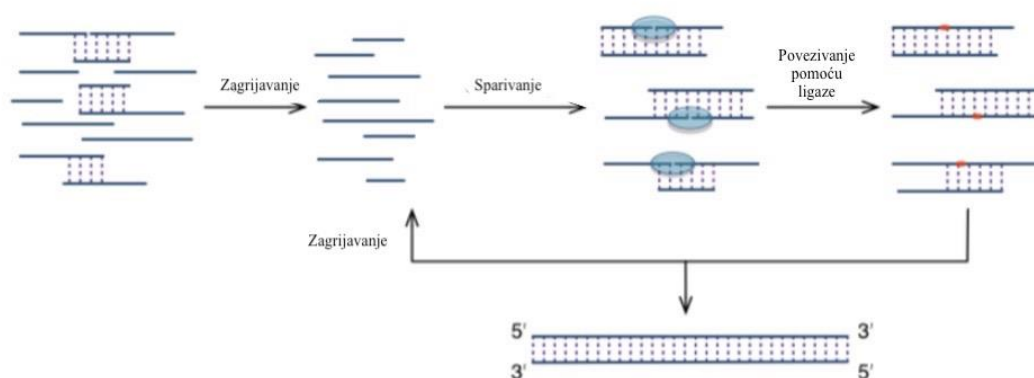
djelomično preklapaju (u duljini 15-20 nukleotida) i zajedno odgovaraju željenom genu. Između susjednih oligonukleotida se nalaze „rupe“. Smjesa tih oligonukleotida se grije te se onda hladi kako bi se mogli spariti komplementarni oligonukleotidi. 5'-kraj jednog oligonukleotida se veže za 3'-kraj drugog. Oligonukleotidi koriste suprotni lanac kao kalup. Puno oligonukleotida se preklapa, ali se produžuju samo oni fragmenti koji se mogu polimerizirati u u 5'→3' smjeru, inače replikacija staje jer DNA-polimeraza ne može produživati lance u u 3'→5' smjeru. Na taj način nastaje dvolančana DNA koja se opet denaturira u jednolančanu DNA. U svakom sljedećem ciklusu nastaju dulji fragmenti od prethodnih koji se sparuju. Ponavljanjem grijanja i hlađenja oligonukleotidi se produžuju dok se ne dobije potpuno sastavljen željeni gen. Željeni gen može se amplificirati pomoću lančane reakcije polimeraze.<sup>7,11,12,16</sup>



Slika 5. Verzija PCR-a za kreiranje sintetskih gena pomoću preklapajućih oligonukleotida. Preuzeto i prilagođeno prema [16]

### 3.4. Lančana reakcija ligaze

Mehanizam lančane reakcije ligaze (LCR) je sličan onom u PCR-u, ali se razlikuje po tome što koristi dva enzima: termostabilnu ligazu i *Taq*-DNA-polimerazu. Kao i u PCR-u, oligonukleotidi se zajedno pomiješaju, denaturiraju te ohlade kako bi se fragmenti mogli spariti. Termostabilna ligaza povezuje dva fragmenta što se onda može amplificirati putem PCR. Može se zagrijati blizu točke mekšanja oligonukleotida čime se povećava specifičnost. Točka mekšanja je temperatura pri kojoj je polovina strukture DNA denaturirano. Korištenjem termostabilne ligaze mogu se razlikovati DNA sljedovi koji se razlikuju u samo jednom paru baza.<sup>17</sup> Proces se ponavlja dok se ne dobije gen željene duljine.<sup>7,16</sup>



Slika 6. Lančana reakcija ligaze. Preuzeto i prilagođeno prema [16]

### 3.5. Pogreške u sintezi gena

U kemijskoj sintezi oligonukleotida nije moguće izbjeći pogreške kao što su delecije, umetanje, supstitucije baza. Najčešće vrste pogrešaka u sintezi oligonukleotida događaju se kada se novi fosforamiditni monomer ne uspije povezati u rastući lanac. Sprječava se rast lanaca acetilacijom, a neuspjeh u deprotonaciji dovodi do delecija u završnom DNA lancu. Umetanja se mogu dogoditi kada se DMT cijepa aktivatorom tetrazolom.

Spajanje kratkih oligonukleotida u dugačke lance DNA pomoću DNA-polimeraze isto može uzrokovati pogreške. Sve ove moguće pogreške u sintetskim genima uzrokuju stopu pogreške od 1-10 mutacija po kilobazi.<sup>19</sup>

Čistoća oligonukleotida se može poboljšati metodama pročišćavanja kao što su HPLC ili SDS-PAGE. Oligonukleotidi s hidrofobnim DMT mogu se odvojiti od prerano terminiranih sekvenci koje nemaju zaštitnu grupu. Ovim se postupkom može ukloniti 90% pogrešaka, najviše umetanje i delecije, ali ne mogu se popraviti pogreške u supstituciji ili umetanju baza koje su i najčešće.<sup>18,20</sup>

### 3.6. Popravak pogrešno sparenih baza

Enzimi koji kataliziraju hidrolizu fosfodieterske veze u DNA nazivaju se nukleaze. Nukleaze se dijele na egzonukleaze i endonukleaze. Egzonukleaze cijepaju nukleinsku kiselinu s jednog kraja molekule te uklanjaju nukleotide samo s 5'-kraja ili 3'-kraja. Endonukleaze cijepaju DNA na nekom specifičnom mjestu. Restriksijske endonukleaze prepoznaju određene sljedove u DNA te se vežu i cijepaju okosnicu na točno određenom mjestu.<sup>21</sup>

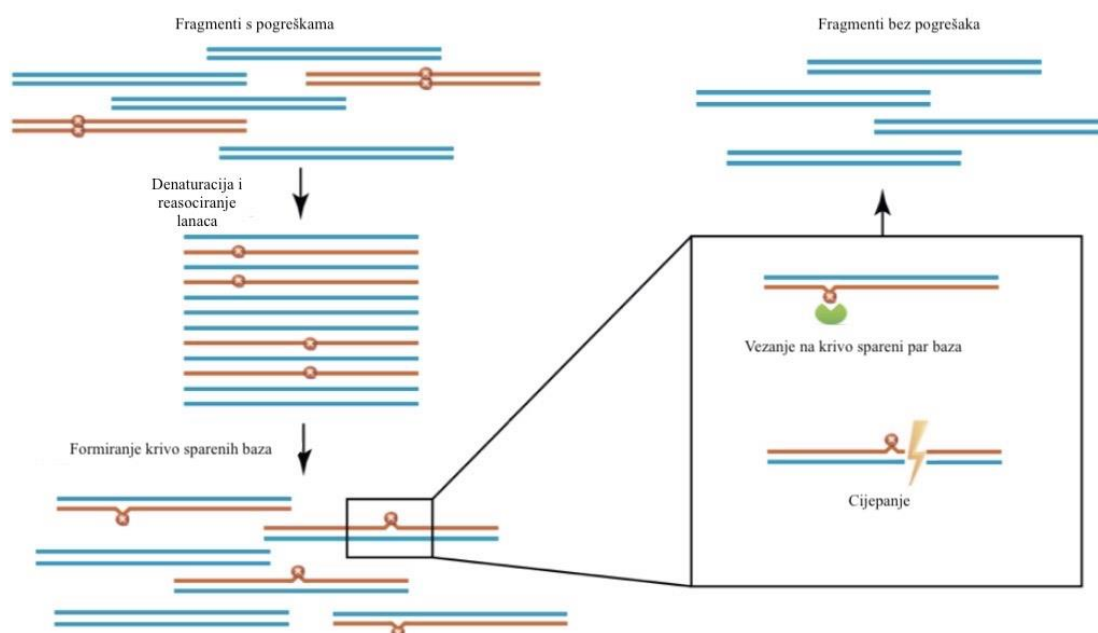
MutH, MutL i MutS su proteini izolirani iz bakterije *E. coli*. Popravak se temelji na metilaciji kalupa te kratko vrijeme nakon replikacije kalup je metiliran dok novosintetizirani lanac nije. Novosintetizirani lanac se onda može raspoznati od metiliranog kalupa. Kasnije se i novosintetizirani lanac metilira te se ne može raspoznati od kalupa. Izostanak metilacije kratko vrijeme nakon replikacije omogućava kompleksu proteina MutHLS da prepozna koji je novi lanac i da u njemu ispravi pogrešku nastalu ugradnjom pogrešnog nukleotida tijekom replikacije DNA. Kompleks proteina MutL i MutS se vežu na krivo spareni par baza i zajedno s endonukleazom MutH započinju skenirati DNA dok ne naiđu na GATC hemimetiliranu sekvencu. Endonukleaza onda reže lanac, lanac se pocijepa i hidrolizira te se ukloni krivo spareni par baza, a nastala „rupa“ se popuni pomoću DNA-polimeraze i ligaze. MutHLS se može koristiti za uklanjanje mutiranih sekvenci iz oligonukleotida nastalih putem PCR. Ova metoda korištenja MutHLS je korisna za male pogreške umetanja i delecije, ali za ostale vrste pogrešaka nije učinkovita.

Ako je prisutna greška u DNA, ona će se kopirati dalje putem lančane reakcije polimeraze. Postoji puno metoda kojima se može popraviti krivo spareni par baza. Denaturiranjem i hlađenjem DNA, neki lanci se sparuju ispravno, a neki sadrže pogrešno

sparene baze. Regije koje sadrže krivo sparene baze prepoznaju određeni proteini te ih uklanjaju. MutS protein je dio iz bakterijskog MutHLS proteinskog kompleksa. MutS prepoznaje pogrešno spareni par baza te se veže za njega. Fragmenti koji sadrže pogreške se mogu odvojiti elektroforezom.

Ukoliko oligonukleotid sadrži puno pogrešaka, koristi se druga metoda. Oligonukleotid se denaturira i hladi te mu se dodaje smjesa restriksijskih endonukleaza, a preklapajući kratki fragmenti se podvrgnu koloni na kojoj se nalazi protein MutS. Fragmenti koji sadrže pogrešno sparene baze se zadržavaju na proteinu MutS, a fragmenti bez pogrešaka prolaze kroz kolonu te se povezuju u dugački gen pomoću lančane reakcije polimeraze.<sup>18-20</sup>

Umjesto proteina koji prepoznaje pogrešku može se koristiti i specifična endonukleaza koja prepoznaje i reže oba lanaca tamo gdje se nalazi pogrešno spareni par baza. Egzonukleaza onda reže lance koji sadrže krivu bazu te se lanci povezuju pomoću lančane reakcije polimeraze. Endonukleaze koje se mogu koristiti su endonukleaza MutH, resolvaze kao što je T4 endonukleaza VII, T7 endonukleaza 1 iz *E. coli*, endonukleaza V te nukleaze specifične za jednolančanu DNA kao što su S1 nukleaza iz *Aspergillus oryzae*, P1 nukleaza iz *Penicillium citrinum* i CEL nukleaza iz celera.<sup>18</sup>



Slika 7. Shema popravka krivo sprenog para baza pomoću MutS proteina. Preuzeto i prilagođeno prema [18]

### 3.7. Primjena sintetskih gena

#### 3.7.1. Sinteza bakterijskih genoma

Sintetski geni imaju primjenu u sintetskoj biologiji. Grupa znanstvenika je uspješno transplantirala sintetsku DNA iz jedne bakterije u drugu. Stvorili su sintetski bakterijski kromosom kojeg su prenijeli u bakteriju u kojoj je izbačen prirodni kromosom. Stanice su se počele replicirati i stvarati nove proteine. Sekvencirali su genom bakterije *Mycoplasma mycoides* i napravili sintetski kromosom koristeći preklapajuće sintetske oligonukleotide. Da bi se sintetski kromosom razlikovao od prirodnog u njega su ubačeni specifični sljedovi-oznake. Izbacili su kromosom iz srodne bakterije *Mycoplasma capricolum*, a u nju su prenijeli sintetski kromosom iz bakterije *M. mycoides*. Početni pokušaji izvlačenja genoma *M. mycoides* i transplantacije u *M. capricolum* nisu uspjeli, ali su nakon par mjeseci ipak urodili plodom. *M. capricolum* sa sintetskim kromosomom sintetizirala je proteine koje sintetizira bakterija *M. mycoides*, a ne proteine bakterije *M. capricolum*. Ovim eksperimentom su pokazali da je moguće transplantirati sintetske kromosome iz jednog organizma u drugi.<sup>22</sup>

#### 3.7.2. Optimizacija kodona

Genetski kod se sastoji od 64 kodona od kojih 61 kodon kodira 20 aminokiselina. Zbog degeneriranosti genetskog koda, jedna aminokiselina može biti kodirana s više kodona te je zbog toga moguća optimizacija kodona. Optimizacija kodona je postupak mijenjanja kodona unutar sekvence gena radi poboljšanja ekspresije proteina. mRNA koje kodiraju isti protein pomoću različitih kodona mogu se razlikovati u količini eksprimiranog proteina. Optimizacija kodona može utjecati na funkcije proteina te može imati neočekivane efekte i utjecati na konformaciju i stabilnost proteina i mijenjati njihovu funkciju. Mnoge metode optimizacije kodona izbjegavaju korištenje rijetkih kodona, tj. onih kodona koje se rijetko koriste u genomu stanice domaćina u kojem se proteinski gen želi eksprimirati. Također, mogu se koristiti oni kodoni koji onemogućuju stvaranje nepoželjnih elemenata u DNA slijedu kao što su restrikcijska mjesta i terminatori transkripcije. Dostupni su mnogi programi koji automatski predviđaju optimizirani kodonski slijed gena, ovisno o tome u kojem organizmu se želi eksprimirati proteinski gen. Neki od programa su JCat i Optimizer.<sup>19</sup> Optimizer koristi



informacije iz baze podataka gena za predviđanje povećano isklimiranih gena. Nakon što se odredi koji je optimalan slijed kodona za neki gen, priredi se sintetski gen s optimiranim kodonima.

Iako se ekspresija proteina može povećati pomoću optimizacije kodona, mRNA sadrži brojne informacije koje nalaze u aminokiselinskom kodu, a što se može poremetiti optimizacijom kodona. Optimizacija kodona se primjenjuje u rekombinantnim proteinskim lijekovima i terapijama nukleinskim kiselinama.<sup>19,23</sup>

### 3.7.3. Mutageneza

Mutageneza je jedna od metoda za proučavanje funkcije gena koja se temelji na promjenama u slijedu nukleotida. Najčešće se provodi ciljana mutageneza korištenjem mutagenih PCR početnica koje sadrže mutaciju. Druga metoda je priređivanje sintetskog gena u kojem je jedan ili više nukleotida ciljano izmijenjeno u svrhu promjene aminokiselina. Mutirani geni se ekspimiraju npr. u bakteriji pri čemu nastaju mutirani proteini koji se uspoređuju s divljim tipom proteina. Stoga mutageneza omogućuje proučavanje utjecaja pojedinih aminokiselina na strukturu i funkciju proteina.<sup>24,25</sup>

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 105-111.
2. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2013, str. 288-289.
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 828-832.
4. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2013, str. 1011-1015.
5. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2013, str. 979-980.
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 123-126.
7. R. A. Hughes, A. E. Miklos, A. D. Ellington, Gene synthesis: Methods and applications, *Methods in Enzymology*, Vol 498, 2011, str. 278-286.
8. <https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis> (datum pristupa 5. rujna 2020.)
9. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2013, str. 304-305.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 139-140.
11. R. A. Hughes, A. D. Ellington, Biochemistry, Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **9**, (2017) str. 4-9.
12. Kosuri, S. & Church, G. M. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nat. Methods* **11**, (2014), str. 500-501.
13. <https://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis> (datum pristupa 5. rujna 2020.)
14. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New

- York, 2013, str. 327-328.
15. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2015, str. 141-142.
  16. <https://www.atdbio.com/content/63/Gene-synthesis> (datum pristupa 5. rujna 2020.)
  17. M. Wiedmann, W. I. Wilson, J. Czajka, J. Luo, F. Barany, C. A. Batt, Ligase chain reaction (LCR)-Overview and applications, *PCR Methods and Applications*, 1994; 3(4), str. 51-53
  18. S. Ma, I. Saaem, J. Tian, Error correction in gene synthesis technology, *Trends Biotechnology*, 2012, 30(3), str. 147-151.
  19. R. A. Hughes, A. E. Miklos, A. D. Ellington, Gene synthesis: Methods and applications, *Methods in Enzymology*, Vol 498, 2011, str. 293-298.
  20. R. A. Hughes, A. D. Ellington, Biochemistry, Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **9**, (2017) str.12-13.
  21. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 2013, str. 315.
  22. <https://science.sciencemag.org/content/328/5981/news-summaries> (datum pristupa 18. rujna 2020.)
  23. V. P. Mauro, S. A. Chappell, A critical analysis of codon optimization in human therapeutics, *Trends Mol Med.* 2014; 20(11): str. 1-7.
  24. <https://www.synbio-tech.com/gene-synthesis-mutagenesis/> (datum pristupa 24. rujna 2020.)
  25. [https://www.genscript.com/gsfiles/gene\\_synthesis\\_handbook.pdf](https://www.genscript.com/gsfiles/gene_synthesis_handbook.pdf) (datum pristupa 24. rujna 2020.)