

Genetski modificirane bakterije sigurne za okoliš

Barić, Anja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:217:767782>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GENETSKI MODIFICIRANE BAKTERIJE SIGURNE ZA OKOLIŠ

**GENETICALLY MODIFIED BACTERIA SAFE FOR THE
ENVIRONMENT**

SEMINARSKI RAD

Anja Barić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor : doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. OPĆA SVOJSTVA MEHANIZAMA ZA OBUZDAVANJE	2
2.1 EFIKASNOST	3
2.2 SLOJEVITOST	4
2.3 ZADRŽAVANJE PLAZMIDA U REKOMBINANTNOJ BAKTERIJI	5
3. MEHANIZMI BAZIRANI NA AUKSOTROFNOSTI	6
4. MEHANIZMI TOKSIN-ANTITOKSIN SUSTAVA	8
5. ORTOGONALNI SUSTAVI	10
5.1 GEOMETRIJA DNA MOLEKULE	11
5.2 FOSFAT-ŠEĆERNA OKOSNICA NUKLEINSKIH KISELINA	11
5.3 ALTERNATIVNI KODONI I NESTANDARDNE AMINOKISELINE	12
6. ZAKLJUČAK	12
7. LITERATURA	13
8. SAŽETAK	15
9. SUMMARY	15

1. UVOD

Od ranih 1970-tih kada su se razvile prve metode za stvaranje genetički modificiranih bakterija, polja genetičkog inženjerstva i biotehnologije doživljavaju strelovit razvoj. Vrlo brzo postalo je jasno da uvođenje promjena u genetičku informaciju nije korisno samo za bolje razumijevanje građe i organizacije samih bakterija, već da takve bakterije mogu imati široku i nezamjenjivu ulogu u industriji, medicini, zaštiti okoliša i mnogim drugim sferama ljudske djelatnosti. Promijenjene (rekombinantne) bakterije danas se koriste za proizvodnju lijekova, farmacijski ili industrijski važnih spojeva, goriva, suzbijanje nametnika te prijenos cjepiva. Dizajnirani su razni sojevi s iznimnim katalitičkim svojstvima, sposobni razgraditi skoro sve poznate aktivne zagađivače okoliša. Na taj način otvorila su se vrata mnogobrojnim opcijama za bioremedijaciju i oporavak čitavih ekosustava (Cases i de Lorenzo, 2005).

Primjena rekombinantnih bakterija u otvorenim sustavima je mala, skoro nikakva. Za razliku od optimiziranih i kontroliranih uvjeta u laboratoriju, u vanjskom okolišu bakterije su suočene s mnoštvom nepredvidivih faktora kao i srodnim sojevima s kojima mogu ući u interakciju. Opasnost postoji i kod primjene u zatvorenim sustavima, u slučaju da dođe do bijega ili kontaminacije. Dvije su opasnosti na koje posebno treba obratiti pažnju. Prva je narušavanje ekosustava uslijed pretjeranog razmnožavanja genetički modificiranih bakterija, te njihove kompeticije s autohtonim organizmima za nutrijente i prostor. Druga, mnogo opasnija situacija, je ona u kojoj dolazi do horizontalnog prijenosa gena iz genetički modificirane jedinice u recipijentne bakterije bilo to konjugacijom, transdukcijom ili transformacijom. Na taj način može vrlo lako doći do novih i neželjenih genetičkih kombinacija kao i do daljnjeg širenja rekombinantnih gena (Wright i sur., 2013).

Kako bi primjena genetički modificiranih bakterija ostvarila svoj puni potencijal, javila se potreba za stvaranjem mehanizama koji bi riješili problem navedenih rizika i omogućili sigurno obuzdavanje bakterija u okolišu. U daljnjem tekstu prikazani su neki od tih mehanizama, njihove prednosti, mane i opća svojstva.

2. OPĆA SVOJSTVA MEHANIZAMA ZA OBUZDAVANJE BAKTERIJA

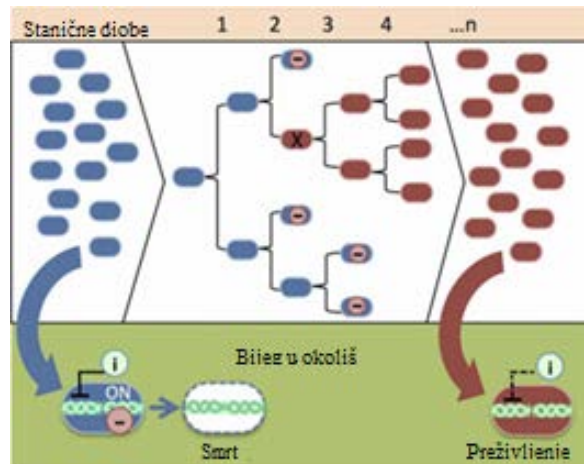
Mehanizmi za obuzdavanje genetički modificiranih bakterija mogu se svrstati u pasivne i aktivne. Pasivno obuzdavanje temelji se na upotrebi višestruko auksotrofnih sojeva koji su toliko oslabljeni, da u slučaju bijega u okoliš, brzo umiru. Kao takvi nisu adekvatni za

bilo kakvu primjenu u otvorenim sustavima, a i u zatvorenim sustavima im je vijabilnost često vrlo mala. Aktivni mehanizmi su raznoliki, a uglavnom podrazumijevaju inaktivaciju esencijalnih ili aktivaciju letalnih gena čija ekspresija ovisi o prisutnosti prirodnih ili sintetičkih spojeva. Jedan od velikih nedostataka ovakvih mehanizama je što se u bakterije uvodi mnogo strane DNA (Lee, 2010).

Iako indukcija aktivnih mehanizama uglavnom znači smrt bakterije domaćina ona ne zaustavlja u potpunosti mogućnost prijenosa rekombinantne DNA. Slobodna DNA može ostati funkcionalna unatoč vanjskim uvjetima i transformirati druge bakterije koje je unesu u sebe. Procjenjuje se da gram zemlje sadrži 1 mg, a litra morske vode čak 80 mg slobodnih nukleinskih kiselina (Wright i sur., 2013).

2.1 EFIKASNOST

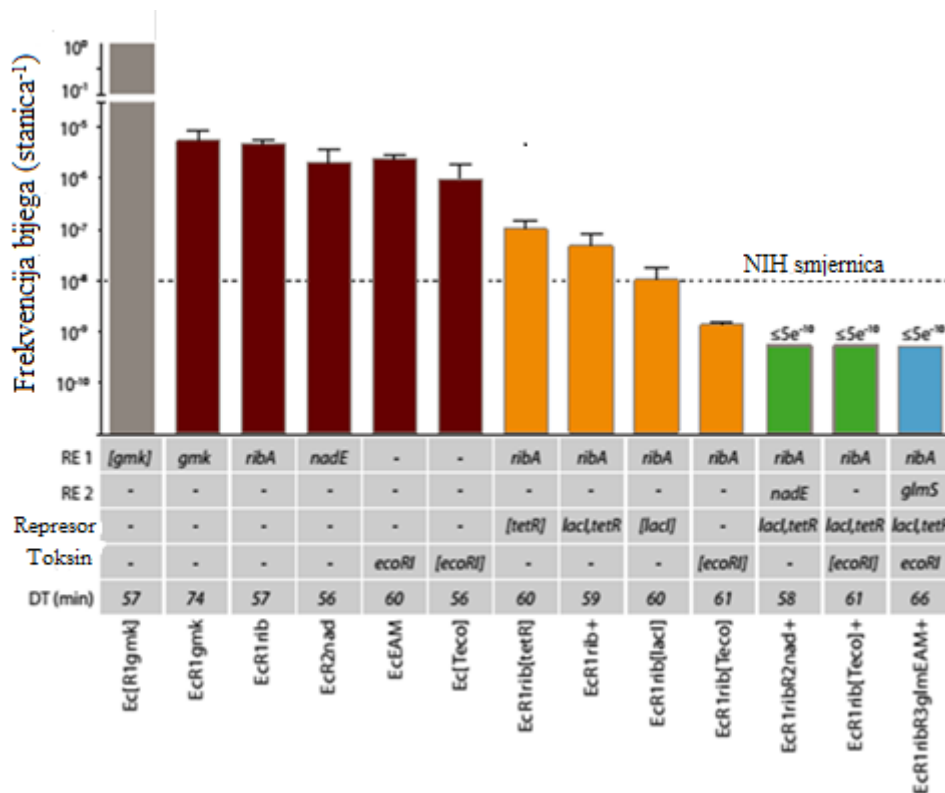
Potrebna razina efikasnosti aktivnog mehanizma obuzdavanja bakterija ovisi o razini opasnosti koju predstavlja rekombinantna bakterija, a procjenjuje se brojem jedinki koje su preživjele indukciju takvog sustava (slika 1). Američki Nacionalni institut za zdravlje (American National Health Institute) nalaže da frekvencija bijega (preživljenja) bakterija ne bi smjela biti veća od 10^{-8} (Knudsen i Karlstrom, 1991). Gallagher i suradnici su u svojem najnovijem radu zaključili da svaki efikasan sustav za obuzdavanje bakterija mora imati tri ključna svojstva: nisku frekvenciju bijega, modularnost i robusnost. Mutacije u letalnom genu ili kontrolnom elementu predstavljaju najveću prepreku aktivnim sustavima, stoga što manja frekvencija bijega smanjuje i pojavu mutantnih jedinki. Robusnost osigurava da bakterija održi fitness približno, ako ne i jednak, divljem tipu, a modularnost da se više različitih mehanizama može zajedno ukomponirati u jednu jedinku (Gallagher i sur., 2015).



Slika 1. Bijegom rekombinantnih bakterija može doći do propusne mutacije (-) ili mutacije koja u potpunosti onespособi ugrađeni mehanizam za obuzdavanje (x). Takvi mutanti preživljavaju i mogu u potpunosti preplaviti populaciju. (Preuzeto i prilagođeno iz Moe-Behrens, 2013)

2.2 SLOJEVITOST

Za sada još ne postoji jedan savršeni mehanizam kojim bi se opasnost od genetički modificiranih bakterija svela na nulu. Stoga je radi povećanja sigurnosti, američka Predsjednikova komisija za bioetička pitanja donijela konsenzus 2010. da rekombinantne bakterije trebaju sadržavati više različitih mehanizama za obuzdavanje (Wright i sur., 2013). Prednost različitih mehanizama obuzdavanja omogućava da, u slučaju da dođe do situacije u kojoj je jedan od mehanizama inaktiviran, obuzdavanje se može održati pomoću preostalih mehanizama. Vrlo je mala vjerojatnost da će istovremeno doći do inaktivacije svih mehanizama posebno ako oni imaju različite principe rada. Ta višestruka slojevitost može se postići kombiniranjem raznih mehanizama auktotrofnosti, toksičnih sustava i letalnih gena (slika 2). Veliki korak naprijed napravili su Gallagher i suradnici povezavši kontrolu ekspresije esencijalnih gena pomoću riboregulatora, auktotrofnost i ekspresiju restriksijske endonukleaze EcoRI koja cijepa genomsku DNA, u ovisnosti o malim sintetskim molekulama. Dobiveni rekombinantni soj *E. coli* ima frekvencijom bijega $<1.3 \times 10^{-12}$ (Gallagher i sur., 2015). O svakom od tih pojedinih mehanizama biti će još govora kasnije.



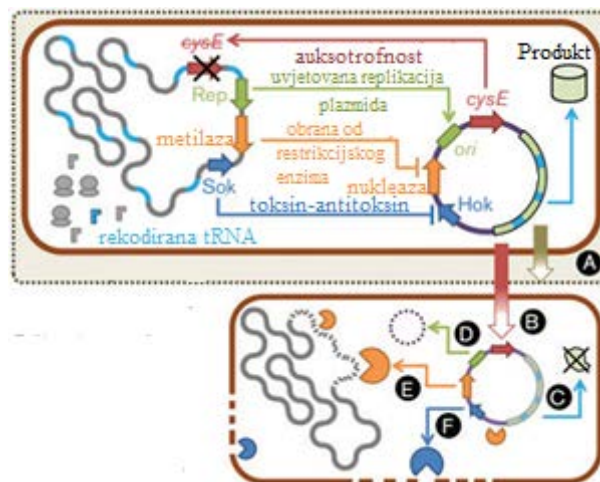
Slika 2. Slojevitost mehanizama za obuzdavanje bakterija povećava sigurnost. Prikazane su frekvencije bijega za sojeve *E. coli* koji sadrže jedan (crveno), dva (narančasto), tri (zeleno) i četiri (plavo) mehanizma za obuzdavanje. (Preuzeto i prilagođeno iz Gallagher i sur., 2015)

2.3 ZADRŽAVANJE PLAZMIDA U REKOMBINANTNOJ BAKTERIJI

Potrebno je obratiti pozornost na još neke nedostatke mehanizma obuzdavanja bakterija. Rekombinantni geni se uglavnom nalaze na plazmidima iako mogu biti i ugrađeni u sam genom bakterije. Plazmidima je mnogo lakše manipulirati, te se postiže mnogo veći broj produkata nekog gena s obzirom na njihovu puno veću ekspresiju u usporedbi s genomskom DNA (Wright i sur., 2013). No, plazmidi se konjugacijom mogu lako prenositi među srodnim bakterijama. Stoga su znanstvenici razvili više metoda kako zadržati plazmide učinivši ih ovisnima o genomskoj DNA rekombinantne bakterije u kojoj se nalaze. U slučaju da plazmid uđe u neku drugu bakteriju ona neće preživjeti, jer će sa plazmida doći do ekspresije toksičnih proteina ili letalnih enzima za koje ona nema kodirane obrambene mehanizme (Wright i sur., 2013). Prijenos plazmida može se onesposobiti inhibicijom njegove replikacije jer proteini potrebni za inicijaciju replikacije ostaju kodirani izvornom genomskom DNA. Plazmidi se mogu konstruirati i tako da njihovi geni recipijentu ne donose neku prednost ili da je za

translaciju njihovih gena potrebna neka nestandardna aminokiselina za koju recipijent opet ne kodira (slika 3). (stanica⁻¹)

Također, glavni selektivni markeri pri konstrukciji plazmida su geni za otpornost na antibiotike. Mnogi se danas slažu da rekombinantne jedinice namijenjene za puštanje u okoliš ne bi smjele sadržavati nikakve gene za otpornost na antibiotike jer bi se u protivnom riskirao nastanak superbakterija ili persistera; bakterija otpornih na više vrsta antibiotika (Wright i sur., 2013).



Slika 3. Mehanizmi za sprječavanje širenja plazmida: fizičke prepreke (A), nedostatak prednosti pri unosu (B), nemogućnost translacije zbog nedostatka sintetičkih komponenti (C), nemogućnost replikacije zbog nedostatka inicijatorskog proteina (D), te smrt recipijenta zbog nedostatka imunosti na određene restriktivske endonukleaze (E) i toksine (F). (Preuzeto i prilagođeno iz Wright i sur., 2013)

3. MEHANIZMI ZA OBUZDAVANJE BAKTERIJA BAZIRANI NA AUKSOTROFNOSTI

Auksotrofni organizmu su oni koji ne mogu sintetizirati određeni esencijalni spoj. Bez dodatka tog spoja u podlogu ili u okoliš, takvi organizmi umiru. Postoji više načina na koje se može postići auksotrofnost, a obično se inaktiviraju geni za sintezu aminokiselina (Wright i sur., 2013). Deaktivacija gena uvođenjem jednostavnih mutacija često nije dovoljna jer se takve mutacije, iako rijetko, pod selektivnim pritiskom mogu revertirati ili suprimirati. Delecija čitavih gena ima nešto bolju učinkovitost no i ona se potencijalno može nadomjestiti rekombinacijom gena iz srodnih jedinki divljeg tipa. Problem auksotrofности je što se često

spoj ili nutrijent koji bakterija ne može sintetizirati može nadomjestiti istim ili sličnim spojem iz prirode - okoliša. Auksotrofnost se stoga često kombinira s ekspresijom nekog toksičnog proteina. Molin i suradnici su 1987. dizajnirali bakteriju ovisnu o triptofanu, koja je ujedno sadržavala toksičan gen *hok* pod kontrolom *trp* promotora. U slučaju nedostatka triptofana dolazi do ekspresije proteina Hok koji narušava membrane što dovodi do smrti bakterije (Molin i sur., 1987).

Kod bakterija koje su namijenjene za bioremedijaciju, praktično je da one ujedno ovisne o molekuli koju razgrađuju. Contreras i suradnici su 1991. radili na soju bakterije *Pseudomonas putida* sposobne za razlaganje benzoata. U trenutku nestanka benzoata, dakle kada bakterija obavi svoju 'misiju', dolazi do ekspresije gena *xylS* koji pak pozitivno utječe na ekspresiju gena *gef*. Produkt Gef je toksičan i dovodi do smrti bakterije (Contreras i sur., 1991). Njihov rad nastavio je Ronchel, koji je gen za aspartat- β -semialdehid dehidrogenazu (gen *asd*), zamijenio istim tim genom pod negativnom kontrolom gena *xylS*. Tako je dobio da u nedostatku benzoata ujedno dolazi do deaktivacije gena *asd* neophodnog za rast i ekspresije toksičnog gena *gef* (Ronchel and Ramos, 2001).

Zadnjih par godina znanstvenici su uspješno radili na razvoju sojeva čija se auksotrofnost ne može suprimirati spojevima u vanjskom okolišu. Gallagher i suradnici razvili su sintetičke auksotrofe; sojeve *E. coli* kod kojih ekspresija esencijalnih gena ovisi o malim sintetičkim molekulama. Umjesto da mijenjaju svojstva promotora, kontrolu željenog esencijalnog gena stavili su u ruke riboregulatora. Riboregulatori su male molekule RNA koje mogu utjecati na transkripciju i translaciju željenog gena. One su pak pod kontrolom malih sintetičkih aktivatora i represora. U prisutnosti aktivatora, vijabilnost i fitness takvih bakterija približno je jednaka divljem tipu, a frekvencija bijega iznosi $\sim 10^{-6}$. Kombinacijom više esencijalnih gena pod kontrolom riboregulatora trebala se još više smanjiti frekvenciju bijega, no to u početku nije bio slučaj. Za uspješnu riboregulaciju potrebna je konstitutivna ekspresija represora s genoma, u ovom slučaju, represora LacI. Ekspresija je moguća jedino u prisustvu aktivatora koji veže represor i tako ga inaktivira. Genetskim sekvenciranjem bakterijskih mutanata koji su uspjeli preživjeti, utvrđeno je da je došlo do *frameshift* mutacije u genu *lacI* koja je deaktivirala represor i tako omogućila ekspresiju esencijalnog gena. Uspostavom dodatne ekspresije funkcionalnog represora LacI s gena umetnutog u plazmid, uspješno je suprimirana mutacija u kromosomskom genu. Frekvencija bijega se smanjila na $< 9.9 \times 10^{-8}$. Iz toga se pretpostavlja da se uporabom više različitih riboreguliranih esencijalnih gena u istom soju, zaista može smanjiti frekvencija bijega dokle god su za regulaciju korišteni različiti represori (Gallagher i sur., 2015).

Sintetičkim auksotrofima bavili su se i Mandell i suradnici na Harvardu. Uzeli su šest esencijalnih gena *E. coli*: adenilat kinazu, alanil-tRNA sintetazu, delta podjedinicu DNA polimeraze III, metionil-tRNA sintetazu, fosfoglicerat kinazu i tirozil-tRNA sintetazu i, pomoću kompjuterskog programa, u njih su na određenim mjestima uklopili amber stop kodon UAG tako da su enzimi zadržali stabilnu funkciju i strukturu. U bakteriju su također umetnuli plazmid koji sadrži posebno dizajniranu tRNA sintetazu koja na mjestu kodona UAG ugrađuje nestandardnu aminokiselinu L-4,4'-bifenilalanin (bipA). Tako su dobili soj *E. coli* kojem je za točnu translaciju, slaganje i funkciju određenih esencijalnih proteina potrebna nestandardna aminokiselina koju ne mogu dobiti iz prirodnog okoliša. To ih čini skoro otpornim na metaboličku nadobranu, mutacijski bijeg i horizontalni prijenos gena (Mandell i sur., 2015).

4. MEHANIZMI OBUZDAVANJA BAKTERIJA MEHANIZMOM TOKSIN-ANTITOKSIN

Sustavi toksin-antitoksin rašireni su u mnogim vrstama bakterijama, a prirodna uloga im je da osiguravaju nasljeđivanje plazmida. Rade na principu kratkoživućih antitoksina koji se vežu na toksine koji su mnogo stabilniji i tako ih inaktiviraju (slika 4). Zbog jednostavnosti, podjela sustava toksin-antitoksin s navedenim primjerima, te prednostima i nedostacima, prikazana je u tablici 1.

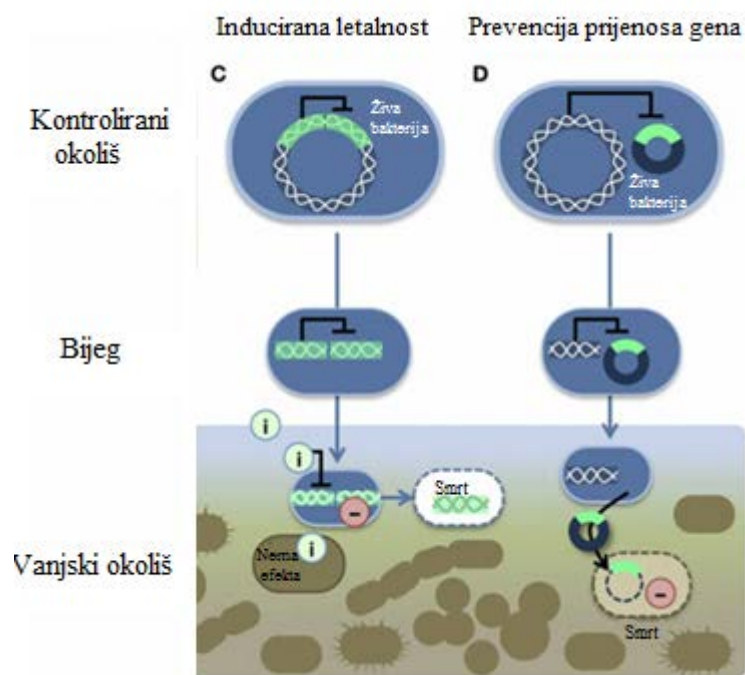
Tablica 1. Podjela toksin-antitoksin sustava u bakterijama (Preuzeto i prilagođeno iz Wright i sur.,2013.)

TIPOVI TOKSIN-ANTITOKSIN SUSTAVA	PRIMJERI	PREDNOSTI	NEDOSTATCI
TIP 1 Membranski toksični proteini koji su inaktivirani kratkim RNA antitoksinima	Hok (6.1 kDa)/ <i>sok</i> (65 nt) Fst (3.7 kDa)/RNAII (66 nt) TxpA (6.7 kDa)/ <i>ratA</i> (222 nt)	- dobro okarakterizirani - zbog male veličine nisu metabolički teret	- specifični za Gram- pozitivne ili Gram negativne bakterije - prevelika ekspresija može dovesti do pojave persistera

<p>TIP 2</p> <p>RNAaze, inhibitori giraze i translacijski inhibitori inaktivirani spajanjem sa antitoksin proteinom.</p>	<p>Kid (14.8 kDa)/Kis (9.3 kDa)</p> <p>MazF (12.1 kDa)/MazE (9.4 kDa)</p> <p>CcdB (11.7 kDa)/CcdA (8.4 kDa)</p> <p>Doc (13.6 kDa)/ Phd (8.1 kDa)</p>	<p>- dobro okarakterizirani</p> <p>- većina aktivna u i Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama</p>	<p>- bakteriostatici</p> <p>- CcdB/CcdA samo aktivni u enterobakterijama</p>
<p>TIP 3</p> <p>RNAaze inhibirane sekundarnim strukturama 5' kraja transkripta.</p>	<p>ToxN (19.7 kDa)</p>	<p>- prisutni i u Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama</p> <p>- mali metabolički teret</p>	<p>- bakteriostatici</p>

U okviru obuzdavanja bakterija, pod toksine možemo ubrojiti i neke restriksijske endonukleaze i bakteriokolicine. Često se koriste endonukleaza EcoRI i njen 'antitoksin' EcoRI metil transferaza. EcoRI endonukleaza cijepa DNA na mjestu GAATTC, koje se u genomu *E. coli* pojavljuje 645 puta što daleko nadmašuje sposobnost stanice za popravak dvostrukih lomova (Gallagher i sur., 2015). Kontrolirana ekspresija toksina pa tako i EcoRI endonukleaze pomoću neke male sintetičke molekule ili spoja kojeg je bakterija dužna razgraditi, predstavlja prvu generaciju korištenja sustava toksin-antitoksin. Bakterije prve generacije su uslijed selektivnog pritiska podložne mutacijama koje inaktiviraju toksični gen što omogućava rekombinantnim bakterijama opstanak u okolišu. Druga generacija bakterija ima konstitutivnu ekspresiju toksina i kontroliranu ekspresiju antitoksina. EcoRI metiltransferaza metilira GAATTC mjesta i tako ih štiti od rezanja. Uklapanje gena za EcoRI metiltransferazu u genom domaćina pod kontrolom sintetičke inducibilne molekule (npr. anhidrotetraciklina) nasuprot konstitutivnoj ekspresiji toksina sa plazmida ima nekoliko prednosti. Ako i dođe do horizontalnog prijenosa gena, bakterija recipijent koja je primila plazmid s toksinom neće preživjeti jer ne posjeduje gen za antitoksin. Također, u novijim istraživanjima utvrđeno je da geni koji imaju visoku ekspresiju su manje podložni mutacijama što bi moglo smanjiti vjerojatnost inaktivacije toksina. Predviđa se da će bakterije treće generacije biti dizajnirane tako da do indukcije toksina dođe nakon definiranog vremena provedenog u otvorenom okolišu pomoću sintetičkih molekula RNA (Wright i sur., 2013).

Drugi često korišteni par je kolicin E3 i protein koji na njega pruža imunost kodiran genom *immE3*. Cole3 je RNAaza koja cijepa 16S rRNA; samo nekoliko molekula je dovoljno da dođe do smrti bakterije. Istraživanje koje su izveli Torres i suradnici pokazali su da su parovi EcoRI endonukleaza/EcoRI metiltransferaza i Cole3/ImmE3 vrlo pogodni za uspostavu dvostrukog letalnog sustava u rekombinantnim jedinkama *E. coli* jer imaju različite ciljne molekule na koje djeluju, DNA i RNA. Uz različite regulatorne mehanizme i dovoljnu udaljenost među genima koja bi onemogućila jedinstveni delecijski događaj koji bi izrezao oba toksina, ovakav dvostruki sustav može postignuti frekvenciju bijega od $\sim 10^{-8}$ (Torres i sur., 2003).



Slika 4. Mehanizmi obuzdavanja bazirani na induciranoj letalnosti. Indukcijom toksina dolazi do smrti rekombinantne bakterije (C). U slučaju prijenosa plazmida koji kodira toksin, dolazi do smrti bakterije recipijenta jer ne kodira za antitoksin (D). (Preuzeto i prilagođeno iz Moe-Behrens, 2013)

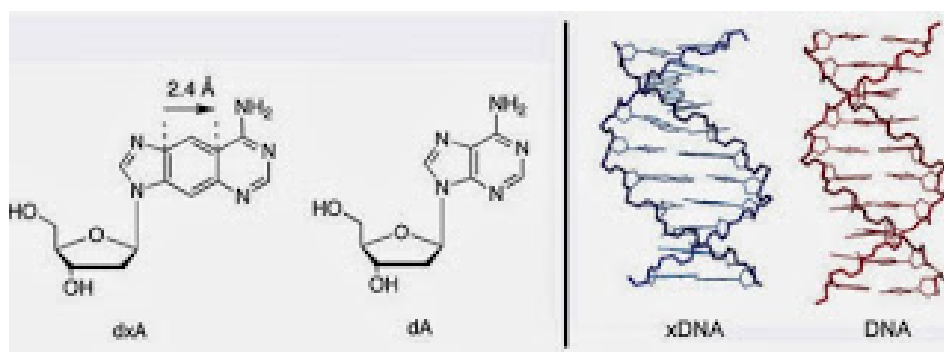
5. ORTOGONALNI SUSTAVI OBUZDAVANJA BAKTERIJA

Za sve navedene mehanizme obuzdavanja bakterija, bilo da se radi o akusotrofnosti ili uvjetnoj letalnosti, priroda prije ili kasnije nađe način da ga zaobiđe. Bez obzira na složenost dizajna, zaštita od širenja genetski modificiranih bakterija još uvijek nije apsolutna. Stoga se u mnogim laboratorijima diljem svijeta trenutno radi na ortogonalizaciji rekombinantnih bakterija. Cilj tih istraživanja je dizajnirati bakterije koje koriste novi genetički jezik koji bi

njima omogućio normalnu vijabilnost i funkcionalnost, a onemogućio interakciju i protok gena s postojećim bakterijama (Wright, 2013). Za takve se bakterije popularno kaže da bi mogle predstavljati genetički 'firewall'. Istraživanja u ovom području zaista su mnogobrojna i detaljna, stoga ćemo mi iznijeti samo neke primjere.

5.1 GEOMETRIJA MOLEKULE DNA

Mijenjanjem veličine baznih parova dodavanjem benzenskog prstena, možemo promijeniti veličinu molekule DNA. Taj proces naziva se benzo homologacija (slika 5). Sparivanjem produljenih baza xA, xG, xT, xC sa normalnim bazama A, G, T, C dobivamo proširenu molekulu DNA nazvanu xDNA. Druga vrsta proširene DNA naziva se yDNA u kojoj se dodavanjem benzenskog prstena, mijenja tautomerni oblik baza. Prednosti ovih proširenih molekula DNA je što zasebno čine vrlo stabilne i funkcionalne uzvojnice, a pri sparivanju s normalnom molekulom DNA dolazi do destabilizacije. To bi onemogućilo bilo kakvu ugradnju rekombinantne DNA u srodne bakterije (Schmidt, 2012).



Slika 5. Procesom benzo homologacije dolazi do produljenih baza koje sparivanjem sa standardnim bazama grade proširenu xDNA. (Preuzeto s <http://syntheticorganic.blogspot.com/>)

5.2 FOSFAT-ŠEĆERNA OKOSNICA NUKLEINSKIH KISELINA

Unutar sintetičke biologije koja proučava i istražuje mogućnosti sinteze i manipulacije biološkim komponentama i sustavima, razvija se istraživačko polje ksenobiologija koja se trenutno bavi razvijanjem alternativnih nukleinskih kiselina nazvanih kseno nukleinske kiseline (XNA). Takve nukleinske kiseline u svojoj okosnici, umjesto standardne riboze i deoksiriboze, imaju alternativne ugljikohidrate s različitim brojem ugljikovih atoma no sadrže standardne četiri baze A, T, G, C. Poznate su heksozne nukleinske kiseline (HNA), treozne

nukleinske kiseline (TNA), glikolne nukleinske kiseline (GNA) ili cikloheksenilne nukleinske kiseline (CeNA). Jednom kada će se one moći sintetizirati *in vivo*, pretpostavlja se da će bilo kakva informacija pohranjena u takvim nukleinskim kiselinama biti nečitljiva prirodnim organizmima stoga idealna za korištenje u genetski modificiranim bakterijama (Schmidt i de Lorenzo, 2012).

5.3 ALTERNATIVNI KODONI I NESTANDARDNE AMINOKISELINE

Već smo prije u ovom radu spomenuli jedan primjer ortogonalnog sustava u kojem posebno dizajnirana tRNA sintetaza na mjesto amber stop kodona ugrađuje nestandardnu aminokiselinu. Bakterije s takvim tRNA sintetazama mogu čitati mRNA transkripte koji u običnim bakterijama ne bi imale smisla. Osim toga, razvija se i posebna biološka abeceda koja bi se temeljila na četverostrukim kodonima, umjesto trostrukim, i pripadajućim ribosomima koji bi ih mogli čitati (Schmid i de Lorenzot, 2012).

6. ZAKLJUČAK

Genetički modificirane bakterije, ako pobjegnu u okoliš, mogu ozbiljno ugroziti ekosustave. Do sada uspostavljeni mehanizmi obuzdavanja su uvelike podigli razinu sigurnosti za primjenu u zatvorenim sustavima, ali još uvijek nisu dostatni kako bi omogućili izravno puštanje bakterija u okoliš. Koliko god se frekvencije bijega smanjivale, puštanje u prirodu uključuje mnoštvo faktora koji se jednostavno ne mogu predvidjeti i rizik uvijek postoji. Sve dok se mehanizmi obuzdavanja bakterija baziraju na standardnoj biokemiji živih organizama, selektivni pritisak će uvijek naći način kako da iz zaobiđe i inaktivira. Dovoljno je da jedna bakterija preživi i da se nastavi dijeliti da dođe nepovratnih posljedica. Stoga budućnost sigurne uporabe genetski modificiranih bakterija zasigurno leži u rukama sintetičke biologije i razvoja ortogonalnih sustava. Iako mnoge od tih ideja postoje samo u teoriji i vjerojatno će proći mnogo godina do pojave prve u potpunosti ortogonalne bakterije, najnoviji radovi s nestandardnim aminokiselinama ulijevaju mnogo povjerenja. No postavlja se pitanje, kad se takvi organizmi jednom pojave, kakve će nove rizike sa sobom donijeti?

7. LITERRATURA

Cases I., Víctor de Lorenzo, 2005. Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *International microbiology* **8** 213-222

Contreras, A., Molin, S., and Ramos, J. L., 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Applied and Environmental Microbiology* **57** 1504–1508

Gallagher R., JayminR.Patel, Alexander L. Interiano, Alexis J. Rovner and Farren J. Isaacs, 2015. Multilayered genetic safeguards limit growth of microorganisms to defined environments. *Nucleic Acids Research* **43** 1945–1954

Knudsen,S.M. and Karlstrom,O.H., 1991. Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **57** 85–92

Lee P., 2010. Biocontainment strategies for live lactic acid bacteria vaccine vectors. *Bioengineered Bugs* **1** 75-77

Mandell D.J., Lajoie M.J., Mee M.T., Takeuchi R., Kuznetsov G., Norville J.E., 2015. Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design. *Nature* **518** 55–60

Moe-Behrens,G.H., Davis,R. and Haynes K.A., 2013. Preparing synthetic biology for the world. *Frontiers in Microbiology* **4** 1–10

Molin,S., Klemm,P., Poulsen,L.K., Biehl,H., Gerdes,K. and Andersson,P., 1987. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Nature Biotechnology* **5** 1315–1318

Ronchel, M. C., and Ramos, J. L., 2001. Dual system to reinforce biological containment of recombinant bacteria designed for rhizoremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **67** 2649–2656

Schmidt,M. and de Lorenzo,V., 2012. Synthetic constructs in/for the environment: managing the interplay between natural and engineered biology. *FEBS Lett* **586** 2199–2206

Torres,B., Jaenecke,S., Timmis,K.N., Garcia,J.L. and Diaz,E., 2003. A dual lethal system to enhance containment of recombinant micro-organisms. *Microbiology* **149** 3595–3601

Wright O., Guy-Bart Stan and Tom Ellis, 2013. Building-in biosafety for synthetic biology.
Microbiology **159** 1221–1235

<http://syntheticorganic.blogspot.com/>

8. SAŽETAK

Razvojem genetičkog inženjerstva i biotehnologije, genetički modificirane bakterije postale su nezamjenjive u proizvodnji mnogih industrijskih i medicinskih spojeva. S ciljem što sigurnije upotrebe, mnogo truda se ulaže u razvoj mehanizama za obuzdavanje koji bi spriječili širenje GMO bakterija i prijenos rekombinantnih gena u srodne sojeve divljeg tipa u slučaju bijega takvih bakterija u okoliš .

U ovom radu prikazani su do sada poznati mehanizmi obuzdavanja bakterija koji se temelje na standardnoj biokemiji živih organizama i mehanizmima nove generacije, koji su tek na početku svog razvoja, a temelje se na sintetičkoj biologiji. Navedena su glavna svojstva koja definiraju takve mehanizme kao i mnogi nedostaci, koji nažalost, još uvijek postoje. Mehanizmi sa stopostotnom efikasnošću bi jednog dana mogli omogućiti uporabu GMO bakterija u otvorenim sustavima pa čak i u živim organizmima, te možda, bar malo promijeniti stav javnosti o upotrebi GMO tehnologije.

9. SUMMARY

Huge development in the fields of genetic engineering and biotechnology has made genetically modified bacteria to become irreplaceable in production of industrial and medical compounds. With the goal of raising safety of their use, a lot of an effort has been put to design biocontainment mechanisms which would prevent spreading of GMO bacteria and transfer of recombinant genes into wild type relatives in the case of the escape into the environment.

Illustrated in this paper are all known biocontainment mechanisms based on standard biochemistry of living organisms and new generation mechanisms which are at the beginning of their development, and are based on synthetic biology. Basic traits that define these mechanisms are listed, as well as many shortcomings that unfortunately still exist. Biocontainment mechanisms with a hundred percent efficiency could one day enable use of GMO bacteria in open environments and even living organisms and maybe, just a little, change the public opinion on the use of GMO technologies.