

Stvaranje umjetnog života u laboratoriju

Majstorović, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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:217:640591>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Stvaranje umjetnog života u laboratoriju
Creation of synthetic life in laboratory

SEMINARSKI RAD

Ivana Majstorovi
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Mirjana Kalafati
Zagreb, 2010.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Put prema stvaranju umjetne stanice.....	3
3. Sinteza umjetne stanice.....	9
3.1 Dizajniranje sinteti kog genoma	9
3.2 Strategija sastavljanja sinteti kog genoma	9
3.3 Semi-sinteti ka sinteza genoma i transplantacija	11
3.5 Stanica s genomom <i>M. mycoides</i> JCVI-syn1.0	14
3.6 Zaključak.....	16
4. Popis literature:	17
5. Sažetak.....	20
6. Summary	20

1. Uvod

Ljudi su se oduvijek zanimali za život i pokušavali objasniti kako je on nastao. Ima mnogo različitih objašnjenja i zapisani datiraju još iz razdoblja Stare Grčke, ali su se ljudi nesumnjivo bavili tim pitanjima od početka razvoja misli. Objašnjenja variraju od različitih amaterskih pa do današnjih filozofskih, znanstvenih... Usprkos svim nastojanjima da se objasni i definira život i njegovo porijeklo, i dalje nemamo općenito prihvaćeno objašnjenje.

Razvoj znanosti i tehnologije je omogućio još jedan pokušaj razumijevanja života putem novog područja biologije: sintetske biologije, koja je tek u začetku. Iz tog razloga još uvijek ne postoji jedinstvena definicija sintetske biologije oko koje se svi slažu. Neki je definiraju kao dizajniranje i sintezu novih organizama s predodređenim osobinama dok je za druge ona područje biološkog istraživanja koje kombinira znanost i inženjerstvo u svrhu stvaranja novih bioloških funkcija i sustava (Balmer i Martin, 2008.). Središnja je ideja sintetske biologije stvaranje umjetnog života, organizma izgrađenog samo od kemijskih dijelova i DNA predloška, a cilj je ovoga rada opisati stvaranje prve samostalne i samoreplicirajuće bakterijske stanice, odnosno prvo uspješno stvaranje umjetnog života.

Jedna od glavnih metoda kojima se koristi sintetska biologija je sekvenciranje genoma. Ono ne bi bilo moguće bez izuma sekvenciranja biokemikara Fredericka Sanguera koji je za svoje otkriće dobio i Nobelovu nagradu za kemiju 1958. Prvi sekvencirani DNA genom je bio genom bakteriofaga *phi X174* sa samo 5 368 parova baza (pb) (Sanger et al., 1977.). Godine 1978., Arber, Nathans i Smith dobivaju Nobelovu nagradu za otkriće restrikcijskih enzima tipa II čime je omogućeno brže sekvenciranje genoma. Prvi potpuno sekvencirani genom slobodno živućeg organizma je genom bakterije *Haemophilus influenzae* od 1 830 137 pb 1995. godine (Fleischmann *i sur.*, 1995.). Za taj je projekt predviđeno 13 godina; a obavljen je u samo 4 mjeseca. (Danas je njen genom moguće sekvencirati za 2-3 sata). Iste je godine sekvenciran genom bakterije *Mycoplasma genitalium* (580 070 pb), najmanji poznati genom nekog slobodnoživućeg organizma. Determiniran je nasumičnim sekvenciranjem i sastavljanjem. Identificirano je ukupno samo 470 kodirajućih regija koje uključuju gene potrebne za DNA replikaciju, transkripciju i translaciju, popravak DNA, stanični transport, energiju i metabolizam (Frasier *i sur.*, 1995.).

Pitanje koje se nametnulo bilo je koliko je zapravo gena potrebno za stanični život, odnosno koji je minimalni set esencijalnih staničnih gena. Znanstvenici su se nadali da će se odgovaranjem na ova pitanja uspjeti približiti odgovoru na pitanje što je to život. Godine

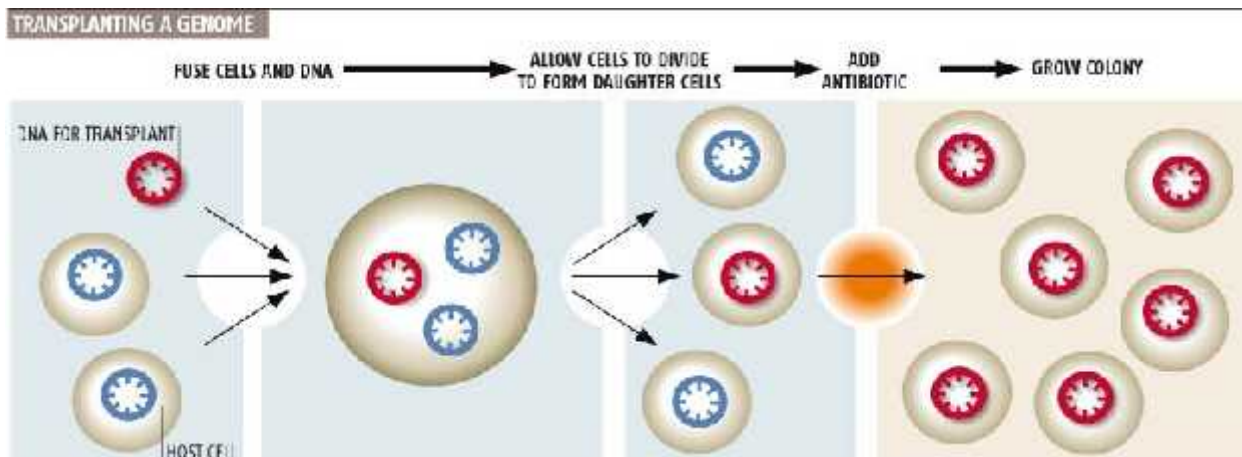
1999. je objavljen rad putem kojeg se pokušalo saznati minimalni broj gena esencijalnih za život bakterije *Mycoplasma genitalium* u laboratorijskim uvjetima pokusima transpozonske mutageneze (Hutchison *i sur.*, 1999.). Poskusi transpozonske mutageneze uključuju transpozone (male molekule DNA) koji se nasumično ugrađuju u genom organizma i time narušavaju funkcionalnost gena. Geni s transpozonomima bez kojih je bakterija normalno funkcionirala su nazvani neesencijalnim. Analizom je dobiveno 265 do 350 gena esencijalnih za rast u laboratorijskim uvjetima od ukupno 480 gena. Iako *Mycoplasma genitalium* posjeduje približno minimalni genom potreban za preživljavanje u ljudskoj stanici domaćina, jasno je iz dobivenih rezultata da sadrži i velik broj gena koji su neesencijalni u laboratorijskim uvjetima uzgoja (Hutchison *i sur.*, 1999.). Injenice da je multiple gene relativno teško eliminirati iz genoma (moraju se eliminirati jedan po jedan) i da različiti geni postaju esencijalni ovisno o raznim uvjetima uzgoja bakterija, veoma su otežavale pronalazak minimalnog genoma potrebnog za stanični život. Iz tih su razloga neki znanstvenici odlučili pokušati sintetizirati umjetni bakterijski kromosom kojem bi varirali sadržaj gena te tako identificirali minimalni genom za samorepliciranje i život. Putem su morali razviti mnoge nove metode i tehnike za stvaranje velikih segmenata genetskog koda kao i za premošćenje ostalih poteškoća na koje su nailazili.

2. Put prema stvaranju umjetne stanice

Za stvaranje umjetne stanice je trebalo riješiti dvije strane problema: kemiju za sintezu velikih DNA molekula te biološku stranu, odnosno kako transplantirati i aktivirati sintetički genom u domaću stanicu. Dva su tima radila paralelno na tim problemima. Osmišljene su nove metode za ekstrakciju cjelovitih kromosoma iz kvasca, metode za transplantaciju sintetiziranih kromosoma iz kvasca u recipientsku bakterijsku stanicu (kako bi nastala stanica kontrolirana isključivo sintetičkim genomom), te su uspostavljeni uvjeti i protokoli za transplantaciju sintetičkog genoma iz kvasca.

Kada je započeo projekt stvaranja sintetičke stanice, znanstvenici su mislili da će im sinteza genoma biti najveći problem, zbog čega su i odabrali manji genom. 2003. je sintetiziran infektivni genom veličine 5 386 pb bakteriofaga bakterije *Escherichia coli*, *phi X174* iz sintetičkih oligonukleotida u samo 14 dana (Smith *et al.*, 2003). Taj je bakteriofag bio izabran iz povijesnih razloga (prvi sekvencirani DNA genom). Poboljšana je metodologija i dramatično skraćeno vrijeme potrebno za preciznu sintezu segmenata DNA od sintetičkih oligonukleotida dugih 5 - 6 kilobaza (kb). Takav je uspjeh omogućio znanstvenicima sintezu i množenje genoma.

Godine 2007. je objavljena, fiziološki gledano, jedna od najbitijih publikacija: transplantiranje bakterijskog kromosoma iz jedne bakterije u drugu. Jednom kad se uspješno transplantira genom, mogli bi se uspješno transplantirati i umjetno stvoreni genomi. Goli je DNA genom jedne vrste bakterije transplantiran u drugu blisko srodnu bakteriju. Intaktna genomska DNA, virtualno bez proteina, je transplantirana iz bakterije *Mycoplasma mycoides* LC (large colony) u bakteriju *Mycoplasma*. Nije bilo rekombinacije, a stanice koje su preživjele selekciju za rezistenciju na tetraciklin, sadržanu u kromosom *M. mycoides* LC, sadrže cjeloviti genom donora i nikakve tragove recipientskog genoma (Shema 1.)

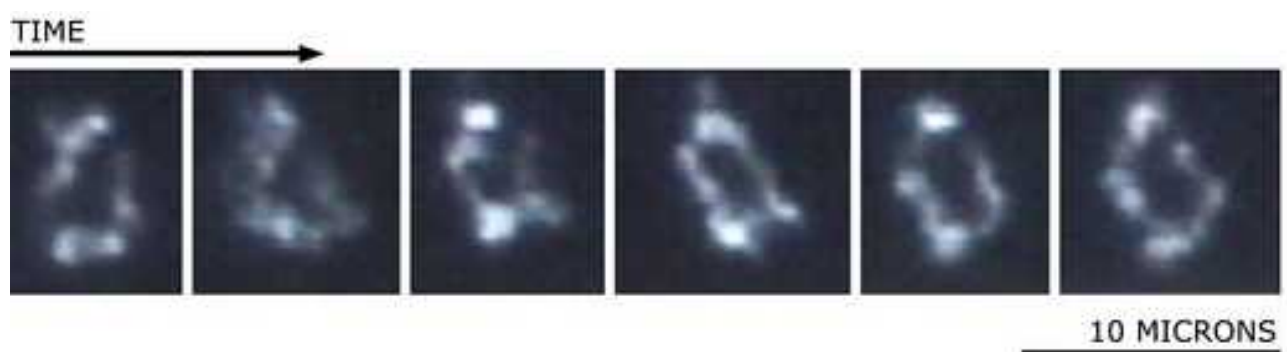


Shema 1. Pregled transplantacije genoma iz jedne bakterije u drugu. Genom za transplantaciju je prikazan crvenom bojom i sadrži gen za rezistenciju na antibiotik tetraciklin. Genom doma inske stanice je označen plavom bojom. Crveni je genom (genom bakterije *M. mycoides* LC) transplantiran u doma insku stanicu bakterije *M. Capricolum* (stanice s plavim genomom). Nakon nekoliko ciklusa stani njih dioba je napravljena selekcija za tetraciklin, a preživjele su one stanice koje su sadržavale gen za otpornost na antibiotik.

(Preuzeto i prilagođeno iz openwetware.org/images/0/0e/Derek_Ju_Presentation_4-8-10.pdf)

Stanice nastale transplantacijom su genotipom i fenotipom identične donorskim *M. mycoides* LC stanicama prema nekoliko kriterija. Samo je jedna od ~150 000 transplantacija bila uspješna (Lartigue, *et al.*, 2007.).

Godine 2008. je sintetiziran do tada najveći i umjetni funkcionalni genom nekog organizma koji je stvorio ovaj svijet, genom bakterije *Mycoplasma genitalium*, veličine 582 970 pb, nazvan *M. genitalium* JCVI-1.0. (Slika 1.)

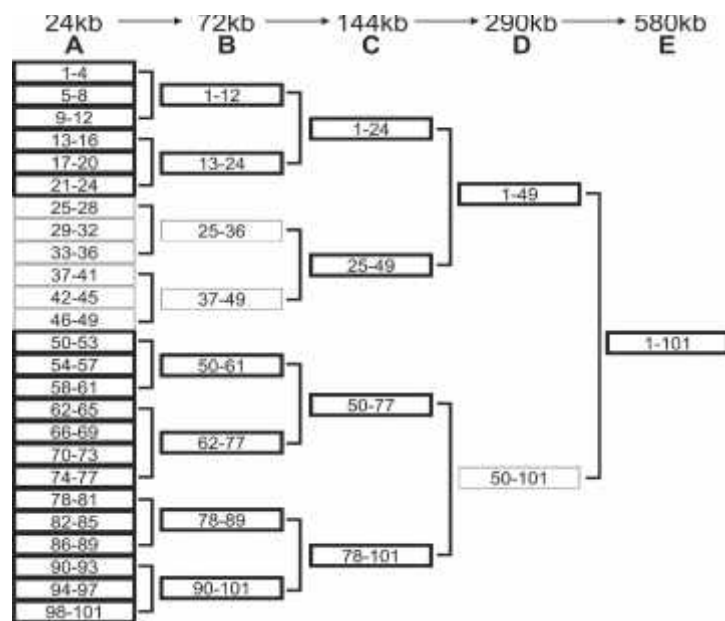


Slika 1. Prikaz sintetičkog genoma *M. genitalium* JCVI-1.0. Slika prikazuje mikrograf umjetnog genoma *M. Genitalium* snimljenog tijekom perioda od ~0.6 sekundi.

(Preuzeto iz <http://cellnews-blog.blogspot.com/2008/01/synthetic-bacterial-genome.html>)

Sintetički genom sadrži sve gene kao i divlji tip *M. genitalium* G37, osim gena MG408, čija je funkcionalnost narušena antibiotskim markerom sa svrhom blokiranja

patogenosti i omoguavanja selekcije. Izmeđ u gena, na mjestima koja toleriraju inserciju transpozona, su ubačeni „vodeni žigovi“. Preklapajuće modularne DNA sekvence koje nose jedan ili više gena za neku biokemijsku funkciju (kasete) veličine 5 kb do 7 kb (nastale od kemijski sintetiziranih oligonukleotida) sastavljene su *in vitro* rekombinacijom. Dobiveni su intermedijeri za sastavljanje nizova dugih otprilike 24 kb, zatim 72 kb ("1/8 genoma") i 144 kb ("1/4 genoma") (Shema 2.) koji su klonirani kao umjetni kromosomi u bakteriji *Escherichia coli*. Sekvenciranjem intermedijernih klonova su dolivene sve četiri 1/4 genoma s točnom željenom sekvencom. Cjeloviti je genom sastavljen kloniranjem u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao kružni centromerni plazmid (dodatak kvaševog centromera u DNA bakterije omogućuje segregaciju bakterijskog plazmida s kromosomima kvasca), a zatim je izoliran i sekvenciran. Klon sa željenim genomom *M. genitalium* je pronađen (Gibson *i sur.*, 2008. a).

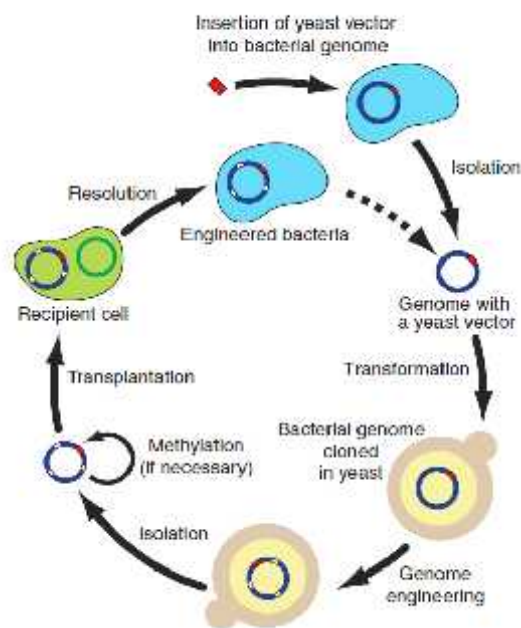


Shema 2. Plan sastavljanja genoma bakterije *M. genitalium* u pet koraka. U prvom se koraku sinteze genoma udružuju po četiri kasete i tvore A seriju sekvenci dugih oko 24 kb (sekvenca 37-41 sadrži pet kasete). U sljedećem se koraku po tri A sekvence udružuju u osam sekvenci B serije dugih 72 kb (sekvencu B62-73 tvore četiri A sekvence). Osam se B sekvenci udružuju u parovima i tvore C sekvence veličine četvrtine genoma. Navedene su sekvence dobivene *in vitro* rekombinacijom i klonirane u *E. coli*. Sekvence veličine pola genoma i cijeli genom su dobiveni *in vivo* rekombinacijom u kvascu. Sekvence u podebljanim pravokutnicima su sekvencirane zbog provjere točnosti. Cjeloviti je genom sastavljen iz četiri C sekvence. (Preuzeto iz Gibson *i sur.*, 2008. a)

Ovaj je postupak još malo dorađen demonstracijom sastavljanja sintetičkog genoma iz 25 preklapajućih fragmenata u jednom koraku (Gibson *i sur.*, 2008. b) što je bilo moguće

zahvaljuju i sposobnosti kvasca da prihvati brojne preklapajuće DNA molekule. Objavljen je i rad o novoj metodi enzimatskog sastavljanja DNA veličine do nekoliko stotina kilobaza koja je prednost mogućnost da sastavi i popravi preklapajuće DNA molekule u jednom izotermalnom koraku (Gibson *i sur.*, 2009. a). Demonstrirano je da kvasac *Saccharomyces cerevisiae* može primiti i sastaviti barem 38 jednolanjanih oligonukleotida (koji se preklapaju na samo 20 pb, a mogu biti dugi do 200 pb) ako primi i linearni dvo-lanjanik vektor. Sinteza je moguća u jednom transformacijskom koraku. Ova metoda ima vrlo niski stupanj pogreške zbog čega je pogodna za stvaranje DNA bez grešaka (Gibson *i sur.*, 2009. b). Navedeni su postupci veoma pojednostavili sastavljanje velikih fragmenata DNA, bilo sintetičkih ili prirodnih.

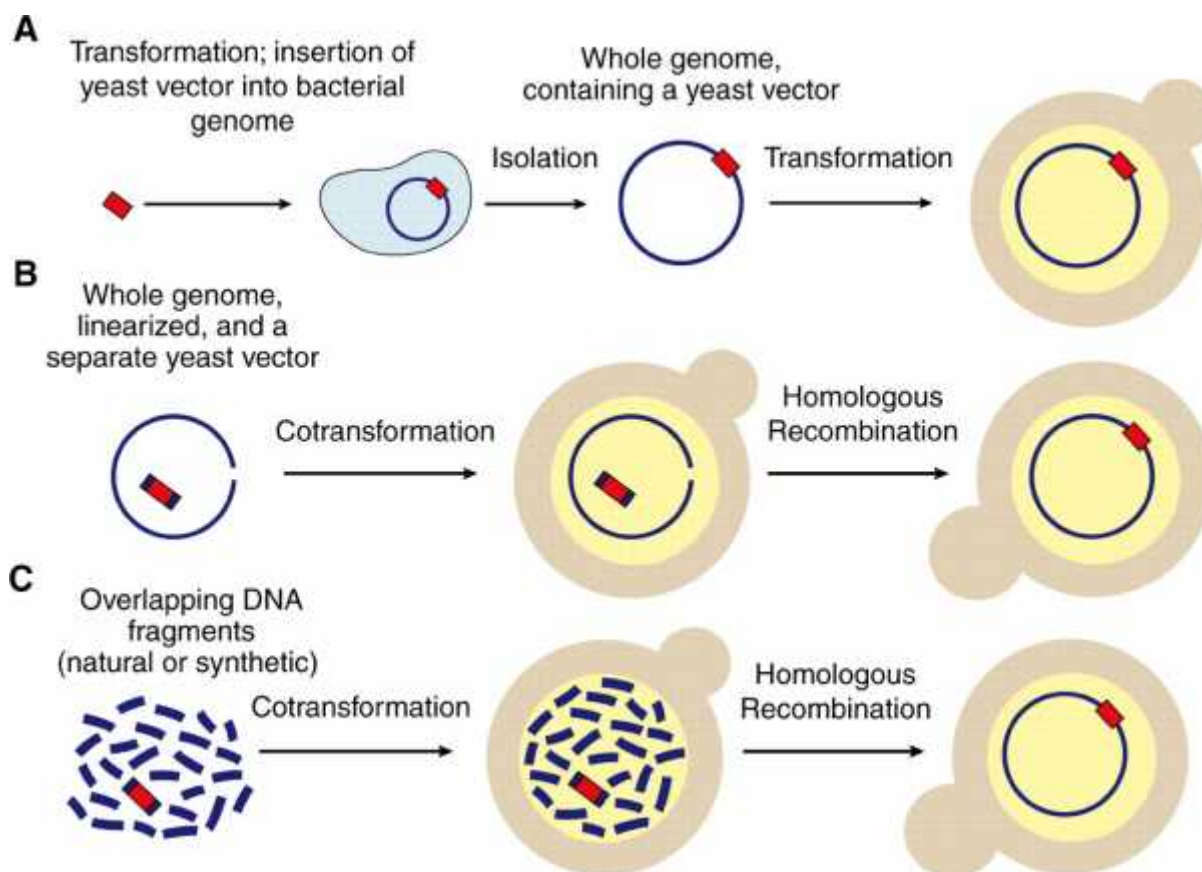
Kako bi stvorili umjetnu stanicu, genom treba izolirati i prenijeti iz kvasca u receptivnu citoplazmu koja će ostvariti genetske upute dovoljne za stvaranje samoreplicirajućeg organizama. Metode za postizanje toga cilja su opisane u radu Lartigue *i sur.*, 2009. godine (Shema 3.).



Shema 3. Premještanje bakterijskog genoma u kvasac, modifikacija u kvascu i vraćanje genoma u bakteriju. Vektor kvasca je ubačen u bakteriju transformacijom. Taj je genom kloniran u kvasac. Nakon kloniranja se koriste razne metode za stvaranje insercija, delecija, premještanja ili bilo kojih drugih modifikacija genoma. Modificirani se genom zatim izolira i transplantira u recipijentsku bakterijsku stanicu gdje se stvoriti modificiranu bakteriju. Moguće je da je potrebna metilacija genoma kako bi ostao otkuvan od restriktivnih enzima stanice. Ciklus se može ponoviti počevši od novog modificiranog genoma (isprekidana strelica). (Preuzeto i prilagođeno iz Lartigue *i sur.*, 2009.)

Kloniran je genom bakterije *Mycoplasma mycoides* kao kvaš ev kružni centromerni plazmid. U kvascu je genom bakterije izmijenjen vektorom koji sadrži tetraciklin rezistentni marker za selekciju, gen za β -galaktozidazu, auktotrofni marker, centromer kvasca i sekvencu za autonomnu replikaciju a zatim transplantiran u *Mycoplasma capricolum* ime je stvorena vijabilna *M. mycoides* stanica. Odabrane vrste bakterija su pogodnije za rad od *M. genitalium* zbog brže stope rasta. Genom novog soja je nazvan YCpMmyc1.1. Izolirani je genom YCpMmyc1.1 iz kvasca transplantiran u stanicu divljeg tipa bakterije *M. capricolum*, ali nije uspješno izoliran genom YCpMmyc1.1 iz bakterije. Problem su stvarale restriksijske endonukleaze u recipientskoj *M. capricolum* stanici koje bi razgradile transplantirani donorski genom YCpMmyc1.1 izoliran iz kvasca. Prepreku su uklonili bilo inaktivacijom restriksijskog enzima *M. capricolum*, bilo zaštitom YCpMmyc1.1 genoma *in vitro* metilacijom nakon ega su uspješno izolirali YCpMmyc1.1 genom iz *M. capricolum*. (Lartigue *i sur.*, 2009.) Nakon uspješne sinteze i transplantacije genoma YCpMmyc1.1 u bakteriju, još je samo ostalo nekako aktivirati sintetski genom.

2010. godine su znanstvenici uspješno klonirali cijele bakterijske genome u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao jednolanane DNA molekule. Klonirani su genomi bakterija *Mycoplasma genitalium* (0.6 megabaza -Mb), *M. pneumoniae* (0.8 Mb) i *M. mycoides* podvrsta *capri* (1.1 Mb) kao kvaš evi kružni centromerni plazmidi. Takve molekule mogu biti klonirane kao linearne (dodatkom telomera) ili kao kružne i stabilno se održavaju u domaćinu. Razrađena su tri različita pristupa kloniranja bakterijskih genoma u kvascu (Shema 4.) (Benders *i sur.*, 2010.)



Shema 4. Tri metode kloniranja genoma bakterije *Mycoplasma* u kvascu. Bakterijski genom (tamno plavi krug) mora sadržavati nekoliko kvaševih sekvenci (vektor, obojen crveno) da bi se mogao uspješno umnožiti u kvascu (taman s žutom jezgrom) nakon transformacije. **(A)** Vektor može biti uključen u bakterijski genom transformacijom bakterije (svijetlo plava stanica). Ova metoda je najpogodnija za sintezu genoma koji će biti transplantiran u živu stanicu. **(B)** Vektor može biti unesen u bakterijski genom kotransformacijom u kvasac s genomom bakterije. U tom slučaju vektor i bakterijski genom moraju posjedovati terminalne preklapajuće sekvence kako bi se mogle homologno rekombinirati u kvascu. **(C)** Bakterijski genom također može biti kloniran sastavljanjem preklapajućih fragmenata od kojih jedan fragment treba sadržavati vektor. (Preuzeto i prilagođeno iz Benders *et al.*, 2010.).

3. Sinteza umjetne stanice

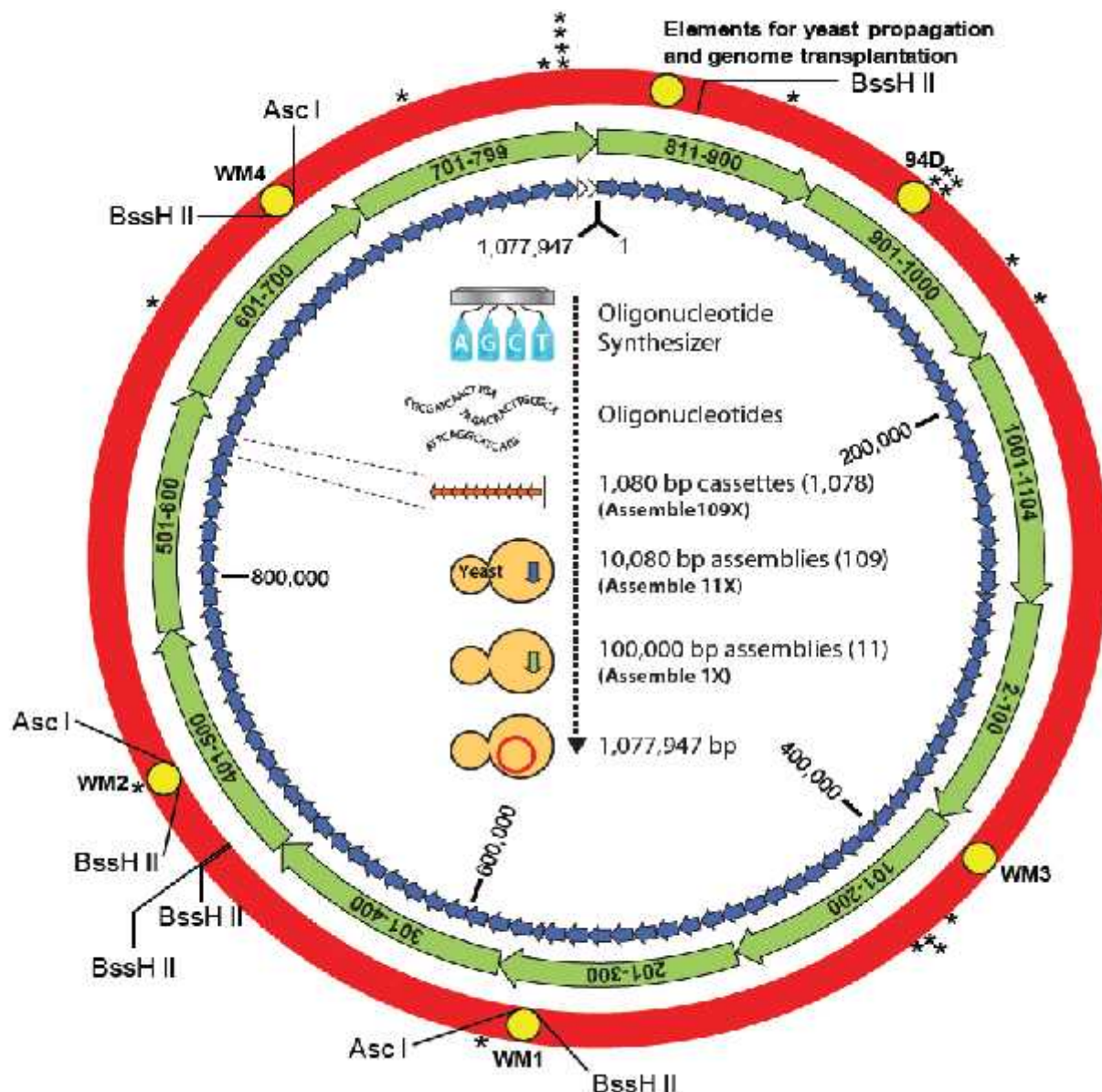
Kombinacijom prije uspostavljenih znanstvenih metoda i procedura uspješno je sintetiziran, sastavljen, kloniran i transplantiran 1.08 megabazni (Mb) sintetički *M. mycoides* JCVI-syn1.0 genom kako bi stvorio novu stanicu pod svojom kontrolom.

3.1 Dizajniranje sintetičkog genoma

Dizajn sintetičkog genoma bakterije *M. mycoides* JCVI-syn1.0 se bazira na visokotom, gotovim sekvencama genoma dvaju laboratorijskih sojeva bakterije *M. mycoides* podvrsta *capri* GM12. Jedan genom je genom donor koji je korišten u radu Lartigue *i sur.* [GenBank pristupni broj CP001621], a drugi je soj stvoren transplantacijom genoma kloniranog i izmjenjenog u kvascu, YCpMmyc1.1-typeIIIres, [GenBank pristupni broj CP001668]. Ovaj je projekt izrazito ovisan o točnosti tih sekvenci. Veličina je kasete dizajnirana i sintetizirana prema CP001621 sekvenci, a CP001668 je korišten kao referenca dizajna. Sve su biološki bitne razlike dobivene između u CP001668 i prije sintetiziranih kasete ispravljene, a 19 bezazlenih razlika je ostavljeno kako bi poslužile kao polimorfne razlike između u sintetičkog genoma (JCVI-syn1.0) i prirodnog, nesintetičkog genoma (YCpMmyc1.1). Da bi se još više pojačala različitost tih genoma, dodana su i četiri vodena žiga.

3.2 Strategija sastavljanja sintetičkog genoma

Dizajnirane su kasete veličine 1 078 bp koje sadrže preklapanja s prethodnim kasetama veličine 80 bp. Svaka kasete je individualno sintetizirana i sekvenciranjem provjerena od strane proizvođača. Osmišljena je hijerarhijska strategija za sastavljanje genoma pomoću transformacije i homologne rekombinacije u 3 koraka u kvascu iz kasete (Shema 5.).



Shema 5. Sastavljane sintetskog genoma *M. mycoides* u kvascu. Umjetni je genom *M. mycoides* sastavljen od 1 078 preklapaju ih DNA kasete u tri koraka *in vivo* rekombinacijom u kvascu. Prvo su sintetizirane kasete veli ine 1078 pb (naran aste strelice) iz sinteti kih oligonukleotida i rekombinirani u setovima po 10 da bi nastalo 1000 fragmenata veli ine ~10 kb (plave strelice). One su zatim rekombinirane u setovima po 10 da stvore 11 fragmenata veli ine ~100 kb (zelene strelice). U zadnjem koraku sastavljanja genoma 11 je fragmenata rekombinirano u cjeloviti genom (crveni krug). Dva su fragmenta spojena enzimima *in vitro* (bijeले strelice). Ve a odstupanja od prirodnog genoma su prikazana žutim krugovima, a tu spadaju regije s 4 vodena žiga (WM1-WM4), namjerno deletirana regija veli ine 4 kb (94D) te elementi za rast u kvascu i transplantaciju. Zvezdicama je ozna eno 20 lokacija s polimorfizmima nukleotida. Kordinate genoma su relativne prema prvom nukleotidu prirodne sekvence bakterije *M. mycoides*. Dizajnirana sekvenca sadrži 1 077 947 bp. Prikazane su lokacije za restikciju s Asc I i BssH II. Kasete 1 i 800-810 su nepotrebne i uklonjene iz procesa sastavljanja pa se kasete 2 preklapa s kasetom 1 104, a kasete 799 s kasetom 811.

(Preuzeto i prilago eno iz Gibson *i sur.*, 2010.)

U prvom su koraku kasete i vektori rekombinirani u kvascu i prebaeni u *E. coli*. Izolirana je plazmidna DNA iz klonova *E. coli* i pretraživana je za one koje sadrže vektor sa 10-kb fragmentom, dok svi nisu pronaeni. Fragmenti su zatim sekvencirani.

U drugom su koraku intermedijeri veliine 10 kb transformirani u kvasac gore opisanim procesom kako bi proizveli intermedijere veliine 100 kb. DNA je presaena u kvasac jer su rezultati upućivali da se takvi DNA ne mogu stabilno održavati u *E. coli*. Nakon ekstrakcije sastavljenih intermedijera iz kvasca, napravljen je multiplex PCR (PCR metoda kod koje se koristi mnogo setova po etnicima u jednoj PCR mješavini) i nastaju produkti (amplikoni) različitih veličina koji su specifični za različite DNA sekvence). Uspješno je obavljen drugi korak sastavljanja genoma sa sekvencama vektora veliine otprilike 105 kb. Nakon stvaranja svih amplikona u multiplex PCR reakciji, obično su dobiveni intermedijeri željene veličine.

Izolacija mikrogramske količine svakog od 11 intermedijera dobivenih u drugom koraku sinteze genoma je purificirana kako bi se uspješno pripremio zadnji korak u sintezi genoma. Nakon izolacije, purifikacije i analize, fragmenti su transformirani u sferoplaste kvasca (stanice kružnog oblika zbog uklanjanja stanične stijenke). Pretraživanje klonova kvasca za cjeloviti sintetički genom je postignuto s multiplex PCR metodom izvršenom sa 11 parova po etnicima dizajniranim da premoste svaki od 11 spojeva između fragmenata veličine 100 kb. Od pretraženih 48 kolonija kvasca, DNA je ekstrahirana iz jednog klona (sMmYCp235) kod kojeg je pronaeno svih 11 amplikona. PCR divljeg tipa (YCpMmyc1.1) je bio pozitivna kontrola i proizveo prepoznatljiv set 11 amplikona.

3.3 Semi-sintetički genom i transplantacija

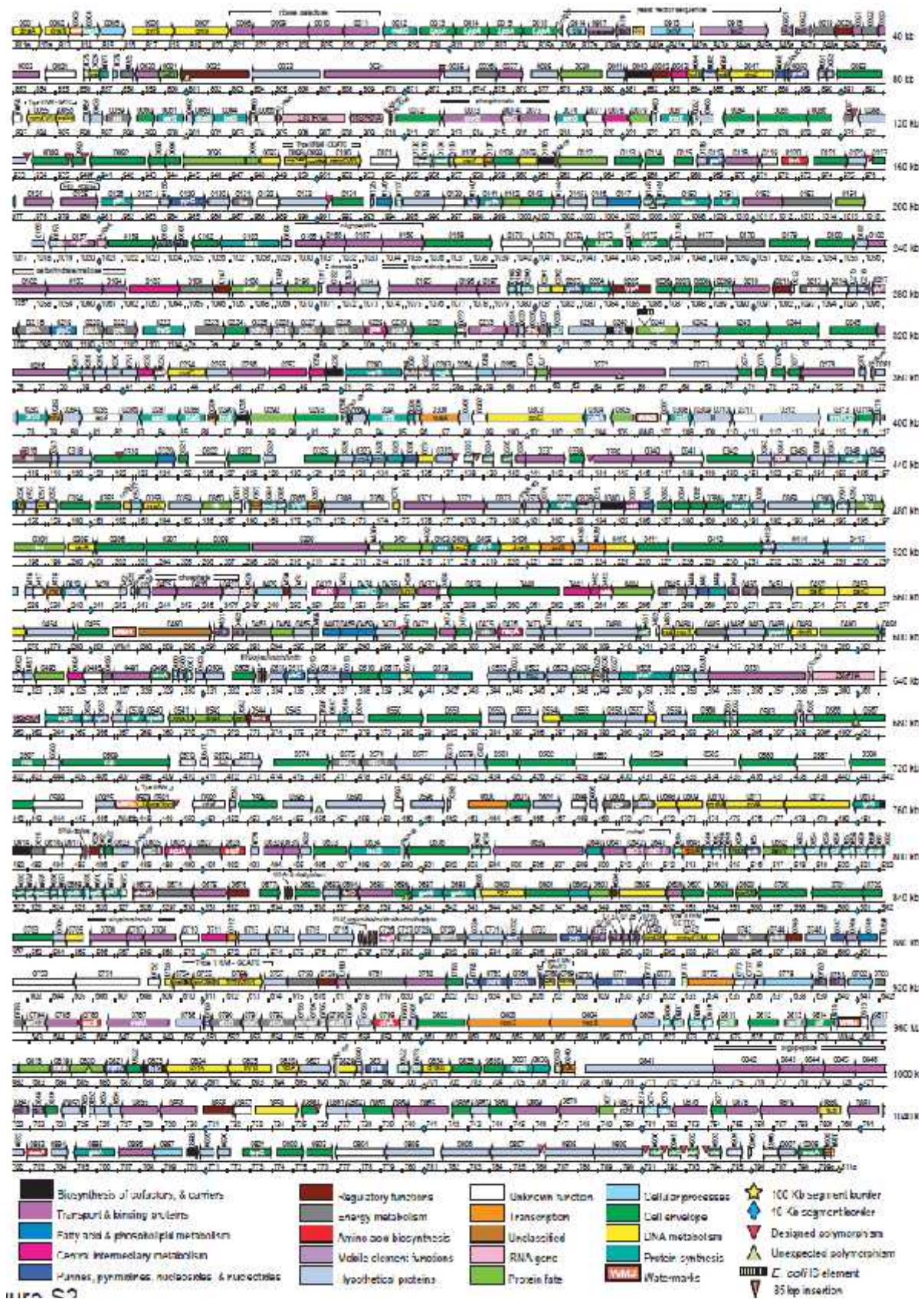
Cjeloviti sintetički genom bakterije *M. mycoides* je iz klona kvasca sMmYCp235 presaen u recipijentsku stanicu *M. capricolum* kojoj su inaktivirani restriksijski enzimi, ali nije došlo do aktivacije sintetičkog genoma. Tri je mjeseca bilo potrebno da napokon uspiju aktivirati genom. Osmišljena je metoda za testiranje funkcionalnosti svakog od 100 kb sintetičkih segmenata koja uključuje konstrukciju i transplantaciju semi-sintetičkih genoma. Miješanjem prirodnih dijelova sa sintetičkim je omogućeno provjeravanje sekvence bez sekvenciranja intermedijera veličine 100 kb. Klonirano je 11 preklapajućih, prirodnih sekvenci od 100 kb u kvascu korištenjem prije opisane metode kloniranja rekombinacijom povezane s transformacijom. Konstruirani semi-sintetički genomi su sadržavali između 2 i 10 od 11 sekvenci dugih 100-kb. Jedna kriva baza pronaena na preko milijun baza u esencijalnom genu

je inaktivirala cijeli genom, dok velike insercije i delecije na neesencijalnim dijelovima genoma nisu utjecale na njegovu vijabilnost. Pogreška je bila u deleciji jednog jedinog para baza ime je stvoreno pomicanje u okviru itanja u esencijalnom genu za replikaciju, *dnaA*.

3.4 Transplantacija i analiza genoma

Mutacija *dnaA* je ispravljena modifikacijom genoma u kvascu, a sinteti ki genom bakterije *M. Mycoides* je transplantiran natrag u recipijentsku bakteriju *M. capricolum* s inaktiviranim restriksijskim enzimima gdje je uspješno stvorio vijabilne kolonije.

Jedan je transplantant porijeklom od sMmYCp235 sinteti kog genoma izoliran i sekvenciran, a dobivena je sekvenca genoma nazvana *M. mycoides* JCVI-syn1.0 i odgovarala je o ekivanom dizajnu s iznimkom 19 prije spomenutih polimorfizama, 8 novih jednonukleidnih polimorfizama, transpozonskom insercijom iz *E. coli*, duplikacija veli ine 85 pb i vodenim žigovima (Slika 2). U sinteti kom genomu nisu na ene nikakve sekvence koje su prepoznate da pripadaju bakteriji *M. capricolum* što upu uje na zaklju ak da je genom bakterije *M. capricolum* u potpunosti zamijenjen sintetskim genomom. Demonstracija da sinteti ki genom daje transplantante s karakteristikama stanica *M. mycoides* implicira da je DNA sekvenca prema kojoj se bazira dovoljno precizna da specificira živu stanicu s odgovaraju im karakteristikama.

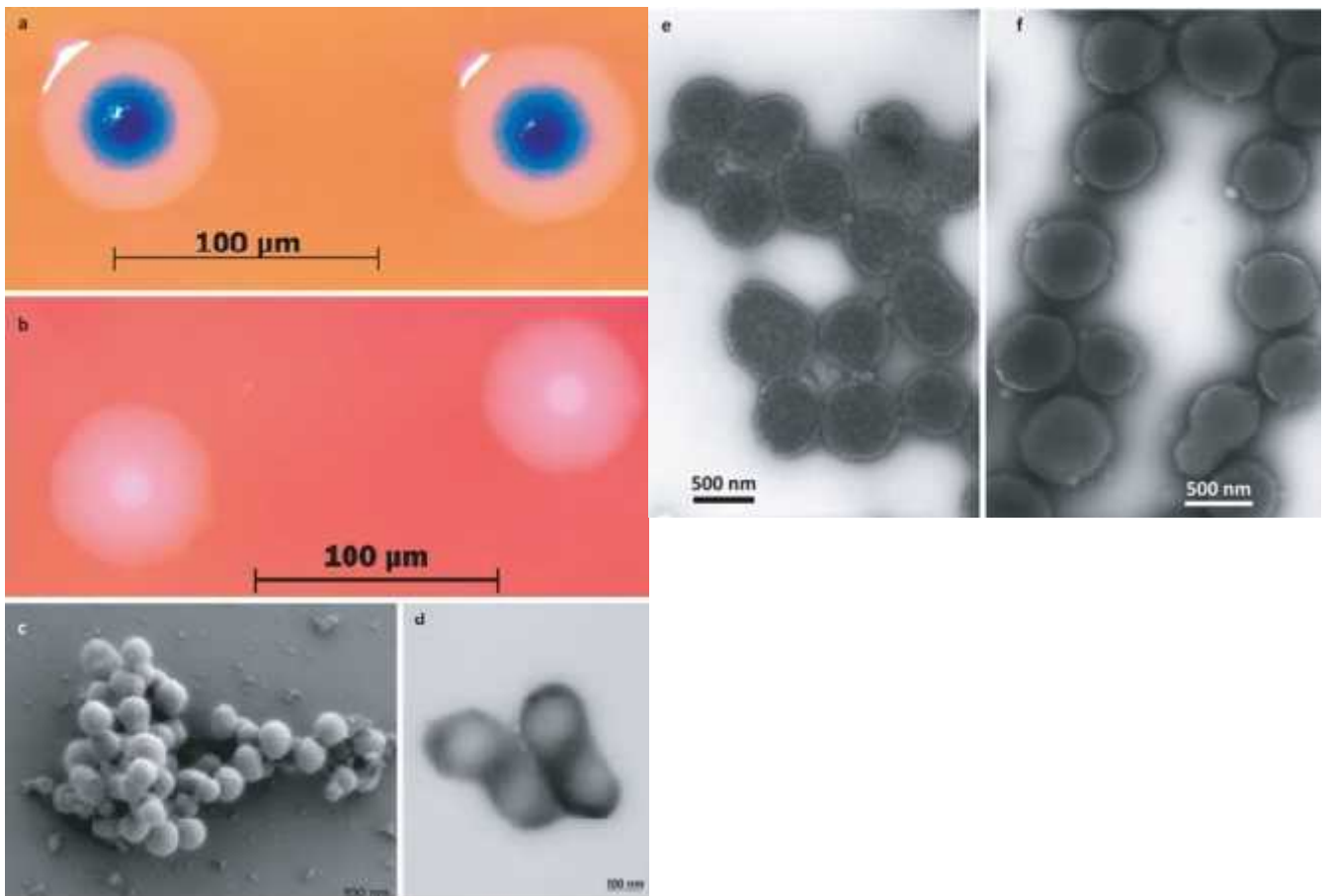


Slika 2. Mapa genoma *M. mycoides* JCVI-syn1.0. Prikazani su geni, strukturne RNA, vodeni žigovi, polimorfizmi relativni prema *M. mycoides capri* GM12 i koordinati kasete sintetske DNA.

(Preuzeto i prilagođeno iz Gibson i sur., 2010.)

3.5 Stanica s genomom *M. mycoides* JCVI-syn1.0

Genom *M. mycoides* JCVI-syn1.0 je najveća umjetna molekula definirane strukture. Stanica kontrolirana tim umjetnim genomom je nazvana umjetnom iako citoplazma pripada recipijentskoj stanici jer se nakon nekoliko dioba izgubi fenotip recipijentske citoplazme i nisu na njoj recipijentski proteini. Stanice s umjetnim genomom *M. mycoides* JCVI-syn1.0 su sposobne za logaritamski rast. Skeniraju ih i transmisivnim mikroskopom se mogu vidjeti malene, ovalne stanice okružene citoplazmom. (Slika 2.).



Slika 4. Slike *M. mycoides* JCVI-syn1.0 i divljeg tipa *M. mycoides*. Proučavana je morfologija kolonija divljeg tipa *M. mycoides* (WT) i stanica s umjetnim genomom (JCVI-syn1.0) na agaru s X-gal u svrhu usporedbe fenotipova. Tri dana nakon presaivanja su vidljive plave JCVI-syn1.0 kolonije koje sadrže *lacZ* gen za ekspimiranje β -galaktozidaze koja konvertira X-gal u plavu tvar (a). Kolonije WT ne sadrže *lacZ* gen i ostaju bijele (b). Stanice oba tipa imaju kolonije s morfologijom poput njihova jaja koja je karakteristična za većinu mikoplazmi. Elektronske mikroskopske (EM) slike JCVI-syn1.0 izolata dobivene korištenjem i skenirajućeg EM (c) i transmisivnog EM (d). Za usporedbu morfologije stanica su korištene EM snimke stanica *M. mycoides* JCVI-syn1.0 (e) i WT (f). Oba tipa stanica pokazuju ovalan oblik i sličnu morfologiju. (Preuzeto i prilagođeno iz Gibson *i sur.*, 2010.)

etiri vodena žiga su dodana u sinteti ki genom. Osmišljeni su tako da zamjene jednu ili više kasete u regijama koje ne utje u na viabilnost stanice (Slila 3.)

Watermark-1, 1246 base pairs

TTAACTAGCTAAAGTTTCGAATATTTCTATAGCTGTACATATTGTAATGCTGATAAATTAAGTGTGGCGCTTGGATGCTGATAAAATAACTTCTTCTGTAGGGTAGAGTTTAA
 TTTAAAGGCTACTCACTGGTTTGCAAAACCAATGCCGTACATTACTAGCTTGTATGCTTGGTGGSTGATTGGGGATATGCTTACTTAATAGAGCGCGCTATCGGCTATTCTGGCGG
 CAGGCGGCTCTGCGCACACGCGGCTGTACCATCAGCAACAAATCAGCGGAAACCGGATCAGGAACGAGTCCGGCGCTATTCCTGATCATAATGACTGTTTATATATCTAATCG
 CGTCAACTGTGTGTGTGATCTGTGCTTTCGAGGGCGGGAGATTGGTTTTGACATACATAATATCATGACAAACAGCGCGGTCTATGACAAACAGCGGCTATATAGAT
 TAGCCGGTGTACTGTGAAACCTAAATCTACTAATGCCGTCAAATAATATGATAATAGCAACCGGCTACTGACTGTGAAACCTAAAGCGCGGCTATATAGATTAGCGGAGTCTGT
 ATTGATAGCGGGTAGATATCACTATAAGGCCCGAGGATCATGATGAACACAGCACCAGCTCGTGGTGGAGTTTTTTGCTGGGACGCTATACCAGCGGAAGCTGATATAAAAT
 AGTTTTTTTGGTGGGCACTAGAGCGGACAAGCACACTAGCTTTGTAATAATACATGTTCCGAAATTGAAATAAATTAATTTGGTATTTAAATATATGATCACTGGCTATAGTC
 TAGTGATACTACAATAGCTAGCAATAAGTCAATATAACAATAGCTGAACCTGTGCTACATATCGCTATACGGTAGATATCACTATAAGGCCAGGACAATAGCTGAAGTGA
 CGTCAGCAACACGTTTACGTTTACTGTGTGGTGGTTTTTTGGTGGGAGTGTGATACGGGAGTGTGATTAATAGAGCGGGCAGTAGGCGGGGACALAAAGCGGGGACATG
 CGTATTCATAGCGGCGGCTGTATGACAAAACAAGCGGGCGGCTTAACTAGCTAA

Watermark-2 1081 base pairs

TTAACTAGCTAAACAAGTGGCAGCATAAAACATATAGAAGTACTGCTATAAGTGTATCAACTGTTTCATAGTAAAACATACAACGTTGGTGTAGTACTGCTAAGTGTATAGCT
 AGTGGGTTTTAGCATATATTSTAGGCTTCAATAAAGTGTATTTTTAGCTAGTAACTAATAAACTAGCTATGACTGTACTGCTAAGTGTATTTTTGATCCTTTGCAATACAATAA
 CTACTACATCAATAGTGGCTGTATGCTGTGCTATAGAACACATAACTAGCTTTGCTGTTTTCAAGTGTATAGTGGTTCATGTATAGATATAGGCTGCTTGAATTCGGT
 ACTAGCTATTTCTGTAGGTTATATACATGCTCATTGCATAAGTTAATGCTTTTAACTAGCTGTGATACATAGCATCCGCTATTCCTAGTGCATATTTTATCCTAGTGCATGAT
 ATAAATGTAATAAGTGTATGATATAAAGCTGTGATGATTTAAAGCTGGTGGTGGTTTTGAGTGTATTAATGAGTGGCTGAAAACATATACCTGAGTGTCTGGTGGTGTATGTTCTGCT
 ATACAAGTGGTGTGTATGTTGCTACTGCTTACTGTGTACATATTAAGTGGGAGGATGACGTATAAACTGTTGTAAGTGTATGACGTATAACTACTAGTGA
 TATGAGCTATAGCTAGAACAAAGTGTATGAGTGTATGACTACTGTCCCAACATCAGTGTATGAGCTATACTATAAATTTCTATAAAGTGTATAAATAAACCTGGGCTAAA
 TAGTTCCTGAATACGTGGCATAAACCTGGGCTAACGAGGAATACCCATAGTTAGCAATAAGCTATAGTTGCTGCTATTTTAAAGCGCGGCTTAACTAGCTAA

Watermark-3 1109 base pairs

TTAACTAGCTAAATTAACCATATTAAATATCATCTGATTTTCACTGGCTGGTGGCTGTATAGATTCTACTGTAGTGTAGATAGTTCGTACTAGGTGATACTATAGATTTT
 ATAGATAGCACTACTGGCTTCACTGCTAGGCTATCCCAATAGCTAGTGTATGTTTATGGCATACAACGCTDAAGTGTACAACCTTGGTGGCTGTAGATACAACGCTCGTATTCTGT
 AAGTGTACAATAGCTATTTGCTGTGCTATAGGCTATAGTGGCTGTAAGTGTATGATACACGTAACCAADCATAAAGTTAGATTTAATGCCCTGACTGAACGCTCGTTGGCTG
 ATAGTTTGGCTGGTGTGATACAACGTGATTTTCAAAAACAAAGTATAATTAGTGTATAGTTCGCTAGTAAAGTTCGCTTAGCAAGTGTATAGTTCGCTGACTGTGATATGCT
 TCAAGCTGCTGCTGTATGATAAAGTGTGCAAGCTTCAACAAGTATAATTTAATTTGATATTGCTGGCTGTAGTGTGCTATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATAAGTGTAT
 CTTTTACATATGACGCTGCTTCAATAAAGTGTGCTACTGCTAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 CTAAATGCTGGCTGCTGACGCTTTGGTGTATGTTAGCTAGCTTCACTATAAATAATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 GCTATAGGCTTTGAATATAGGCTATATGATACAACATAATAGCTATAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 AACGAGGATTAAGTGTATGAT

Watermark-4 1222 base pairs

TTAACTAGCTAAATTTATTGCTGATCACTGTATAGATATAGTGCATTTCTATAAGTGTGCTCCACAGGCTAGTGTGGCGCAGTTTTTTCAGTGTATATTAAGTGTGCTACTAACA
 TCACTAGTGGTGTATAAACCTGATACAATAGGTTGATATCATAGCAACTGAAGTGAAGTGCATAGCTCAACTGTGATCACTGTATAGATTTCTGATACTATAGCAACGTTGGCT
 GATATTTTCACTACTGGCTTACTGTAGTGCATAATAGTGTACGCTAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 TAATCAACTAGATAGTGTCTGACTGATCCCTATGCTAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 ACAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 CTATAGATTTTCTGCTAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 GCACTGTGGCTGTATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 TCACTAGTGTGCTAGATATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 GATATTTTAGTGTGCTGGCTTTAATATGCTGATTAAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGTATGATAGTGT
 GGGCGGCTTAACTAGCTAA

Slika 3. Vodeni žigovi umjetnog genoma. Zelenom je označena stop sekvenca, a sivim restrikcijska mjesta za Asc I.

(Preuzeto i prilagođeno iz Gibson i sur., 2010.)

Vodeni su žigovi posebno osmišljeni segmenti DNA veličine preko 1000 pb genskog koda, a služe kao razlikovno sredstvo od prirodnog genoma bakterije *M. mycoides* i govore u kojem su laboratoriju nastali. Pisani su novo osmišljenim kodom koji omoguće upotrebu svih slova engleske abecede i punkcijske znakove, a koristi četiri stop kodone. Prvi vodeni žig u sebi sadrži kod za interpretaciju ostatka genoma, ostali sadrže imena 46 različitih autora i ključne doprinositelja koji su sudjelovali u stvaranju genoma. Također su ugrađene tri internet adrese na koje se može javiti bilo koja osoba koja uspije dešifrirati kod. Ugrađene su i tri citata:

„To live, to err, to fall, to triumph, to recreate life out of life“

(Živjeti, grijешiti, padati, pobijediti, ponovo stvoriti život iz života.)

James Joyce;

„See things not as they are, but as they might be.“

(Vidjeti stvari ne onakvima kakve jesu, nego kakve bi mogle biti.)

Citat iz knjige *Ameri ki Prometej*

„What I cannot create, I cannot understand.“

(Što ne mogu stvoriti, ne mogu razumjeti.)

Richard P. Feynman

3.6 Zaključak

Stvaranje sintetičke stanice je dokaz da se stanice mogu proizvesti bazirane prema genetskoj sekvenci dizajniranoj u računalu. Ogroman raspon biokemijskih, biofizičkih i genetičkih tehnika osmišljen je za opisivanje bioloških sustava, a to nam je dalo metode za opsežno opisivanje genoma nekog organizma te uzoraka ekspresije gena i metaboličkih aktivnosti što omogućuje razumijevanje bioloških uloga gena, a možda dati i definiciju života. Nove metode vizualizacije omogućuju nadgledanje aktivnosti unutar živih organizama što omogućuje preciznu rekonstrukciju stanične arhitekture, a napredci u tehnologiji sinteze i sastavljanja DNA omogućuju kopiranje i rekonstrukciju cijelih kromosoma. Navedene se metode mogu upotrijebiti za reprogramiranje bioloških sustava ili stvaranje novih organizama. Sintetska biologija je bit od velikog značaja u raznim granama tehnologije i gospodarstva, a vjerojatno najbitnija u proizvodnji lijekova i cjepiva, te borbi protiv patogena i to na njihovoj molekularnoj osnovi. Stvoriti će nove produkte i primjene kao što su napredna biogoriva ili tehnologije za poljivavanje vode. Kapacitet za sintezu DNA je daleko nadmašio mogućnosti dizajniranja ili modificiranja genetičkih sustava na sličnoj razini. Ova nova grana znanosti već ima utjecaj na neka od spomenutih područja i nastaviti će ga širiti sve dok se njezine mogućnosti ne mogu mudro iskoristavati.

4. Popis literature:

1. Ajioka J., Haseloff J., 2009. Synthetic Biology: History, Challenges and Prospects. *J. R. Soc.* 6
2. Algire, M. A., Lartigue, C., Thomas, D. W., Assad-Garcia, N., Glass, J. I., Merryman, C., 2009. A new selectable marker for manipulating the simple genomes of mycoplasma, *Antimicrob Agents Chemother*, 53
3. Benders G. A., Noskov V. N., Denisova E. A., Lartigue C., Gibson D. G., Assad-Garcia N., Chuang R., Carrera W., Moodie M. M., Algire, M. A., Phan Q., Alperovich N., Sanjay Vashee S., Merryman C., Smith H. O., Venter J. C., Glass J. I., Hutchison C. A., 2008. Cloning whole bacterial genomes in yeast. *Nucleic Acids Research*, 38
4. Carole Lartigue, Glass J. I., Alperovich N., Pieper R., Parmar, Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. C., 2007. Genome Transplantation in Bacteria: Changing One Species to Another. *Science*, 317
5. Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science*, 269
6. Fraser C. M., Gocayne J. D., White O., Adams M. D., Clayton R. A., Fleischmann R. D., Bult C. J., Kerlavage A. R., Sutton G., Kelley J. M., Fritchman J. L., Weidman J. F., Small K. V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T. R., Saudek D. M., Phillips C. A., Merrick J. M., Tomb J., Dougherty B. A., Bott K. F., Hu P., Lucier T. S., Peterson S. N., Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. C., 1995. The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270
7. Gibson D. G., Benders G. A., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E. A., Baden-Tillson H., Zaveri J., Stockwell T. B., Brownley A., Thomas D. V., Algire, M. A., Merryman C., Young L., Noskov V. N., Glass J. I., Venter J. C., J., Hutchison C. A., Smith H. O., 2008. a Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. *Science* , 319
8. Gibson D. G., Benders G. A., Axelrod K. C., Zaveri J., Algire M. A., Moodie M., Montague M. G., Venter J. C., Smith H. O., Hutchison C. A., 2008. a One-Step

- Assembly in Yeast of 25 Overlapping DNA Fragments to form a Complete Synthetic *Mycoplasma genitalium* Genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105
9. Gibson D. G., Young L., Chuang R., Venter J. C., J., Hutchison C. A., Smith H. O., 2009. a Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases. *Nature Methods*, 6
 10. Gibson D. B., 2009. b *Nucleic Acids Research*, 37, Synthesis of DNA Fragments in Yeast by One-step Assembly of Overlapping Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 38
 11. Gibson D. G., Glass J. I., Lartigue C., Noskov V. N., Chuang R., Algire, M. A., Benders G. A., Montague M. G., Ma L., Moodie M. M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E. A., Young L., Qi Z., Segall-Shapiro T. H., Calvey C. H., Parmar P. P., Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. C., 2010. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science Express* , 329
 12. Glass J. I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M. R., Maruf M., Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. C., 2005. Essential Genes of a Minimal Bacterium. *PANS*, 103
 13. Hutchison C. A., 2007. DNA Sequencing: Bench to Bedside and Beyond. *Nucleic Acids Research*, 35
 14. Hutchison C. A., Peterson S. N., † Gill S. R., Cline R. T.,¹ White O., Fraser C. M., Smith H. O., Venter J. C., 1999. Global Transposon Mutagenesis and a Minimal Mycoplasma. *Science* 286
 15. Lartigue C., Vashee S., Algire M. A., Chuang R., Benders G. A., Ma L., Noskov V. N., Denisova E. A., Gibson D. G., Assad-Garcia N., Alperovich N., Thomas D. V., Merryman C., Hutchison C. A., Smith H. O., Venter J. C., Glass J. I., 2009. Creating Bacterial Strains from Genomes That Have Been Cloned and Engineered in Yeast. *Science*, 325
 16. Noskov V. N., Segall-Shapiro T. H., Chuang R., 2010. Tandem Repeat Coupled with Endonuclease Cleavage (TREC): a Seamless Modification Tool for Genome Engineering in Yeast. *Nucleic Acids Research* 38
 17. Peterson S. N., Hu P., Bott K. F., Hutchison C. U., 1993., A Survey of the *Mycoplasma genitalium* Genome by Using Random Sequencing. *Journal of bacteriology*, 175

18. Sanger F., Air G. M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M., 1977. Nucleotide Sequence of Bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265
19. Smith H. O., Hutchison C. A., Pfannkoch C., Venter J. C., Generating a Synthetic Genome by Whole Genome Assembly: phiX174 Bacteriophage from Synthetic Oligonucleotides. 2003. *Science*, 100
20. bioinfo.mbb.yale.edu/
21. cellnews-blog.blogspot.com/2008/01/synthetic-bacterial-genome.html
22. oba.od.nih.gov/
23. openwetware.org/images/0/0e/Derek_Ju_Presentation_4-8-10.pdf
24. syntheticbiology.org/
25. web.mit.edu/
26. www.bbsrc.ac.uk/web/FILES/Reviews/0806_synthetic_biology.pdf
27. www.genomenewsnetwork.org/
28. www.jcvi.org/
29. www.sciencedaily.com/
30. www.sciencedirect.com/
31. www.sciencemag.org/
32. www.synberc.org/
33. www.synbioproject.org/news/
34. www.synbiosafe.eu/
35. www.ted.com/

5. Sažetak

Ljudi su oduvijek bili fascinirani životom i pokušali su ga stvoriti više nego jednom kroz povijest. Pojavom novog područja biologije, sintetske biologije, koje kombinira znanost i inženjstvo; je to postalo moguće. Ovaj rad daje kratki pregled događaja koji su doveli znanstvenike iz J. Craig Venter Instituta (JCVI) do objave rezultate u kojima opisuju uspješno konstruiranje prve samoreplicirajuće sintetske bakterijske stanice. Tim znanstvenika je sintetizirao modificirani kromosom iz genoma bakterije *Mycoplasma mycoides* veličine 1.08 milijuna parova baza. Sintetska stanica je nazvana *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 i dokaz je da genomi mogu biti dizajnirani u računalu, kemijski stvoreni u laboratoriju te transplantirani u domaćinsku stanicu gdje se stvoriti novu samoreplicirajuću stanicu kontroliranu samo sintetičkim genomom.

6. Summary

People have always been fascinated by life and have tried to create it more than once throughout the history. With the appearance of new area of biology, the synthetic biology, which combines science and engineering; that become possible. This work gives a short review of events that led to publishing results of scientists at the J. Craig Venter Institute (JCVI) describing the successful construction of the first self-replicating, synthetic bacterial cell. The team of scientists synthesized the 1.08 million base pair chromosome of a modified *Mycoplasma mycoides* genome. The synthetic cell is called *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 and is the proof of principle that genomes can be designed in the computer, chemically made in the laboratory and transplanted into a recipient cell to produce a new self-replicating cell controlled only by the synthetic genome.