



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Modrić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ORTOGONALNI RIBOSOMI I REPROGRAMIRANJE GENETSKOG KODA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2018. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

19. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. ORTOGONALNI RIBOSOMI.....	2
2.1. Sinteza proteina pomoću ribosoma s neodvojivim podjedinicama	6
§ 3. ŠIRENJE GENETSKOG KODA	8
3.1. Ortogonolani aminoacil-tRNA-sintetaza/tRNA parovi	9
3.2. Selekcija ortogonalnih aminoacil-tRNA-sintetaza	10
§ 4. ZAKLJUČAK	13
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XIV

§ Sažetak

Reprogramiranje i proširenje genetskog koda može se postići prenamjenom već postojećih kodona ili proširenjem uobičajenog tripletnog genetičkog koda na kvadruplete čime se omogućuje ugradnja nekanonskih aminokiselina u polipetidni lanac. Da bi ugradnja nekanonskih aminokiselina bila uspješna potrebno je unaprijediti ribosome, aktivna vezna mjesta ribosoma, elongacijske faktore, tRNA, aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) te druge faktore koji su potrebni u sintezi proteina. Tako su stvoreni ortogonalni ribosomi s modifikacijama koje omogućuju stvaranje 16S rRNA/mRNA ortogonalnog para, ortogonalni ribosomi koji ugrađuju nekanonske aminokiseline na mjesto UAG (amber) stop kodona te oni ribosomi koji umjesto tripleta mogu dekodirati kvadruplete. Uloga enzima aminoacil-tRNA-sintetaze je vezanje aminokiseline na odgovarajuću tRNA pri čemu troši energiju u obliku ATP-a (adenozin trifosfata). Modifikacije aminoacil-tRNA-sintetaza bitne su jer imaju utjecaj na točnost translacije. Razvijene su tako da čine ortogonalni par sastavljen od aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA. Navedeni ortogonalni par mora biti specifičan, odnosno ortogonalne sintetaze trebaju aminoacilirati samo pripadne tRNA, a ortogonalna tRNA mora biti inertna na endogene aminoacil-tRNA-sintetaze.

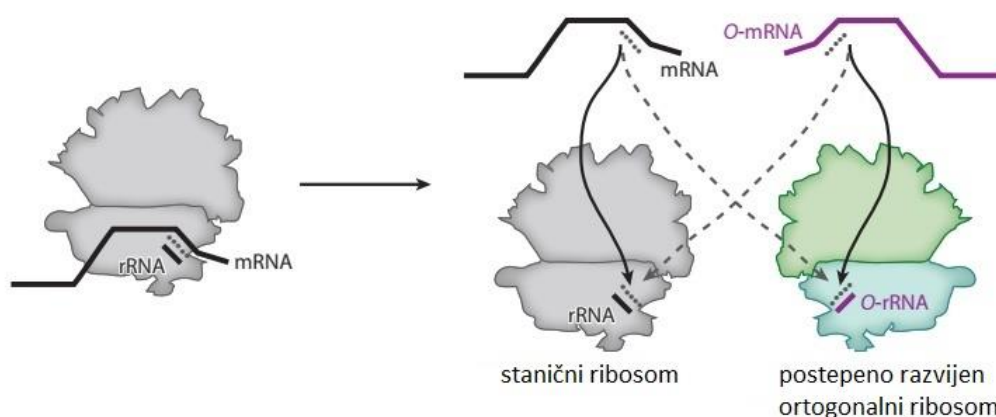
§ 1. UVOD

Ribosomi su ribonukleoproteinski kompleksi odgovorni za biosintezu proteina. Građeni su od velike i male podjedinice koje se razlikuju za bakterijski i eukariotski ribosom. Veći dio ribosoma sačinjava rRNA (ribosomska ribonukleinska kiselina), dok manji dio ribosoma grade ribosomski proteini. Na ribosomu se razlikuju 3 vezna mjesta za tRNA, a to su aminoacil (A) vezno mjesto, peptidil (P) vezno mjesto i izlazno (E) vezno mjesto. Interakcija inicijacijskih faktora i *N*-formilmetionil-tRNA^{fMet} signalizira sklapanje ribosoma i inicijaciju translacije. Nakon inicijacije translacije odnosno inicijacije biosinteze protina, u procesu elongacije dolazi do dekodiranja genetskog koda. Genetski kod je skup pravila koji se koristi za prevođenje informacija s genetskog materijala u proteine. Degeneriran je, univerzalan i nepreklapajući, a čita se u obliku tripleta - kodona. Tripleti kodiraju za neku od 20 osnovnih (kanonskih ili proteinogenih) aminokiselina čiji kovalentni niz daje polipeptid. U procesu dekodiranja aminoacil-tRNA veže se na A mjesto ribosoma u kompleksu s elongacijskim faktorom Tu (EF-Tu). Ispravno prepoznavanje kodona i antikodona u maloj podjedinici potiče otpuštanje aminoacil-tRNA u A mjesto ribosoma te sintezu peptidne veze. Velika podjedinica ribosoma ima peptidil-transferaznu aktivnost i katalizira nastajanje peptidne veze čime se stvara hibridno stanje ribosoma. U posljednjem koraku elongacije dolazi do translokacije peptidil-tRNA i mRNA za jedan kodon. Polipeptidni lanac raste sve dok se u A mjesto ribosoma ne vežu faktori otpuštanja (RF) koji prepoznaju stop kodone na mRNA, a to su UAA, UGA i UAG. Vezanje faktora otpuštanja potiče hidrolizu esterske veze peptidil-tRNA u P mjestu i otpuštanje polipeptida. Zatim slijedi razdvajanje velike i male podjedinice ribosoma te otpuštanje mRNA.

Reprogramiranje i širenje genetskog koda omogućuje ugradnju nekanonskih aminokiselina u polipeptid. Nekanonske aminokiseline sadrže posttranslacijske modifikacije bočnih ogranaka i umjetno sintetizirane fluorescentne ili bioortogonale funkcionalne grupe.¹ Da bi ugradnja nekanonskih aminokiselina bila učinkovita koriste se ortogonalni ribosomi te međusobno ortogonalni parovi aminoacil-tRNA-sintetaza (aaRS) i tRNA.

§ 2. ORTOGONALNI RIBOSOMI

Jedan od načina poboljšanja ugradnje nekanonskih aminokiselina *in vivo* istražen je stvaranjem parova ortogonalnih ribosoma i mRNA (glasnička RNA) u bakteriji *Escherichia coli*. Ortogonalni ribosomi djeluju paralelno u odnosu na prirodni ribosom i selektivno transliraju ortogonalnu poruku koja nije supstrat za prirodni ribosom (slika 1). Sadrže mutaciju u 16S rRNA u maloj podjedinici čime se ortogonalni ribosom usmjerava prema ortogonalnoj poruci koja sadrži komplementarne mutacije u svojoj Shine-Dalgarno sekvenci.² Shine-Dalgarno sekvenca karakteristična je regija bogata purinskim bazama, adeninom i gvaninom, koja prethodi start kodonu. Sparivanje sekvence sa 16S rRNA jedan je od signala za inicijaciju translacije.

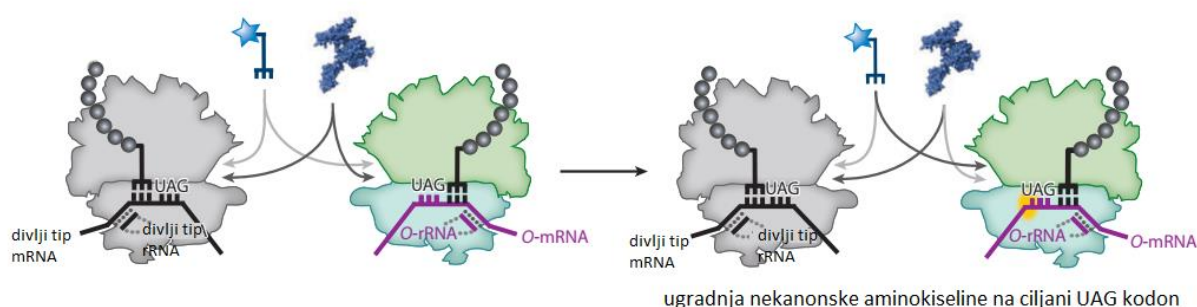


Slika 1. Evolucija ortogonalnog ribosoma u bakteriji *E.coli*. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.

Napredak u sintezi potpuno ortogonalnog ribosoma postignut je korištenjem sheme dvostruke selekcije kojom je stvoren 16S rRNA/mRNA par ortogonalan međusobno i u odnosu na domaćina. Negativnom selekcijom uklonjena je mRNA sekvenca koja je supstrat za endogeni ribosom. To je postignuto uzgajanjem stanica s veznim mjestima ribosoma u prisutnosti 5-fluorouracila i sintezom kloramfenikol-acetiltransferaznog (CAT) – uracil-fosforibotransferaznog (UPRT) fuzijskog proteina. Uracil-fosforiboziltransferaza čini 5-

fluorouracil toksičnim čime dolazi do smrti stanice. Ribosomsko vezno mjesto je uklonjeno, a mRNA s ribosomskim veznim mjestom koja nije translirana endogenim ribosomom je pridružena zbirci ortogonalnih mRNA. Stanice s takvom mRNA su transformirane s mutantima 16S rRNA, a zatim su uzgajane u prisutnosti kloramfenikola koji ometa sintezu proteina na ribosomima⁴. Stanica preživi kada je ortogonalna mRNA učinkovito translirana u CAT-UPRT.³

Ortogonalni ribosom može se laboratorijski unaprijediti tako da ugrađuje nekanonske aminokiseline kao odgovor na amber (UAG) stop kodon čime je moguće razlikovati dekodiranje amber stop kodona prema ortogonalnoj ili staničnoj poruci (slika 2). Amber stop kodon jedan je od tri stop kodona koji inače označavaju terminaciju sinteze proteina, a može biti dekodiran supresorskom amber-tRNA. Supresorska amber-tRNA dekodira amber stop kodon kao signal za umetanje aminokiselina.



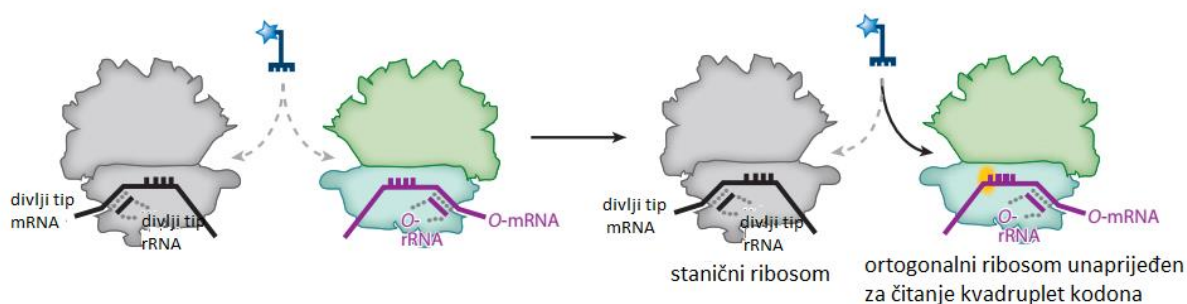
Slika 2. Ortogonalni ribosom koji učinkovito dekodira supresorsku amber-tRNA unaprjeđujući tako ugradnju nekanonskih aminokiselina kao odgovor na amber stop kodon, a ne kao odgovor na genomski kodirane stop kodone. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.

Ugradnja nekanonskih aminokiselina prema amber stop kodonu postignuta je stvaranjem modifikacija u dekodirajućem centru 16S rRNA, regiji koja veže tRNA i RF1 (faktor otpuštanja) u ortogonalnom ribosomu. Unaprijeđeni ortogonalni ribosom (ribo-*X*) učinkovito ugrađuje nekanonske aminokiseline na ortogonalnu mRNA kao odgovor na amber stop kodon, a pri tome koristi ortogonalnu amber-tRNA supresor. Razvijena varijanta ortogonalnog ribosoma ribo-*X* dekodira više amber stop kodona u jednoj poruci te vjero

usmjerava ugradnju više nekanonskih aminokiselina u jedan polipeptid. *In vitro* eksperimenti pokazali su da ribo-*X* olakšava ugradnju nekanonskih aminokiselina smanjenjem vezanja RF1.²

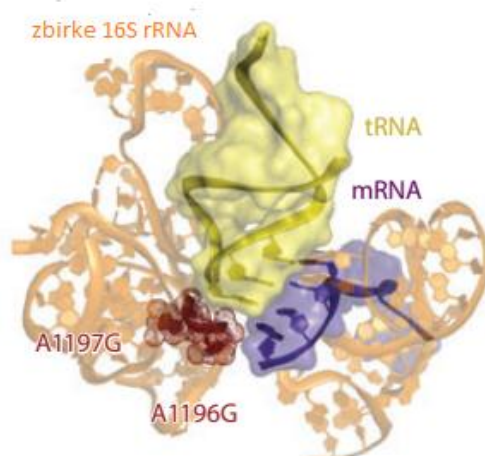
Neučinkovitost ugradnje nekanonskih aminokiselina dekodiranjem amber stop kodona proizlazi iz kompeticije supresorske amber-tRNA s faktorima otpuštanja. Faktor otpuštanja 1 (RF1) u *E. coli* olakšava terminaciju sinteze proteina na amber kodonu. To zahtjeva regulaciju kompeticije između RF1 i supresorke amber-tRNA u korist tRNA dekodiranja. Uklanjanje *PrfA* gena koji kodira za RF1 letalno je za *E. coli*, no neki eksperimenti osporili su ovu tvrdnju. Sedam je esencijalnih gena u *E. coli* koji su određeni amber kodonima. Verzije tih gena u kojima je UAG kodon zamjenjen UAA kodonom smještene su na bakterijski umjetni kromosom i uvedene u soj *E. coli* koja sadrži supresorsku amber-tRNA. Zatim je u prisutnosti supresorske amber-tRNA i bakterijskog umjetnog kromosoma izoliran gen *PrfA* iz tog soja. Umjetni bakterijski kromosom mora sadržavati esencijalni gen *hda* sa TAA terminacijskim kodonom. Iako je određena količina gena koja sadrži UAA kodon bila potrebna za rast, drugi geni individualno nisu bili potrebni. Dodatni eksperimenti pokazali su da se nedostaci uklanjanja *PrfA* gena mogu ublažiti ekspresijom *SucB* gena koji inače završava amber kodonom i važan je za rast.²

Drugi mogući način unaprijeđenja ortogonalnih ribosoma je čitanjem kodona sastavljenih od četiri nukleotida umjesto onih građenih od tri nukleotida. Takav ribosom čita kvadruplete na pripadnoj ortogonalnoj poruci koristeći prošireni tRNA antikodon (slika 3). U kombinaciji s ortogonalnom aminoacil-tRNA-sintetazom može se učinkovito i specifično ugraditi više UAA terminacijskih kodona u jedan protein. Mogućnost učinkovitog dekodiranja amber stop kodona i kvadrupletnih kodona omogućila je razvoj novih tehnologija za ispitivanje strukture i funkcije proteina.³



Slika 3. Laboratorijski unaprijeđen ortogonalni ribosom za čitanje kvadrupleta kodona. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.

Za stvaranje ortogonalnog ribosoma koji učinkovito dekodira kvadruplete stvorena je modifikacija u dekodirajućem centru ribo-*X*, ortogonalnom ribosomu koji je prethodno odabran za poboljšano dekodiranje amber-kodona na ortogonalnoj poruci. Zatim su odabrane varijante ribo-*X* na temelju mogućnosti dekodiranja kvadrupleta i uvedene su u gene za rezistenciju na antibiotike pomoću produženog tRNA antikodona. Tako dobivene varijante ortogonalnog ribosoma nazivaju se ribo-*Q* (slika 4). Ribo-*Q* efikasno dekodiraju serije kvadrupleta preko pripadne tRNA. Točnost translacije može se usporediti s translacijom kod prirodnih ribosoma.²



Slika 4. Struktura ribo-*Q* ribosoma s mutacijom u A mjestu 16S rRNA čime se olakšava dekodiranje kvadrupleta na ortogonalnom ribosomu. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.

Razvojem novog ortogonalnog ribosoma, ribo-*Q*, broj mogućih kodona raste sa 64 na 256, a uz to omogućava ugradnju čak 200 različitih aminokiselina.⁵ Osim toga, pomoću ribosoma ribo-*Q* uspješno su ugrađene dvije različite nekanonske aminokiseline u protein kao odgovor na dva različita kodona. Sposobnost usmjeravanja dvije nekanonske aminokiseline u proteine omogućava programiranje svojstava koja nisu svojstva ni jedne aminokiseline pojedinačno, već se pojavljuju iz interakcija između dvije aminokiseline.⁶ Korištenjem ortogonalnog para pirolizil-tRNA-sintetaze (PylRS) i tRNA_{CUA} uključen je alifatski alkin u proteine, a uz prisutnost para *Methanococcus janaschii* tirozil-tRNA-sintetaze (*Mj*TyrRS) i tRNA_{AGGA} uključen je fenil-azid u proteine. Te dvije bioortogonalne aminokiseline međusobno specifično reagiraju, putem cikloadicije, kako bi se formirala stabilna veza triazola.⁶

Kodiranjem ovih aminokiselina moguće je genetički programirati brzu cikloadiciju i tako omogućiti istraživanje svih mogućih križnih veza u proteinima ili određenih funkcionalnih stanja proteina.

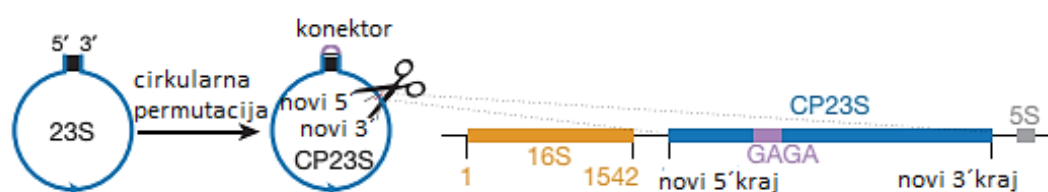
Iako se ovom vrstom ortogonalnih ribosoma, ribo-*Q*, osigurava niz praznih kvadrupletnih kodona, potrebno je otkriti i razviti više međusobno ortogonalnih parova sintetaza/tRNA da bi se olakšalo kodiranje dodatih aminokiselina u polipeptidni lanac.

2.1. Sinteza proteina pomoću ribosoma s neodvojivim podjedinicama

Mala i velika podjedinica ribosoma imaju neovisne, ali koordinirane funkcije bitne za sintezu proteina. To uključuje sklapanje podjedinica za vrijeme inicijacije, rotaciju tijekom elongacije te disocijaciju nakon otpuštanja proteina. Slobodna izmjena podjedinica ograničava razvoj ortogonalnih genetičkih sustava, no utvrđeno je da su ribosomi s povezanim i neodvojivim podjedinicama, nazvanim ribo-*T*, također sposobni za uspješnu sintezu proteina i stvaranje potpuno ortogonalnog ribosom-mRNA sustava. Upravo nasumična izmjena podjedinica uzrokuje problem pri stvaranju potpuno ortogonalnog ribosoma. Moguće je izmijeniti subpopulaciju malih ribosomskih podjedinica tako da umjesto translacije autohtonih mRNA translatiraju specifičnu mRNA. To je omogućeno stavljanjem alternativnih Shine-Dalgarno sekvenci u mRNA i uvođenjem komplementarnih promjena u anti-Shine-Dalgarno sekvencu u 16S rRNA. Mutirane 30S podjedinice stoga imaju nova svojstva dekodiranja. Suprotno tome, inženjering 50S podjedinice je ograničen zbog slobodne izmjene te podjedinice između nativnih i ortogonalnih malih podjedinica. Budući da se peptidil transferazni centar (PTC) i izlazno mjesto proteina nalaze na velikoj 50S podjedinici i oni ograničavaju moguće promjene potrebne za stvaranje novih svojstava.

Inženjeringom hibridne rRNA sastavljene od velikih i malih rRNA sekvenci podjedinice, proizveden je funkcionalan ribosom u kojem su podjedinice kovalentno povezane u jednu cjelinu pomoću kratkih RNA poveznica.⁷ Da bi takva cjelina bila funkcionalna mora pravilo komunicirati s ribosomskim proteinima i čimbenicima biogenze, izbjegavati RNaznu degradaciju i imati dovoljno kratku vezu kako bi se osigurala *cis*-asocijacija podjedinice, ali dovoljno dugu za minimalnu interferenciju s podjedinicom potrebnom za inicijaciju translacije, elongaciju i otpuštanje peptida.⁷ U nativnom ribosomu krajevi 16S i 23S rRNA su previše udaljeni da bi bili povezani RNA poveznicom otpornom na nukleaze. Zbog toga je

smišljen novi dizajn u kojem je 23S rRNA transplacirana u 16S rRNA. Da bi se utvrdilo potencijalno vezno mjesto, povezani su 23S rRNA krajevi nativnog ribosoma koji su međusobno blizu i stvoreni su novi krajevi na različitim položajima (slika 5). Takav pristup zove se cirkularna permutacija.⁷ Tri cirkularne permutacije 23S rRNA mogu stvoriti funkcionalnu podjedinicu.



Slika 5. Shema konstruiranja rRNA operona. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema C. Orelle, E. D. Carlson, T. Szal, T. Florin, M. C. Jewett, A. S. Mankin, *Letter* (2015) 119-124.

§ 3. ŠIRENJE GENETSKOG KODA

Specifična ugradnja nekanonskih aminokiselina u proteine zahtjeva:

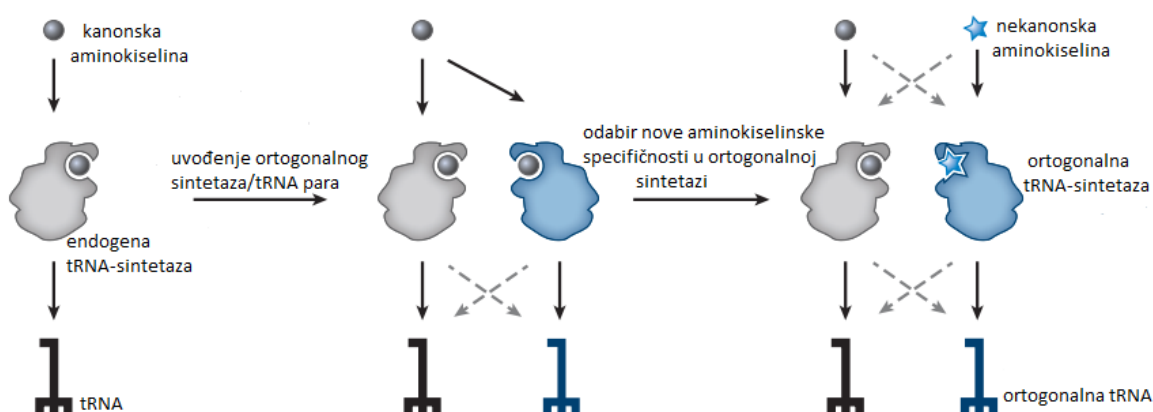
- par aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA koji su ortogonalni na sintetaze i tRNA prisutne u stanicama
- adaptaciju i specifičnost para aminoacil-tRNA-sintetaze i tRNA za ugradnju nekanonskih aminokiselina
- prazni kodon (amber stop kodon, kvadruplete ili druge stop kodone)

Osim navedenog, za *in vivo* ekspanziju genetskog koda potrebna je i dovoljna koncentracija nekanonskih aminokiselina u stanici. Većina nekanonskih aminokiselina može biti akumulirana u stanici jednostavnim dodatkom aminokiselina u medij stanice, no neke nekanonske aminokiseline ne mogu dosegnuti potrebnu koncentraciju bez metaboličkih ili genomskih modifikacija. Primjer jedne takve aminokiseline je fosfoferin. Ugradnja fosfoferina u ljudski MEK1 (mitogen aktivirana ERK proteinska kinaza koja ima dvojni specifičnost) u *E. coli* postignuta je delecijom gena *serB* koji kodira za fosfoferin-fosfatazu SerB. Visokom ili niskom koncentracijom fosfata u mediju može se kontrolirati koncentracija fosfoferina. Pri visokoj koncentraciji fosfata snižavanje koncentracije fosfoferina je potisnuto, a pri niskoj koncentraciji fosfata potrošnja fosfoferina je stimulirana. U uvjetima kada je koncentracija fosfoferina viša u odnosu na koncentraciju kanonskih aminokiselina ugradnja fosfoferina u protein je poboljšana.¹

Važnu ulogu pri ugradnji nekanonskih aminokiselina u početni peptidni lanac ima elongacijski faktor Tu (Ef-Tu) koji ima veći afinitet prema kanonskim aminokiselinama, a manji prema nekanonskim aminokiselinama. Nekanonske aminokiseline koje imaju razgranate bočne ogranke ili negativno nabijene bočne ogranke najteže se ugrađuju u peptidni lanac. Navedeno ukazuje na potrebu modificiranja Ef-Tu. Aktivno vezno mjesto na elongacijskom faktoru je promjenjeno tako da bolje odgovara fosfoferinu i nekanonskim aminokiselinama koje imaju velike bočne ogranke poput aromatskih skupina.¹

3.1. Ortogonalni aminoacil-tRNA-sintetaza/tRNA parovi

Kada se ekspanzija genetskog koda događa *in vivo*, dostupnost aminoacil-tRNA oslanja se na egzogeno uvedene ortogonalne parove sintetaze i tRNA. Ortogonalna tRNA treba biti inertna na endogene aminoacil-tRNA-sintetaze, a ortogonalne sintetaze trebaju specifično i učinkovito aminoacilirati pripadne ortogonalne tRNA, a ne bilo koje tRNA (slika 6).¹



Slika 6. Proces otkrića ortogonalnih aminoacil-tRNA-sintetaza za nekanonske aminokiseline. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.

Ortogonalna tRNA usmjerava umetanje aminokiselina kao odgovor na jedinstveni kodon, amber stop kodon. Ortogonalnost sintetaze ili tRNA je određena komplementarno prema sintetazi i tRNA u organizmu domaćinu. Glavne ortogonalne aminoacil-tRNA-sintetaze razvijene za širenje genetskog koda su:

- Methanococcus janaschii* tirozil-tRNA-sintetaza (*MjTyrRS*)/tRNA_{CUA} par
- Escherichia coli* tirozil-tRNA-sintetaza (*EcTyrRS*)/tRNA_{CUA} par
- E. coli* leucil-tRNA-sintetaza (*EcLeuRS*)/tRNA_{CUA} par
- pirolizil-tRNA-sintetaza (*PylRS*)/tRNA_{CUA} par²

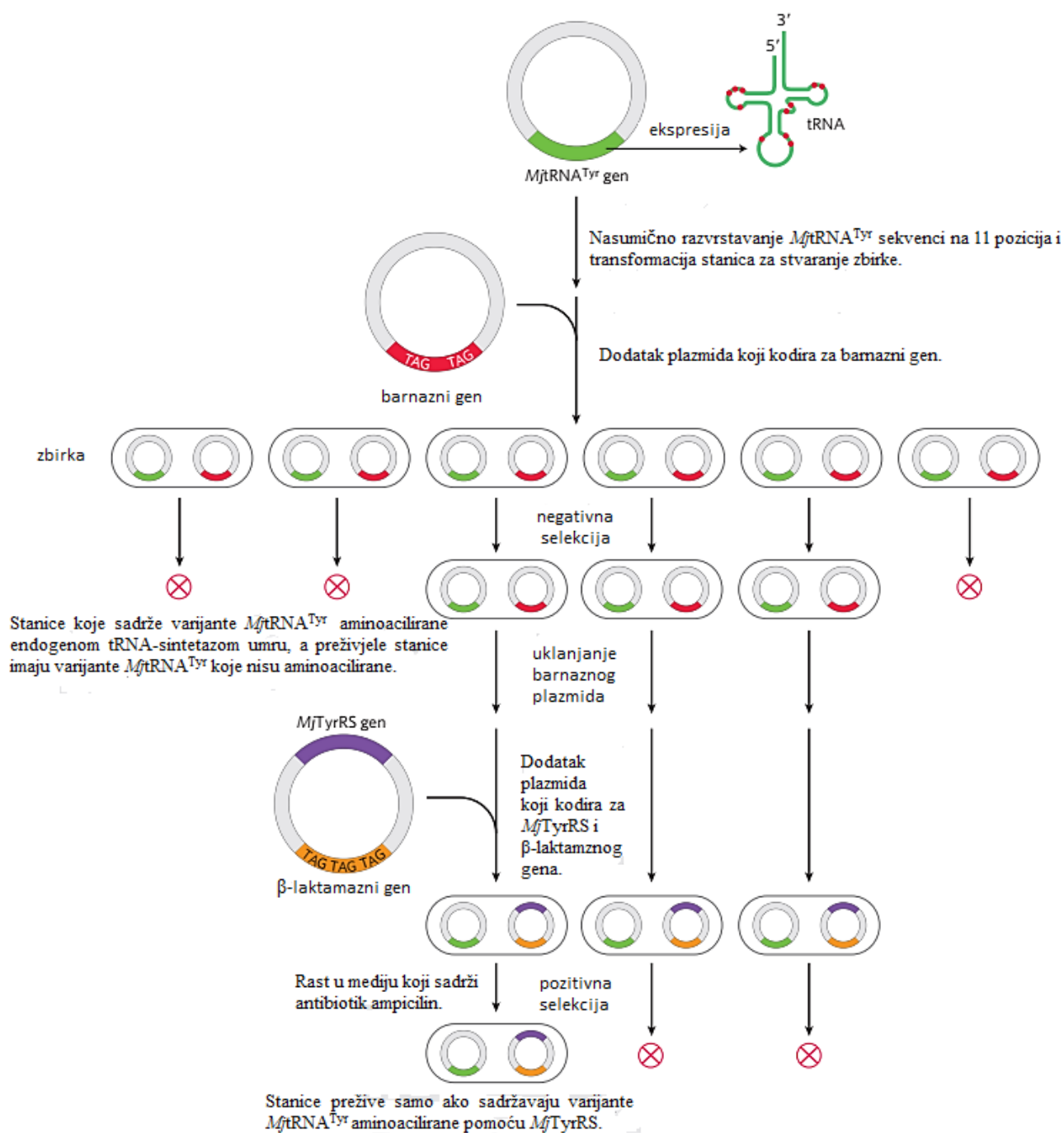
Najkorisni par je pirolizil-tRNA-sintetaza (*PylRS*)/tRNA_{CUA} jer je ortogonalan u bakterijama, eukariotskim stanicama i životinjama. Sintetaza takvih ortogonalnih parova mora imati aktivno mjesto u koje se specifično veže nekanonska aminokiselina. Također, mora premjestiti nekanonsku aminokiselinu na pripadnu ortogonalnu tRNA. Pritom je bitno da ne

veže neku od kanonskih aminokiselina jer u suprotnom aktivno mjesto enzima mutira da se taj proces spriječi.

3.2. Selekcija ortogonalnih aminoacil-tRNA-sintetaza

Za stvaranje nove tRNA i tRNA-sintetaze uzet je gen za tirozil-tRNA i pripadnu tirozil-tRNA-sintetazu iz *Methanococcus janaschii* ($MjtRNA^{Tyr}$ i $MjTyrRS$). $MjTyrRS$ se ne veže na antikodonsku petlju $MjtRNA^{Tyr}$, pa se antikodonska petlja modificira do CUA bez utjecaja na interakcije. Antikodon CUA je komplementaran UAG kodonu koji je uzet kao prvi pokušaj dekodiranja novih aminokiselina jer je najmanje korišten od tri terminacijska kodona.⁸ Gen koji kodira za $MjtRNA^{Tyr}$ mora biti modificiran za generiranje onog produkta tRNA koji je aminoaciliran samo s $MjTyrRS$. Produkt ne smije biti aminoaciliran bilo kojom aminoacil-tRNA-sintetazom. Nizom negativnih i pozitivnih selekcijskih ciklusa moguć je pronalazak varijante takvog gena (slika 7). Dijelovi sekvence gena za $MjtRNA^{Tyr}$ su nasumični, dopuštajući tako stvaranje zbirke stanica koje daju različite tRNA. Gen koji kodira za ribonukleazu koja je toksična za *E. coli* (barnazni gen) je takav da njegov mRNA transkript sadrži nekoliko UAG kodona te je ugrađen u stanice plazmida. Ekspirira se ako je određena varijanta $MjtRNA^{Tyr}$ izražena u stanici aminoacilirana endogenom tRNA-sintetazom. Tada stanica umire, a takva selekcija naziva se negativnom. Preživjele stanice bi sadržavale varijante tRNA koje nisu aminoacilirane endogenom tRNA-sintetazom, ali mogu potencijalno biti aminoacilirane s $MjtRNA^{Tyr}$.⁸

Pozitivna selekcija postignuta je stvaranjem gena za β -laktamazu čiji transkript sadrži nekoliko UAG kodona, te je gen uveden u stanice zajedno s genom koji kodira za $MjTyrRS$. Gen za β -laktamazu daje bakteriji otpornost na antibiotik ampicilin. Varijante $MjtRNA^{Tyr}$ koje su aminoacilirane pomoću $MjTyrRS$ omogućile su rast bakterija na antibiotiku ampicilinu samo kad je u stanici prisutan $MjTyrRS$. Nakon nekoliko ciklusa pozitivnih i negativnih selekcija moguće je izolirati novu $MjtRNA^{Tyr}$ varijantu koja nije podložna utjecajima endogenih enzima već je aminoacilirana pomoću $MjTyrRS$ i dobro funkcionira u translaciji.⁷ $MjTyrRS$ mora biti promjenjena tako da prepoznaje novu aminokiselinu, a gen koji kodira za tu sintetazu je također mutiran tako da se može stvoriti velika zbirka sintetaza. Varijante sintetaza koje s endogenim aminokiselinama aminoaciliraju nove $MjtRNA^{Tyr}$ eliminiraju se koristeći barnazni gen.⁸



Slika 7. Odabir $MjtrNA^{Tyr}$ varijanti koje funkcioniraju samo s tirozil-tRNA-sintetazom $MjTyrRS$. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema D. L. Nelson, M. M. Cox, *Leninger Principles of biochemistry*, W. H. Freeman and company, 2013, str. 1103-1139.

Drugom pozitivnom selekcijom stanice prežive samo ako je Mj tRNA^{Tyr} aminoacilirana u prisutnosti nekanonske aminokiseline. Nakon nekoliko ciklusa pozitivne i negativne selekcije stvara se pripadni tRNA-sintetaza/tRNA par koji prepoznaje samo nekanonsku aminokiselinu.⁸

Ovim pristupom razvijeno je mnoštvo sojeva *E. coli*, od kojih je svaki sposoban ugraditi nekanonsku aminokiselinu u protein kao odgovor na UAG stop kodon.⁸

§ 4. ZAKLJUČAK

Iako 20 osnovnih aminokiselina omogućuju zapanjujuću biokemijsku raznolikost, ipak ograničavaju potencijal novih i korisnih funkcija proteina. Prošireni genetski kod za održivu funkciju *in vivo* zahtijeva integrirani pristup: modificirane ribosome koji funkcioniraju bez ometanja endogenih puteva i stvaranje rekodiranog genoma.⁹ Složena građa ribosoma i njegove koordinirane funkcije otežavaju modificiranje ribosoma. No, znanstvenici su uspjeli u naumu unaprijeđenja biosinteze proteina. Stvoreni su ortogonalni ribosomi i njihove varijante koje se osim u svrhe ugradnje nekanonskih aminokiselina mogu koristiti i za istraživanje ili stvaranje drugih funkcija ribosoma. Za dodatan napredak u biosintezi proteina potrebno je razviti više ortogonalnih parova sinetaza-tRNA koji bi mogli ugraditi mnogo različitih aminokiselina i tako proširiti opseg translacije. Također, potrebno je proširiti pristupe ugradnje nekanonskih aminokiselina na eukariote i životinje da bi se olakšala druga biološka otkrića.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. N. Teresaka, Y. Iwane, A. Geiermann, Y. Goto, H. Suga, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (2015) 6513-6531.
2. J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 379-408.
3. C. J. Glasscock, J. B. Lucks, M. P. DeLisa, *Cell Chemical Biology* (2016) 45-56.
4. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Kloramfenikol> (datum pristupa 6. kolovoza 2018.)
5. https://en.wikipedia.org/wiki/Expanded_genetic_code (datum pristupa 11. kolovoza 2018.)
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3116288/> (datum pristupa 4. rujna 2018.)
7. C. Orelle, E. D. Carlson, T. Szal, T. Florin, M. C. Jewett, A. S. Mankin, *Letter* (2015) 119-124.
8. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Leninger Principles of biochemistry*, W. H. Freeman and company, 2013, str. 1103-1139.
9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5772603/> (datum pristupa 4. rujna 2018.)