Sintetski genomi

Pavlinek, Eva

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:679655

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

SINTETSKI GENOMI
SYNTHETIC GENOMES

SEMINARSKI RAD

Eva Pavlinek
Preddiplomski studij Molekularna biologija
Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2017.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. DNA sintetizator 2
3. Metode sastavljanja genoma 4
3.1. *BioBricks* - standardno sastavljanje DNA s restrikcijskim enzimima i ligazom 5
3.2. *In-Fusion* metoda sastavljanja DNA 6
3.3. Metoda sastavljanja DNA po Gibsonu 8
4. Sinteza prvih genoma 10
4.1. Synthia – prva bakterijska stanica kontolirana sintetskim genomom 10
4.2. Synthia 2.0 i 3.0. – dizajn i sinteza minimalnog bakterijskog genoma 11
4.3. Kvaščev sintetski genom 14
5. Kvaščev sintetski genom: The Genome Project – Write 17
6. Zaključak 19
7. Literatura 20
8. Sažetak 22
9. Summary 22

1. Uvod

Suvremene metode i tehnologije su znatno napredovale od prvih spoznaja o strukturi, sekvenciranju i umnažanju DNA. U današnje vrijeme, sekvenciranje genoma se vrši brzo i jeftino. Idući korak jest razvoj metoda za također brzo i jeftino sintetsko sastavljanje DNA i cijelih genoma. U području sintetske biologije stvara se sve veći interes za sintetske genome koji bi omogućili dizajn bioloških sustava u korisne svrhe. Znanstvenici pomoću njih dobivaju detaljnije informacije u genomici, ali također ih koriste i u istraživanjima za stvaranje lijekova, cjepiva, biogoriva te razvoj specifičnih staničnih linija i tkiva (König i sur. , 2013)

Još uvijek nije moguće sintetizirati cjeloviti genom odjednom, ali su razvijene metode koje omogućuju postepeno sintetiziranje dugih sljedova DNA specifičnim spajanjem kraćih fragmenata. U tu svrhu su razvijene brojne metode, od kojih će u ovom radu biti opisane metode sastavljanja/sklapanja DNA *BioBricks*, *In-Fusion* te *Gibson Assembly* (Gibson i sur., 2009; Sleight i sur., 2010).

Razvoj ovih metoda omogućio je znanstvenicima sintetiziranje cijelih genoma nekih organizama. Prva bakterijska stanica kontrolirana kemijski sintetiziranim genomom, *Synthia*, stvorena je 2010. godine (Gibson i sur., 2010). Ona je poslužila kao temelj daljnjih istraživanja, poput proučavanja minimalnog genoma koji se sastoji samo od esencijalnih gena. Od tada su ovakvi pokušaji provedeni i na drugim organizmima, od kojih su neki uspješni primjeri genomi drugih bakterija, kvasca te mišjeg mitohondrijskog genoma.

Idući korak u svijetu sintetskih genoma je pokušaj sintetiziranja genoma viših organizama. S tim ciljem je započet projekt „The Genome Project - Write“ (Boeke i sur., 2016). Iako su metode za sintezu cijelih genoma još uvijek u začetku, današnja istraživanja vode njihovom značajnom napretku i razvoju.

2. DNA sintetizator

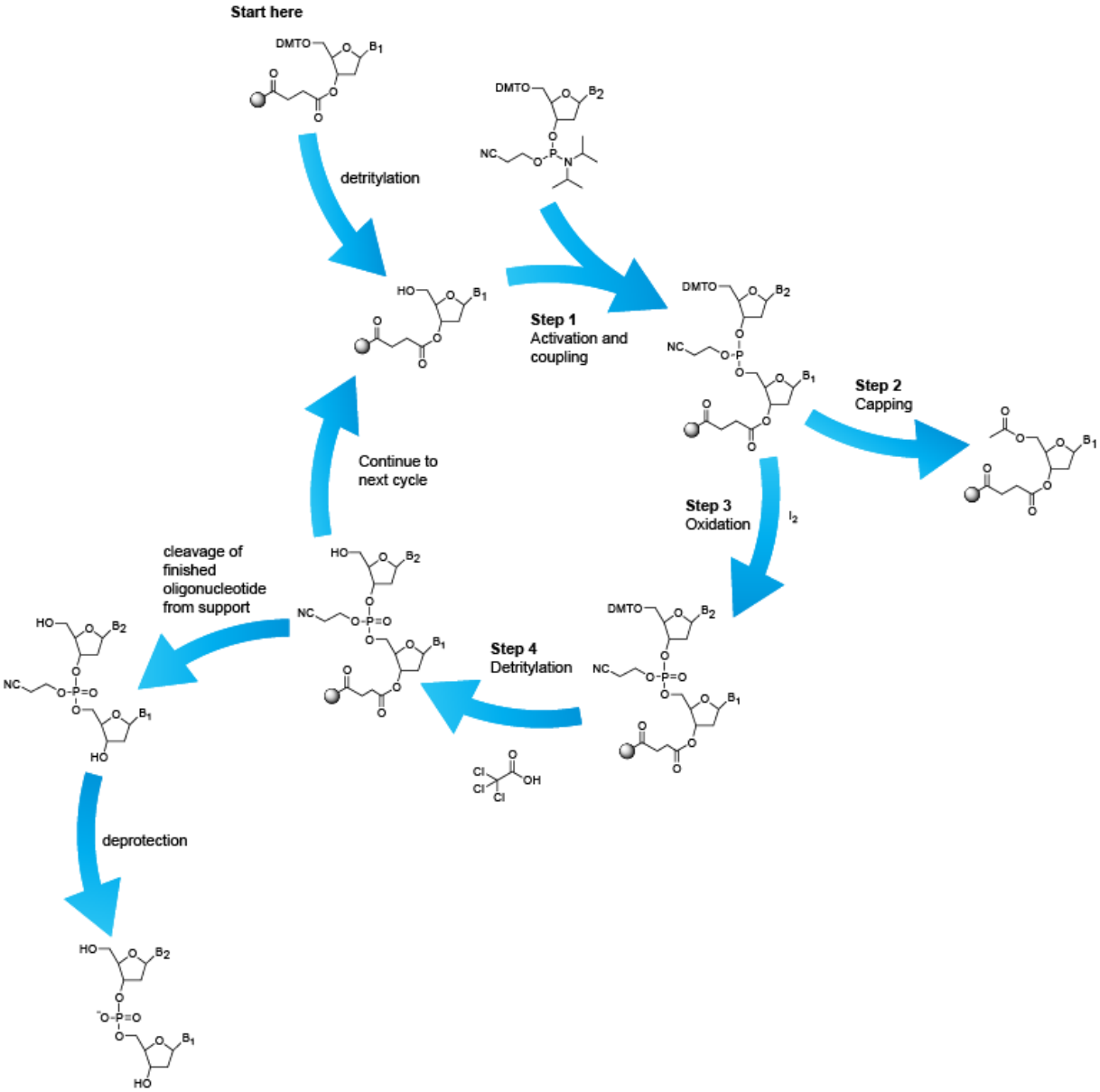
Kako bi se sintetizirali dijelovi ili cijeli genomi, najprije je potrebno sintetizirati oligonukleotide koji će biti povezani u dulje sljedove. Uređaji zvani DNA sintetizatori omogućuju kemijsku sintezu oligonukleotida željenog slijeda (Slika 1.). Moguće je sintetizirati polimere do 200-tinjak nukleotida, ali efikasno se sintetiziraju sljedovi kraći od 100 baza. Tehnologija je daleko napredovala od 1950.-ih kada su znanstvenici tek pokušavali otkriti temeljne principe za kemijsku sintezu dinukleotida. Marvin Caruthers je otkrio kemijsku sintezu odsječaka DNA ili RNA dugog lanca iz nukleotid fosforamidita s nezaštićenim baznim dijelom kao jediniciom. Ona je od tada automatizirana i unaprijeđena u današnjim DNA sintetizatorima.



Slika 1. ABI 3400 DNA SYNTHESIZER (Preuzeto s http://www.labx.com/)

Ova metoda sintetizira oligonukleotide u smjeru 3'-5', što je obrnuto od biosinteze DNA tijekom replikacije. Metoda se temelji na nizu reakcija povezanih u ciklus, a po ciklusu se dodaje jedan nukleotid (Slika 2.). Na temelju željenog slijeda, oligonukleotid se sintetizira na krutim zrncima poroznog stakla ili polistirena unutar sintetizatora dovođenjem reakcijske otopine s pojedinim aktiviranim monomerima.

Reakcijski ciklus se sastoji od četiri koraka. Početni nukleotidni monomer vezan za zrnce ima 5'-DMT (dimetiltriptamin) zaštitnu skupinu koja ga štiti od polimerizacije tijekom pripreme zrnaca. Najprije se ona mora ukloniti kako bi se mogla vršiti daljnja polimerizacija. Uvođenjem idućeg monomera te aktivatora (npr. tetrazol), monomer se veže s postojećim oligonukleotidom (1. korak/*Step 1* na slici 2.). Tijekom ovog koraka, postoji mogućnost da neke 5'-hidroksi grupe na oligonukleotidu ostanu slobodne što može dovesti do ugradnje pogrešnih nukleotida u daljnjim reakcijama. Kako bi se to izbjeglo, oligonukleotid se tretira acetanhidridom i N-metilimidazolom koji sprječavaju daljnje vezanje nadolazećih monomera (2. korak/*Step 2* na slici 2.). Polimerizacijom nastaje nestabilna reaktivna fosfatna okosnica koja se oksidira (3. korak/*Step 3* na slici 2.). Posljednja reakcija ciklusa je uklanjanje 5'-DMT-a s posljednjeg nukleotida kako bi sintetizirani oligonukleotid mogao vezati idući monomer (4. korak/*Step 4* na slici 2.). Ciklus se ponavlja sve dok čitav oligonukleotid nije sintetiziran. Uklanjanje zaštitnih skupina i odvajanje od zrnaca se vrši pomoću amonijevog hidroksida te se, na samom kraju, dobiveni oligonukleotidi pročišćuju nakon evaporacije vodene otopine (http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis).

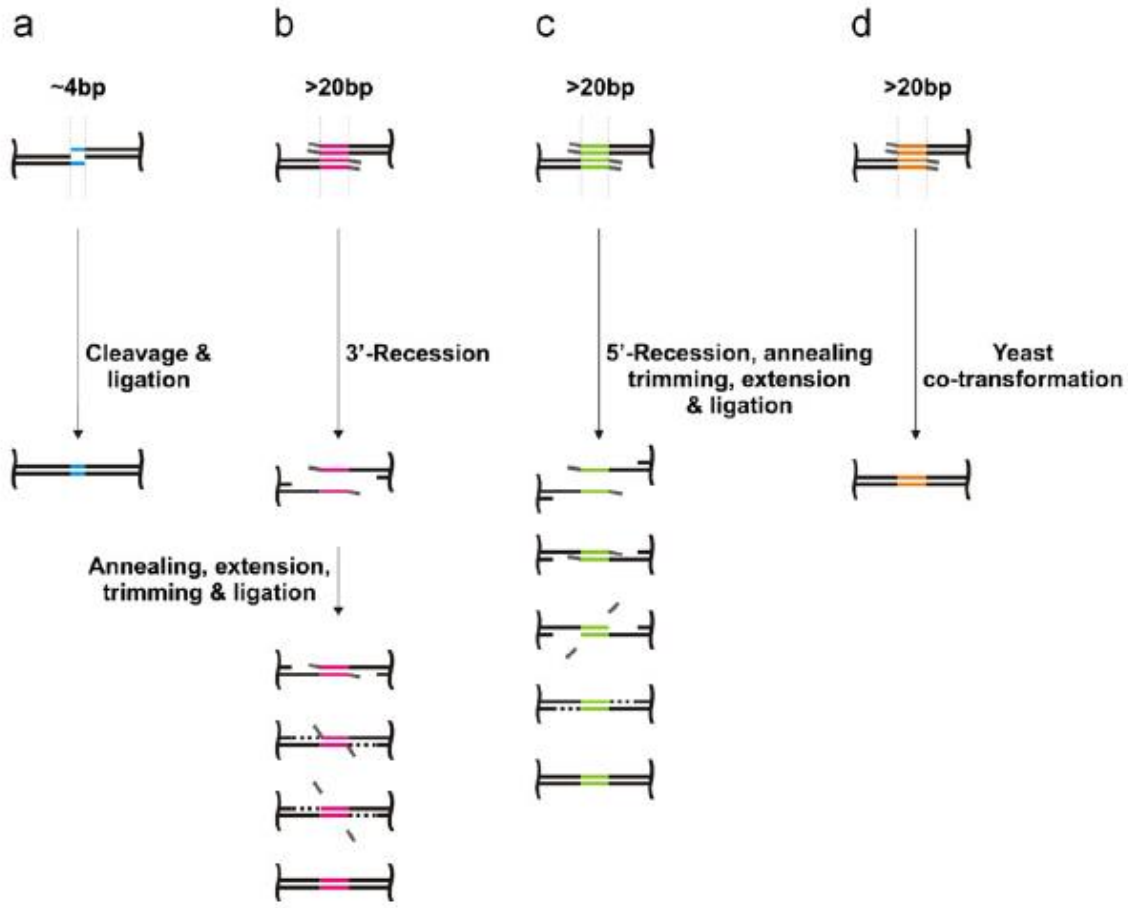


Slika 2. Reakcijski ciklus za sintezu oligonukleotida u DNA sintetizatoru (Preuzeto s http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis)

3. Metode sastavljanja genoma

Sastavljanje kraćih dijelova DNA već neko vrijeme ne predstavlja problem u genetičkom inženjerstvu. Razvijene su brojne metode koje omogućuju postepeno sastavljanje kraćih fragmenata te su pomoću njih uspješno konstruirani genomi pojedinih virusa (Cello i sur. 2002; Smith i sur. 2003), modifikacije plazmida (Tsuge i sur. 2003) te bakterija (Itaya i sur. 2005). Međutim, manipuliranje DNA fragmentima duljim od 20 kb postaje izazovno. Trenutne mogućnosti su daleko od sastavljanja cijelih genoma odjednom, ali sadašnje tehnologije omogućuju sastavljanje više fragmenata odjednom. Metode sastavljanja DNA fragmenata se ugrubo mogu svrstati u 4 kategorije (Slika 3.) :

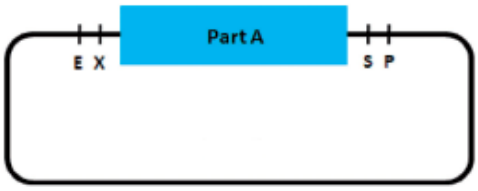
a) metode temeljene na ligaciji
b) metode temeljene na homolognoj rekombinaciji preko 5'-stršećih krajeva
c) metode temeljene na homolognoj rekombinaciji preko 3'-stršećih krajeva
d) *in vivo* sastavljanje u kvascu



Slika 3. Postojeće metode sastavljanja DNA fragmenata (Preuzeto iz Merryman & Gibson, 2012)

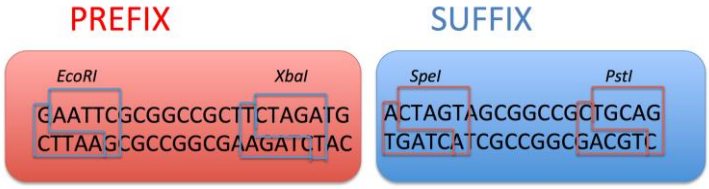
3.1. *BioBricks* - standardno sastavljanje DNA s restrikcijskim enzimima i ligazom

U genetičkom inženjerstvu je često potrebno konstruirati biološke sustave koji se sastoje od pojedinih genetičkih elemenata zvanih *BioBricks*. Ovisno o potrebama istraživanja, ti elementi mogu biti raznoliki: promotori, vezna mjesta za ribosome, kodirajući sljedovi ili pak terminatori transkripcije, a omeđeni su dvama restrikcijskim mjestima s obje strane. Metoda sastavljanja *BioBrick* omogućuje sastavljanje željenih elemenata u jednu cjelinu na specifičan način pomoću restrikcijskih enzima te ligacijom dva *BioBrick*-a (Sleight i sur. 2010). Upotreba različitih restrikcijskih enzima ograničava smjer u kojem se željeni fragment može ugraditi te također zatvaranje vektora bez ugradnje fragmenta. Svaki BioBrick se nalazi na plazmidu te je omeđen sa četiri specifična restrikcijska mjesta: uzvodno su *Eco*RI (E) i *Xba*I (X) (tzv. prefiks) te nizvodno *Spe*I (S) i *Pst*I (P) (tzv. sufiks) (Slika 4.). Ova restrikcijska mjesta se ne pojavljuju nigdje drugdje na plazmidu ili unutar samih *BioBricks*-a.



Slika 4. Primjer *BioBrick*-a na plazmidu. Određeni genetički element „Part A“ omeđen je specifičnim restrikcijskim mjestima (Preuzeto iz Sleight i sur. 2010)

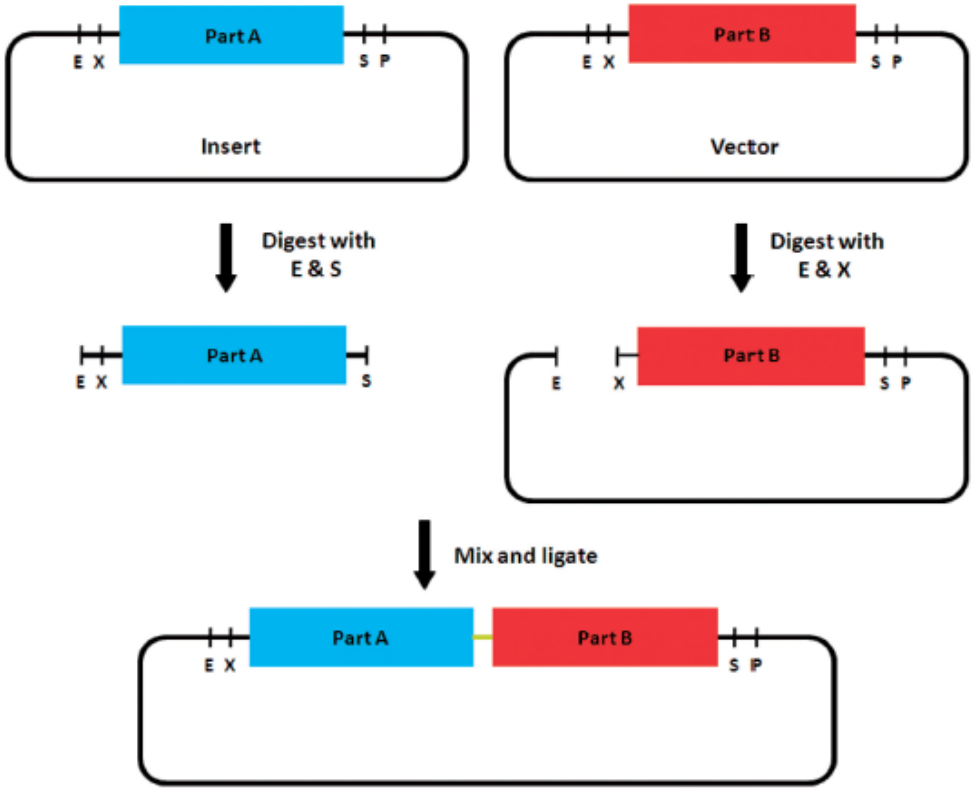
Restrikcijski enzimi *Spe*I i *Xba*I imaju različita restrikcijska mjesta, ali proizvode komplementarne ljepljive krajeve (Slika 5.). To omogućuje spajanje produkata njihove restrikcijske razgradnje, ali time nastaje novi slijed kojeg neće prepoznati nijedan od tih restrikcijskih enzima.



Slika 5. Restrikcijska mjesta restrikcijskih enzima korištenih u metodi sastavljanja *BioBricks* (Preuzeto s http://www.2015.igem.org/Team:Birkbeck/BioBricks)

U metodi se koriste dva plazmida, svaki s po jednim *BioBrick*-om koje želimo spojiti u jedan plazmid. Prvi plazmid služi kao vektor u koji se ugrađuje *BioBrick* iz drugog plazmida (Slika 6). Plazmid s fragmentom kojeg treba ugraditi se tretira restrikcijskim enzimima *Eco*RI i *Spe*I. Rezultat ove reakcije su dva fragmenta, veći dio plazmida koji je nepotreban te manji fragment, odnosno *BioBrick* koji treba ugraditi u drugi vektor. Jedna od mana ove metode je potreba za pročišćavanjem željenog fragmenta, najčešće gel elektroforezom, za daljnje reakcije. Drugi vektor se tretira restrikcijskim enzimima *Eco*RI i *Xba*I. Ova reakcija pocijepa vektor i stvori u njemu mjesto u koje se može ugraditi *BioBrick* iz prvog plazmida zbog komplementarnih ljepljivih krajeva. Budući da su oba plazmida cijepana pomoću *Eco*RI, nastali ljepljivi krajevi će uzvodno ponovno stvoriti restrikcijsko mjesto za isti enzim. Ljepljivi krajevi nastali pomoću *Spe*I i *Xba*I će se također povezati, ali neće tvoriti isto restrikcijsko mjesto.

Ligacijom ovih fragmenata nastaje novi plazmid koji sadrži oba *BioBrick*-a te „ožiljak“, odnosno slijed od 8 bp između njih, zbog kojeg ovom metodom nije moguće stvarati fuzionirane/kimerne proteine. Rezultat spajanja dva *BioBrick*-a je novi *BioBrick* okružen istim restrikcijskim mjestima kao početni te se dalje može tretirati kao jedan cjeloviti *BioBrick* i spajati s drugima.



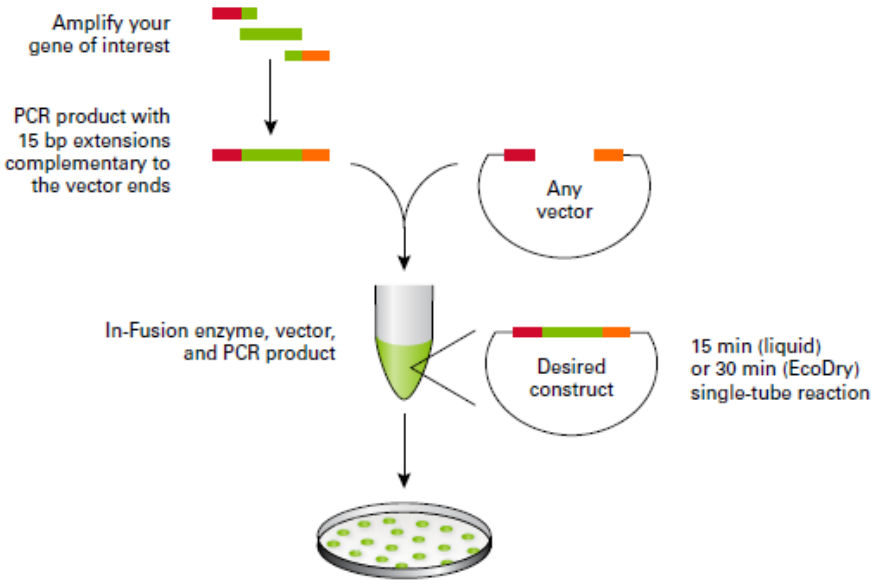
Slika 6. Temeljni princip standardne metode *BioBricks* (Preuzeto iz Sleight i sur. 2010)

Prednost ove metode je njena standardiziranost koju omogućuju specifična restrikcijska mjesta. Međutim, upravo radi ožiljka kojeg ostavlja, nužnog pročišćavanja DNA, višestrukih reakcija te potrebne pripreme plazmida, nije najpovoljnija za sintetiziranje kompleksnijih DNA.

3.2. *In-Fusion* metoda sastavljanja DNA

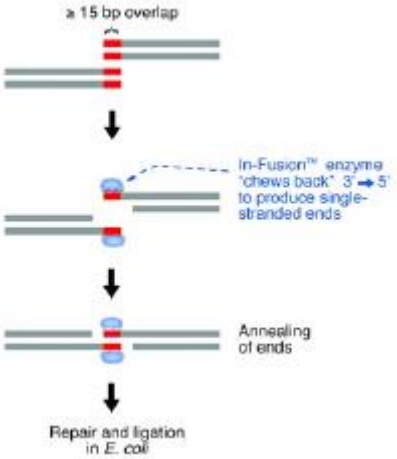
Metoda *In-Fusion* omogućava spajanje dva DNA slijeda koji imaju preklapajuće krajeve od 15 pb. Velika prednost ove metode je što je njome moguće spajati više fragmenata istovremeno te što se preklapajući krajevi jednostavno kreiraju pomoću PCR-a. Ukoliko ih dodamo na početnice za umnažanje željenog fragmenta DNA, rezultat će biti umnoženi fragment sa željenim preklapajućim krajevima. Upravo zato, ovom metodom moguće je stvarati fuzionirane proteine, vršiti mutagenezu te uklanjati ili zamijeniti bilo koji segment DNA na plazmidu (Zhu i sur. 2007).

Nakon odabiranja mjesta na plazmidu na koje je potrebno ugraditi gen ili fragment DNA od interesa, vektor se linearizira restrikcijskim enzimima ili inverznim PCR-om te pročisti. Zatim se dizajniraju početnice za željeni fragment s dodatnih 15 pb komplementarnim krajevima lineariziranog vektora. PCR produkt se umnoži, pročisti te pomiješa s vektorom i reakcijskom smjesom koja sadrži dNTP-ove, pufer te specifičnu poksvirusnu DNA polimerazu. (Slika 7.).



Slika 7. Protokol metode *In-Fusion* (Preuzeto s https://www.clontech.com/)

Poksvirusna DNA polimeraza ima 3'-5' *proofreading* egzonukleaznu aktivnost. U prisustvu Mg^{2+} i niske koncentracije dNTP-ova, polimeraza uklanja nukleotide s 3' kraja te stvara stršeće 5' krajeve u željenim sljedovima. Oni se spontano spajaju zbog svoje komplementarnosti, a popravljanje mogućih jednolančanih praznina te ligacija se vrši u samim bakterijama (Zhu i sur., 2007).

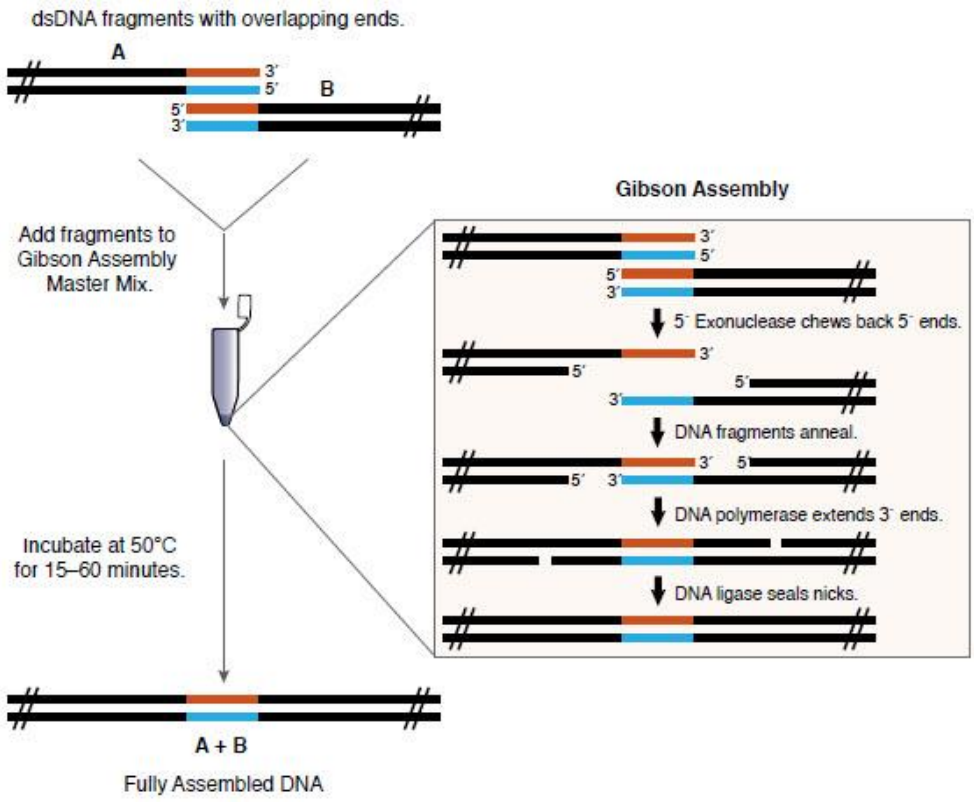


Slika 8. Princip metode sastavljanja *In-Fusion* (Preuzeto iz Zhu i sur., 2007)

3.3. Metoda sastavljanja DNA po Gibsonu

Metoda koju su osmislili Daniel Gibson i suradnici temelji se na izotermalnoj reakciji pomoću 5'-egzonukleaze, DNA polimeraze i DNA ligaze. Njome je moguće spajati više fragmenata DNA, različitih duljina, a spaja preklapajuće krajeve od 15-80 pb. U svijetu sintetske biologije je stekla popularnost upravo radi svoje jednostavnosti, fleksibilnosti te prikladnosti. Koristi se u sintetiziranju gena, regulatornih elemenata ili pak čitavih genoma te je kao takva iznimno koristan alat u genetičkom inženjerstvu (Gibson i sur. 2009).

Metoda sastavljanja Gibson omogućava spajanje više fragmenata u samo jednom izotermalnom koraku. Razvijena je unaprjeđenjem starije metode pomoću koje su Gibson i suradnici konstruirali genom bakterije *Mycoplasma genitalium* (Gibson i sur. 2008a). Ovim pristupom je uspješno sastavljen sintetski genom veličine 583 kb (Gibson i sur. 2009). Optimizirana metoda koristi 5' egzonukleazu T5, *Phusion* DNA polimerazu i *Taq* DNA ligazu. Budući da egzonukelaza ne sprječava polimeraznu aktivnost, svi enzimi mogu biti istovremeno aktivni u jednoj reakciji (Slika 9.). Dva dvolančana fragmenta DNA s preklapajućim (homolognim) krajevima se pomiješaju s reakcijskom smjesom i inkubiraju 15-60 min na 50°C. Pritom će 5'-egzonukleaza razgraditi 5'-krajeve fragmenata i stvoriti 3'-stršeće jednolančane krajeve. T5 egzonukleaza je termolabilna i inaktivirat će se tijekom inkubacije na 50°C. Zbog svoje komplementarnosti, jednolančani krajevi će se spojiti, DNA polimeraza će sintetizirati nedostajeće dijelove lanaca, a DNA ligaza će spojiti preostale jednolančane ureze. Rezultat reakcije su sastavljena dva ili više fragmenata DNA.



Slika 9. Princip metode sastavljanja DNA po Gibsonu (Preuzeto s https://www.neb.com/)

Metoda je korisna za kloniranje više fragmenata u vektore bez ograničenja restrikcijskim mjestima. Budući da se T5 egzonukleaza inaktivira tijekom reakcije, ova metoda je idealna za sastavljanje i lineariziranih konstrukata. Također omogućava brzo sastavljanje

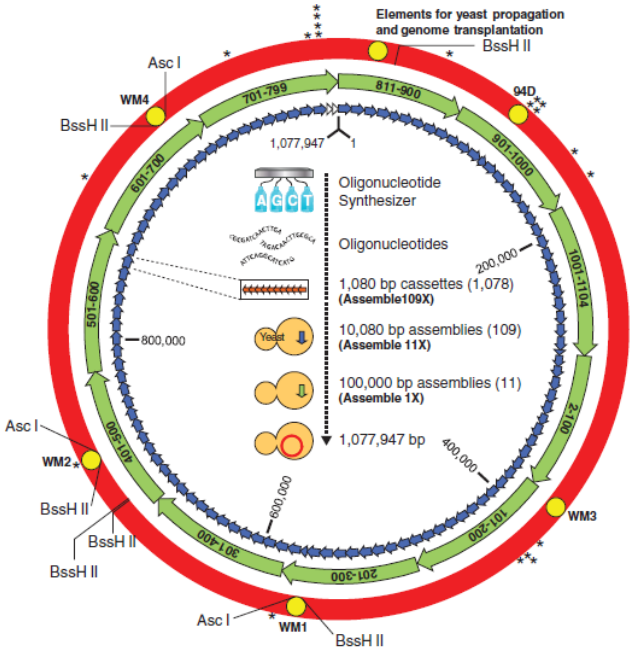
velikih dijelova DNA budući da se fragmenti preveliki za umnažanje u PCR-u mogu pocijepati na manje te jednostavno spojiti (Gibson i sur. 2009). Danas je ova metoda jedna od najkorištenijih u svrhu sintetiziranja genoma. Jedan od zanimljivih uspješnih projekata bio je sintetiziranje mišjeg mitohondrijskog genoma (Gibson i sur. 2010). Također se može koristiti i zajedno s *in vivo* rekombinacijskim sastavljanjem u kvascu gdje su Daniel Gibson i suradnici imali mnoge uspjehe (Gibson, 2009; Gibson i sur., 2008a; Gibson i sur., 2008b).

4. Sinteza prvih genoma

Razvoj novih tehnologija pomiče granice genetičkog inženjerstva ka sintezi cijelih genoma. Još 2003. godine sintetiziran je cijeli genom bakteriofaga ΦX174 (5,386 pb) u samo dva tjedna (Smith i sur. 2003). Kromosom bakterije *Mycoplasma genitalium* od 583 kb je prvi bakterijski genom sastavljen od potpuno kemijski sintetizirane DNA (Gibson i sur., 2008a). Do sada su uspješno provedene modifikacije nekih prokariotskih genoma kao npr. redukcija genoma *Escherichie coli* (Posfai, 2006) ili spajanje genoma *Bacillus subtilis* i *Synechocystis* PCC6803 (Itaya i sur., 2005), a u toku su i istraživanja na eukariotima (Juhas & Ajioka, 2016).

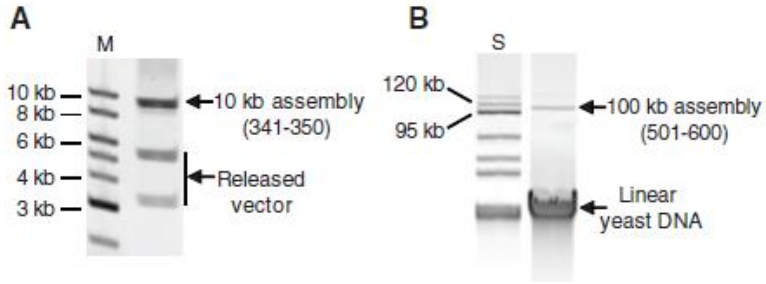
4.1. *Synthia* – prva bakterijska stanica kontolirana sintetskim genomom

Nakon otkrića da je moguće sintetizirati cijeli bakterijski genom, Daniel Gibson i suradnici su si postavili za zadatak otkriti je li moguće transplantirati takav sintetski genom u bakterijsku stanicu koja će biti kontrolirana samo tim genomom. Tako je nastala *Synthia* (JCVI-syn1.0), bakterijska stanica *Mycoplasma capricolum* u potpunosti kontrolirana sintetskim genomom *Mycoplasme mycoides*. Dizajn sintetskog genoma se temeljio na dva potpuno sekvencirana laboratorijska soja *Mycoplasma mycoides* uz određene razlike naspram divljeg tipa. Dizajniran je tako da sadrži i četiri karakteristična biljega koji se mogu otkriti restrikcijskim cijepanjem. Dizajnirano je 1078 DNA fragmenata duljine 1080 pb. (naručene i kemijski sastavljenje od sintetiziranih oligonukleotida u tvrtki Blue Heron (http://www.blueheronbio.com/gene-synthesis/)). DNA fragmenti su sintetizirani tako da imaju preklapajuće krajeve od 80 pb sa susjednim fragmentima te restrikcijsko mjesto Not I na krajevima. Osmišljena je hijerarhijska strategija za sastavljanje genoma u tri koraka pomoću transformacije i homologne rekombinacije u kvascu (Slika 10.) (D. G. Gibson et al., 2010).



Slika 10. Koncept sastavljanja sintetskog genoma *Mycoplasme mycoides* u kvascu. U prvom koraku, 10 fragmenata od 1080 pb (narančaste strelice) je sastavljeno u 109 fragmenata od 10 kb (plave strelice). U drugom koraku je 10 takvih fragmenata sastavljeno u 11 fragmenata od 100 kb (zelene strelice). U posljednjem koraku su oni spojeni u cjeloviti genom (crveno). Žuti krugovi predstavljaju određene modifikacije u odnosu na prirodni genom (WM1-4 predstavljaju karakteristične umetnute biljege s restrikcijskim mjestima AscI i BssH II). (Preuzeto iz D. G. Gibson et al., 2010)

Prvo je sastavljeno 109 intermedijera od 10 kb. DNA fragmenti i vektor su rekombinirani u kvascu i transferirani u *E. coli*. Plazmidna DNA je izolirana iz pojedinih kolonija te pocijepana i analizirana na gelu kako bi se pronašle stanice koje sadrže vektor sa sastavljenim intermedijerom od 10 kb (Slika 11A.). Nakon sekvenciranja i provjere točnosti, intermedijeri od 10 kb i njihovi vektori su transformirani u kvasac kako bi se stvorilo 11 većih intermedijera od 100 kb (Slika 11B.). Oni su u posljednjem koraku sastavljeni u konačni genom od 1,08 Mb. Kako se za svaki intermedijer može koristiti drugi set početnica, pomoću PCR-a s više početnica je provjereno nalaze se li se svi manji intermedijeri u sastavljenom konstruktu.



Slika 11. Analiza sastavljenih intermedijera na gelu (Preuzeto iz D. G. Gibson et al., 2010)

Za razliku od prirodnog, sintetski genom sadrži četiri karakteristična biljega. To su sljedovi DNA koji ne utječu na vijabilnost stanica, ali se mogu otkriti restrikcijskim enzimima. Konačna provjera sastavljenog genoma izvršena je pomoću restrikcijskog cijepanja s *Asc*I i *BssH*II budući da se te restrikcijska mjesta nalaze u 3 od 4 biljega (Slika 10.). Cijepanjem sintetskog genoma nastaje karakteristični uzorak fragmenata na gelu koji se razlikuje od divljeg tipa. Druga provjera se temeljila na PCR-u s više početnica gdje su korištene početnice specifične za biljege. U sintetskom genomu nastaje 4 amplikona dok u divljem tipu nijedan.

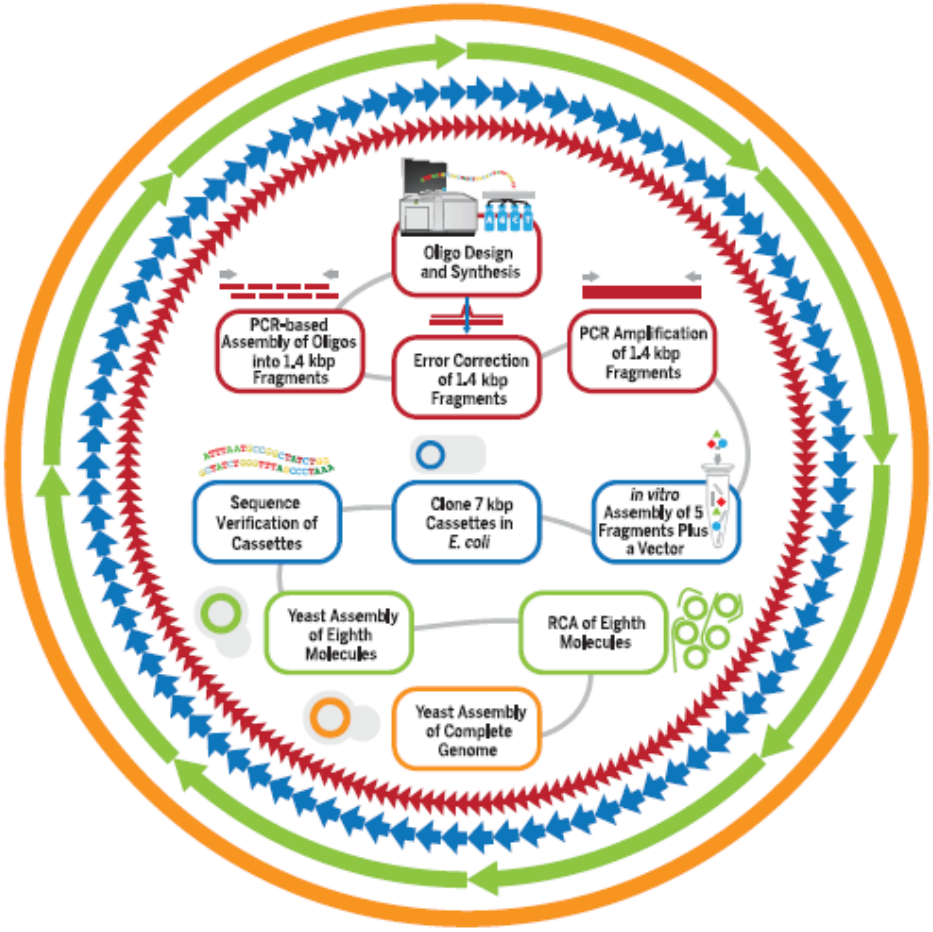
Na samom kraju, sintetski genom je transplantiran u stanice *Mycoplasme capricolum* s modificiranim restrikcijskim sustavom kako se ubačeni sintetski genom ne bi pocijepao. Takve stanice su sposobne replicirati se same i postići logaritamski rast. Također, sama morfologija stanica te uzorak proteina sintetiziranih u njima je vrlo sličan divljem tipu.

4.2. *Synthia 2.0 i 3.0.* – dizajn i sinteza minimalnog bakterijskog genoma

Nakon uspješne sinteze prvog bakterijskog sintetskog genoma, odnosno JCVI-syn1.0, stvoren je najmanji bakterijski genom koji je manji od bilo kojeg pronađenog u prirodi. Dizajnirani genom JCVI-syn3.0 je reducirani oblik syn1.0 te nakon tri ciklusa dizajniranja, sinteze i testiranja, stvoren je genom od 531 kb i 473 gena. (Hutchison et al., 2016).

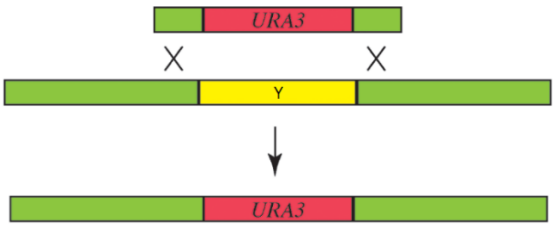
Ideja projekta je bila reducirati genom na samo esencijalne gene. Interesantni organizmi su mikoplazme budući da imaju najmanje genome od svih autonomno replicirajućih stanica. Usporedbom genoma *Haemophilus influenzae* (1815 gena) i *M. genitalium* (525 gena), pronađeno je 256 gena koje sadrže oba organizma. Pretpostavljeno je da je to najmanji set gena potreban za život. Ova hipoteza je testirana transpozonskom mutagenezom cijelog genoma gdje su pojedini geni inaktivirani ugradnjom transpozona te podijeljeni na esencijalne ili neesencijalne, ovisno o tome daju li vijabilne stanice. Pokazalo se da je moguće reducirati broj gena, ali da je minimalni set potreban za vijabilnost veći od pretpostavljenih 256 gena.

Razvijena je strategija u kojoj bi se minimalni genom sintetizirao u 8 segmenata (Slika 12.). U prvom koraku, razvili su metodu u kojem su u jednoj reakciji sastavljeni oligonukleotidi u DNA fragmente duljine 1,4 kb. Zatim je 5 takvih fragmenata spojeno u veće DNA fragmente od 7 kb i, na samom kraju, 15 takvih framenata je spojeno u fragmente koji čine 1/8 ukupnog genoma.



Slika 12. Koncept sastavljanja minimalnog sintetskog bakterijskog genoma. Sintetizirani oligonukleotidi su sastavljeni u fragmente od 1,4 kb (crvene strelice). Nakon ispravljanja pogrešaka i umnažanja u PCR-u, oni su sastavljeni u fragmente od 7 kb (plavo). Nakon ponovnog ispravljanja grešaka, oni su sastavljeni u kvascu u fragmente koji čine najprije 1/8 genoma (zeleno), a zatim u cjeloviti genom (narančasto). (Preuzeto iz Hutchison i sur., 2016)

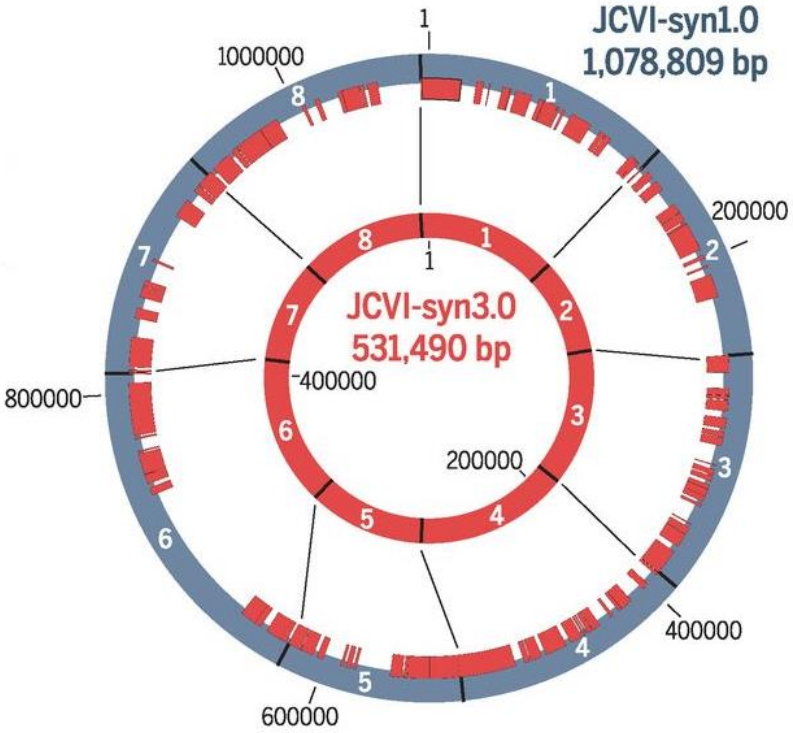
Za razlikovanje esencijalnih od neesencijalnih gena, korištena je mutageneza pomoću transpozona Tn5 te delecija gena pomoću markera *URA3*. Ukoliko se insercija transpozona dogodila u esencijalnom genu, nije mogla nastati vijabilna stanica. Marker *URA3* omogućava rast stanica na podlozi bez uracila ukoliko se on ugradio. Pomoću PCR-a se, sa svake strane markera, sintetiziraju krajevi od 50 pb koji su homologni dijelovima genoma gdje se on treba ugraditi. Ubacivanjem takve DNA u kvasac, ona se homolognom rekombinacijom ugrađuje te na taj način može zamijeniti gen između odabranih homolognih dijelova (Slika 13.) (Brumfield i sur. 2010).



Slika 13. Metoda ugradnje markera *URA3* u željeni dio genoma. „Y“ predstavlja gen koji treba zamijeniti. (Prilagođeno na temelju Brumfield i sur. 2010)

Nakon klasifikacije gena, dizajnirani su segmenti od samo esencijalnih i kvazi-esencijalnih gena. Kvazi-esencijalni geni su oni koji nisu nužni za vijabilnost stanice, ali bez njih stanični rast je značajno usporen. Sintetizirano je 8 fragmenata genoma (Slika 12). Svaki segment je ugrađen u ostalih 7/8 genoma syn1.0 kako bi se dodatno provjerio za vijabilnost. Nakon dodatnih korekcija kao npr. otkrivanja sintetskih letalnih parova gena, stvoren je JCVI-syn2.0, prvi minimalni sintetski bakterijski genom koji je manji od bilo kojeg genoma pronađenog u prirodi. Syn2.0 ima genom veličine 576 kb, sadrži 478 protein-kodirajućih gena i 38 RNA gena iz *M. mycoides* te se dijeli svake 92 min u laboratorijskoj kulturi.

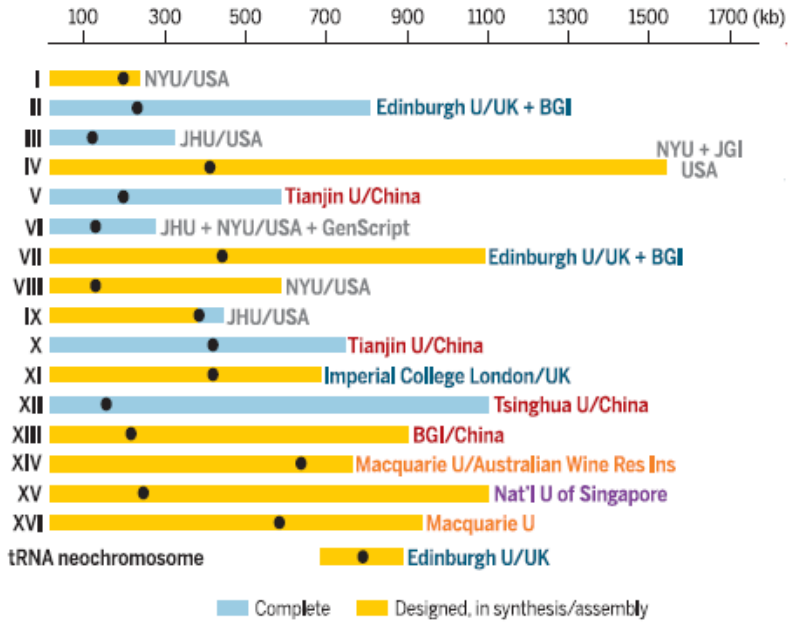
Ponovljenom analizom pomoću transpozonske mutageneze na syn2.0, pronađeno je dodatnih 42 gena koji bi se mogli deletirati. Sintetizrano je 8 novih segmenata, temeljenih na reduciranom dizajnu, u obliku kvaščevih plazmida. Njihovim sastavljanjem u kvascu te transplantiranjem u stanice *M. capricolum*, dobiveno je nekoliko vijabilnih varijanti još reduciranijeg genoma. Jedan od tih genoma veličine 531 kb nazvan je JCVI-syn3.0. Sadrži 438 protein-kodirajućih gena te 35 RNA gena. Iako sadrži 149 gena nepoznate funkcije, syn3.0 predstavlja minimalni bakterijski genom. Ima sličnu morfologiju kao i početni genom syn1.0, a stanice se dijele svaka 3 sata. Iako je moguće dodatno reducirati genom, to bi ishodilo značajno usporenim rastom stanica.



Slika 14. Usporedba sintetskog genoma syn1.0 s reduciranim genomom syn3.0. Vanjski plavi krug predstavlja genom syn1.0, a unutarnji crveni genom syn3.0. Brojevi 1-8 označuju pojedine fragmente genoma s naznačenim parovima baza. (Preuzeto iz Hutchison i sur., 2016)

4.3. Kvaščev sintetski genom

Nakon uspješne sinteze prokariotskih genoma, nekoliko znanstvenih grupa se udružilo s idejom da sintetiziraju prvi eukariotski genom. Cilj projekta „Synthetic Yeast 2.0“ (Sc2.0) je sintetizirati i sastaviti 12 Mb kvaščevog genoma. On je organiziran u 16 kromosoma pa je tako i sinteza pojedinih kromosoma, uz dodatni sintetski „tRNA neokromosom“, podijeljena između institucijama (Slika 15.). Ovaj projekt će pružiti nova saznanja vezana uz strukturu i funkciju eukariotskih kromosoma, kao i razvoj strategija i metoda za dizajn i sintezu genoma (Juhas & Ajioka, 2016).



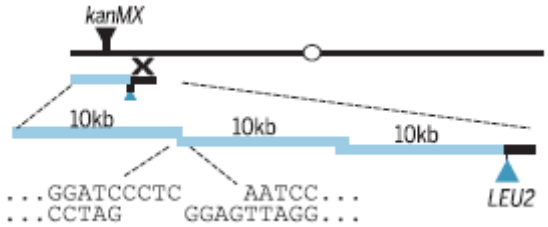
Slika 15. Podjela sinteze kromosoma po znanstvenim institucijama (Preuzeto iz Richardson i sur., 2017)

Trenutno je sastavljeno 6 od 16 kromosoma: *synII*, *synIII*, *synV*, *synVI*, *synX*, *synXII* te dio *synIX*. Za dizjan je korištena poznata sekvenca genoma *Saccharomyces cerevisiae* sa ciljem da se zadrži fenotip divljeg tipa uz određene promjene u genotipu. U svrhu povećavanja stabilnosti genoma, u modificiranom dizajnu su uklonjeni ponavljajući elementi i mnogi introni, svi stop kodoni UAG su promijenjeni u UAA te su sve tRNA premještene na „tRNA neokromosom“. Dodatne modifikacije uključuju označavanje otvorenih okvira čitanja s PCR biljezima (PCRTags) kako bi se razlikovali geni divljeg tipa od sintetskih te dodatna mjesta *loxPsym* kako bi se omogućila genetička raznolikost i uklanjanje neesencijalnih dijelova. (Richardson i sur., 2017).

4.3.1. Metoda sastavljanja kvaščevih kromosoma

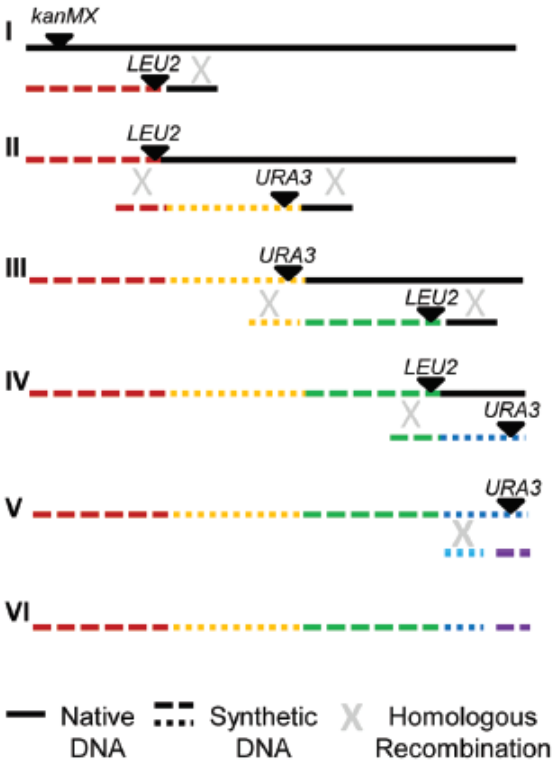
Sastavljanje kromosoma se temelji na postupku *SwAP-In* (***Sw**itching **A**uxotrophies **P**rogressively for **In**tegration*) kojim se dijelovi kromosoma divljeg tipa postpuno zamjenjuju dijelovima sintetskih kromosoma. Sintetski kromosom se slaže u dijelovima, počevši od oligonukleotida. Oni se povezuju u kratke fragmente (*minichunks*/*building blocks*) od 2-4 kb, zatim u veće (*chunks*) koji su manji od 10 kb te na kraju u još veće (*megachunks*) veličine 30-60 kb. Fragmenti se spajaju *in vitro* pomoću restrikcijskih enzima koji stvaraju stršeće krajeve na jedinstvenim restrikcijskim mjestima (Slika 16.). Posljedni fragment (*chunk*) u svakom većem fragmentu (*megachunk*) sadrži selektivni marker na samom kraju. Za sintezu cijelog

kromosoma dovoljna su dva različita selektivna markera s tim da svaki susjedni fragment mora sadržavati drugi marker kako bi se ustanovila ugradnja fragmenta (Richardson i sur., 2017).



Slika 16. Spajanje fragmenata pomoću restrikcijskih enzima i ligaze (Preuzeto iz Richardson i sur., 2017)

Najveći sintetski fragmenti se redom unose u stanicu kvasca gdje postepeno zamjenjuju dijelove prirodnog kromosoma kvaščevom homolognom rekombinacijom. Svaki idući fragment je susjednim krajem homologan prethodnom, a drugim krajem je homologan dijelu prirodnog kromosoma te na tom kraju sadrži i selektivni marker. Ugradnjom novog fragmenta, uklanja se selektivni marker iz prethodnog fragmenta te se na taj način provjerava ugradnja svakog fragmenta (Slika 17.).



Slika 17. Postepena zamjena dijelova prirodnog kromosoma sintetskim postupkom *SwAP-In* (Preuzeto iz Dymond, Boeke 2012)

Na krajevima fragmenata koji predstavljaju krajeve kromosoma nalaze se telomerne sekvence.

4.3.2. Modifikacije u sintetskim kromosomima

Kako bi se potvrdila ugradnja sintetskih dijelova kromosoma, u pojedinim otvorenim okvirima čitanja se nalaze biljezi zvani „PCRTags“. To su određene promjene nukleotida u sljedovima od otprilike 20 pb koje ne mijenjaju slijed aminokiselina, ali omogućuju različito specifično vezanje početnica za DNA divljeg tipa i sintetske DNA. Na taj način se, pomoću PCR-a, brzo potvrđuje ugradnja željenog fragmenta (Richardson i sur., 2017).

Prvi uspješno kreirani sintetski genomi sadržavali su malo promjena u nukleotidnom slijedu u odnosu na divlji tip. U sintezi kvaščevog genoma, korišten je sustav preuređivanja genoma „SCRaMbLE“ (**S**ynthetic **C**hromosome **R**ecombination **a**nd **M**odification **b**y **L**oxP-mediated **E**volution). Ova metoda se temelji na rekombinazi Cre koja izrezuje dijelove DNA između mjesta *loxPsym*. Ova mjesta su ubačena nizvodno od stop kodona svakog neesencijalnog gena. To omogućuje nasumične delecije i inverzije pojedinih dijelova, odnosno nasumično preuređivanje genoma, gdje će preživljavati samo one stanice koje nisu slučajno deletirale esencijalne dijelove. Osim genomske fleksibilnosti i fenotipske raznolikosti koje pruža ova metoda, također se može koristiti i u svrhu minimaliziranja genoma. (Dymond, Boeke 2012).

5. Kvaščev sintetski genom: *The Genome Project – Write*

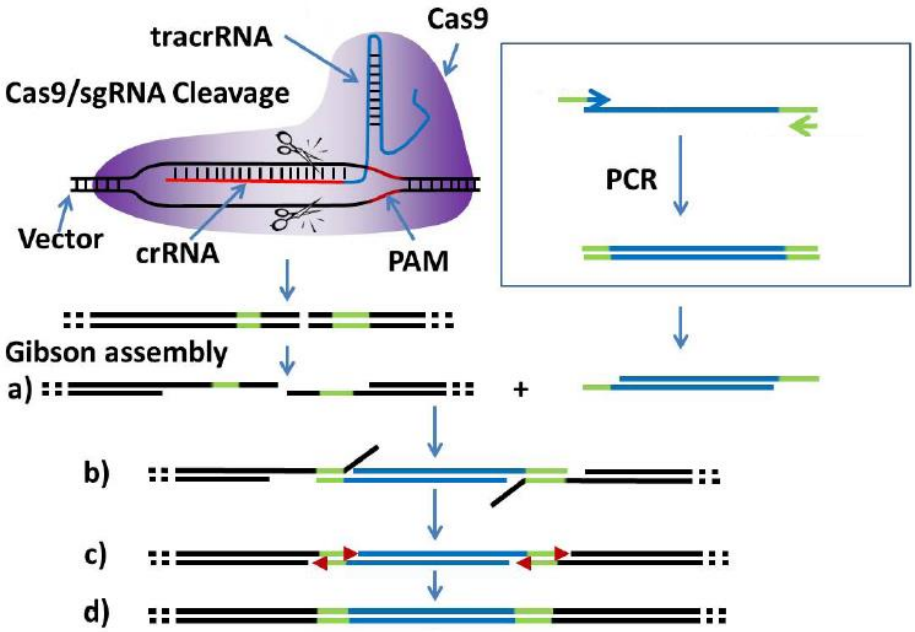
Sinteza kvaščevog genoma je dio većeg projekta „The Genome Project – Write“ (GP-write). Baš kao što je i sekvenciranje genoma bilo prekretnica u znanosti, idući takav korak u genetičkom inženjerstvu mogao bi biti sinteza eukariotskih genoma. Ovaj projekt je započet upravo sa ciljem da se razviju pristupačne tehnologije za sastavljanje i testiranje velikih genoma. Srž čini projekt „Human Genome Project – Write“ (HGP-write) s namjerom da se sintetizira ljudski genom. Sekvenciranje cijelog ljudskog genoma dovršeno je 2003. što je dovelo do revolucionarnih spoznaja u znanosti. Napredak sintetske genomike pružit će sve više informacija o funkcioniranju i razvoju živih bića.

Iako ovaj projekt sa sobom donosi i velike etičke rasprave, on otvara velike mogućnosti za razvoj znanosti i medicine. Od boljeg poznavanja same strukture i funkcije kromosoma do razvoja genetičkih analiza, novih tehnologija, metoda dizajna, sinteze i sastavljanja. Znanost se bliži medicinskim mogućnostima poput stvaranja staničnih linija otpornih na viruse ili tumore (König i sur., 2013), razvoj sintetskih organa ili pak efikasnije proizvodnje cjepiva i drugih lijekova (Wimmer i sur., 2009). Postavljene su određene granice pa se tako korištene ljudske stanice neće moći reproducirati, a istraživanja su ograničena na staničnoj razini i organoidima proizvedenim od njih.

Osim ljudskog genoma, u središtu interesa su i biljke korisne čovječanstvu. One su značajan izvor hrane i sekundarnih metabolita bitnih za medicinu i industriju. Danas su moguće razne modifikacije biljnih genoma, a najčešće se uklanja neželjena DNA, ubacuju se transgeni te se regulira ekspresija gena. Ovaj projekt bi omogućio sintetiziranje biljnih genoma u svrhu redizajniranja metaboličkih puteva za veće prinose hranjivih tvari ili bioterapeutika, kao i razvijanje biljaka otpornijih na suše i patogene (Baltes & Voytas, 2015).

Rasprave koje donosi ovaj projekt su uglavnom vezane uz biosigurnost, okolišne opasnosti te etičke i filozofske dileme oko prirode života i njegove manipulacije. Uvođenje sintetskih genoma u prirodu mora biti strogo kontrolirano kako se neželjeni geni ne bi mogli proširiti među prirodnim organizmima. Tako bi se moglo utjecati na otpornost raznih virusa i bakterija te oprašivanje biljaka. Naravno, najbitnije pitanje je do koje mjere bi ljudi trebali biti u mogućnosti „stvarati život“, odnosno, koje su prihvatljive granice modificiranja živih bića za dobrobit ljudi. Iako je znanost još daleko od toga, najveći strahovi su vezani uz „dizajnirane“ bebe te hoće li se takvo modificiranje koristiti nužno u svrhu medicinske genetike.

Trenutne računalne i tehnološke mogućnosti nisu još na razini za uspješno sintetiziranje velikih eukariotskih genoma, ali ovaj projekt potiče njihov razvoj. Sinteza genoma se može koristiti uz druge moderne metode u genetičkom inženjerstvu, poput CRISPR/Cas9 sustava. Aktualne metode sintetiziranja genoma omogućuju sastavljanje fragmenata DNA neovisno o njihovom slijedu, ali su ograničene njihovim veličinama. CRISPR/Cas9 sustav korišten u genetičkom inženjerstvu se temelji na endonukleazi Cas9 koja, vođena sa sgRNA, specifično cijepa DNA na željenom mjestu. Suradnja ovih metoda omogućava znatno brže spajanje fragmenata neovisno o njihovoj veličini i s manjom stopom mutacija (Slika 18.). Ovisno o namjeni sinteze DNA, ovim načinom je moguće ugrađivati fragmente DNA u veće vektore no samom metodom Gibson (Wang i sur., 2015).



Slika 18. Princip kombiniranja CRISPR/Cas9 sustava i metode sastavljanja Gibson. Fragment DNA koji se ugrađuje (plavo) se umnoži u PCR-u pomoću početnica sa sljedovima baza (zeleno) komplementarnim DNA u koju se fragment ugrađuje (crno). Endonukleaza Cas9 cijepa DNA na specifičnom mjestu koje se nalazi između homolognih dijelova te se fragment ugrađuje metodom sastavljanja Gibson. (Prilagođeno na temelju Wang i sur., 2015)

Ovakvim kombiniranjem metoda te kroz transparentan i postepeni napredak, ovaj projekt ima potencijala pomaknuti granice ljudskih mogućnosti na gotovo nezamislive razine.

6. Zaključak

Današnja tehnologija nam omogućuje brzo, jeftino i efikasno sekvenciranje genoma. Iako je područje sintetskih genoma na početku svog uspona, samo je pitanje vremena kada će i *de novo* sintetiziranje genoma doseći istu razinu. To će uvesti mnoge etičke dileme, ali, puno važnije, također i značajna otkrića i prilike za medicinu i znanost.

Sastavljanje DNA, naročito u čitave genome, je ključno za sintetsku biologiju. Fascinantno je pomisliti koliko je malo vremena bilo potrebno da se od otkrića strukture DNA razviju metode za sekvenciranje i sintetiziranje iste. Napredak biotehnologije doveo je od rigidne sinteze malog virusnog genoma od svega 5 kb do razvoja metoda za fleksibilnu sintezu eukariotskog genoma od 12 Mb, a projekt *GP-write* tek otvara nova vrata u sintetskoj biologiji.

„Unatoč njenoj gotovo beskonačnoj raznolikosti, biologija je veoma standardizirana.“ (Merryman & Gibson, 2012). Pomisao da je čitavi živi svijet, od bakterija do ljudi, građen na istom principu budi neizmjernu znatiželju za istraživanjem. Proučavanje te standardiziranosti će pružiti mnoge odgovore na pitanje što to čini život. Svako otkriće u području sintetskih genoma pruža djelić odgovora, ali, kao i uvijek u znanosti, postavlja i još mnogo više pitanja.

7. Literatura

Baltes, N. J., & Voytas, D. F. (2015). Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends in Biotechnology*, *33*(2), 120–131. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.11.008

Boeke, J. D., Boeke, J. D., Church, G., Hessel, A., Kelley, N. J., Arkin, A., … Yang, L. (2016). The Genome Project – Write. *Science*, *6850*(June), 1–4. https://doi.org/10.1126/science.aaf6850

Brumfield, K. M., Moroney, J. V., Moore, T. S., Simms, T. A., & Donze, D. (2010). Functional characterization of the Chlamydomonas reinhardtii ERG3 ortholog, a gene involved in the biosynthesis of ergosterol. *PLoS ONE*, *5*(1), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008659

Cello, J. (2002). Chemical Synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template. *Science*, *297*(5583), 1016–1018. https://doi.org/10.1126/science.1072266

Dymond, J., Boeke, J., & Rearrangement, C. (2012). The Saccharomyces cerevisiae SCRaMbLE system and genome minimization © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience ., *3*(3), 168–171. https://doi.org/10.4161/bbug.19543

Gibson, D. G. (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, *37*(20), 6984–6990. https://doi.org/10.1093/nar/gkp687

Gibson, D. G., Benders, G. A., Axelrod, K. C., Zaveri, J., Algire, M. A., Moodie, M., … Hutchison, C. A. (2008). 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*(51), 20404–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0811011106

Gibson, D. G., Benders, G. a, Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. a, Baden-Tillson, H., Zaveri, J., … Smith, H. O. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5867), 1215–1220. https://doi.org/10.1126/science.1151721

Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., … Venter, J. C. (2010). Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science*, *329*(5987), 52–56. https://doi.org/10.1126/science.1190719

Gibson, D. G., Smith, H. O., Iii, C. A. H., Venter, J. C., & Merryman, C. (2010). Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature Methods*, *7*(11), 901–903. https://doi.org/10.1038/nmeth.1515

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. a, Smith, H. O., … America, N. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, *6*(5), 343–5. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

Hutchison, C. A., Chuang, R.-Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., … Venter, J. C. (2016). Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, *351*(6280), aad6253-aad6253. https://doi.org/10.1126/science.aad6253

Itaya, M., Tsuge, K., Koizumi, M., & Fujita, K. (2005). Combining two genomes in one cell: stable cloning of the Synechocystis PCC6803 genome in the Bacillus subtilis 168 genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(44), 15971–6. https://doi.org/10.1073/pnas.0503868102

Juhas, M., & Ajioka, J. W. (2016). High molecular weight DNA assembly in vivo for

synthetic biology applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *8551*(April), 1–10. https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1141394

König, H., Frank, D., Heil, R., & Coenen, C. (2013). Synthetic genomics and synthetic biology applications between hopes and concerns. *Current Genomics*, *14*(1), 11–24. https://doi.org/10.2174/1389202911314010003

Posfai, G. (2006). Emergent Properties of Reduced-Genome Escherichia coli. *Science*, *312*(5776), 1044–1046. https://doi.org/10.1126/science.1126439

Richardson, S. M., Mitchell, L. A., Stracquadanio, G., Yang, K., Dymond, J. S., DiCarlo, J. E., … Bader, J. S. (2017). Design of a synthetic yeast genome. *Science*, *355*(6329), 1040–1044. https://doi.org/10.1126/science.aaf4557

Sleight, S. C., Bartley, B. A., Lieviant, J. A., & Sauro, H. M. (2010). In-fusion biobrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Research*, *38*(8), 2624–2636. https://doi.org/10.1093/nar/gkq179

Smith, H. O., Hutchison 3rd, C. A., Pfannkoch, C., & Venter, J. C. (2003). Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(26), 15440–15445. https://doi.org/10.1073/pnas.2237126100

Tsuge, K., Matsui, K., & Itaya, M. (2003). One step assembly of multiple DNA fragments with a designed order and orientation in Bacillus subtilis plasmid. *Nucleic Acids Research*, *31*(21), e133. https://doi.org/10.1093/nar/gng133

Wang, J. W., Wang, A., Li, K., Wang, B., Jin, S., Reiser, M., & Lockey, R. F. (2015). CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning. *BioTechniques*, *58*(4), 161–170. https://doi.org/10.2144/000114261

Wimmer, E., Mueller, S., Tumpey, T. M., & Taubenberger K, J. (2009). Viral Disease. *Nat Biotechnol.*, *27*(12), 1–23. https://doi.org/10.1038/nbt.1593.Synthetic

Zhu, B., Cai, G., Hall, E. O., & Freeman, G. J. (2007). In-Fusion™ assembly: Seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques*, *43*(3), 354–359. https://doi.org/10.2144/000112536

Korištene web stranice:

http://www.2015.igem.org/Team:Birkbeck/BioBricks
http://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis
http://www.blueheronbio.com/gene-synthesis/
https://www.clontech.com/
http://www.engineeringbiologycenter.org/
http://www.labx.com/dna-synthesizers
https://www.neb.com/
http://syntheticyeast.org/

8. Sažetak

Napredak biotehnologije doveo je do jednostavne sinteze kratkih oligonukleotida željenog slijeda u DNA sintetizatorima. Već godinama se razvijaju metode kojima bi se takvi fragmenti spajali u veće, sve do cjelovitih sintetskih genoma. Standardne metode sastavljanja pomoću restrikcijskih enzima i ligaze imaju već odužu povijest pa tako i ograničenja. Iako je temeljena na tom principu, metoda *BioBricks* je danas široko primijenjena zahvaljujući modifikacijama. Danas se rutinski koriste modernije metode koje ne zahtijevaju restrikcijske enzime, već se temelje na preklapajućim homolognim sljedovima. Specifične egzonukelaze, polimeraze i ligaze su sposobne prerađivati takve sljedove te od njih sastavljati veće fragmente DNA. Primjeri takvih metoda su metode sastavljanja DNA *In-Fusion* te *Gibson Assembly*.

Navedene metode se koriste u proučavanju strukture i funkcije genoma, kao i mogućnosti unaprjeđenja samih metoda. Najistaknutiji uspješni projekt sinteze genoma je sintetski genom *Synthia*, gdje je uspješno stvorena bakterijska stanica potpuno kontrolirana kemijski sintetiziranim genomom. Daljnja istraživanja su pružila mnoge spoznaje o esencijalnim genima te mogućnosti modifikacije sintetskih genoma.

Aktualni projekt *The Genome Project – Write* istražuje mogućnosti sinteze većih eukariotskih genoma. Do sada su najznačajniji uspjesi postignuti s kvaščevim sintetskim genomom, a daljnji planovi stavljaju naglasak na sintezu ljudskog genoma.

9. Summary

The progress of biotechnology has led to a simple synthesis of short oligonucleotides of the desired sequence in DNA synthesizers. Many methods have been developed to assemble them into larger fragments, even to complete synthetic genomes. Although standard assembly methods based on restriction enzymes and ligases have been used for a long time, they are limited for today's purposes. Such method, BioBrick assembly is widely applied thanks to modifications. Currently developed are modern methods which do not require restriction enzymes, but are based on overlapping homologous ends. Specific exonucleases, polymerases and ligases are capable of processing such sequences and assembling them into larger DNA fragments. Examples of such methods are In-Fusion and Gibson Assembly.

Mentioned methods are used in studying the structure and function of the genome, as well as the possibilities of improving the methods themselves. So far, the most prominent genome synthesis project is synthetic genome Synthia, where researchers created a bacterial cell completely controlled by chemically synthesized genome. Further research has provided many insights into the nature of genomes and the potential for their modification.

Current project The Genome Project - Write explores possibilities for synthesis of larger eukaryotic genomes. Up to now, the most significant successes have been achieved with the yeast synthetic genome, and further plans emphasize the synthesis of the human genome.